

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

НАЗИВ ФАКУЛТЕТА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИМЛ	24.04.2025
Орг. јед.	Вредност
05	2263

ОЦЕНА МЕНТОРА О ИЗВЕШТАЈУ О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ ОДНОСНО ДОКТОРСКОГ УМЕТНИЧКОГ ПРОЈЕКТА

НАЗИВ ДИСЕРТАЦИЈЕ	Ефекти хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана у експерименталном моделу срчане инсуфицијенције
Кандидат	Маја Мурић
Ментор:	Проф. др Иван Срејовић
Датум пријема потпуног извештаја о провери оригиналности докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта	23.04.2025.

Докторска дисертација кандидата Маје Мурић је оригинални рад докторанта и бави се испитивањем ефеката комбиноване примене сакубитрил/валсартана и емпаглифлозина, као и поређењем са ефектима монотерапије, на експерименталном моделу срчане инсуфицијенције индуковане применом изопротеренола на пацовима. У самом раду поштована су сва академска правила цитирања и навођења извора на које се кандидат позивао током писања докторске дисертације и образлагања добијених резултата. У извештају о плагијаризму укупан степен сличности износи 9%, при чему највећи степен преклапања са појединачним извором износи 3%. Делови текста који су препознати као слични са другим изворима односе се на делове материјала и метода, и наводе референци. Делови текста који се подударају са другим изворима су углавном фразе, као и референце на које се кандидат позвао, а које се уобичајено цитирају у радовима и докторатима.

Докторска дисертација кандидата Маје Мурић под називом „Ефекти хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана у експерименталном моделу срчане инсуфицијенције“ је оригинални рад докторанта те се прописани поступак припреме за одбрану може наставити (позитивна оцена).

Датум

24.04.2025.

ПОТПИС МЕНТОРА

Проф. др Иван Срејовић

Ефекти хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/ валсартана у експерименталном моделу срчане инсуфицијенције

By Maja Мурић



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Маја Д. Мурић

**Ефекти хроничне коадминистрације
емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана у
експерименталном моделу срчане
инсуфицијенције**

докторска дисертација

Крагујевац, 2025. године



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Maja D. Murić

**Efekti hronične koadministracije empagliflozina i
sakubitril/valsartana u eksperimentalnom
modelu srčane insuficijencije**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2025. godine



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Maja D. Murić

**Effects of Chronic Empagliflozin and
Sacubitril/Valsartan Coadministration in an
Experimental Heart Failure Model**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2025.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор
Име и презиме: Маја Д. Мурић
Датум и место рођења: 26.08.1990. године, Крагујевац, Србија
Садашње запослење: асистент за ужу научну област Физиологија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Ефекти хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана у експерименталном моделу срчане инсуфицијенције
Број страница: 175
Број слика: 40 слика, 26 графика и 4 табеле
Број библиографских података: 517
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Центар изузетних вредности за изучавање редокс равнотеже у кардиоваскуларним и метаболичким поремећајима
Научна област (УДК): Медицинске науке
Ментор: проф. др Иван Срејовић, ванредни професор за ужу научну област Физиологија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: IV-03-558/25, 10.07.2024. године

IDENTIFIKACIONA STRANICA DOKTORSKE DISERTACIJE

Autor
Ime i prezime: Maja D. Murić
Datum i mesto rođenja: 26.08.1990. Kragujevac, Srbija
Sadašnje zaposlenje: asistent za užu naučnu Fiziologija na Fakultetu medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
Doktorska disertacija
Naslov: Efekti hronične koadministracije empagliflozina i sakubitril/valsartana u eksperimentalnom modelu srčane insuficijencije
Broj stranica: 175
Broj slika: 40 slika, 26 grafika i 4 tabele
Broj bibliografskih podataka: 517
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, Centar izuzetnih vrednosti za izučavanje redoks ravnoteže u kardiovaskularnim i metaboličkim poremećajima
Naučna oblast (UDK): Medicinske nauke
Mentor: prof. dr Ivan Srejović, vanredni profesor za užu naučnu oblast Fiziologija Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
Broj i datum odluke Veća univerziteta o prihvatanju teme doktorske disertacije: IV-03-558/25, 10.07.2024. godine

IDENTIFICATION PAGE OF DOCTORAL DISSERTATION

Author
Name and surname: Maja D. Murić
Date and place of birth: 26.08.1990. Kragujevac, Serbia
Current employment: assistant for the narrower scientific field of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Effects of Chronic Empagliflozin and Sacubitril/Valsartan Coadministration in an Experimental Heart Failure Model
No. of pages: 175
No. of images: 40 images, 26 graphs and 4 tables
No. of bibliographic data: 517
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Center of Excellence for the Study of Redox Balance in Cardiovascular and Metabolic Disorders
Scientific area (UDK): Medical sciences
Mentor: Prof. Dr. Ivan Srejskić, Associate Professor for the narrower scientific field of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic: IV-03-558/25, July 10 th , 2024

САЖЕТАК

Срчана инсуфицијенција (енгл. *Heart Failure* - HF) представља значајан здравствени изазов савременог друштва. Циљ ове студије био је да се процене ефекти емпаглифозина и сакубитрил/валсартана, као и њихове комбинације на HF изазвану изопротеренолом (енгл. *Isoproterenol* - ISO).

HF је индукована применом ISO (5 mg/kg дневно, 7 дана), што је потврђено смањеном ејекционом фракцијом испод 55% након 4 недеље. HF пацови су затим третирани емпаглифозином, сакубитрил/валсартаном или њиховом комбинацијом током 4 недеље. Испитивани су хемодинамски параметри, као и функција миокарда *in vivo* и *ex vivo*. Анализирани су кардиоспецифични маркери, параметри редокс статуса, инфламације и апоптозе, хистоморфолошке промене миокарда, као и релативна генска експресија различитих маркера. Биохемијски су одређивани параметри оксидационог стреса у крви, коронарном венском ефлуенту и хомогенату миокардног ткива.

У HF групи уочене су значајне промене у хемодинамици и срчаној функцији, као и повећани нивои оксидационог оштећења, инфламације и апоптозе уз структурне промене миокарда. Сви испитивани терапијски протоколи су показали значајне кардиопротективне ефекте, али се комбинована терапија издвојила као најефикаснија, показујући највећи потенцијал у смањењу оксидационог стреса, инфламације и побољшању срчане функције.

Комбинована терапија емпаглифозином и сакубитрил/валсартаном показала је супериорну кардиопротекцију код HF, првенствено појачавањем антиоксидационих ефеката. Ови налази су посебно значајни јер указују на то да синергистички ефекти ова два лека не само да побољшавају хемодинамске параметре, већ и штите срце од оштећења изазваног оксидационим стресом и инфламацијом. Наши резултати сугеришу велики потенцијал примене комбиноване терапије у раном лечењу HF.

Кључне речи: срчана инсуфицијенција; емпаглифлозин; сакубитрил/валсартан; срчана функција; оксидациони стрес

SAŽETAK

Srčana insuficijencija (engl. *Heart Failure* - HF) predstavlja ozbiljan zdravstveni izazov savremenog društva. Cilj ove studije bio je da se procene efekti empagliflozina i sakubitril/valsartana, kao i njihove kombinacije na HF izazvanu izoproterenolom (ISO).

HF je indukovana primenom ISO (5 mg/kg dnevno, 7 dana), što je potvrđeno smanjenom ejakcionom frakcijom ispod 55% nakon 4 nedelje. HF pacovi su zatim tretirani empagliflozinom, sakubitril/valsartanom ili njihovom kombinacijom tokom 4 nedelje. Ispitivani su hemodinamski parametri, kao i funkcija miokarda *in vivo* i *ex vivo*. Analizirani su kardiospecifični markeri, parametri redoks statusa, inflamacije i apoptoze, histomorfološke promene miokarda, kao i relativna genska ekspresija različitih markera.

U HF grupi uočene su značajne promene u hemodinamici i srčanoj funkciji, kao i povećani nivoi oksidacionog oštećenja, inflamacije i apoptoze uz strukturne promene miokarda. Svi ispitivani terapijski protokoli su pokazali značajne kardioprotektivne efekte, ali se kombinovana terapija izdvojila kao najefikasnija, pokazujući najveći potencijal u smanjenju oksidacionog stresa, inflamacije i poboljšanju srčane funkcije.

Kombinovana terapija empagliflozinom i sakubitril/valsartanom pružila je značajnu kardioprotekciju kod HF, prvenstveno povećanjem antioksidativnih efekata. Ovi nalazi su posebno značajni jer ukazuju na to da sinergistički efekti ova dva leka ne samo da poboljšavaju hemodinamske parametre, već i štite srce od oštećenja izazvanog oksidacionim stresom i inflamacijom. Naši rezultati sugerišu veliki potencijal kombinovane terapije u ranom lečenju HF.

Ključne reči: srčana insuficijencija; empagliflozin; sakubitril/valsartan; srčana funkcija; oksidacioni stres.

ABSTRACT

Heart failure (HF) represents a significant health challenge for modern society. The aim of this study was to assess the effects of empagliflozin and sacubitril/valsartan, as well as their combination, on ISO-induced HF.

HF was induced by the administration of ISO (5 mg/kg daily, 7 days), which was confirmed by a reduced ejection fraction below 55% after 4 weeks. HF rats were then treated with empagliflozin, sacubitril/valsartan, or their combination for 4 weeks. Hemodynamic parameters, as well as myocardial function *in vivo* and *ex vivo* were examined. Cardiovascular-specific markers, oxidative stress parameters, inflammation, apoptosis, histomorphological myocardial changes were analyzed, as well as relative gene expression of different markers.

In the HF rat group, significant changes in hemodynamics and cardiac function were observed, along with increased levels of oxidative damage, inflammation, and apoptosis, leading to structural myocardial changes. All tested therapeutic protocols showed significant cardioprotective effects, but the combined therapy emerged as the most effective, showing the greatest potential in reducing oxidative stress, inflammation, and improving cardiac function.

The combined therapy of empagliflozin and sacubitril/valsartan provided significant cardioprotection in HF, primarily through enhanced antioxidant effects. These findings are particularly significant as they indicate that the synergistic effects of these two drugs, not only improve hemodynamic parameters but also protect the heart from damage caused by oxidative stress and inflammation. Our results suggest a great potential of combined therapy in early HF treatment.

Keywords: heart failure; empagliflozin; sacubitril/valsartan; cardiac function; oxidative stress

Садржај

I УВОД.....	1
1.1. Социоепидемиолошке карактеристике срчане инсуфицијенције	1
1.2. Срчана инсуфицијенција као историјска парадигма.....	2
1.3. Дефиниција и класификација срчане инсуфицијенције.....	3
1.4. Концептуални модели у срчаној инсуфицијенцији	9
1.4.1. Кардиоренални модел	9
1.4.2. Хемодинамски (кардиоциркулаторни) модел	9
1.4.3. Неурохуморални модел	10
1.4.4. Биомеханички модел	10
1.5. Етиолошки фактори у срчаној инсуфицијенцији	11
1.6. Патофизиолошки механизми у настанку срчане инсуфицијенције	13
1.6.1. Процеси фиброзе и ремоделовања леве коморе у срчаној инсуфицијенцији	15
1.6.2. Интеракција оксидационог стреса, инфламације и апоптозе у развоју срчане инсуфицијенције	18
1.6.3 Улога JAK2/STAT3 сигналне каскаде у кардиоваскуларним болестима и срчаној инсуфицијенцији	22
1.7. Дијагностички потенцијал биомаркера из крви у срчаној инсуфицијенцији	23
1.7.1. Маркери оштећења кардиомиоцита	24
1.7.1.1. Систем натриуретских пептида	25
1.7.1.1.1. BNP и његов активни терминални фрагмент - NT-proBNP	26
1.7.1.1.2. Средњи регион прохормона атријалног натриуретског пептида	27
1.7.1.2. Срчани тропонини	27
1.7.1.3. Срчани везујући протеин за масне киселине	28
1.7.2. Маркери миокардијалне фиброзе и инфламације	28
1.7.2.1. Галектин-3	29
1.7.2.2. Солубилна изоформа супресије туморогенезе	29
1.7.2.3. Фактор диференцијације раста 15	30
1.8. Савремене фармаколошке стратегије за лечење срчане инсуфицијенције	30
1.8.1. Развојни пут сакубитрил/валсартана	30
1.8.1.1. Фармакокинетика сакубитрил-валсартана	32
1.8.1.2. Примена сакубитрил/валсартана у срчаној инсуфицијенцији и другим КВБ	32
1.8.1.2.1. Примена сакубитрил/валсартана у лечењу срчане инсуфицијенције	33
1.8.1.2.2. Примена сакубитрил/валсартана у лечењу инфаркта миокарда	34
1.8.1.2.3. Примена сакубитрил/валсартана у лечењу срчане дисфункције повезане са терапијом карцинома	35
1.8.1.2.4. Сакубитрил/валсартан као антиаритмик	36
1.8.1.3. Нежељена дејства, токсичност и контраиндикације за примену сакубитрил/валсартана	37
1.8.1.4. Кардиопротективни ефекти сакубитрил/валсартана у експерименталним студијама	38
1.8.1.4.1. Ефекти сакубитрил/валсартана на фиброзу, хипертрофију и ремоделовање миокарда у анималним моделима кардиоваскуларних болести	38

1.8.1.4.2. Ефекти сакубитрил/валсартана на оксидациони стрес, инфламацију и апоптозу у анималним моделима кардиоваскуларних болести	40
1.8.2. Развојни пут SGLT2i	41
1.8.2.1. Примена SGLT2 инхибитора код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 и придруженом срчаном инсуфицијенцијом	43
1.8.2.2. Примена SGLT2i у лечењу срчане инсуфицијенције	45
1.8.2.3. Примена SGLT2i у лечењу инфаркта миокарда	47
1.8.2.4. Хемодинамски и метаболички ефекти SGLT2i у клиничким студијама	47
1.8.2.4.1. Хемодинамски ефекти SGLT2i	48
1.8.2.4.2. Метаболички ефекти SGLT2i	50
1.8.2.5. Нежељена дејства, токсичност и контраиндикације за примену SGLT2i	51
1.8.2.6. Кардиопротективни ефекти SGLT2i у експерименталним студијама	52
1.8.2.6.1. Ефекти SGLT2i на фиброзу, хипертрофију и ремоделовање миокарда у анималним моделима кардиоваскуларних болести	53
1.8.2.6.2. Ефекти SGLT2i на оксидациони стрес, инфламацију и апоптозу у анималним моделима кардиоваскуларних болести	54
1.9. Анимални модели срчане инсуфицијенције	56
1.9.1 Велики анимални модели срчане инсуфицијенције	57
1.9.1.1. Модели миокардијалне исхемије/инфаркта миокарда	57
1.9.1.2. Модели оптерећења леве коморе притиском/волуменом	58
1.9.1.3. Модели дилатативне кардиомиопатије	59
1.9.2 Мали анимални модели срчане инсуфицијенције	59
1.9.2.1. Модели миокардијалне исхемије/инфаркта миокарда	60
1.9.2.2. Модели оптерећења леве коморе притиском/волуменом	60
1.9.2.3. Модели токсичне кардиомиопатије	61
1.9.2.3. Модели генетског инжењеринга	61
II ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	63
2.1 ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	64
2.2. ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	64
III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	65
3.1. Експерименталне животиње	66
3.2. Индукција срчане инсуфицијенције	67
3.3. Хронични терапијски протоколи	68
3.4.1. Испитивање <i>in vivo</i> функције миокарда	69
3.4.2 Испитивање <i>in vivo</i> хемодинамских параметара	71
3.4.3 Метод рада <i>Langendorff</i> апарата	72
3.4.3.1. Испитивање <i>ex vivo</i> функције миокарда методом ретроградне перфузије срца <i>Langendorff</i> техником	73
3.4.4. Мерење телесне масе и масе срца и одређивање индикатора хипертрофије срца	74
3.4.5. Биохемијске анализе	75
3.4.5.1. Припрема узорака крви, коронарног венског ефлуента и хомогената ткива миокарда за одређивање параметара оксидационог стреса	75

3.4.5.1.1. Одређивање параметара оксидационог стреса из крви пацова	76
3.4.5.1.1.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мереног као TBARS)	76
3.4.5.1.1.2. Одређивање концентрације нитрита (NO_2^-)	77
3.4.5.1.1.3. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала (O_2^-)	78
3.4.5.1.1.4. Одређивање концентрације водоник пероксида (H_2O_2)	78
3.4.5.1.1.5. Одређивање активности каталазе (CAT)	79
3.4.5.1.1.6. Одређивање активности супероксид дизмутазе (SOD)	79
3.4.5.1.1.7. Одређивање активности редукованог глутатиона (GSH)	79
3.4.5.1.2. Одређивање параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту	80
3.4.5.1.2.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мереног као TBARS)	80
3.4.5.1.2.2. Одређивање концентрације нитрита (NO_2^-)	80
3.4.5.1.2.3. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала (O_2^-)	80
3.4.5.1.2.4. Одређивање концентрације водоник пероксида (H_2O_2)	80
3.4.5.1.3. Одређивање параметара оксидационог стреса у хомогенату ткива миокарда	81
3.4.5.2. Одређивање концентрације кардиоспецифичних маркера и натриуретских пептида ELISA методом	81
3.4.6. Патохистолошка анализа ткива миокарда	82
3.4.6.1. Бојење ткива миокарда хематоксилин/еозин (H/E) техником	83
3.4.6.2. Бојење ткива миокарда Picrosirius red техником	83
3.4.7. Одређивање релативне експресије антиоксидационих, (анти)апоптотских и (анти)инфламацијских гена, као и релативне експресије гена сигналних молекула JAK2 и STAT2 у левој комори срца методом квантитативне полимеразне ланчане реакције у реалном времену (qRT-PCR)	84
3.5. Статистичке анализе	85
3.5.1. Снага студије	85
3.5.2. Статистичка обрада података	85
IV РЕЗУЛТАТИ	87
4.1. Процена <i>in vivo</i> функције срца пацова пре почетка експерименталних процедура	88
4.2. Потврда модела срчане инсуфицијенције код пацова	88
4.3. Испитивање ефеката хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на хемодинамске параметре пацова са срчаном инсуфицијенцијом	89
4.4. Испитивање ефеката хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на <i>in vivo</i> функцију срца пацова са срчаном инсуфицијенцијом	91
4.5. Испитивање ефеката хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на <i>ex vivo</i> функцију срца пацова са срчаном инсуфицијенцијом	93
4.6. Испитивање ефеката хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на телесну масу, масу срца и индекс хипертрофије срца пацова са срчаном инсуфицијенцијом	101
4.7. Испитивање ефеката хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на параметре системског редокс статуса пацова са срчаном инсуфицијенцијом	102
4.7.1. Испитивање ефеката хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на системске прооксидационе параметре пацова са срчаном инсуфицијенцијом	102
4.7.2. Испитивање ефеката хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на системске антиоксидационе параметре пацова са срчаном инсуфицијенцијом	103
4.8. Испитивање ефеката хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на прооксидационе параметре из коронарног венског ефлуента пацова са срчаном инсуфицијенцијом	104

4.9 Испитивање ефеката хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на параметре редокс статуса у хомогенату ткива миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом	110
4.10 Испитивање ефеката хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на концентрацију кардиоспецифичних маркера и натриуретских пептида у серуму пацова са срчаном инсуфицијенцијом	111
4.11 Патохистолошка анализа миокарда	112
4.11.1 Испитивање ефеката хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на структуру миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом - техника НЕ бојења	112
4.11.2 Испитивање ефеката хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на фиброзу миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом - техника PSR бојења	114
4.12 Испитивање ефеката хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на релативну експресију специфичних гена у узорцима ткива миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом	115
V ДИСКУСИЈА	121
5.1 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на хемодинамске параметре пацова са срчаном инсуфицијенцијом	123
5.2 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на <i>in vivo</i> срчану функцију пацова са срчаном инсуфицијенцијом	125
5.3 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на <i>ex vivo</i> срчану функцију пацова са срчаном инсуфицијенцијом	126
5.4 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на морфометријске параметре и индекс хипертрофије пацова са срчаном инсуфицијенцијом	128
5.5 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на вредност кардиоспецифичних маркера и натриуретских пептида пацова са срчаном инсуфицијенцијом	129
5.6 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на оксидациони статус пацова са срчаном инсуфицијенцијом	130
5.6.1 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на системски оксидациони статус пацова са срчаном инсуфицијенцијом	130
5.6.2 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на оксидациони статус ткива миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом	132
5.6.3 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на оксидациони статус у коронарном венском ефлуенту пацова са срчаном инсуфицијенцијом	133
5.7 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на хистоморфолошке карактеристике миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом	134
5.8 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на релативну генску експресију одређених маркера код пацова са срчаном инсуфицијенцијом	136
5.8.1 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на релативну генску експресију антиоксидационих маркера код пацова са срчаном инсуфицијенцијом	136
5.8.2 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на релативну генску експресију (анти)инфламационих маркера код пацова са срчаном инсуфицијенцијом	138
5.8.3 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на релативну генску експресију (анти)апоптотских маркера код пацова са срчаном инсуфицијенцијом	139
5.8.4 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на релативну генску експресију одређених сигналних молекула код пацова са срчаном инсуфицијенцијом	140
VI ЗАКЉУЧЦИ	141
VII РЕФЕРЕНЦЕ	144

I УВОД

1.1. СОЦИОЕПИДЕМИОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ СРЧАНЕ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈЕ

Срчана инсуфицијенција представља озбиљан здравствени изазов савременог друштва, са учесталошћу од 1-2% у општој популацији до преко 10% код особа старијих од 70 година (1). Од 1997. године, када је проглашена новом епидемијом (2), срчана инсуфицијенција привлачи значајну пажњу стручне и научне јавности. Подаци из Сједињених Америчких Држава (САД) показују да је морталитет од кардиоваскуларних (КВ) болести (КВБ) опао за више од 40% у периоду између 1980. и 2000. године. Међутим, од почетка 21. века, овај позитиван тренд се успорава, а од 2015. године добија потпуно другачији правац, што се у великој мери приписује порасту морталитета због срчане инсуфицијенције (3).

Извесни извори литературе су утврдили да преко 64,3 милиона људи широм света живи са срчаном слабошћу, што сведочи о глобалној распрострањености овог клиничког синдрома (4). Студије из 2017. године показују да је највећа стопа преваленце срчане инсуфицијенције регистрована у регионима Централне Европе, Северне Африке и Блиског Истока, док су ниже стопе примећене у Источној Европи и Јужноисточној Азији (5). Према статистичкој анализи, преваленца срчане инсуфицијенције у САД-у у периоду између 2017.-2020. године износила је 6,7 милиона људи, што представља приближно 2,3% укупног становништва (6). Међутим, мета-анализе указују на значајно већу преваленцу од 11,8% када се узму у обзир систематски ехокардиографски прегледи (7). Напредак у методама лечења срчане инсуфицијенције, као и продужетак животног века опште популације, утичу на повећање преваленце овог синдрома, што се очекује и у наредним годинама (8). Са друге стране, стопа инциденце срчане инсуфицијенције остаје релативно стабилна и показује опадајући тренд, нарочито код узнапредовале и срчане инсуфицијенције са редукованом ејекционом фракцијом (енгл. *Heart failure with reduced ejection fraction (EF)* - HFrEF), док је ситуација код срчане инсуфицијенције са очуваном EF (енгл. *Heart failure with preserved EF* - HFpEF) другачија (8). Очекивања су да ће оштећење миокарда настало услед обољења узрокованог корона вирусом (енгл. *Coronavirus disease-2019 - COVID-19*) утицати на повећање броја пацијената са срчаном инсуфицијенцијом почев од 2020. године (9). Овај потенцијално нови етиолошки узрочник срчане инсуфицијенције може да изазове додатно оптерећење здравственог система и потребе за додатним истраживањем и унапређењем метода лечења.

Код особа старијих од 65 година, срчана инсуфицијенција представља један од најчешћих узрока хоспитализације (10). У земљама западне хемисфере, болничко лечење због срчане инсуфицијенције чини 1-2% укупних хоспиталних пријема (11). Данска кохортна студија, која је обухватила преко 300.000 пацијената први пут хоспитализованих због срчане инсуфицијенције у периоду од 1983. до 2012. године, показала је да се стандардизована стопа хоспитализације за ову болест смањила за 25% код жена и 14% код мушкараца (12). Међутим, познато је да чак 30-40% пацијената са дијагнозом срчане инсуфицијенције има историју хоспиталног лечења због овог обољења, а током прве године од постављања дијагнозе, 50% пацијената бива поново хоспитализовано (8).

Квалитет живота пацијената са срчаном слабошћу је значајно нарушен, а стопа преживљавања ових пацијената је лошија у поређењу са пацијентима који болују од малигних болести, као што су карцином дојке или простате (13). Дугорочна прогноза пацијената хоспитализованих због срчане инсуфицијенције је лоша, са високом стопом петогодишњег морталитета која је приближно иста у различитим групама пацијената,

без обзира на вредност EF леве коморе (14). На глобалном нивоу, 17-45% пацијената са срчаном инсуфицијенцијом умире током прве године од хоспитализације, док већина преживелих умире током првих 5 година (15). Стопа mortalитета се значајно повећава са старењем, и то чак четвороструко код особа старијих од 85 година у поређењу са особама средње животне доби. Према подацима из Шведског регистра за срчану инсуфицијенцију (енгл. *The Swedish Heart Failure Registry - SwedeHF*), прилагођени трогодишњи mortalитет био је за 20% већи код пацијената са HFrEF у односу на пацијенте са HFpEF, док су пацијенти са срчаном инсуфицијенцијом са „граничном” EF (енгл. *heart failure with mildly reduced EF - HFmrEF*) имали сличну прогнозу као и пацијенти са HFpEF (16).

Економски аспект срчане инсуфицијенције је изузетно забрињавајући с обзиром да ово обољење представља велико оптерећење за здравствени систем због велике потрошње ресурса и значајних трошкова здравствене заштите (8). Како је срчана инсуфицијенција широко распрострањена и има „епидемијски” карактер, здравствени системи су под константним притиском због високог mortalитета, морбидитета и честих хоспитализација (17). Током 2012. године, укупни економски трошкови срчане инсуфицијенције у 197 земаља износили су чак 108 милијарди долара (18). Новији подаци указују да годишњи трошкови здравствене заштите по пацијенту са срчаном инсуфицијенцијом могу досегнути и до 25.000 евра у западним земљама (8).

Имајући у виду све наведене аспекте комплексности срчане инсуфицијенције, неопходно је примењивати најсавременије и најефикасније терапијске модалитете како би се постигли оптимални резултати код ове популације пацијената.

1.2. СРЧАНА ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈА КАО ИСТОРИЈСКА ПАРАДИГМА

Срчана инсуфицијенција кроз историју пролази кроз периоде бројних хипотетичких тврдњи и открића која су допринела разумевању основних патофизиолошких механизма овог синдрома, као и развоју напредних дијагностичких и терапијских метода. Пут до данашњег схватања срчане инсуфицијенције био је дуг и сложен, од древних запажања симптома „слабог срца” до савремених научних истраживања која су расветлила неке од сложених механизма који стоје иза ове болести. Значајни помак у разумевању хемодинамских поремећаја у срчаној инсуфицијенцији догодио се када је *William Harvey* 1628. године детаљно описао анатомске и функционалне карактеристике циркулаторног система, што је поставило темеље за каснија истраживања. У наредним столећима, уследиле су кључне прекретнице у дијагностици срчане инсуфицијенције, попут *Röntgen*-овог открића х-зрака, развоја електрокардиографије од стране *Einthoven*-а, као и развоја софистицираних дијагностичких метода попут ехокардиографије (19).

Новија истраживања форензичке медицине пружила су поуздане доказе о постојању попуштања срца као клиничког феномена који датира више од 3.500 година. Најстарији познати случај срчане инсуфицијенције идентификован је код египатског великодостојника, средовечног мушкарца по имену Небири. Његови посмртни остаци откривени су 1904. године у гробници у Долини Краљица од стране италијанског египтолога *E. Schiaparelli*-ја. Детаљна патохистолошка анализа ових остатака показала је промене које се највише могу повезати са едемом плућа, што указује на то да је ова особа највероватније боловала од срчане инсуфицијенције (20). Ова открића пружају важан увид у дугу историју срчане инсуфицијенције као медицинског стања.

Приступу у лечењу срчане инсуфицијенције су се кроз историју значајно мењали. „Пуштање” крви и третман пијавицама били су уобичајени током векова, све

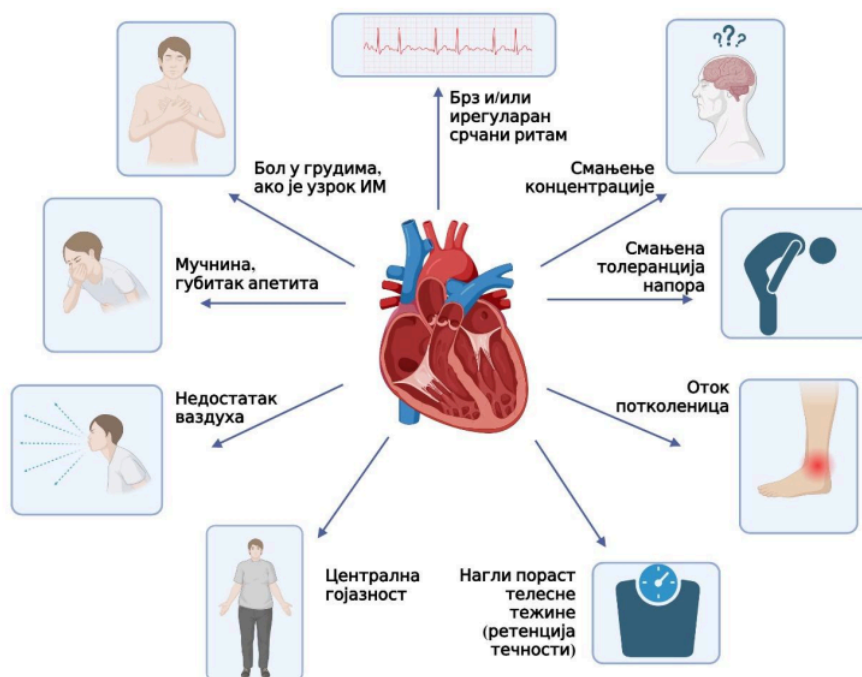
док William Withering 1785. године стручној јавности није представио корисна дејства дигиталиса. У 19. и почетком 20. века, за лечење периферних едема коришћене су *Southey*-еве цевчице. Средином 20. века, откриће тиазидних диуретика било је важан корак напред, а пар деценија касније увођење инхибитора ангиотензин-конвертујућег ензима (енгл. *Angiotensin-converting enzyme inhibitors* - ACEi) донело је значајан помак у терапији срчане инсуфицијенције (19). Резултати кључне клиничке студије CONSENSUS (енгл. *The Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study*), објављени 1987. године, показали су да примена ACEi, еналаприла, значајно смањује морталитет код пацијената са тешком срчаном инсуфицијенцијом (21), што је довело до њихове широке примене код ове популације пацијената.

Са усвајањем неурохуморалног модела као основе за патофизиолошка збивања у срчаној инсуфицијенцији, поред ACEi, бета (β)-блокатори су постали кључни у медикаментозном лечењу овог стања (22). Пре неколико година, развијена је нова класа лекова - инхибитори ангиотензин II рецептора тип 1 и неприлизина (енгл. *Angiotensin Receptor/Neprilysin Inhibitors* - ARNI), а њихов први представник, сакубитрил/валсартан, је укључен у алгоритам смерница за лечење пацијената са HFrEF (22, 23). Поред тога, антидијабетици, инхибитори натријум-глукозног котранспортера тип 2 (енгл. *Sodium-Glucose Cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors* - SGLT2i), недавно су добили индикацију за примену у лечењу срчане инсуфицијенције (22, 23). Такође, 21. век је донео напредак у лечењу срчане инсуфицијенције кроз нове модалитете, као што је примена имплантабилног кардиовертер дефибрилатора (енгл. *Implantable Cardioverter-Defibrillator* - ICD). Овај уређај се примењује за смањење ризика од изненадне срчане смрти (енгл. *Sudden Cardiac Death* - SCD) код високо ризичних пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (24).

И поред бројних открића која су током историје значајно изменила клинички ток срчане инсуфицијенције, овај синдром и даље остаје велики изазов данашњице и наставља да буде предмет интензивног истраживања и изучавања.

1.3. ДЕФИНИЦИЈА И КЛАСИФИКАЦИЈА СРЧАНЕ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈЕ

Према универзалној дефиницији, срчана инсуфицијенција представља клинички синдром који се карактерише симптомима и/или знацима који произилазе из структурних и/или функционалних поремећаја срца, уз повишене вредности натриуретских пептида и/или постојање објективних знакова плућне или системске конгестије (25). Овај синдром узрокује повећање интракардијалних притисака и/или неадекватни ударни волумен, како у стању мировања, тако и при физичком напору (22). Симптоми који су особени за пацијенте са срчаном инсуфицијенцијом подразумевају осећај недостатка ваздуха, отицања око скочних зглобова и осећај замора, а може бити праћена и објективним знацима као што су повишен југуларни венски притисак, пукоти над плућима (који указују на плућни едем), као и други знаци који указују на акумулацију течности у организму (Слика 1) (22).



Слика 1. Најчешћи симптоми и знаци пацијената са срчаном инсуфицијенцијом.

Постоји више класификационих система за категорисање пацијената са срчаном инсуфицијенцијом, који помажу у прецизном дијагностиковању и збрињавању овог стања. Клиничка презентација срчане инсуфицијенције може бити акутна и хронична (26). Акутна срчана инсуфицијенција, често названа срчана декомпензација, настаје нагло (лат. *de novo*) и може се јавити као резултат акутних стања као што је акутни инфаркт миокарда (АИМ). С друге стране, хронична срчана инсуфицијенција је стање које се карактерише присуством стабилних и компензованих симптома током дужег временског периода, али које под одређеним околностима може ескалирати у акутну декомпензовану срчану инсуфицијенцију (27), која је уједно и најчешћа манифестација акутне срчане инсуфицијенције у клиничкој пракси (28).

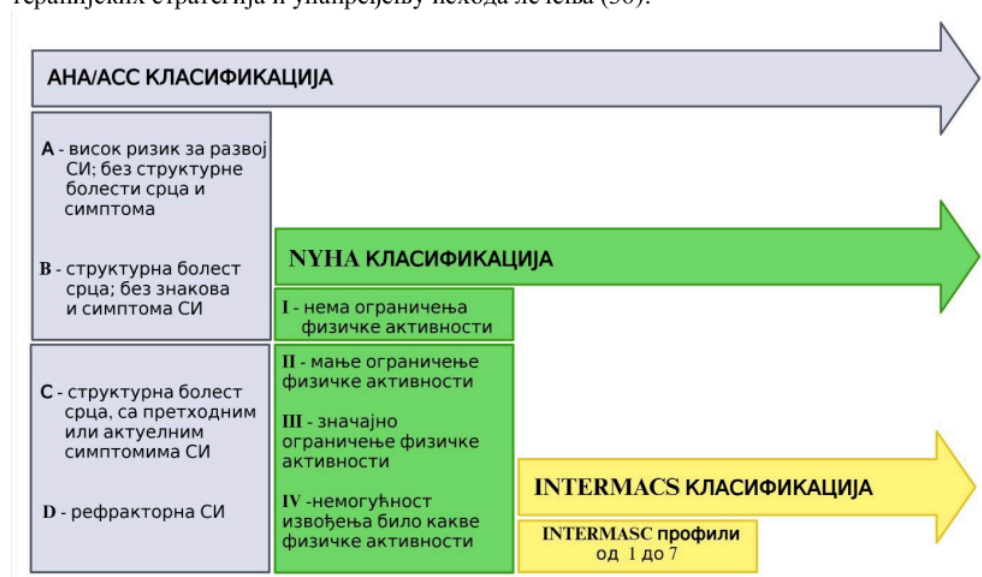
Прва класификација срчане инсуфицијенције представљена је у смерницама Америчке фондације за кардиологију/Америчког удружења за срце (енгл. *American College of Cardiology Foundation/American Heart Association - ACCF/AHA*) из 2001. године. Ова класификација је истиче развој срчане инсуфицијенције кроз четири стадијума (A-D) на основу симптома и структурних промена (Слика 2) (23). Основни циљ ове класификације приказ стадијума болести у контексту прогресије; од ризика и структурних промена до симптома и клиничке декомпензације. Главни циљ примењених терапијских мера у сваком од стадијума је следећи (23):

- **Стадијум А:** Модификација фактора ризика.
- **Стадијум В:** Лечење фактора ризика и структурне болести срца у циљу превенције развоја срчане инсуфицијенције.
- **Стадијуми С и D:** Смањење симптома, морбидитета и морталитета.

Већ дуги низ година, класификациони систем Њујоршког кардиолошког друштва (енгл. *New York Heart Association* - NYHA) користи се за одређивање тежине срчане инсуфицијенције. Према овом систему, пацијенти су сврстани у један од четири стадијума (I-IV) на основу присуства симптома при различитим нивоима физичке активности (**Слика 2**) (1).

Узнапредовала срчана инсуфицијенција је посебан ентитет који захтева прецизан опис, с обзиром да пацијенти у овом стадијуму болести често захтевају трансплантацију срца или примену механичке вентрикуларне потпоре (3). У смерницама Европског Удружења кардиолога (енгл. *European Society of Cardiology* - ESC) из 2018. године, дијагноза узнапредовале срчане инсуфицијенције захтева присуство неколико налаза, који морају бити присутни и поред примене оптималне терапије. Ови пацијенти имају веома тешке симптоме (NYHA III или IV), озбиљну срчану дисфункцију са $EF \leq 30\%$, дисфункцију десног срца, неоперабилне абнормалности на срчаним записима или конгениталне мане, плућну конгестију или низак минутни волумен срца, који захтева примену интравенских диуретика или инотропних лекова, као и озбиљну интолеранцију на напор за коју се верује да је кардиогене природе (29).

Класификација INTERMACS (енгл. *Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support*) је развијена ради праћења клиничког статуса и исхода пацијената са узнапредовалом срчаном инсуфицијенцијом лечених механичком циркулаторном потпором (**Слика 2**). INTERMACS класификација сврстава пацијенте у различите категорије (1-7 клиничких профила) на основу изражености присутних симптома и потребе за механичком циркулаторном потпором, чиме помаже у оптимизацији терапијских стратегија и унапређењу исхода лечења (30).



Слика 2. Класификациони системи за оцену тежине срчане инсуфицијенције.

За описивање тежине клиничког стања пацијената након АИМ често се користи *Killip* и *Kimbal* класификација (31). Ова класификација се заснива на процени ризика за развој срчане инсуфицијенције након АИМ, узимајући у обзир налазе при физичком прегледу и категорише пацијенте у четири стадијума (1):

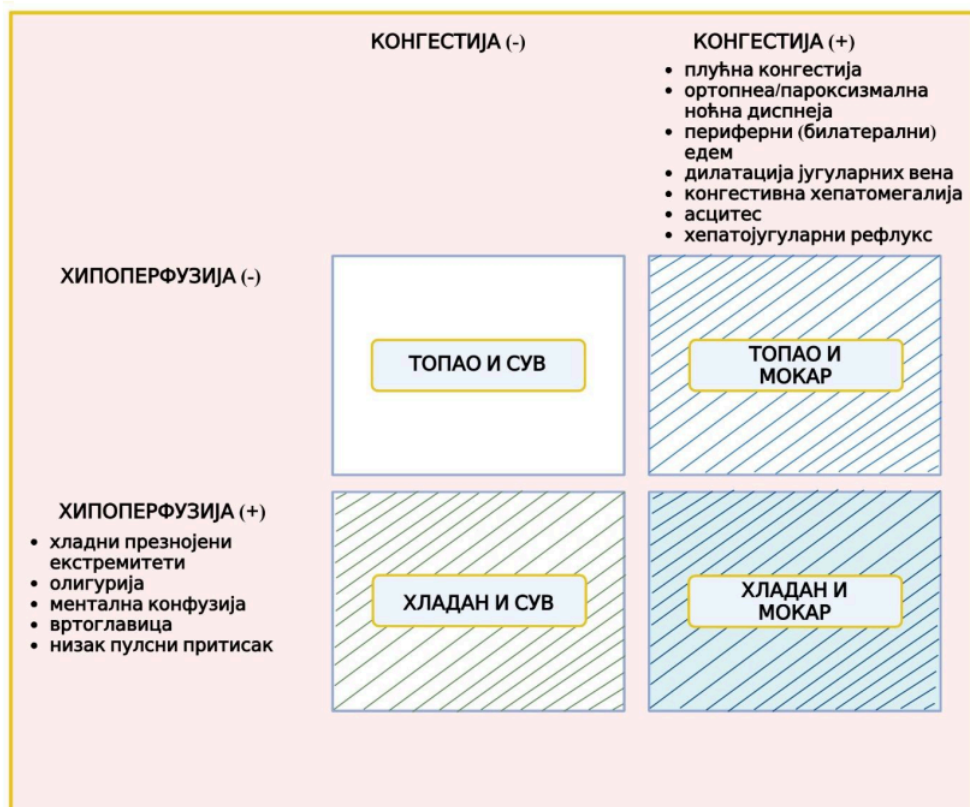
- **Стадијум I:** Без клиничких знакова срчане инсуфицијенције.
- **Стадијум II:** Срчана инсуфицијенција са лаким симптомима уз присуство пукота над плућима и S3 галоба.
- **Стадијум III:** Тешка срчана инсуфицијенција са значајним плућним едемом.
- **Стадијум IV:** Кардиогени шок са знацима који укључују хипотензију (сistolни притисак <90 mmHg) и доказе периферне вазоконстрикције, као што су олигурија, цијаноза и дијафореза.

Важно је напоменути да сваки од наведених класификационих система за категоризацију срчане инсуфицијенције има своје предности и мане, што истиче потребу за пажљивим избором методе у зависности од клиничке презентације и индивидуалних карактеристика пацијената. ACCF/АНА класификација пружа детаљнији увид у стадијуме болести засноване на структурним променама и симптомима, што је корисно за планирање терапије и праћење прогресије болести. Међутим, она може бити сложена за примену у свакодневној клиничкој пракси због потребе за детаљним проценама и спровођењем додатних тестова. NYHA класификација даје јасну слику о функционалним ограничењима пацијената у свакодневним активностима и широко је коришћена за процену напредовања болести и евалуацију одговора на терапију. Ипак, она не узима у обзир све аспекте срчане инсуфицијенције, као што је одговарајући одабир пацијената за доступне третмане, укључујући уградњу пејсмејкера, трансплантацију срца или механичку циркулаторну потпору (30), што може ограничити њену примену у одређеним ситуацијама. Штавише, сматра се да је овај класификациони систем прилично субјективан и да нема могућност да јасно разликује пацијенте са срчаном инсуфицијенцијом кроз спектар функционалних поремећаја, нити да пружи јасну прогнозу преживљавања ових пацијената (32). INTERMACS класификација је специјализована за пацијенте код којих је неопходна примена механичке циркулаторне потпоре, пружајући важне информације о клиничком статусу и одговору на терапију у овим комплексним ситуацијама. Њене мане укључују ограничену примену ван контекста механичке потпоре и потребу за свеобухватним праћењем. *Killip* класификација је корисна за процену озбиљности срчане инсуфицијенције, али искључиво након АИМ и има практичну примену у предвиђању ризика од компликација код ових пацијената.

Посебан вид клиничке класификације срчане инсуфицијенције заснива се на физикалном прегледу у болесничком кревету ради детекције присуства клиничких симптома/знакова конгестије („мокар” или „сув” ако су присутни или одсутни) и/или периферне хиперперфузије („хладан” или „топао” ако су присутни или одсутни) (**Слика 3**) (33). Комбинација ових опција идентификује четири следеће групе пацијената:

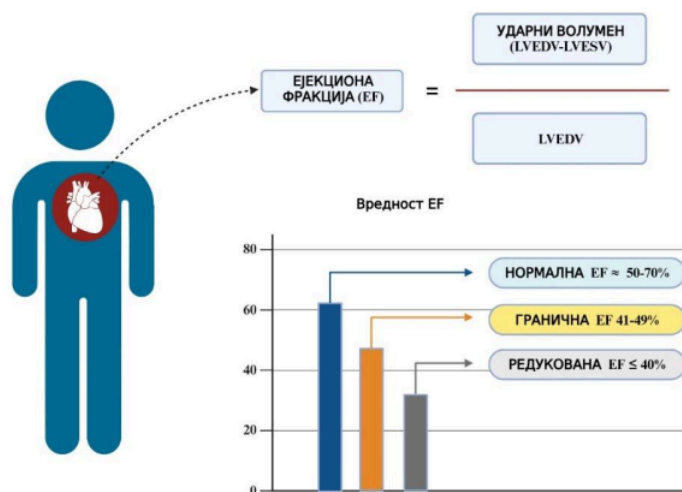
1. **Топео и мокар** - добра перфузија и конгестија (најчешће),
2. **Хладан и мокар** - присутна хиперперфузија и конгестија,
3. **Хладан и сув** - присутна хиперперфузија без конгестије и
4. **Топео и сув** - добра перфузија без конгестије (компензовано стање).

Ова класификација може бити корисна за одабир одговарајуће терапијске стратегије у почетној фази лечења и носи значајне прогностичке информације (1).



Слика 3. Клинички профили пацијената са акутном срчаном инсуфицијенцијом у односу на присуство/одсуство конгестије и/или хипоперфузије.

Један од основних показатеља срчане функције је EF леве коморе, која се изражава у процентима и представља фракцију енд-дијастолног волумена, односно количину крви коју лева комора избаци током сваке контракције (Слика 4) (34). Сматра се да свако снижење EF леве коморе за 1% повећава ризик од срчане инсуфицијенције за 4% (35, 36). Увођење неинвазивних имидинг метода, нарочито ехокардиографије у клиничку примену средином 1990-тих година, омогућило је идентификацију пацијената са клиничким симптомима и знацима срчане инсуфицијенције који нису показивали смањење EF леве коморе. На основу ових сазнања дошло се до закључка да је природа срчане инсуфицијенције хетерогена (3).



Слика 4. Ејекциона фракција леве коморе: распон вредности и њихова интерпретација.

ESC смерница за лечење срчане инсуфицијенције из 2016. године представиле су нови класификациони систем који се заснива на вредности EF леве коморе (1). Према овом систему, пацијенти са срчаном инсуфицијенцијом сврстани су у следеће категорије:

- **HFrEF** (EF ≤ 40%),
- **HFmEF** (EF 41-49%) и
- **HFpEF** (EF ≥ 50%).

Процењује се да око 50% пацијената са срчаном инсуфицијенцијом има HFrEF. Преваленца овог фенотипа показује тенденцију стабилности или чак смањења, што се може приписати савременој терапији која се примењује у лечењу исхемијске болести срца. У исто време, преваленца HFpEF-а је у сталном порасту, што сугерише да ће ово стање вероватно постати најчешћа форма срчане слабости у будућности (8). Разумевање патофизиолошких механизма који су одговорни за настанак HFrEF-а и HFpEF-а је изузетно важно, обзиром да се ова два ентитета разликују по етиологији, клиничкој слици, прогнози и начину лечења (37).

Према најновијем консензусу из 2021. године, уведена је нова категорија овог синдрома, такозвана срчана инсуфицијенција са побољшаном EF (енгл. *Heart failure with improved EF* - HFimpEF), која обухвата пацијенте са базалном вредношћу EF ≤ 40%, код којих је на контролном ехокардиографском прегледу регистрован пораст EF од ≥ 10%, при чему је EF већа од 40% (25). Ова класификација је од велике важности обзиром да, према вредности EF, различите категорије пацијената са срчаном инсуфицијенцијом имају различите одговоре на примењену терапију, као и другачију прогнозу болести (23).

1.4. КОНЦЕПТУАЛНИ МОДЕЛИ У СРЧАНОЈ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈИ

Током претходних 300 година, на научној сцени представљени су различити концептуални модели срчане слабости. Између 1680. и 1960. године, срчана инсуфицијенција је посматрана углавном као кардиоренални поремећај, узрокован ретенцијом натријума у бубрезима и последичним волумним оптерећењем, што изазива развој плућног и/или периферног едема као крајње последице. Од 1960. до 1980. године, хемодинамски (кардиоциркулаторни) модел срчане слабости постао је преовлађујући. У овом моделу, настанак симптома и интоларанције напора превасходно се сматра последицом интеракције поремећене контрактилне функције миокарда и периферне вазоконстрикције. Од 1990. године, активација неурохуморалних механизма је сматрана основним узроком прогресије срчане инсуфицијенције (неурохуморални модел), док је почетак 21. века донео концепт биомеханичког модела срчане инсуфицијенције. Овај модел подразумева да механички поремећаји узроковани ремоделовањем леве коморе представљају кључни механизам за прогресију овог обољења (38, 39).

1.4.1. Кардиоренални модел

Први модел срчане слабости заснован је на претпоставци да периферни или плућни едем представља главно обележје срчане инсуфицијенције, а патофизиолошка збивања овог мултисистемског обољења разматрана су кроз две хипотезе. Прва хипотеза је срчану инсуфицијенцију објашњавала као немогућност срца да „пумпа” крв у системску циркулацију (енгл. „*forward failure*”), чиме се смањује ренални проток крви, задржавају се натријум и вода, и настаје повећање интраваскуларног волумена. Друга хипотеза је подразумевала да је основни проблем у срчаној слабости немогућност срца да „прими” одговарајућу количину венске крви (енгл. „*backward failure*”), услед чега настаје пораст венског притиска и развој плућног и/или периферног едема. Накнадне анализе су показале да су ове две хипотезе комплементарне и да обе имају улогу у патофизиологији срчане инсуфицијенције (40).

Творци првог модела срчане инсуфицијенције, као и тадашња научна јавност, нису посматрали срчану инсуфицијенцију као хронично обољење које напредује и изазива бројне органске поремећаје и смрт. Напротив, сматрало се да пацијенти са едемима пате од срчане слабости, али и да повлачење едема применом одговарајуће терапије омогућава потпуно излечење (40). Иако је концепт кардиореналног модела допринео развоју и широкој примени диуретика за смањење едема и дигиталиса за побољшање контрактилности миокарда, примена ове терапије није значајно смањила морталитет. Напротив, сматрало се да употреба вазодилаторних лекова и β -блокатора погоршава едеме због компликација у реналној перфузији, што је став који је касније ревидиран и напуштен (39).

1.4.2. Хемодинамски (кардиоциркулаторни) модел

Од шездесетих година 20. века, значајно је напредовало разумевање патофизиологије срчане слабости. Уочено је да се срчана инсуфицијенција карактерише компромитованим ударним волуменом, смањеном функцијом леве коморе и значајном периферном вазоконстрикцијом. Према кардиоциркулаторном моделу, основни узрок срчане инсуфицијенције је поремећај пумпне функције срца и периферна вазоконстрикција, односно хемодинамски поремећај, који објашњава интолеранцију на напор, упркос повлачењу едема применом одговарајуће терапије (40). Међутим, током

времена, примена одређених фармаколошких агенаса није само показала ограничену ефикасност, већ је у неким случајевима значајно повећала морталитет код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом. У великој клиничкој студији PROMISE (енгл. *Prospective Randomized Milrinone Survival Evaluation*), примена оралног инотропног агенса милринона код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (NYHA III-IV) и вредношћу EF мањом од 35% резултирала је драматичним повећањем морталитета за чак 53% код пацијената са најтежим обликом срчане инсуфицијенције (41). Иако неки од ових медикамената имају значајно место у терапијској стратегији за збрињавање пацијената са акутном декомпензованом срчаном инсуфицијенцијом, кардиоциркулаторни модел је значајно успорио напредак у лечењу срчане инсуфицијенције. Према овим постулатима, употреба β -блокатора била је контраиндикована због њиховог негативног инотропног дејства, што је ограничавало могућности за побољшање исхода код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (38, 39, 42).

1.4.3. Неурохуморални модел

У последњих неколико деценија, три главне класе лекова - ACEi, блокатори ангиотензинских рецептора (енгл. *Angiotensin Receptor Blockers* - ARB) и β -блокатори - значајно су промениле ток болести код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом. Бројна претклиничка и клиничка истраживања су показала да се током прогресије овог синдрома активирају неурохуморални системи, као што су адренергички нервни систем и ренин-ангиотензин-алдостерон систем (енгл. *Renin-Angiotensin-Aldosterone System* - RAAS). Ови системи играју кључну улогу у патофизиологији срчане инсуфицијенције и представљају основу неурохуморалног модела. Према овом моделу, срчана слабост се не посматра само као хемодинамски поремећај, већ и као сложени биолошки проблем који укључује дисфункцију ових система.

Иако активација неурохуморалних система у почетку има за циљ компензацију патофизиолошких промена у срчаној инсуфицијенцији, истраживања су показала да повишени нивои биолошки активних молекула, као што су норепинефрин, ангиотензин II и алдостерон, после одређеног времена испољавају негативан ефекат на већ оштећен срчани мишић (43). Једно од првих клиничких истраживања усмерених на блокаду неурохуморалне активације код пацијената са срчаном слабошћу, студија CONSENSUS, донела је значајне резултате. Примена ACEi, еналаприла, код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом и NYHA IV класом, значајно је смањила морталитет у првих 6 месеци (за 40%) и 12 месеци (за 31%) лечења (21). Ови резултати учинили су ACEi каменом темељцем у лечењу срчане инсуфицијенције. Међутим, упркос напорима да се унапреди лечење ових пацијената применом „неурохуморалних блокатора” (ACEi, ARB, β -блокатора и блокатора минералокортикоидних рецептора (енгл. *Mineralocorticoid Receptor Antagonists* - MRA)), принцип неурохуморалне активације није успео да у потпуности објасни прогресију овог синдрома (39).

1.4.4. Биомеханички модел

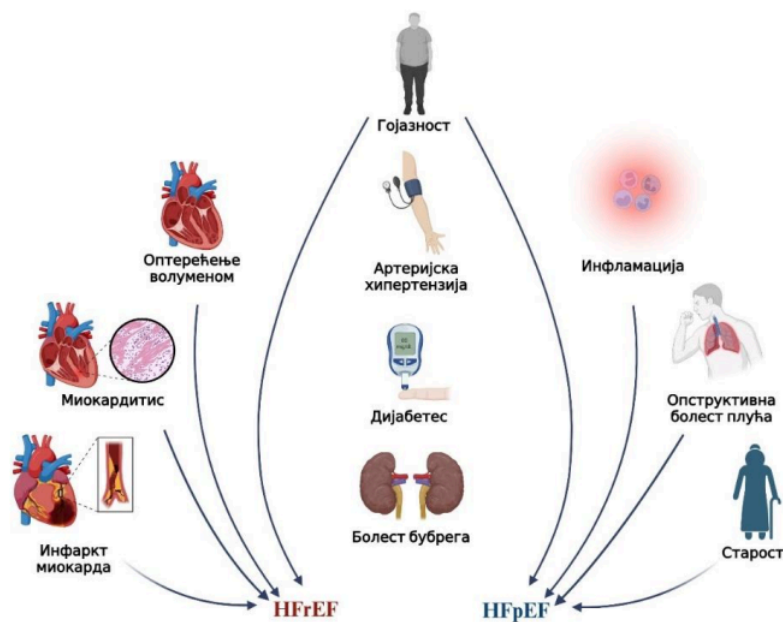
Од почетка 21. века, срчана инсуфицијенција се посматра кроз концепт биомеханичког модела који сугерише да дуготрајна неурохуморална активација изазива погоршање срчане функције услед механичких поремећаја проузрокованих ремоделовањем леве коморе. Како срчана инсуфицијенција напредује, неурохуморална активација постаје мање значајна у контексту њене прогресије, што објашњава ограничену ефикасност терапијских модалитета заснованих на неурохуморалним

факторима у узнапредовалим стадијумима овог синдрома. Биомеханички модел се фокусира на терапијске стратегије које циљају негативне последице неуроуморалне активације, укључујући ћелијску смрт, фиброзу миокарда, дисинхронију и дилатацију леве коморе. Са друге стране, остаје неразјашњено због чега долази до прогресије срчане инсуфицијенције у раним стадијумима болести, с обзиром да се овај модел пре свега односи на узнапредовалу срчану инсуфицијенцију, у којој су ремоделовање и дилатација леве коморе главне клиничке манифестације овог синдрома (39).

1.5. ЕТИОЛОШКИ ФАКТОРИ У СРЧАНОЈ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈИ

Срчана инсуфицијенција, као крајњи исход бројних КВБ (44), настаје услед поремећене структуре и/или функције срца, које није у стању да обезбеди организму довољну количину кисеоника, неопходну за његове метаболичке потребе (45). Анализа Европског регистра за срчану инсуфицијенцију, који води ESC (енгл. *ESC Heart Failure Long-Term Registry*), у којем је обухваћено више од 16.000 пацијента, показала је да пацијенти са хроничном срчаном инсуфицијенцијом, сврстани у различите категорије према вредности EF, представљају различите фенотипе у смислу демографских карактеристика, клиничке презентације, етиологије и механичког и електричног ремоделовања. Од укупног броја пацијената, укључених у овај регистар, 60% је имало HFrEF, 24% HFmrEF и 16% HFpEF (37).

Етиолошки чиниоци који доприносе развоју срчане инсуфицијенције су бројни и разноврсни, обухватајући широк спектар фактора који могу утицати на функционисање целокупног КВ система (Слика 5).



Слика 5. Фактори ризика и коморбидитети одговорни за настанак HFrEF-а и HFpEF-а.

Најновији подаци из мултинационалног регистра који је обухватио преко 23.000 пацијента са срчаном слабошћу из 40 земаља, различитих економских стандарда,

указују да је исхемијска болест срца један од кључних узрока за настанак срчане инсуфицијенције са учесталошћу од 38,1%. Хипертензија је на другом месту са 20,2% (46). Поред ових фактора, важно је поменути и хроничну опструктивну болест плућа (ХОБП), различите облике кардиомиопатија, не-реуматску дегенеративну болест митралне валвуле, друга КВ и циркулаторна обољења, алкохолну кардиомиопатију, не-реуматску калцификовану аортну валвулу, реуматску болест срца и миокардитис као узрок срчане инсуфицијенције (5).

Срчана инсуфицијенција је мултисистемско обољење које не настаје као изоловано стање, већ најчешће деловањем традиционалних фактора ризика као што су дијабетес мелитус тип 2 (ДМТ2), хипертензија, гојазност, хиперлипидемија и конзумирање дувана. Ови фактори ризика значајно повећавају вероватноћу развоја срчане инсуфицијенције (3). Коморбидитети у великој мери утичу на прогнозу и квалитет живота пацијената са срчаном инсуфицијенцијом, док удруженост више коморбидитета често доводи до интолеранције на медикаментозну терапију, као и до појаве интеракција између фармаколошких агенаса (47). Због тога је јасно да превенција, дијагностика и лечење срчане инсуфицијенције захтевају холистички приступ, са посебним акцентом на контролу и модификацију поменутих фактора ризика и коморбидитета, како би се смањила инциденца овог озбиљног здравственог стања.

Исхемијска болест срца је у значајном проценту повезана са развојем HFrEF и HFmrEF (37). Са друге стране, хипертензија је главни етиолошки чинилац који доприноси настанку HFrEF-а (37). Према доступним литературним подацима, процењује се да око 50% пацијената са срчаном инсуфицијенцијом има HFrEF, уз очекивани тренд пораста преваленце у наредним годинама. HFrEF представља комплексни клинички синдром који се карактерише неадекватном релаксацијом леве коморе, која настаје као резултат структурних и ћелијских поремећаја, укључујући хипертрофију кардиомиоцита, фиброзу и инфламацију. Овај системски синдром је повезан са високим морбидитетом и морталитетом и његова инциденца расте више него у случају HFrEF-а (48). Пацијенти са HFrEF су углавном женског пола и старије животне доби. Најчешћи коморбидитети у овој популацији укључују ДМТ2, хипертензију, гојазност и бубрежну инсуфицијенцију (49). Са друге стране, мушкараци су склонији развоју HFrEF-а у односу на жене, што је вероватно последица веће подложности мушког пола за настанак АИМ и ексцентричне хипертрофије леве коморе услед преоптерећења притиском. Насупрот томе, код жена је чешће присутна концентрична хипертрофија (50).

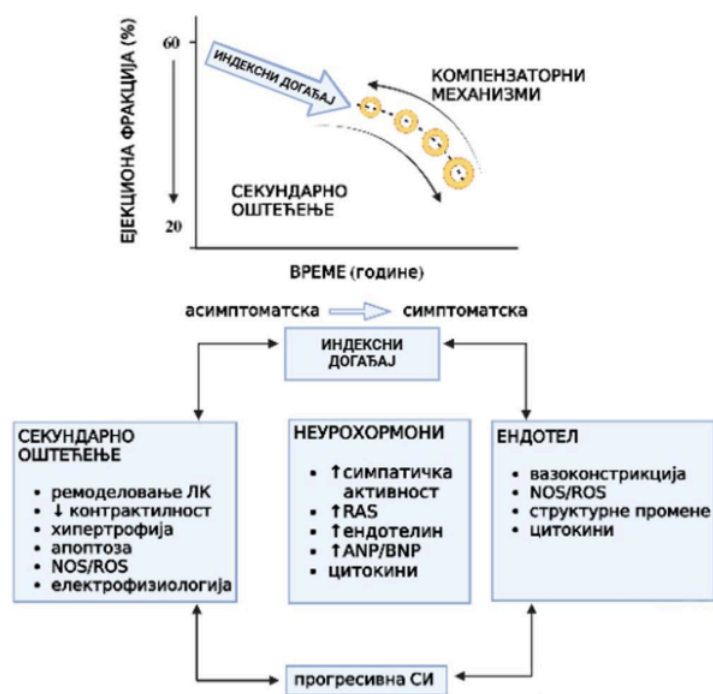
HFmrEF обухвата пацијенте са вредностима EF у ужем опсегу у поређењу са HFrEF и HFpEF. Досадашње студије су показале да овај клинички фенотип има етиолошке карактеристике и терапијски одговор ближи HFrEF, те се понекад описује као срчана инсуфицијенција са „благо редукованом” EF (51). Резултати кохортних студија спроведених у САД указују на сличне карактеристике пацијената са HFmrEF и HFpEF, укључујући старије животно доба, већи индекс телесне масе (енгл. *Body Mass Index* - BMI), као и већу преваленцу артеријске хипертензије и атријалне фибрилације. Међутим, запажено је и да пацијенти са HFmrEF у већем проценту припадају мушком полу и да чешће болују од исхемијске болести срца, као што је то случај са пацијентима са HFrEF (51). Детаљније анализе су показале да највећи проценат пацијената са HFmrEF има идиопатску дилатациону кардиомиопатију, што чини чак 65% случајева. Исхемијска болест срца је на другом месту са 20% код ових пацијената (49).

Савремени терапијски приступи који су се показали безбедним и ефикасним за пацијенте са HFrEF нису били успешни за пацијенте са HFpEF (50), што указује на различитост ова два стања, пре свега у погледу патофизиолошких механизма који их

узрокују (50). Са друге стране, показано је да пацијенти са HFmrEF добро реагују на терапијске модалитете који се користе у третману HFrEF. Међутим, очекује се да ће резултати актуелних клиничких студија пружити додатне информације о најоптималнијем терапијском режиму за ову групу пацијената (51).

1.6. ПАТОФИЗИОЛОШКИ МЕХАНИЗМИ У НАСТАНКУ СРЧАНЕ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈЕ

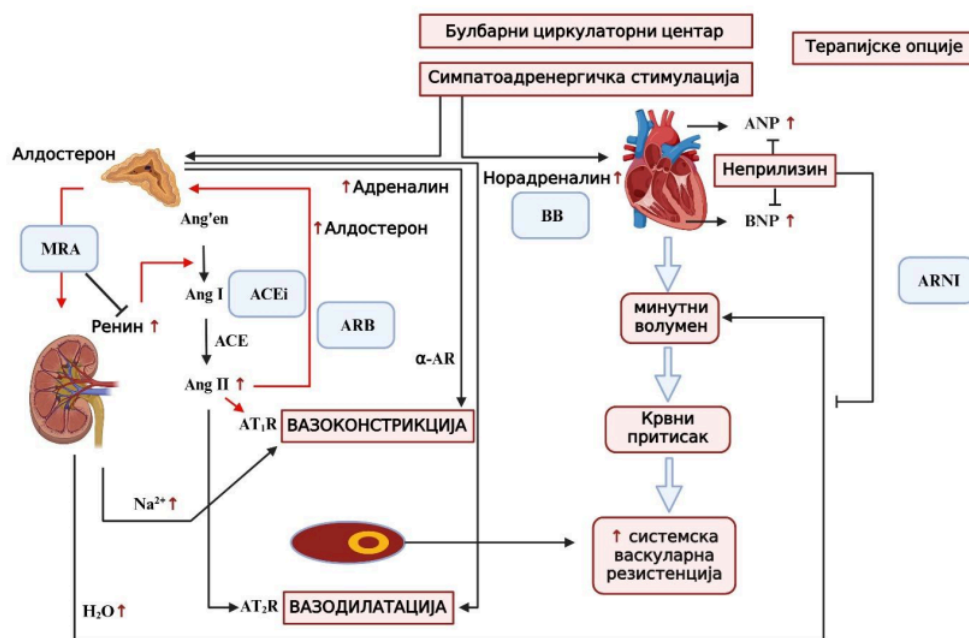
Деценијама су постојали бројни покушаји да се формулише хипотеза која би у потпуности објаснила патофизиолошка збивања у HFrEF. Данас је познато да је овај комплексни синдром заправо резултат интеракције структурних и функционалних промена које не обухватају само срце, већ и аутономни нервни систем (АНС) (1), бубреге (52), периферну васкулатуру (53) и скелетне мишиће (54). Кључни тренутак у развоју HFrEF јесте „индексни” догађај који доводи до оштећења пумпне функције миокарда (Слика 6). Овај догађај може бити акутно оштећење срца узроковано АИМ или хронично хемодинамско оптерећење.



Слика 6. Патогенетски механизми у настанку срчане инсуфицијенције.

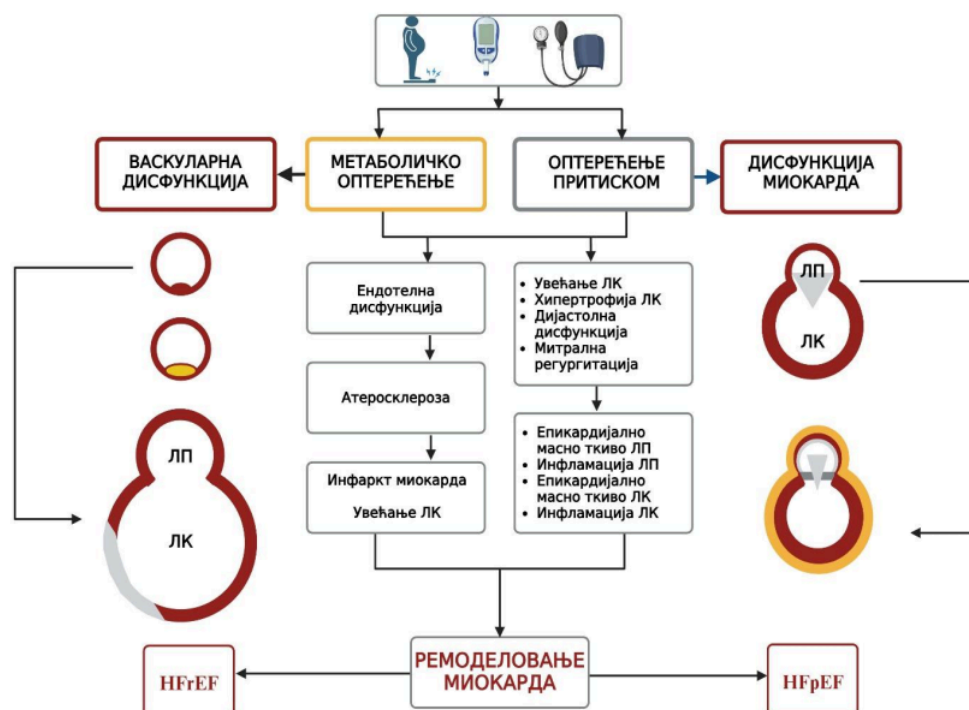
Комплексност разумевања патофизиологије срчане инсуфицијенције произлази из чињенице да бројни биолошки фактори, као што су старење, генетске карактеристике, коморбидитети и исхрана, као и не-биолошки фактори околине, додатно утичу на постојеће промене органских система (43). Познато је да код пацијента са HFrEF различити поремећаји на молекуларном и ћелијском нивоу доводе до фенотипских промена, као што су промене у величини, облику и функцији миокарда. Ове промене резултирају поремећајем функције срца као пумпе и смањењем ударног волумена (43). Генетски поремећаји који узрокују срчану инсуфицијенцију ремете

контракtilну функцију срца, узрокујући фрагилност сарколеме и смрт кардиомиоцита (55). Као последица оштећене контракtilне функције миокарда настаје стимулација компоненти неуроендокриног система, као што су адренергички нервни систем, RAAS и систем натриуретских пептида (28). На овај начин расте концентрација неуроендокриних и натриуретских пептида (Слика 7).



Слика 7. Активација неуроендокриних система у срчаној инсуфицијенцији и главне терапијске мете.

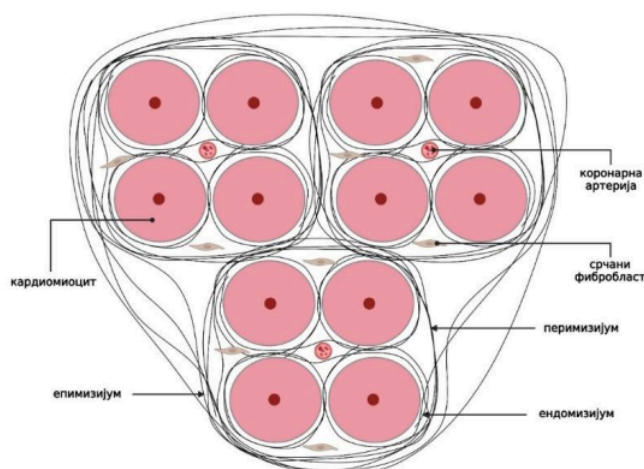
Упркос чињеници да HFrEF и HFpEF имају заједничке факторе ризика и коморбидитете, ова два стања се значајно разликују у неколико патофизиолошких аспеката (Слика 8). HFrEF и HFpEF показују различите профиле системске инфламације, ремоделовања и крутости миокарда. HFrEF је често повезана са дисфункцијом ендотела, хипертрофијом миокарда и смрћу кардиомиоцита, док се HFpEF карактерише већом крутошћу миокарда, која је последица фиброзе, промене титина и дисбаланса калцијума у миокарду (50). Ове разлике у патофизиологији су у основи различите клиничке презентације и потребе за специфичним стратегијама лечења.



Слика 8. Патофизиолошке разлике пацијената са HF_rEF и HF_pEF.

1.6.1. Процеси фиброзе и ремоделовања леве коморе у срчаној инсуфицијенцији

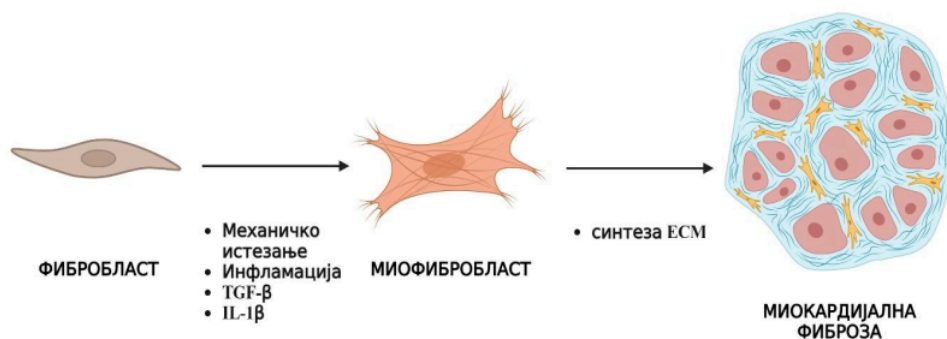
Кардиомиоцити су окружени интерстицијалном мрежом екстрацелуларног матрикса (енгл. *Extracellular matrix* - ECM), који је претежно сачињен од фибриларног колагена. ECM представља механички стабилну структуру која обавља кључну улогу у очувању систолне и дијастолне функције срца, као и у регулацији контрактилне силе кардиомиоцита. Овај матрикс се састоји од три основне компоненте: ендомизијума, перимизијума и епимизијума, који су распоређени око миофбриларних снопова и коронарне васкулатуре (Слика 9). Ендомизијум окружује и међусобно повезује суседне кардиомиоците, перимизијум одваја и групише кардиомиоците, док епимизијум окружује и групише велики број миофбрила (56). Поред ових компоненти, ECM садржи и бројне гликопротеине, гликозаминогликане, протеогликане и солубилне факторе (57).



Слика 9. Схематски приказ мреже срчаног интерстицијумског колагена.

У физиолошким условима, ЕСМ се претежно састоји од дебљег колагена тип I, који чини око 85% колагених влакана, док је колаген тип III тањи и има га мање, око 11% (56). Са друге стране, колаген IV и V улазе у састав срчаног мишића у веома малом проценту (56). Главне ћелије које учествују у одржавању хомеостазе ЕСМ-а су миофибробласти и активирани миофибробласти. Ове ћелије синтетишу колаген као солубилни проколаген са N- и C-терминалним пропептидним регионом који онемогућава инсолубилну депозицију (58). Такође, миофибробласти су један од доминантних извора матриксних металопроотеиназа (енгл. *Matrix Metalloproteinases* - MMPs), цинк (Zn)-зависних ендопептидаза одговорних за разградњу протеина у матриксу (58) које су укључене у депозицију колагена и про-фибротску сигналну каскаду (59).

Развој фиброзе заправо представља акумулацију ожиљног ткива у срцу, што је последица неусклађене производње и разградње ЕСМ-а (60). Патолошки стресори, као што су старење, оштећење миокарда или оптерећење притиском леве коморе изазивају значајне промене у ЕСМ-у. Ови стресори изазивају повећано стварање фиброзног ткива у миокарду, што резултира прекомерном агрегацијом ЕСМ-а од стране миофибробласта (Слика 10) (61).



Слика 10. Прелаз фибробласта у миофибробласт и развој фиброзе миокарда.

Фиброза и ремоделовање леве коморе имају дубоке последице по срчану функцију и клиничке исходе код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом. Акумулација фиброзног ткива у миокарду леве коморе резултује губитком функционалности ткива миокарда и смањењем контрактилности, што ограничава способност срца да ефикасно „пумпа” крв. У HFrEF, фиброза миокарда углавном настаје услед губитка кардиомиоцита и изазива систолну дисфункцију леве коморе. Одговорни механизми за овај процес укључују губитак фибриларног колагена, који обично пружа структурну подршку, што нарушава способност кардиомиоцита да се ефикасно контрахују. Тиме се ремете интеракције између ендомизијалних компоненти које повезују суседне кардиомиоците и капиларе, као и њихових рецептора. Овај поремећај у структури ЕСМ-а нарушава масу кардиомиоцита и систолну резерву срца, доприносећи погоршању срчане функције и напредовању срчане инсуфицијенције. У HFrEF-у, прекомерно таложење колагена и смањење заступљености флексибилнијег колагена тип III повећава крутост миокарда (50), што доприноси настанку дијастолне дисфункције, главног обележја овог стања (62).

Поред повећаног нагомилавања колагена, ефекти фиброзе миокарда такође зависе и од локализација фиброзних депозита. Наиме, периваскуларна фиброза настаје као одговор на стварање профибротских медијатора, као што је трансформишући фактор раста- β (енгл. *Transforming Growth Factor* - β - TGF- β), који се производе од стране имунских ћелија у близини васкуларне мреже. Овај фибротски процес је последица системске и миокардијалне инфламације и у HFrEF-у и у HFpEF-у, мада је израженији у HFpEF-у. У срчаној инсуфицијенцији интерстицијална фиброза се карактерише експанзијом ЕСМ-а, која није праћена значајним губитком кардиомиоцита, што је типично за HFrEF не-исхемијске етиологије и HFpEF (50). Описана су три кључна сигнална пута која имају важну улогу у процесу фиброзе:

1. **Митогеном-активирани протеинске киназе** (енгл. *Mitogen-Activated Protein Kinases* - MAPKs) које укључују активацију c-Jun NH2-терминалних киназа (енгл. *c-Jun NH2-terminal kinases* - JNKs), p38MAPKs и екстрацелуларну сигналом-модулирану киназу. Ови системи киназа посредују у сигнализацији између ћелија, било да су иницирани спољашњим факторима, као што су фактори раста и цитокини, или унутар саме ћелије.

2. **TGF- β** , сигнални молекул који значајно утиче на регулацију кључних ћелијских функција, укључујући пролиферацију, диференцијацију, апоптозу и преживљавање.

3. **Интегрине**, комплексне мембранске рецепторе који су састављени од α и β субјединица и налазе се на површини готово свих типова ћелија, осим еритроцита. Они играју кључну улогу у везивању ћелија за ЕСМ, као и у активацији сигналних путева унутар ћелије који су од виталног значаја за фиброгенезу. Интегрини често „сарађују” са интрацелуларним киназама, што координира њихову улогу у одржавању хомеостазе и одговору на стресне стимулусе (63).

Ремоделовање леве коморе које настаје услед оштећења и губитка кардиомиоцита у HFrEF узрокује промене у структури зида миокарда, што резултира ексцентричним ремоделовањем и дилатацијом леве коморе уз очувану дебљину зида. Насупрот томе, пацијенти са HFpEF имају концентричну хипертрофију кардиомиоцита, која се карактерише задебљањем зида леве коморе. Ове разлике у ремоделовању миокарда између HFrEF и HFpEF највероватније су последица структурних разлика у самим кардиомиоцитима. Код пацијената са HFrEF, кардиомиоцити су тањи и издуженији, са нижом миофибрилном густином и смањеном пасивном крутошћу, што је утврђено током биопсије миокарда. Различити коморбидитети такође утичу на разлике у структури миокарда. Код пацијената са HFpEF, ДМТ2 доприноси израженијој

хипертрофији леве коморе него што је то случај код пацијената са HFrEF. Увећање димензија кардиомиоцита код пацијената са HFpEF корелира са нижом активношћу протеин-киназе G (енгл. *Protein kinase G* - PKG) и нижом концентрацијом цикличног гуанозин монофосфата (енгл. *Cyclic guanosine monophosphate* - cGMP). Са друге стране, код пацијената са HFrEF, вредности вазопротективног хормона инсулину-сличног фактора раста 1 (енгл. *Insulin-like Growth Factor 1* - IGF-1), који стимулише контрактилност миокарда, су снижени. Ове разлике на целуларном нивоу доприносе појави различитих типова хипертрофије миокарда код пацијената са HFrEF и HFpEF (50).

1.6.2. Интеракција оксидационог стреса, инфламације и апоптозе у развоју срчане инсуфицијенције

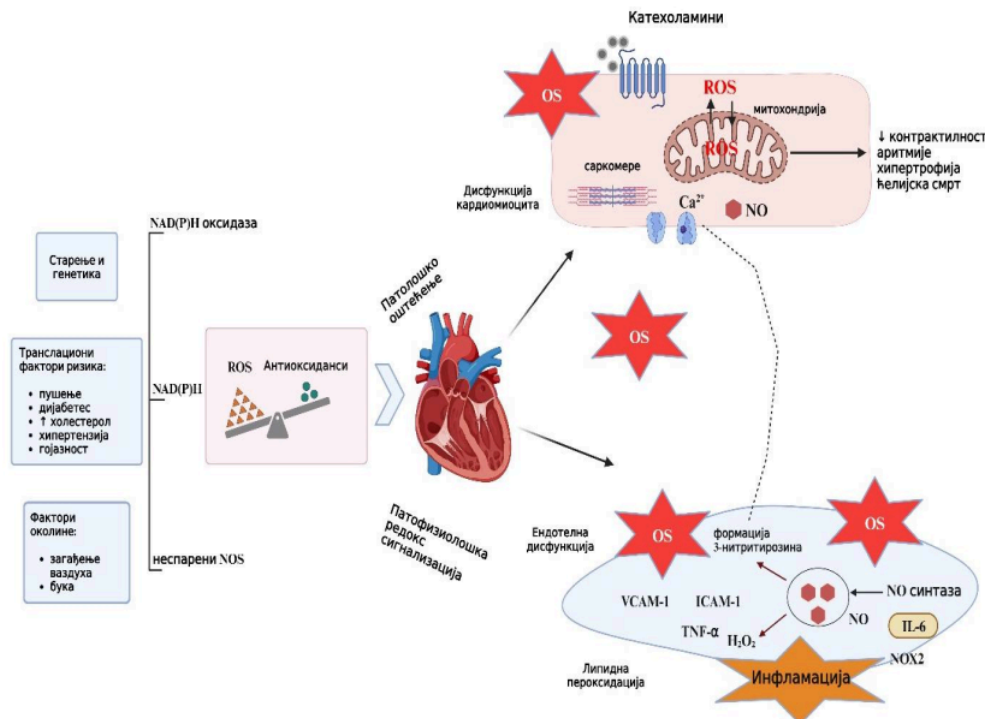
Оксидациони стрес је стање које произилази из неравнотеже између стварања реактивних кисеоничних врста (енгл. *Reactive Oxygen Species* - ROS) и способности организма да им се супротстави кроз антиоксидационе механизме заштите, чиме се нарушава редокс равнотежа (64). ROS представљају молекуле, јоне или атоме, који у својој структури поседују један или више неспарених електрона. Ове честице кисеоника настале су као нуспроductи метаболизма кисеоника и одликују се великом реактивношћу и нестабилношћу. ROS укључују слободне радикале, као што су супероксид анјон радикал (O_2^-) и хидроксил радикал ($-OH$), и нерадикалске реактивне врсте који имају способност да стварају слободне радикале, као што је водоник пероксид (H_2O_2) (65). У физиолошким концентрацијама, ROS имају важну улогу у ћелијској хомеостазу, док њихова прекомерна продукција узрокује ћелијску дисфункцију, оштећење макромолекула и, коначно, оштећење и смрт ћелија (64).

Претходна експериментална и клиничка истраживања указала су на значајну улогу оксидационог стреса у развоју и прогресији срчане инсуфицијенције. Прекомерно стварање ROS-а у срчаном мишићу може подстаћи развој и напредовање ремоделовања миокарда и срчану слабост. ROS имају значајан утицај на електрофизиологију и контрактилну функцију кардиомиоцита. Оне модификују кључне протеине који учествују у процесу који повезује екситацију и контракцију кардиомиоцита.

Показано је да постоји несумњива веза између дисфункције митохондрија и оксидационог стреса (Слика 11) (66). Срчани мишић има високе енергетске потребе које се морају задовољити да би се одржала правилна контрактилна функција и одговарајући јонски баланс. Митохондрије су од суштинског значаја за ћелијску физиологију, јер синтетишу АТФ у транспортном ланцу електрона (енгл. *Electron Transport Chain* - ETC). С обзиром на овако велике енергетске захтеве, митохондрије чине чак 30–40% волумена појединих кардиомиоцита. У условима нормоксије, 60–90% АТФ-а миокарда се производи оксидацијом масних киселина, док преосталих 10–30% АТФ-а настаје гликолизом или употребом лактата, аминокиселина и/или кетонских тела (67). ROS најчешће настају у митохондријама као резултат феномена познатог као „цурење” слободних радикала. Поред митохондрија, други извори ROS-а укључују мијелопероксидазе (енгл. *Myeloperoxidase* - MPO), ксантин оксидазе (енгл. *Xanthin oksidase* - Xo) и неспарене нитрит оксид синтетазе (енгл. *Nitric oxide synthases* - NOS), липоксигеназе и никотинамид аденин динуклеотид фосфат (енгл. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* - NADPH) оксидазе.

ROS које садрже азот познате су као реактивне азотне врсте (енгл. *Reactive Nitrogen Species* - RNS) и имају значајну улогу у патогенези КББ. Под утицајем

егзогенних фактора као што су ултраљубичасто зрачење, изложеност ксенобиотицима, полутантима и пушење цигарета, такође долази до формирања ROS-а (68). Ове ROS могу изазвати низ патолошких промена у ћелијама, укључујући енергетски дефицит и пролиферацију миофибробласта. Поред тога, ROS утичу на активност MMPs, што додатно доприноси екстрацелуларном ремоделовању (64).



Слика 11. Оксидациони стрес у срчаној инсуфицијенцији: механизми и извори.

У физиолошким условима, антиоксидациони системи су задужени за деградацију ROS-а, и то активношћу ензима, као што су супероксид дизмутаза (енгл. *Superoxide dismutase* - SOD), глутатион пероксидаза (енгл. *Glutathione peroxidase* - GPx) и каталаза (енгл. *Catalase* - CAT), као и других неензимских антиоксиданаса (65). Међутим, активност ових антиоксидационих механизма прогресивно опада у условима срчане инсуфицијенције која је настала као последица АИМ (65). Иако су бројни антиоксидациони третмани показали обећавајуће резултате у експерименталним студијама са анималним моделима, њихова примена код пацијената са АИМ и срчаном инсуфицијенцијом представља велики изазов (67).

У бројним изворима литературе описана је несумњива веза између оксидационог стреса и инфламације у патогенези срчане слабости. Повећана продукција ROS-а у условима исхемијско/реперфузионе повреде (енгл. *Ischaemia-Reperfusion injury* - IRI) миокарда активира запаљенски одговор, као и циркулишуће инфламацијске ћелије и прогениторе фибробласта различитим механизмима. Проинфламацијски цитокини и ROS узрокују повећано депоновање колагена, чиме се ствара фиброзно ткиво и настаје прогресивно ремоделовање и дисфункција леве коморе. Године 1990., показано је да пацијенти са HFrEF имају повишене вредности проинфламацијских цитокина у крви, као што је фактор некрозе тумора (енгл. *Tumor necrosis factor* - TNF), у поређењу са здравом популацијом. Ово је био један од најранијих показатеља инфламацијске

реакције код пацијената са хроничном срчаном инсуфицијенцијом (69). У HFrEF-у, инфламацијска реакција настаје као одговор на „индексни” догађај и услед периферне хиперперфузије ткива (70). У одмаклим стадијумима HFrEF-а, уочене су повишене вредности TNF и интерлеукина (IL-) 6 у плазми, што је корелирало са вишом NYHA класом (71) и сниженом EF код ових пацијената (72).

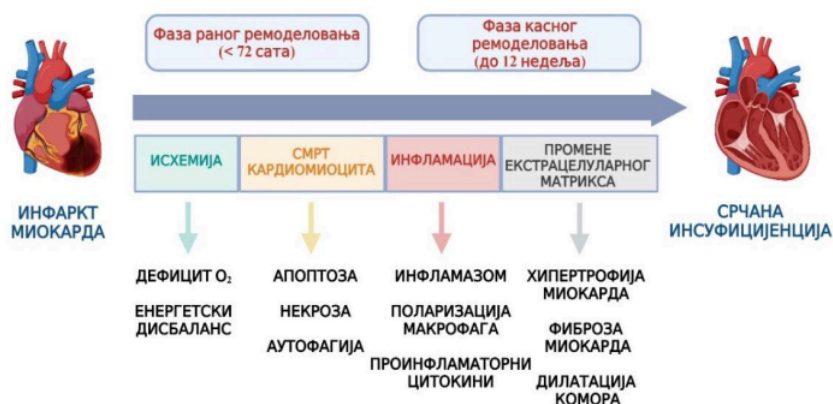
Након оштећења миокарда, урођени имунски систем активира инфламацијски одговор, који иницијално има цитопротективне ефекте, обезбеђујући краткотрајну адаптацију срца на повећан стрес (тзв. **физиолошка инфламација**). Међутим, овај инфламацијски одговор може постати нерегулисан и довести до хроничног инфламацијског процеса, који узрокује дисфункцију и ремоделовање леве коморе у срчаној инсуфицијенцији (69). Инфламација може да изазове изумирање кардиомиоцита и проширења оштећења ткива миокарда након АИМ. Ипак, ангиогене и регенеративне реакције имунског система подстичу резолуцију инфламације и регенерацију оштећеног срчаног ткива. Имунске ћелије уклањају некротично ткиво и стварају повољне услове за миграцију, пролиферацију и диференцијацију фибробласта и ендотелних ћелија. Ови процеси су неопходни за реконструкцију ЕСМ-а, неоваскуларизацију, формирање ожиљног ткива, и на крају, опоравак срчаног мишића (73).

Класичан имунски одговор у пост-инфарктном ремоделовању пролази кроз неколико фаза (**Слика 12**):

1. **Рана инфламацијска фаза** (првих 72 сата након АИМ) се одликује повећаном продукцијом проинфламацијских цитокина и хемокина, уз брзу миграцију неутрофила и моноцита из циркулације на место оштећења миокарда (69). Током ове фазе активирају се процеси који су неопходни за одржавање минутног волумена леве коморе и нормализацију напрезања зида миокарда. Као коначан исход ове фазе настаје разградња ЕСМ-а и фагоцитоза изумрлих кардиомиоцита, познате као ефероцитоза (73).

2. **Касна фаза репарације и пролиферације** (7-10 дана након „индексног” догађаја) се одликује уклањањем некротичних ћелија фагоцитозом од стране макрофага, миграцијом Т и В ћелија, активацијом миофибробласта који продукују колаген и стварањем антиинфламацијских медијатора, као што су липоксини, TGF- β и IL-10. У овој фази се стварају услови за репарацију оштећеног и формирање ожиљног ткива, док здрави делови миокарда активно учествују у процесу касног ремоделовања. Циљ формирања ожиљног ткива јесте спречавање руптуре и погоршања функције миокарда.

3. **Фаза сазревања** се карактерише сазревањем ожиљка и деактивацијом и/или одумирањем репаративних ћелија, што доводи до ремоделовања леве коморе (69). Током ове фазе, структура ожиљка се стабилизује, а функција миокарда се постепено враћа, али често са дугорочним структурним и функционалним променама.

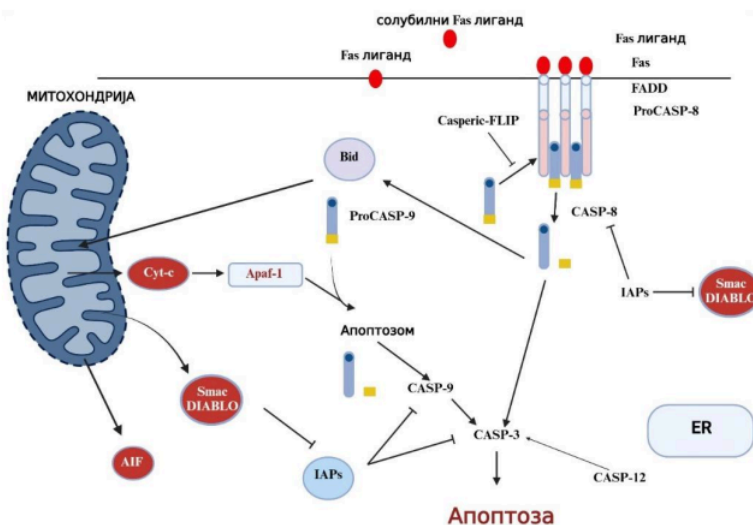


Слика 12. Фазе и главне патолошке промене у пост-инфарктном ремоделовању миокарда.

У HFrEF, инфламацијски одговор произилази из директног оштећења кардиомиоцита, а не као последица присуства системских коморбидитета. Са друге стране, HFpEF је превасходно резултат интеракције бројних фактора ризика који наивају хроничне системске инфламације ниског степена. Ова хронична инфламација узрокује настанак микроваскуларних оштећења и нарушавање функције миокарда, што доприноси развоју и напредовању HFpEF (74). У овом случају, инфламацијски процес произилази из сложене интеракције различитих метаболичких и инфламацијских екстракардијалних фактора ризика, као што су ДМТ2, анемија, хипертензија, ХОБП, аутоимунске болести и бубрежна инсуфицијенција.

Апоптоза је строго регулисан биолошки процес који управља равнотежом између сигнала за ћелијску смрт и сигнала за преживљавање, и одређује судбину ћелије (75). Код пацијената са HFrEF, губитак кардиомиоцита настаје услед различитих механизма ћелијске смрти, укључујући апоптозу, некрозу, некроптозу или аутофагију, у зависности од основног узрока. Некроза, као један од процеса који доприносе губитку кардиомиоцита у HFrEF (76), често је последица инфламације (77). Иако је одумирање кардиомиоцита типично за HFrEF, истраживања су показала да иако у HFrEF путеви апоптозе и аутофагије изазивају увек до ћелијску смрт, они могу значајно да утичу на развој хипертрофије и крутости кардиомиоцита у овом стању (50).

Апоптоза настаје услед каскаде субћелијских догађаја, укључујући ослобађање цитохрома С у цитоплазму и активацију протеолитичких каспаза (енгл. *Caspases* - *CASP*s) и изазива прогресију срчане слабости (78). У процесу апоптозе, кључну улогу имају *CASP*s, група протеаза усмерених на цистеинил-аспартат. У здравим ћелијама, *CASP*s су присутне као неактивне проформе у цитосолу, а углавном се активирају протеолитичким цепањем. Активирани *CASP*s цепају виталне супstrate у ћелији, што доводи до њеног пропадања. У миокарду, *CASP*s супstrати укључују α -актин, α -актинин, α/β миозин тешког ланца, миозин лаког ланца 1/2, тропомиозин и срчане тропонине (енгл. *Cardiac troponins* – *cTn*). Цепање ових кључних молекула за ћелијску функцију се врши помоћу *CASP*-3, -6 и -7, које се називају *CASP*s „делати“ (енгл. *executioner*) (79). Пренос апоптотских сигнала у ћелијама сисара, укључујући и кардиомиоците врши се помоћу два главна пута, интринзичног и екстринзичног. Главну улогу у интринзичком путу остварују митохондрије (Слика 13), док је крајњи исход оба пута активација „делатских“ *CASP*s.



Слика 13. Главни путеви процеса апоптозе у ћелијама сисара.

Оксидациони стрес је један од стимулуса који активира интринзички пут, који се примарно активира у кардиомиоцитима (79). Литературни подаци указују на то да фактор туморске супресије p53 (p53) има важну улогу ембрионалном и постнаталном развоју срца, док повећани нивои p53 имају значајну улогу у патогенези бројних КВБ, укључујући срчану инсуфицијенцију (80). Фамилија Bcl-2 (енгл. *B-cell lymphoma 2*) протеина је позната по регулацији апоптозе преко интеракције са митохондријским мембранама (81). Оксидациони стрес активира интринзичку каскаду различитим механизмима, укључујући повећање транслокације p53, као и чланова Bcl-2 фамилије, Бах (енгл. *BCL-2-associated X*) и Bad (енгл. *Bcl-2-associated agonist of cell death*) протеина у митохондрије. Ова транслокација доводи до ослобађања цитохрома C и активације CASPs (82).

1.6.3 Улога JAK2/STAT3 сигнале каскаде у кардиоваскуларним болестима и срчаној инсуфицијенцији

Јанус киназе (енгл. *Janus kinase* - JAK) представљају фамилију интрацелуларних нерецепроских тирозин-киназа, које су првобитно добиле назив „само још једна киназа” (eng. *Just Another Kinase*). Убрзо након открића, ови ензими су преименовани у „Јанус киназе” по римском богу Јанусу, који је приказан са два лица, због своје јединствене структуре која обухвата два сродна домена за пренос фосфата - један са активном киназном функцијом и други који делује као негативни регулатор, односно инхибитор првог. До данас су идентификована четири JAK протеина, и то JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2, који су укључени у сигнале процесе посредоване различитим цитокинима, што их чини централним актерима у регулацији имунског одговор и других виталних биолошких процеса (83).

Чланови породице протеина преносилаца сигнала и активатора транскрипције (енгл. *Signal Transducer and Activator of Transcription* - STAT) представљају интрацелуларне транскрипционе факторе који имају кључну улогу у регулацији ћелијског имунитета, раста, програмиране ћелијске смрти и диференцијације. До сада је идентификовано седам чланова ове породице, и то STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b и STAT6. Ови протеини се активирају у одговору на различите

комбинације цитокина и фактора раста, при чему је посредовање JAK протеина од суштинског значаја. Активација STAT протеина зависи од њихове интеракције са рецепторским комплексима, који садрже две комбинације JAK протеина, као и бројне цитокине, хормоне раста или факторе раста (84).

Сигнализација преко JAK-STAT пута започиње када се цитокин веже за одговарајући рецептор, што доводи до промена у цитоплазматском делу рецептора и активације JAK протеина везаних за њега. Потом, активирани JAK протеини фосфорилишу специфичне тирозинске остатке на рецептору, који служе као места везивања за STAT протеине и друге сигналне молекуле. STAT протеини се затим фосфорилишу, димеризују, прелазе у једро и везују се за специфичне регулаторне секвенце ДНК, што омогућава транскрипцију гена који учествују у процесима раста, диференцијације и апоптозе (85).

Улога JAK-STAT сигнализације у физиологији и патофизиологији KB система остаје недовољно изучена, иако су открића из ове области указала на посебан значај STAT1 и STAT3 протеина. Познато је да одређени стимулуси који посредују у хипертрофији кардиомиоцита и/или кардиопротекцији уједно активирају и JAK-STAT сигнални пут у миокарду (86). JAK-STAT сигнализацију активирају механичко истезање, оптерећење притиском и ИМ (86), а активација ове сигналне каскаде регистрована је и код пацијената у завршним стадијумима дилатационе кардиомиопатије (87). Истраживања показују да JAK/STAT3 пут има кључну улогу у процесу фиброзе, који се може активирати различитим про-фибротичким медијаторима као што су TGF- β 1, фактор раста који потиче из тромбоцита (енгл. *Platelet-Derived Growth Factor* - PDGF, васкуларни ендотелни фактор раста (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor* – VEGF), IL-6, ангиотензин II (енгл. *Angiotensin II* - Ang II), серотонин (5-HT) и ентоделин (ET-1). На овај начин, активација овог сигналног пута стимулише активацију фибробласта и експресију гена повезаних са фиброзом, укључујући α -актин глатке мишићне ћелије (енгл. *Alpha Smooth Muscle Actin* - α -SMA), колагене и фибронектин, и подстиче експресију хипоксијског фактора транскрипције 1 α (енгл. *Hypoxia-inducible factor 1 α* - HIF-1 α), транскрипционог фактора који стимулише производњу ECM-а. Такође, STAT3 може покренути епително-мезенхималну транзицију, процес у којем епителне ћелије стичу карактеристике мезенхималних ћелија, што доприноси прогресији фиброзе (88). У својој студији, *Huo* и његови сарадници су показали да инхибиција IL6/gp130/STAT3 сигнализације код мишева са срчаном инсуфицијенцијом ублажава ремоделовање и дисфункцију миокарда (89). Поред тога, код мишева са дилатационом кардиомиопатијом, показано је да елиминација IL-6 доводи до смањене фосфорилације STAT3 у ткиву миокарда, што је смањило степен ремоделовања миокарда (90). Сходно томе, активација JAK/STAT3 пута може допринети повећању фибротских ефекторских ћелија и таложењу ECM-а, што овај сигнални пут чини потенцијалном метом за антифибротску терапију (88).

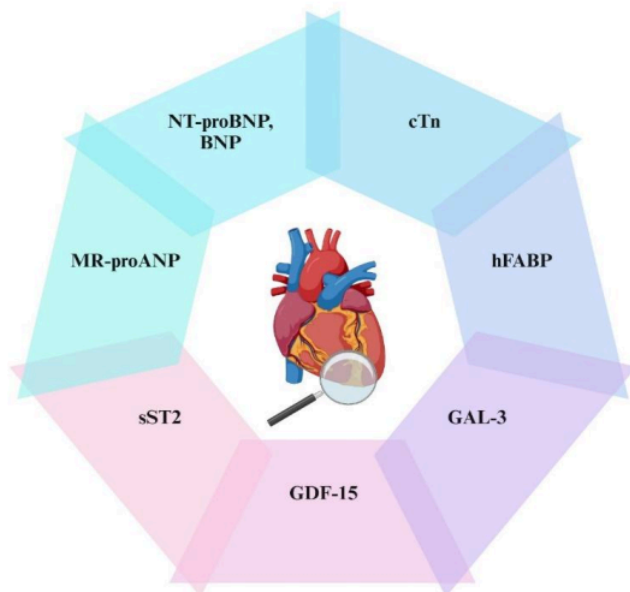
1.7. ДИЈАГНОСТИЧКИ ПОТЕНЦИЈАЛ БИОМАРКЕРА ИЗ КРВИ У СРЧАНОЈ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈИ

Према Радној групи за дефиниције биомаркера Националног института за здравље (енгл. *Biomarkers Definitions Working Group*), биомаркер је „карактеристика која се објективно мери и вреднује као индикатор нормалних биолошких процеса, патогених процеса или фармаколошких одговора на терапијску интервенцију” (91). Биомаркери су од суштинске важности у клиничкој пракси, јер омогућавају лакше дијагностиковање болести, праћење њеног напредовања и процену одговора на

терапију. *Tijssen* и сарадници истичу да би идеалан биомаркер требало да има одређене карактеристике, као што су (92):

- једноставно и неинвазивно сакупљање,
- висок степен осетљивости и специфичности,
- ниска цена,
- једноставност поновљивости, и
- систем брзог мерења.

Срчана инсуфицијенција представља мултисистемско стање које захтева сложен приступ у дијагностици, те су биолошки маркери који се примењују као прилично поуздано дијагностичко средство овог синдрома од посебног значаја (Слика 14).



Слика 14. Биомаркери срчане инсуфицијенције.

Данас се натриуретски пептиди сматрају најзначајнијим биомаркерима за дијагностику срчане инсуфицијенције, праћење њеног тока и ефикасности примењене терапије (93). Према ESC (1) и ACCF/AHA (23) смерницама за дијагностику и лечење срчане инсуфицијенције, два најважнија натриуретска пептида су:

- **Натриуретски пептид В-типа** (енгл. *Brain natriuretic peptide* - BNP) и
- **Н-терминални проВ-тип натриуретски пептид** (енгл. *N-terminal pro B-type natriuretic peptide* - NT-proBNP).

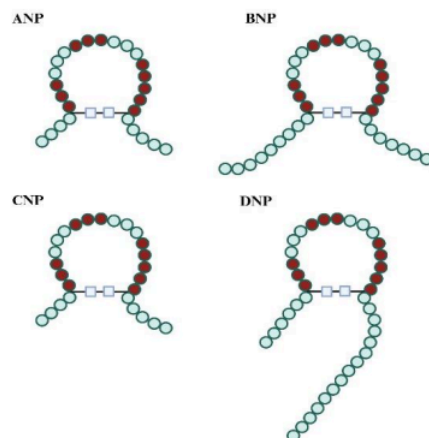
Поред натриуретских пептида, cTn су такође кључни биомаркери који се користе у алгоритму за постављање дијагнозе срчане инсуфицијенције. Додатно, постоје и други биомаркери који се користе за дубље разумевање срчане инсуфицијенције и процену различитих аспеката болести, као што су маркери инфламације, оксидационог стреса и ремоделовања миокарда (23).

1.7.1. Маркери оштећења кардиомиоцита

У срчаној инсуфицијенцији, биомаркери имају кључну улогу у превенцији, дијагностици и праћењу терапијског одговора. Као што је већ напоменуто, најзначајнији биомаркери који се користе за процену оштећења кардиомиоцита и функције срца укључују BNP, NT-proBNP и cTn. Повишени нивои ових биомаркера у циркулацији указују на присуство и степен оштећења миокарда, што олакшава стратификацију ризика и планирање терапије код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом.

1.7.1.1. Систем натриуретских пептида

Натриуретски пептиди представљају групу биоактивних пептида, међу којима су атријални натриуретски пептид (енгл. *Atrial natriuretic peptide* - ANP), мождани или натриуретски пептид В-типа (енгл. *Brain natriuretic peptide* - BNP), натриуретски пептид С-типа (енгл. *C-type natriuretic peptide* - CNP) (95) и *dendroaspis* натриуретски пептид (енгл. *Dendroaspis natriuretic peptide* - DNP) (Слика 15) (96).



Слика 15. Натриуретски пептиди.

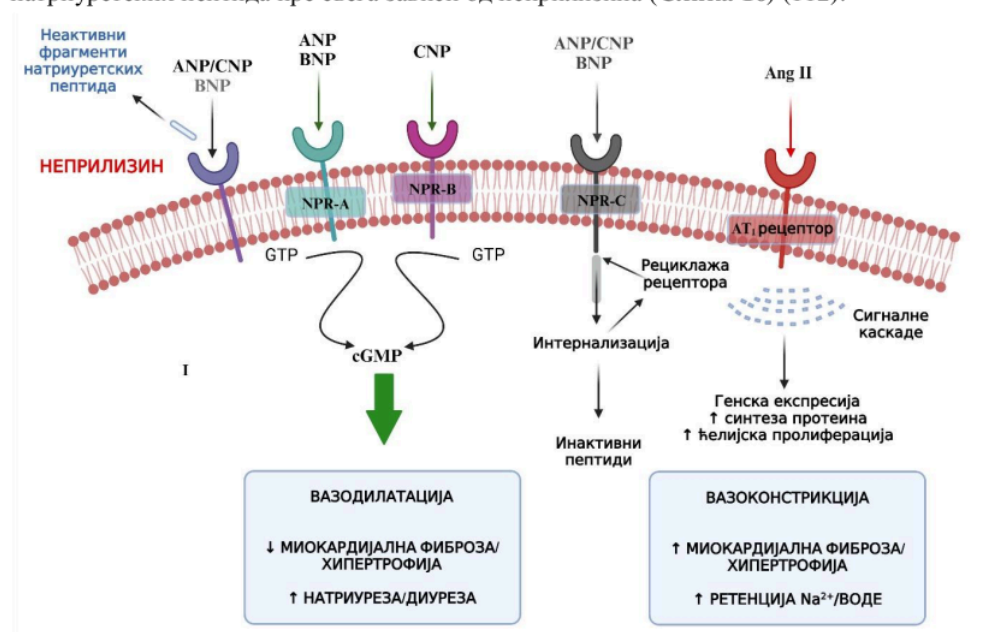
Прва истраживања натриуретских пептида датирају још из 1980.-тих година када су прва открића показала значајно повећање диурезе и натриурезе код пацова код којих је примењен екстракт из ткива преткомора ових глодара (97). ANP, као први откривен члан ове породице, изолован је из животињских и људских преткомора (98, 99). BNP је касније откривен у екстрактима можданог ткива свиња (100), али се у коморама срца пацијената са срчаном инсуфицијенцијом налази у највећој концентрацији (101, 102). CNP је такође првобитно идентификован у свињском можданом ткиву, а касније је утврђено да га углавном излучују ћелије мозга, хондроцити и ендотелних ћелија (103).

Натриуретски пептиди се синтетишу као пре-прохормони и подлежу конверзији у своје активне форме. Њихова активација и биолошки ефекти су повезани са специфичним рецепторима - натриуретски пептидни рецептор (енгл. *Natriuretic Peptide Receptor* - NPR)-А, В (NPR-B) и С (NPR-C). Ови рецептори имају важну улогу у бројним сигналним каскадама, које укључују регулисање вазодилатације, натриурезе, диурезе и инхибицију RAAS-a, ендотелина и вазопресина (104, 105). ANP и BNP се примарно везују за NPR-A, CNP за NPR-B, док сва три пептида показују могућност везивања за NPR-C (106), који функционише као рецептор за њихову разградњу (107). Описана су два главна механизма за разградњу натриуретских пептида, и то:

1. Интернализација посредована са NPR-C и лизозна деградација (107, 108)

2. Деградација ензимом непротирином, Zn-зависном металопротеиназом.

Деградација непротирином је широко заступљена у различитим ткивима, као што су ендотелно и епително ткиво, глатке мишићне ћелије, кардиомиоцити, адипоцити и панкреасна острвца (109). Поред разградње натриуретских пептида, непротирин је основни ензим за деградацију бројних других вазоактивних пептида са различитим физиолошким улогама (са вазодилаторним или вазоконстрикторним ефектом) у КВ систему. Овај ензим показује велики афинитет према ANP-у, CNP-у, ангиотензину I и II, док најнижи афинитет показује према BNP-у, ендотелину-1 и брадикинину (110). У физиолошким условима, метаболизам непротирина има незнатан утицај на разградњу натриуретских пептида, за разлику од NPR-C, рецептора који је примарно одговоран за њихову разградњу. Међутим, у патолошким условима, када је повишен ниво циркулишућих натриуретских пептида, рецептор NPR-C постаје засићен и не може адекватно да разгради све присутне пептиде (111). Према томе, разградња натриуретских пептида пре свега зависи од непротирина (Слика 16) (112).



Слика 16. Схематски приказ механизма дејства непротирина, натриуретских пептида и ангиотензин тип I рецептора.

Улоге натриуретских пептида у организму су бројне и разноврсне. Поред основне улоге у одржавању хомеостазе крвног притиска, они испољавају антифибротске, антихипертрофске, антиинфламаторне и лузитропне ефекте, као и инхибицију симпатичког нервног система (енгл. *Sympathetic Nervous System* - SNS) и RAAS-a (113, 114).

1.7.1.1.1. BNP и његов активни терминални фрагмент - NT-proBNP

Као што је раније наглашено, натриуретски пептиди су значајни биомаркери за дијагностику и прогнозу срчане инсуфицијенције, а посебно BNP и његов активни терминални фрагмент, NT-proBNP. Вредности NT-proBNP у плазми расту као одговор

на повећани стрес у КВ систему и сматрају се кључним индикаторима за дијагнозу, предикцију тежине и прогнозу срчане инсуфицијенције (1, 23). Међутим, са порастом нивоа натриуретских пептида у конгестивној срчаној инсуфицијенцији, протективни ефекти ових молекула се значајно смањују због доминације SNS и RAAS, који доприносе погоршању стања пацијента (115).

Натриуретски пептиди су биомаркери који су највише истраживани за процену прогнозе пацијената са акутном и хроничном срчаном инсуфицијенцијом. Иницијално повишене вредности BNP-а указују на лошију прогнозу ових пацијената, са петоструко већим ризиком од морталитета између вредности највишег и најнижег терцила (116). У студији PARADIGM-HF (енгл. *Prospective Comparison of ARNI with angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEi) to Determine Impact on Global Mortality and Morbidity in Heart Failure*), снижење нивоа NT-proBNP-а код пацијената са HFrEF је било повезано са нижом стопом КВ морталитета и хоспитализације услед срчане инсуфицијенције (117). Аутори су показали да третман сакубитрил/валсартаном доводи до раног пораста концентрације BNP у циркулацији, док су нивои NT-proBNP остали непромењени. Према томе, употреба биомаркера NT-proBNP значајнија у овој патологији, јер се његовом применом избегава могућа клиничка конфузија (118).

Према ESC и ACCF/AHA смерницама за лечење срчане инсуфицијенције, одређивање натриуретских пептида за дијагнозу срчане инсуфицијенције има највишу класу (I) и ниво препорука (A) (1, 23). BNP, а посебно NT-proBNP, имају кардиоспецифичну биолошку функцију, те из тог разлога представљају златни стандард за дијагностику срчане инсуфицијенције (119).

1.7.1.1.2. Средњи регион прохормона атријалног натриуретског пептида

ANP има кратак полуживот, док N-терминална форма прохормона ANP (енгл. *N-terminal-proANP* - NT-proANP) иако стабилна, лако подлеже деградацији (119). Због тога се као дијагностички биомаркер у срчаној инсуфицијенцији користи средњи регион NT-proANP (енгл. *mid-region proANP* - MRproANP), који је мање подложен протеолитичкој деградацији (119). Повишен ниво MR-proANP код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом је повезан са сниженим физичким и менталним квалитетом живота пацијената, док је повишен ниво NT-proBNP повезан са сниженим физичким квалитетом живота (120). Серијска мерења MR-proANP пружају најбољу прогностичку тачност, чак независно од вредности NT-proBNP (121). С обзиром на наведене чињенице, MR-proANP би могао да послужи као прецизан прогностички биомаркер подједнако као NT-proBNP код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (119).

1.7.1.2. Срчани тропонини

Тропонински комплекс се састоји од три структурна протеина: тропонина C (TnC), тропонина T (TnT) и тропонина I (TnI), који су локализовани на танким филаментима контрактилног апарата миокарда. У процесу контракције миокарда најважнију улогу имају TnI и TnT, јер посредују у интеракцији између контрактилних миофиламената, актина и миозина (122). За разлику од TnC, који је експримиран у срчаном и скелетном мишићу, TnI и TnT су специфични за срчани мишић (123), што их чини високо специфичним показатељима оштећења миокарда (124). Иако су нивои cTn често повишени код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (116), ови биомаркери нису специфични за овај синдром, јер њихова повишена концентрација у крви може бити присутна и код других стања. Повишени нивои cTn се детектују у

серуму током различитих обољења која доводе до оштећења миокарда, као што су акутни коронарни синдроми (енгл. *Acute Coronary Syndrome* - ACS), миокардитис, срчана инсуфицијенција или плућна емболија (125). Са друге стране, одређивање концентрације cTn у крви сматра се корисним за ону популацију пацијената која поред ACS има и срчану слабост (126).

Високи нивои cTn на почетку лечења повезани су са лошијом прогнозом пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (127). Понављана мерења високо-сензитивних cTn (енгл. *high sensitivity TnI and TnT* - hs-TnI, hs-TnT) током хоспитализације су корисна за стратификовање ризика од 90-дневног морталитета и поновне хоспитализације (128). Пацијенти код којих су вредности cTn биле повишене на отпуста у поређењу са вредностима при пријему имали су највећи ризик за лош исход (129). Резултати COACH студије (енгл. *the Coordinating Study Evaluating Outcomes Of Advising And Counselling In Heart Failure*) указују да су високе вредности cTn повезане са повишеним ризиком од морталитета и поновне хоспитализације током првих 18 месеци (130). Пацијенти са HFrEF и највишим вредностима hs-TnT имали су 3 до 5 пута већи ризик од КВ смрти и хоспитализације због срчане инсуфицијенције у поређењу са пацијентима са нормалном концентрацијом ових биомаркера у крви (131).

Као и NT-proBNP, cTn су кардиоспецифични биомаркери, а напредак у развоју високо и ултра-високо сензитивних есеја значајно је побољшао могућност њихове детекције (119). Прогностички значај cTn је већи када се одређују у комбинацији са натриуретским пептидима (132). Према томе, ESC и ACCF/AHA смернице за дијагностику и лечење пацијената са срчаном инсуфицијенцијом препоручују одређивање cTn заједно са натриуретским пептидима на пријему, да би се утврдило да ли је ACS узрок акутне срчане инсуфицијенције, као и да би се утврдила прогноза ових пацијената (1, 23).

1.7.1.3. Срчани везујући протеин за масне киселине

Срчани везујући протеин за масне киселине (енгл. *Heart-type fatty acid-binding protein* - H-FABP) је важан биомаркер за предикцију акутне срчане инсуфицијенције, иако се његово одређивање не спроводи рутински у стандардном дијагностичком алгоритму. H-FABP је посебно погодан за детекцију оштећења миокарда, јер се ослобађа у циркулацију веома брзо, у року од једног сата (133). *Kazimierczyk* и сарадници су показали да константно високе вредности H-FABP могу бити повезане са актуелним оштећењем миокарда, што указује на његов потенцијал као значајног предиктора лошег исхода код пацијената са акутном декомпенованом срчаном инсуфицијенцијом (134). Поред тога, H-FABP може бити значајан предиктор за метаболичке поремећаје специфичне за кардиомиоците, с обзиром да су повишене вредности овог параметра забележене не само током, већ и пре самог настанка срчане инсуфицијенције (119). Могућност детекције ране субклиничке фазе срчане инсуфицијенције помоћу H-FABP и његов прогностички значај захтевају даље испитивање у великим клиничким студијама како би овај биомаркер добио потенцијалну примену у дијагностици пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (119).

1.7.2. Маркери миокардијалне фиброзе и инфламације

Инфламаторни процес и некроза ткива представљају физиолошки одговор који доприноси формирању фиброзног ткива и зацељењу (135). Акутна инфламација миокарда, као у случају миокардитиса, може довести до наглог поремећаја функције

срца, док хронична инфламација резултира прогресивним структурним оштећењима и фиброзом миокарда (26). Фиброза срчаног мишића је хистолошки дефинисана као распрострањено и прекомерно нагомилавање фиброзног ткива у интерстицијуму миокарда у односу на укупну масу кардиомиоцита (136). Биопсија миокарда представља златни стандард за процену присуства фиброзе у срцу, али је технички врло захтевна, те је одређивање циркулишућих биомаркера повезаних са овим процесом од суштинског значаја. Lopez и сарадници су представили око 30 молекула који би могли бити потенцијални биомаркери фиброзе миокарда, мада су до сада само проколаген тип I и III били повезани са хистолошки потврђеном фиброзом миокарда (137).

1.7.2.1. Галектин-3

Галектин-3 припада групи β -галактозид-везујућих лектина и има важну улогу у регулацији бројних процеса, укључујући миокардијалну и микроваскуларну инфламацију, миграцију мононуклеара, и акумулацију колагеног матрикса у ЕСМ-у. Овај протеин регулише прекомерену продукцију колагена и пролиферацију фибробласта, што делује на ремоделовање и дисфункцију срчаног мишића (138). Галектин-3, као биомаркер, омогућава увид у фиброзну измењеност миокарда и процену ризика од ремоделовања миокарда и његове прогресије (139).

У PROVE-IT/TIMI 22 студији (енгл. *the Pravastatin or Atorvastatin Evaluation And Infection Therapy - Thrombolysis In MI 22*), показано је да високе вредности галектина-3 корелирају са развојем срчане инсуфицијенције (140). Скорије студије указале су на значајну предиктивну улогу галектина-3 у развоју срчане инсуфицијенције код пацијената са АИМ са елевацијом ST сегмента који су лечени примарном перкутаном интервенцијом (енгл. *Primary Percutaneous Coronary Intervention - pPCI*) (141). У CORONA студији (енгл. *the Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure*), која је укључивала пацијенте са хроничном срчаном инсуфицијенцијом, ниво галектина-3 је мерен на почетку студије и након 3 месеца. Резултати су показали да повећање нивоа галектина-3 за 50% у периоду од 3 до 6 месеци значајно повећава ризик поновне хоспитализације због срчане слабости и морталитета услед других узорка (142).

Иако је одређивање галектина-3 препоручивано за стратификацију ризика и процену прогнозе пацијената са срчаном инсуфицијенцијом у ESC смерницама из 2016. године (1) и АНА смерницама из 2017. године (94), најновије смернице не препоручују галектин-3 као биомаркер за срчану инсуфицијенцију (22, 23). Ипак, његова експресија је повећана током фибротског процеса, што не може искључити његову потенцијалну примену као биомаркера за ову патологију, с обзиром на везу између фиброзе и срчане инсуфицијенције (119).

1.7.2.2. Солубилна изоформа супресије туморогенезе

Солубилна изоформа супресије туморогенезе 2 (енгл. *Soluble isoform of suppression of tumorigenicity 2 - sST2*) припада фамилији рецептора IL-1 и служи као лиганд за IL-33 (143). Лучи га већина ћелија као одговор на оштећење (143). sST2 има делимичну кардиоспецифичност, пошто се ствара као одговор на стрес или повреду васкуларних ендотелних ћелија, кардиомиоцита и срчаних фибробласта (119). Овај биомаркер је посебно користан у процени миокардијалне фиброзе и ризика од ремоделовања миокарда (133), и то са прогностичким значајем који је независан од вредности EF (144). Иако су концентрације sST2 биле веће у популацији пацијената са

HFrEF у поређењу са HFpEF, повишене вредности су у обе групе указивале на повишен ризик од mortalитета.

С обзиром да новије ACCF/AHA и ESC смернице нису укључиле sST2 као значајан биомаркер за срчану инсуфицијенцију, будућа истраживања могла би пружити важне информације о његовој потенцијалној примени у клиничкој пракси (145).

1.7.2.3. Фактор диференцијације раста 15

Фактор диференцијације раста 15 (енгл. *Growth Differentiation Factor 15* - GDF15), познат и као цитокин-1 који инхибира макрофаге, припада суперфамилији TGF- β 1, кога експримирају макрофаги, васкуларне глатке мишићне и ендотелне ћелије и адипоцити (119). Повишени нивои GDF15 детектовани су у срчаном мишићу током инфламације, оштећења и структурних промена (146-148). У Val-HeFT студији (енгл. *Valsartan Heart Failure trial*), показано је да су нивои GDF15 били повезани са повишеним ризиком од mortalитета, а серијско повећање овог маркера било је повезано са погоршањем бубрежне функције и повећањем маркера срчаног напрезања (BNP и TnT) (149). Иако је GDF15 значајан у предикцији mortalитета услед срчане инсуфицијенције (150), специфично ткиво његовог порекла још увек није у потпуности утврђено (119). Стога, овај параметар би могао да послужи као маркер системских узрока или ефеката срчане инсуфицијенције, али су потребна даља истраживања ради његове валидације (119).

1.8. САВРЕМЕНЕ ФАРМАКОЛОШКЕ СТРАТЕГИЈЕ ЗА ЛЕЧЕЊЕ СРЧАНЕ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈЕ

Пацијенти са HFrEF захтевају мултимодални терапијски приступ који укључује комбинацију различитих класа лекова ради побољшања симптома и прогнозе болести (151). Актуелна медикаментозна терапија за HFrEF укључује примену неурохуморалних агенаса, као што су ACEi, ARB, β -блокатори и MRA. Ови лекови имају за циљ смањење КВ и укупног mortalитета, као и смањење хоспитализација због срчане инсуфицијенције или других узрока (152).

У последњих неколико година у истраживањима су развијене нове класе лекова који су унапредили лечење пацијената са HFrEF. Сакубитрил/валсартан, представник ARNI класе, показао је значајно смањење ризика од КВ догађаја и mortalитета код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (117). Према ESC смерницама, сакубитрил/валсартан се препоручује као замена за ACEi/ARB код свих пацијената са HFrEF ($EF \leq 35\%$) код којих симптоми перзистирају упркос оптималном третману који укључује ACEi/ARB, β -блокаторе и MRA (1). Поред тога, недавно је одобрена и примена SGLT2i за лечење срчане инсуфицијенције (22, 23). Иако су ови лекови првобитно развијени за лечење ДМТ2, истраживања су показала да испољавају кардиопротективне ефекте код пацијената са HFrEF независно од присуства дијабетеса. Примена SGLT2i повезана је са смањењем хоспитализација због кардиолошких обољења, прогресије срчане инсуфицијенције и побољшањем укупне прогнозе пацијената са HFrEF (153, 154). Ове новине у терапији представљају значајан напредак у лечењу HFrEF и пружају нове могућности за побољшање квалитета живота и прогнозе ових пацијената.

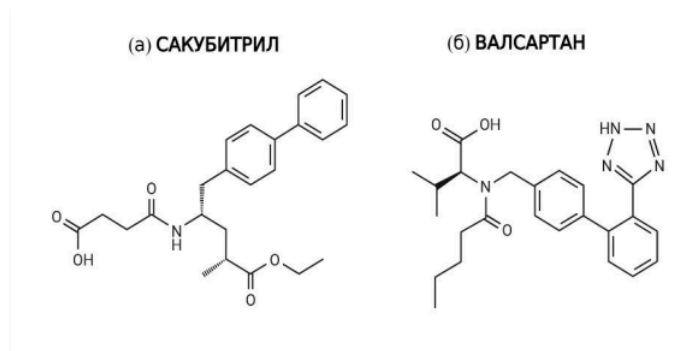
1.8.1. Развојни пут сакубитрил/валсартана

Развој истраживања о натриуретским пептидима значајно је унапредио разумевање њихових ефеката, а касније и до спознаја о њиховој потенцијалној примени у лечењу срчане инсуфицијенције. Првобитне студије усмерене на примену рекомбинантних хуманих натриуретских пептида имале су за циљ повећање концентрације ових молекула у организму, а тиме и постизања благотворних ефеката. Несиритид, рекомбинантни хумани BNP, показао је повољне хемодинамске ефекте код пацијената са акутном декомпензацијом хроничне срчане инсуфицијенције (155), међутим његова употреба није значајно побољшала стопу преживљавања, нити смањила број поновних хоспитализација у поређењу са плацебом (156). Са друге стране, карперитид, рекомбинантни хумани ANP који се користи у Јапану за лечење акутне срчане инсуфицијенције (157), није показао значајне бенефите у поређењу са стандардним третманом нитратима код пацијената са акутном срчаном инсуфицијенцијом (158), што је ограничило примену овог агенса у клиничкој пракси. С обзиром на неуспех у иницијалним истраживањима са каперитидом, следећи логичан корак у развоју терапија заснованих на постизању благотворних ефеката натриуретских пептида била је инхибиција неприлизина.

Познато је да неприлизин делује на низ различитих супстрата, укључујући и оне са вазоконстриктивним дејством као што је ангиотензин. Према томе, инхибиција активности неприлизина не само да може да повећа концентрацију натриуретских пептида, већ може да повећа у концентрацију вазоконстрикторних супстанци у циркулацији, а самим тим и до нежељених ефеката (159). Ове негативне последице су резултирале неуспехом студија које су искључиво користиле инхибиторе неприлизина у покушају да постигну терапеутске предности натриуретских пептида (160). Следећи корак у развоју ове терапије био је формулисање супстанци које не само да инхибирају неприлизин, већ и неутралишу његово дејство на вазоконстрикторне молекуле. На основу ових принципа, развијене су двојне комбинације лекова које садрже инхибиторе неприлизина и инхибиторе RAAS.

Иако су ACEi утемељени у лечењу срчане инсуфицијенције, нарочито након студија [2](#) CONSENSUS (21) и SOLVD-Treatment (161), резултати студије OVERTURE (енгл. *the Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events*), у којој је испитиван омапатрилат у комбинацији са инхибитором неприлизина, нису показали већу ефикасност у смањењу примарних клиничких исхода у поређењу са еналаприлом код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (162). Поред тога, примена омапатрилата била је повезана са повећаним ризиком од ангиоедема (162), што је последица прекомерне акумулације брадикинина услед инхибиције његовог разграђивања од стране ангиотензин-конвертујућег ензима (енгл. *Angiotensin-converting enzyme* - ACE) и неприлизина (163). Интересантно је напоменути да инхибиција неприлизина може довести до акумулације неуротоксина у мозгу, као што је пептид амилоида- β , који је повезан са патогенезом Алцхајмерове болести, с обзиром на то да је неприлизин један од механизма одговорних за његово уклањање (164). Међутим, упркос теоретским ризицима, примена омапатрилата није резултирала повећањем учесталости деменције нити других нежељених ефеката који би били повезани са когницијом (164).

Следећа класа лекова која је испитивана у комбинацији са инхибитором неприлизина су ARB. За комбинацију са сакубитрилом, као представник ARB класе изабран је валсартан, који има добро познату ефикасност у лечењу КВБ (165). Поред тога што инхибира RAAS, валсартан смањује ризик за настанак озбиљног ангиоедема у поређењу са ACEi (166). Први лек из ARNI класе, сакубитрил/валсартан (раније познат као LCZ696), састоји се од две компоненте у односу 1:1 M, сакубитрила и валсартана (Слика 17).



Слика 17. Хемијска структура сакубитрила (а) и валсартана (б).

1.8.1.1. Фармакокинетика сакубитрил-валсартана

Након оралне администрације, сакубитрил/валсартан се разлаже на сакубитрил и валсартан. Сакубитрил се брзо метаболише до сакубитрила (LBQ657), под дејством естераза. Укупна орална биодоступност сакубитрила износи $\geq 60\%$. Пик плазма концентрације сакубитрил постиже за 0,5-1,1 сати, LBQ657 за 1,9-3,5 сати, а валсартан за 1,5-2,2 сата (167). Унос хране нема значајан утицај на апсорпцију сакубитрила нити валсартана. Волумен дистрибуције сакубитрила износи 103L, а валсартана 75L. Сакубитрил, LBQ657 и валсартан показују велики афинитет за везивање за протеине плазме. Такође је важно напоменути да LBQ657 прелази крвно-мождану баријеру у малој мери (0,28%).

Након оралног уноса, 52-68% сакубитрила, у форми LBQ657 и око 13% валсартана се екскретије урином, док се 37-48% сакубитрила, у форми LBQ657 и око 86% валсартана елиминише фецесом. Време полупелиминације сакубитрила износи 1,4 сата, LBQ657 11,5 сати, а валсартана 9,9 сати (167).

1.8.1.2 Примена сакубитрил/валсартана у срчаној инсуфицијенцији и другим КВБ

У последњих десет година, бројне клиничке студије су испитивале безбедност и ефикасност сакубитрил/валсартана у лечењу срчане инсуфицијенције и других КВ стања, као што је АИМ (Слика 18).



Слика 18. Хронолошки приказ великих клиничких студија које су испитивале ефикасност и безбедност сакубитрил/валсартана код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом.

1.8.1.2.1. Примена сакубитрил/валсартана у лечењу срчане инсуфицијенције

Једна од најзначајнијих студија из области срчане инсуфицијенције је PARADIGM-HF, која је обухватила више од 8.000 пацијената са HFrEF-ом лечених у амбулантним условима (168). Резултати ове студије су показали да сакубитрил/валсартан значајно смањује примарне исходе, укључујући КВ морталитет и стопу хоспитализација због срчане инсуфицијенције, за 20% у поређењу са стандардном терапијом еналаприлом (168). Ови изванредни резултати отворили су нове могућности за третман пацијената са HFrEF, што је довело до укључивања сакубитрил/валсартана у алгоритме за лечење у клиничкој пракси (1, 94). Важно је напоменути да је сакубитрил/валсартан био подједнако ефикасан у различитим популацијама пацијената, укљученим у PARADIGM-HF студију, без обзира на специфичну патофизиолошку позадину настанка ове форме срчане инсуфицијенције (169). Поред тога, сакубитрил/валсартан је био супериорнији од еналаприла у смањењу 30-дневних поновних хоспитализација, и то за 26% у случају поновних хоспитализација због других узрока и за 38% у случају поновних хоспитализација због срчане инсуфицијенције након отпуста из болнице (170).

Позитиван ефекат сакубитрил/валсартана на квалитет живота пацијената са HFrEF-ом уочен је у бројним студијама. У PARASAIL (енгл. *Prospective, Multicenter, Open Label, Post-Approval Study Aimed at Characterizing the Use of LCZ696*) студији, која је обухватила пацијенте са HFrEF (већински са NYHA II класом) показано је значајно побољшање средње вредности дистанце коју су пацијенти прешли у 6-минутном тесту ходања (енгл. *The 6 Minute Walk Test – 6MWT*) након 6 месеци лечења сакубитрил/валсартаном. Такође, уочено је и побољшање квалитета живота ових пацијената (171). Са друге стране, резултати LIFE (енгл. *Entresto™ (LCZ696) In Advanced Heart Failure*) студије, спроведени на популацији HFrEF пацијената са NYHA IV класом, нису били обећавајући. У овом истраживању, сакубитрил/валсартан није показао боље резултате у снижавању нивоа NT-proBNP нити у побољшању клиничких исхода у поређењу са монотерапијом валсартаном (172). Међутим, у PROVE-HF (енгл. *Prospective Study of Biomarkers, Symptom Improvement and Ventricular Remodeling During Entresto Therapy for Heart Failure Study*) студији, снижење вредности NT-proBNP је било у корелацији са побољшањем функције и волумена миокарда код пацијената са HFrEF-ом лечених сакубитрил/валсартаном (173). Рано увођење сакубитрил/валсартана код пацијената са HFrEF и скоријом акутном декомпензацијом показало је позитивне ефекте у студијама TRANSITION (енгл. *Comparison of Pre- and Post-discharge Initiation of LCZ696 Therapy in HFrEF Patients After an Acute Decompensation Event*) (174) и PIONEER-HF (енгл. *Comparison of Sacubitril/Valsartan Versus Enalapril on Effect on NT-proBNP in Patients Stabilized from an Acute Heart Failure Episode*) (175).

Поред HFrEF, ефекти сакубитрил/валсартана су испитивани код пацијената са HFpEF. У PARAMOUNT-HF (енгл. *Prospective Comparison of ARNI With ARB on Management of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction*) студији, поређени су ефекти терапије сакубитрил/валсартаном и ARB код пацијената са HFpEF-ом (176). У ову студију био је укључен 301 пацијент са HFpEF и NYHA II–IV класом. Резултати су показали да је сакубитрил/валсартан супериорнији у односу на валсартан у погледу снижења нивоа NT-proBNP након 12 недеља третмана, као и у смањењу димензија леве преткоморе и побољшању NYHA класе након 36 недеља третмана (176). Поред тога, пацијенти лечени сакубитрил/валсартаном имали су ниже вредности артеријског крвног притиска у поређењу са групом пацијената која је лечена валсартаном, и то након 12 и 36 недеља третмана (176). С обзиром да су резултати PARAMOUNT-HF студије указали на значајно ниже вредности hs-TnI код пацијената са HFpEF који су

лечени сакубитрил/валсартаном у поређењу са валсартаном, могуће је да сакубитрил/валсартан има већи потенцијал за смањење оштећења миокарда код ових пацијената (177).

PARAGON-HF (енгл. *Prospective Comparison of ARNI with ARB Global Outcomes in HF With Preserved Ejection Fraction*) студија је обухватила преко 4000 пацијената са HFpEF, са циљем да се процени ефикасност сакубитрил/валсартана у односу на тешке исходе као што су КВ морталитет и укупан број хоспитализација због срчане инсуфицијенције (178). Резултати ове студије показали су да сакубитрил/валсартан није био ефикаснији од валсартана у смањењу нежељених исхода код пацијената са HFpEF. Међутим, постоји значајно побољшање код специфичних подгрупа пацијената, нарочито код жена и пацијената са вишом вредношћу EF, у поређењу са мушкарцима. Овакво запажање указује на потребу за даљим истраживањем и категоризацијом HFpEF популације у односу на пол и вредност EF како би се утврдиле специфичне групе код којих сакубитрил/валсартан може бити ефикаснији (179).

PARALLAX (енгл. *Prospective Comparison of ARNI vs Comorbidity-Associated Conventional Therapy on Quality of Life and Exercise Capacity*) студија истраживала је ефекте сакубитрил/валсартана у поређењу са стандардном терапијом на квалитет живота и физичку способност пацијената са HFpEF. Резултати су показали да сакубитрил/валсартан ефикасно снижава ниво NT-proBNP у поређењу са индивидуалном терапијом. Међутим, у погледу здравственог статуса и физичке способности, нису уочене значајне разлике (180).

Поменуте студије несумњиво указују на разлике у ефикасности сакубитрил/валсартана код пацијената са HFpEF у поређењу са пацијентима са HFpEF. Ове разлике могу бити резултат различитих патофизиолошких механизма су у основи ових стања, као и фенотипских варијација међу пацијентима са HFpEF (181). Посебно је значајано напоменути да су Solomon и сарадници закључили да се ефикасност сакубитрил/валсартана разликује у зависности од вредности EF. Највећа ефикасност овог лека је забележена код пацијената са HFpEF који имају EF мању од физиолошке (182).

1.8.1.2.2. Примена сакубитрил/валсартана у лечењу инфаркта миокарда

АИМ представља један од најчешћих узрока срчане инсуфицијенције, која се може развити под утицајем различитих патофизиолошких механизма у зависности од тренутка настанка (183). Ефикасност сакубитрил/валсартана код пацијената са систолном дисфункцијом леве коморе након АИМ је била предмет истраживања у неколико студија. У RECOVER-LV (енгл. *The Effects of Sacubitril/Valsartan Compared to Valsartan on Left Ventricular Remodelling in Asymptomatic Left Ventricular Systolic Dysfunction After Myocardial Infarction: a Randomised, Double-blinded, Active-comparator, Cardiac-MR Based Trial*) студији, сакубитрил/валсартан није показао значајну предност у односу на валсартан у погледу реверзног ремоделовања миокарда код пацијената са систолном дисфункцијом леве коморе након АИМ (184). Са друге стране, у мета-анализи коју су спровели Zhao и сарадници, установљено је да сакубитрил/валсартан има повољније ефекте након АИМ, у поређењу са ACEi. Ови ефекти укључују побољшање EF и смањење главних кардиоваскуларних нежељених догађаја (енгл. *Major adverse cardiovascular events - MACE*) (185).

PARADISE-MI (енгл. *Prospective ARNI vs ACE Inhibitor Trial to Determine Superiority in Reducing Heart Failure Events After MI*) студија представља прву значајну студију која је поредила ефекте сакубитрил/валсартана и ACEi код пацијената који су

прележали АИМ и који су имали дисфункцију леве коморе ($EF \leq 40\%$) и/или плућну конгестију, уз минимум један од осам додатних фактора ризика (186). Након двогодишњег праћења ових пацијената, резултати су показали да сакубитрил/валсартан није био супериорнији од рамиприла у погледу снижења стопе КВ морталитета, хоспитализација и амбулантних посета због срчане инсуфицијенције (186). У рандомизованој контролисаној студији коју су спровели Yang и сарадници, испитивани су ефекти примене сакубитрил/валсартана код пацијената који су прележали АИМ и који су били подвргнути перкутаној коронарној интервенцији (енгл. *percutaneous coronary intervention* - PCI) (187). Ова студија је показала да сакубитрил/валсартан има упоредив ефекат са валсартаном у погледу смањења ремоделовања миокарда и ризика за развој срчане инсуфицијенције (187). Међутим, у овом контексту, примена сакубитрил/валсартана код пацијената са ACS и сниженом EF након PCI довела је до израженијег реверзног ремоделовања миокарда у поређењу са стандардним терапијским протоколом (188). У студији коју су спровели Chen и сарадници, комбинован третман сакубитрил/валсартана и бисопролола био је ефикаснији у смањењу стопе нежељених догађаја код пацијената са АИМ и срчаном инсуфицијенцијом, након PCI, у поређењу са монотерапијом бисопрололом (189).

Закључак из ових истраживања је да тренутни резултати не пружају јасан одговор о супериорности сакубитрил/валсартана у односу на стандардну терапију код популације пацијената са АИМ након PCI. Будућа истраживања са великим бројем пацијената и продуженим периодом праћења би могла пружити бољи увид у потенцијалне предности примене сакубитрил/валсартана код одређених категорија пацијената са АИМ (190).

1.8.1.2.3. Примена сакубитрил/валсартана у лечењу срчане дисфункције повезане са терапијом карцинома

Претходних година учињен је значајан помак у лечењу пацијената са малигним обољењима. Међутим, заједно са побољшањем преживљавања ових пацијената, продужено излагање терапијама за лечење карцинома повећало је ризик од њихових нежељених ефеката (191). Срчана дисфункција повезана са терапијом карцинома (енгл. *Cancer therapy-related cardiac dysfunction* - CTRCD) се разматра у случају смањене EF за више од 10% од њене базалне вредности до $EF < 53\%$ (192). Код пацијената са карциномом, ACEi/ARB и β -блокатори се препоручују за лечење симптоматске срчане инсуфицијенције или асимптоматске срчане дисфункције, као и за спречавање даљег погоршања функције леве коморе (када се региструје пад $EF > 10\%$ испод референтне вредности) (193). Међутим, срчана инсуфицијенција са дисфункцијом леве коморе и даље у великој мери доприноси морбидитету и морталитету код пацијената са малигним обољењима (194). Развој CTRCD представља озбиљан здравствени проблем који не само да утиче на прогнозу, већ и онемогућава онколошке пацијенте да наставе са лечењем основне болести (195).

Иако је PARADIGM-HF студија показала корисне ефекте сакубитрил/валсартана код пацијената са HFrEF различите етиологије, докази о његовој ефикасности и безбедности код пацијената са CTRCD још увек недостају. Потенцијални кардиопротективни ефекти сакубитрил/валсартана су пријављени у неколико клиничких случајева и студија које су обухватиле серију случајева са малигним обољењима (196-199). Недавно, Gregorietti и сарадници су пријавили потенцијалну корист од сакубитрил/валсартана у популацији пацијената са карциномом дојке и срчаном дисфункцијом, која се огледа кроз побољшање EF леве коморе, дијаметара

леве коморе и дијастолне дисфункције, као и симптома и параметара добијених током 6MWT (200). Штавише, једна мултицентрична ретроспективна студија која је укључивала 67 пацијената са CTRCD лечених сакубитрил/валсартаном показала је обећавајуће резултате (201). Употреба сакубитрил/валсартана била је повезана са реверзним ремоделовањем миокарда (побољшан волумен и EF леве коморе) заједно са побољшаном толеранцијом напора и смањењем нивоа NT-proBNP (201). Толеранција сакубитрил/валсартана је добра, са само неколико пацијената (6%) који су имали нежељени догађај (201). Слично томе, значајно побољшање волумена и EF леве коморе, процењено магнетном резонанцом срца (енгл. *Cardiac magnetic resonance imaging - cMRI*), заједно са смањењем нивоа NT-proBNP, примећено је код пацијената са CTRCD лечених сакубитрил/валсартаном (202). Иако су ове студије укључивале мали број пацијената, ова обећавајућа запажања би требало да подстакну даља истраживања како би се донели снажнији закључци о употреби сакубитрил/валсартана код пацијената са CTRCD.

1.8.1.2.4. Сакубитрил/валсартан као антиаритмик

SCD представља главни узрок смрти код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (203). Као један од најзначајнијих параметара који је у уској вези са SCD, снижена EF представља индикацију за ICD са циљем примарне превенције SCD (204). Показано је да су пацијенти са HFrEF који су лечени сакубитрил/валсартаном живели до 2 године дуже са мањим ризиком од морталитета због SCD или погоршања срчана инсуфицијенције, у поређењу са онима који су лечени еналаприлом (205, 206). Тачан механизам којим сакубитрил/валсартан смањује инциденцу SCD код пацијената са HFrEF није у потпуности разјашњен, с обзиром на различите податке у литератури по питању антиаритмијског потенцијала овог агенса (204, 207-211).

У студији коју су спровели *Vincent* и сарадници, укључено је 108 пацијената лечених сакубитрил/валсартаном, од којих је њих шест имало електричну олују, рано након почетка третмана овим агенсом, што је захтевало прекид терапије (212). Парадоксално, једна опсервациона студија која је укључивала 167 пацијената са дилатативном кардиомиопатијом (исхемијске/неисхемијске етиологија) и двокоморним ICD, известила је да третман сакубитрил/валсартаном смањује инциденцу преткоморских и коморских аритмија и побољшава електричне преткоморске ICD параметре током студијског праћења од 12 месеци (213). *De Diego* и сарадници су у својој студији уочили нижу стопу неодрживе коморске аритмије (енгл. *Non-sustained ventricular tachycardia - NSVT*), као и стопу превремених коморских контракција (енгл. *Premature ventricular beats - PVCs*) код пацијената са HFrEF лечених са сакубитрил/валсартаном, у односу на оне лечене са ACEi/ARB терапијом (214). Такође, аутори су приметили да стопа појављивања PVCs по сату, корелира са нивоом NT-proBNP у плазми, и то у виду смањења стопе регистровања PVCs са терапијом сакубитрил/валсартаном (214). *Martens* и сарадници су у својој студији показали да су пацијенти са HFrEF и ICD или срчаном ресинхронизационом терапијом (енгл. *Cardiac resynchronization therapy - CRT*) који су примали сакубитрил/валсартан имали нижу стопу SCD, што би бар делимично могло да буде изазвано редукцијом епизода коморске тахиаритмије (215). Сакубитрил/валсартан доводи до реверзног ремоделовања миокарда, што може бити један од механизма који доприносе његовом антиаритмијском ефекту.

У једној ретроспективној кохортној студији, показано је да третман сакубитрил/валсартаном повећава максимално лонгитудинално напрезање преткомора

(енгл. - *Peak atrial longitudinal strain* - PALS) код пацијената са HFrEF (NYHA II или III класа) са историјом атријалне фибрилације, као и да смањује стопу епизода атријалне фибрилације у поређењу са стандардном терапијом, у периоду од 12 месеци праћења (216). Познато је да се PALS сматра маркером функције преткомора као резервоара, те његово повећање током третмана сакубитрил/валсартаном указује на благотворне ефекте овог агенса на преткоморско пуњење крвљу, а тиме и на бољу ЕФ леве коморе (216). Штавише, иста група аутора је показала да сакубитрил/валсартан повећава ЕФ леве коморе и глобално лонгитудинално напрезање код пацијената са HFrEF (217), са могућим ефектом на реверзно ремоделовање преткомора и регулацију срчаног ритма (218). Повољни ефекти сакубитрил/валсартана код пацијената са атријалном фибрилацијом могу бити последица његовог благотворног утицаја на електроанатомско ремоделовање преткомора.

1.8.1.3. Нежељена дејства, токсичност и контраиндикације за примену сакубитрил/валсартана

Од свих нежељених ефеката уочених током PARADIGM-HF студије, само је хипотензија била учесталија код пацијената лечених сакубитрил/валсартаном, у односу на пацијенте који су добијали еналаприл (168). Свакако, пацијенти који су прекинули студијски лек због појаве нежељеног догађаја су већински припадали групи пацијената која је примала еналаприл, док разлике у стопи искључења из студије услед хипотензије нису биле значајне међу испитиваним групама. Од осталих нежељених догађаја, важно је напоменути да је умерен ангиоедем био учесталији код пацијената лечених сакубитрил/валсартаном, мада без статистички значајне разлике у односу на третман еналаприлом. Такође, кашаљ, повишен ниво серумског калијума или креатинина су били ређи у популацији пацијената лечених сакубитрил/валсартаном у односу на еналаприл (168).

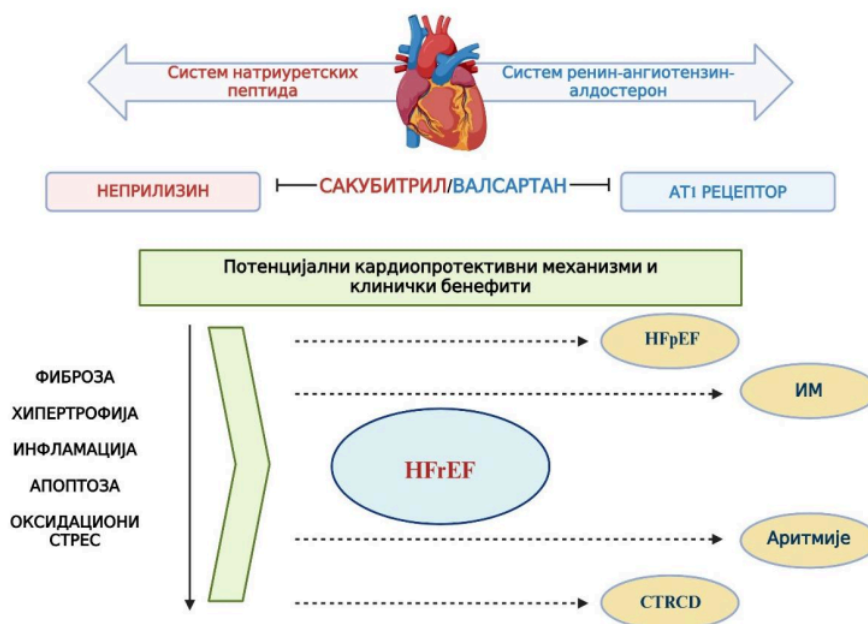
Познато је да медикаменти који испољавају директо дејство на RAAS могу довести до оштећења и/или смрти фетуса, те је примена сакубитрил/валсартана у трудноћи контраиндикована. Неопходно је да пацијенткиње прекину примену овог лека од момента потврде трудноће (219).

Примена сакубитрил/валсартана је контраиндикована код пацијената који су хиперсензитивни на неку од компоненти овог лека, код особа које имају историју ангиоедема услед примене ACEi или ARB терапије, као и код особа које су примиле ACEi у претходних 36 сати, услед повећаног ризика за настанак ангиоедема. Примена сакубитрил/валсартана контраиндикована је и код пацијената са тешким оштећењем јетре. Важно је напоменути да је овај агенс контраиндикован код дијабетичара који су на терапији алискиреном, обзиром да примена лекова из ARB групе (у овом случају валсартана) у комбинацији са алискиреном повећава ризик од хипотензије, хиперкалиемије и бубрежног оштећења (195).

Литературни подаци везани за токсичност сакубитрил/валсартана у хуманој популацији су ограничени. У САД, у Националном систему података о тровању (енгл. *the National Poison Data System*), пријављивани су случајеви тровања сакубитрил/валсартаном, али је фаталан исход био последица полифармације (220). С обзиром да се све три компоненте сакубитрил/валсартана везују за протеине плазме, мале су шансе за уклањање овог агенса хемодијализом (167).

1.8.1.4. Кардиопротективни ефекти сакубитрил/валсартана у експерименталним студијама

Бројне експерименталне студије истраживале су ефекте сакубитрил/валсартана у различитим анималним моделима срчане дисфункције како би се испитали молекулски механизми који посредују у кардиопротекцији (Слика 19). Поред натриуретских пептида, инхибитор неприлизина, сакубитрил, утиче на концентрацију бројних других пептида у циркулацији, што додатно може појачати протективне ефекте сакубитрил/валсартана у различитим КВБ. Ови ефекти укључују антифибротске, антихипертрофске, антиинфламацијске, антиапоптотске ефекте и антиоксидационе ефекте (190). У следећим поглављима ће бити размотрени потенцијални механизми деловања сакубитрил/валсартана, који доприносе његовим кардиопротективним својствима у контексту срчане дисфункције и других КВБ.



Слика 19. Потенцијални кардиопротективни механизми и клинички бенефити сакубитрил/валсартана.

1.8.1.4.1. Ефекти сакубитрил/валсартана на фиброзу, хипертрофију и ремоделовање миокарда у анималним моделима кардиоваскуларних болести

Фиброзни процес представља један од кључних детерминаната ремоделовања миокарда и прогресије срчане инсуфицијенције (221). Последњих година, антифибротске особине сакубитрил/валсартана су истраживане у бројним експерименталним студијама на анималним моделима. Једно од првих истраживања које је испитивало антифибротске ефекте сакубитрил/валсартана спровео је *von Lueder* са сарадницима (222). Резултати њихове студије показали су да увођење сакубитрил/валсартана недељу дана након ИМ код пацова значајно смањује хипертрофију и фиброзу миокарда, што доводи до очувања срчане функције и превенције ремоделовања (222). *Kusaka* и сарадници су утврдили да

сакубитрил/валсартан показује већу ефикасност у поређењу са монотерапијом валсартаном у инхибицији миокардне фиброзе и хипертрофије код хипертензивних пацова са метаболичким синдромом (223). Снижење степена фиброзе миокарда праћено је нижом експресијом информационе рибонуклеинске киселине (иРНК), TGF- β 1, као и колагена тип 1 α 1 (Colla1) у моделу оштећења миокарда пацова индукованог изопротеренолом (енгл. *Isoproterenol* - ISO) (224).

Поједини литерарни извори потврђују везу између TGF- β и Smad (енгл. *small mothers against decapentaplegic*) сигналне каскаде у настанку фиброзе миокарда, при чему инхибиција ових молекула може бити корисна у лечењу одређених KB стања (63). TGF- β се активира након оштећења миокарда везивањем за рецептор Smad протена, што резултира активацијом медијатора, као што су Smad2 и Smad3 (221). У оквиру TGF- β сигналног пута, након активације TGF- β , транскрипциони фактори Smad2 и Smad3 бивају фосфорилисани, формирају хетеромерни комплекс са Smad4 и транслоцирају се у једро где учествују у контроли гена укључених у фиброзни процес (225). Сакубитрил/валсартан се показао ефикаснијим од ARB-а у смањењу фиброзе у левој комори, и то управо супресијом иРНК експресије TGF- β код дијабетичних мишева са HF β EF (226). Антифибротски ефекти сакубитрил/валсартана су уочени у различитим анималним моделима кардиоваскуларне патологије, укључујући анималне моделе АИМ и HF β EF код пацова, где је ефекат овог агенса такође постигнут деловањем на TGF- β /Smads сигнални пут (225). Такође, смањење фиброзе миокарда је уочено код пацова са дијабетесном кардиомиопатијом који су лечени сакубитрил/валсартаном током 8 недеља. Ово је вероватно последица инхибиције поменутих сигналне каскаде, што указује на потенцијал сакубитрил/валсартана у лечењу различитих KB стања узрокованих фиброзом (227).

Познато је да синтеза MMPs и колагена током различитих инфламаторних процеса може довести до фиброзног процеса (228). Као што је већ напоменуто, MMPs представљају групу Zn-зависних ензима који су одговорни за разградњу одређених молекула у ЕСМ и имају важну улогу у процесу ремоделовања леве коморе, као и у срчаној дисфункцији (190). *Boutagy* и његови сарадници су показали да кардиопротективни ефекти сакубитрил/валсартана могу бити делимично последица његове способности да смањи активност срчаних MMPs у моделу доксорубицином (енгл. *Doxorubicin* - DOX)-индуковане кардиотоксичности (229). Ово запажање је уочено и у клиничким студијама које су потврдиле сличне резултате. Наиме, активност MMP-2 је повећана за 25% код пацијената са HF β EF у поређењу са контролном групом, а након 12 недеља терапије, активност је повећана за 30% (230). Поред тога, код пацијената који су лечени сакубитрил/валсартаном, уочена је нижа стопа руптуре миокарда након АИМ у поређењу са терапијом еналаприлом, што је такође повезано са смањењем експресије иРНК MMP-9 код ових пацијената (231).

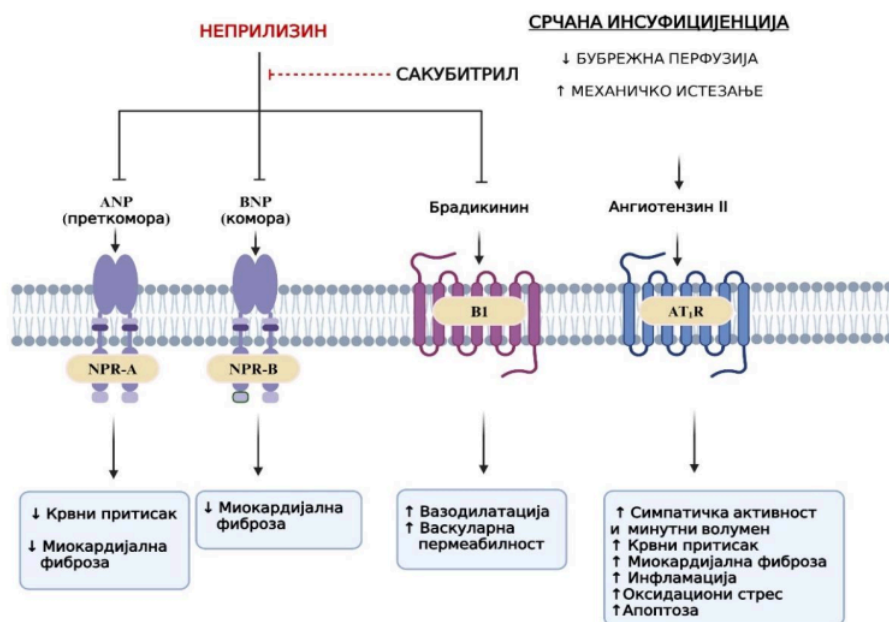
У експерименталним моделима HF β EF на пацовима, сакубитрил/валсартан је испољио антиинфламацијско, антихипертрофично и антифибротско дејство кроз различите ћелијске и молекулске сигналне путеве, што је резултирало побољшањем дијастолне дисфункције и ремоделовања леве коморе (232). Посебно је истакнуто да је сакубитрил/валсартан био успешнији у смањењу симптома HF β EF индукованог исхраном са вишком соли, што је највероватније последица смањења фиброзе миокарда преко инхибиције TGF- β 1/Smad3 сигналне каскаде. Такође, на моделу масивног АИМ пацова, *Kotra* и сарадници су показали повољне ефекте сакубитрил/валсартана на дисфункцију и ремоделовање миокарда. Поред тога, овај лек је побољшао маркере плућне конгестије, као и маркере хипертрофије (233).

Комбинација сакубитрила и валсартана интегрисана је у једну терапијску целину, која поред значајних хемодинамских ефеката, демонстрира и антифибротски и

антихипертрофски потенцијал. Ови ефекти могу бити резултат различитих механизма деловања, а будућа истраживања ће бити кључна за расветљавање потенцијалне доминације одређених сигналних путева или евентуалне синергије која је у основи позитивних исхода.

1.8.1.4.2. Ефекти сакубитрил/валсартана на оксидациони стрес, инфламацију и апоптозу у анималним моделима кардиоваскуларних болести

Истраживања на анималним моделима су показала значајан антиоксидациони потенцијал сакубитрил/валсартана у различитим КВ стањима (Слика 20). *Imran* и сарадници су открили да сакубитрил/валсартан има значајна антиоксидациона својства. Применом овог агенса спречава се разградња антиоксидациони ензима као што су SOD, CAT, глутатион редуктаза (енгл. *Glutathione Reductase* - GR), GPx и глутатион S-трансфераза (енгл. *Glutathion S-transferase* - GST) (234). Аутори су закључили да је смањење оштећења миокарда и величине инфаркта у моделу ISO-индукованог ИМ код пацова највероватније последица антиоксидационог дејства сакубитрил/валсартана (234). У експерименталном моделу кардиометаболичког синдрома код мишева, *Croteau* и сарадници су показали да сакубитрил/валсартан надмашује монотерапију валсартаном у погледу смањења интерстицијалне фиброзе и оксидационог стреса у ткиву миокарда (235).



Слика 20. Механизам дејства и протективни ефекти сакубитрил/валсартана.

Оксидациони стрес је познат по својој способности да активира каскаду догађаја који активирају нуклеарни фактор капа-појачивача лаког ланца активираних В ћелија (енгл. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* - NF-κB). NF-κB је транскрипциони фактор који игра кључну улогу у експресији проинфламацијских цитокина и апоптотских гена (236). У експерименталном моделу дијабетесне кардиомиопатије, *Ge* и сарадници су показали да сакубитрил/валсартан смањује степен

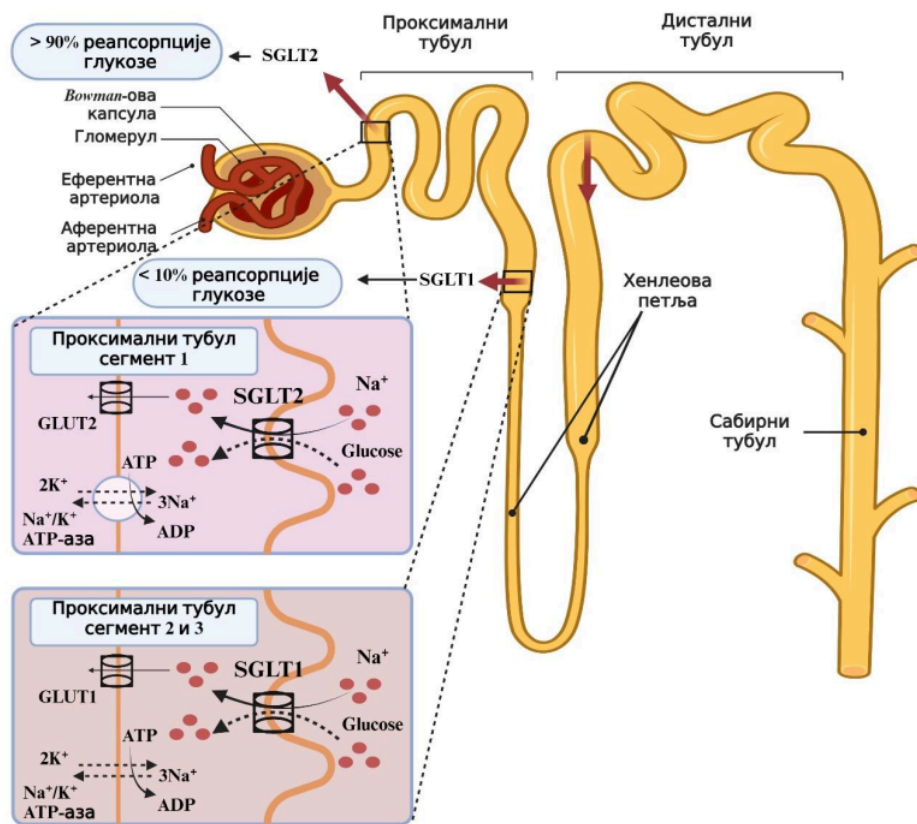
ремоделовања и дисфункцију миокарда, што је делом последица смањења оксидационог оштећења. Ово смањење је делимично повезано са инхибицијом фосфорилације JNKs-а и p38MAPKs-а (JNK/p38MAPK), као и транслокацијом NF- κ B у једро (237). Антиоксидациони и антиапоптотски потенцијал сакубитрил/валсартана такође је потврђен у моделу хипертрофичне кардиомиопатије изазване хипертензијом код пацова (238), као и у моделу DOX-индуковане кардиотоксичности (239).

Поред оксидационог стреса, процес апоптозе има важну улогу у патогенези KB обољења, укључујући и срчану инсуфицијенцију (240). Претходне студије су показале да сакубитрил/валсартан поседује антиапоптотска својства, која доприносе побољшању структуре и функције миокарда (Слика 20) (190). У моделу DOX индуковане кардиомиопатије код мишева, показано је да сакубитрил/валсартан делимично утиче на смањење активности физионог протеина везаног за динамин протеин 1 (енгл. *dynamine-related protein 1* - Drp1) који је повезан са процесом апоптозе (241). Методом TUNEL (енгл. *Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling*) есеја установљено је да четворонедељни третман сакубитрил/валсартаном значајно смањује миокардијалну апоптозу код мишева са срчаном инсуфицијенцијом узрокованом трансверзном аортном констрикцијом (енгл. *Transverse Aortic Constriction* – TAC) (242), што указује на смањење апоптотских процеса у миокарду. Антиапоптотски ефекти сакубитрил/валсартана потврђени су и у моделу дијабетесне кардиомиопатије код мишева. Третман сакубитрил/валсартаном смањује протеинску експресију апоптотских маркера, као што су цепана CASP-3 и однос Bax/Bcl-2, што додатно истиче његов антиапоптотски потенцијал (237).

Корисна дејства сакубитрил/валсартана код пацијената са HFrEF-ом вероватно су делимично последица антиапоптотских, антиоксидационих и антифибротских ефеката овог лека. Даља истраживања молекулских механизма сакубитрил/валсартана била би од изузетног значаја, јер би додатно допринела бољем разумевању његових кардиопротективних особина.

1.8.2. Развојни пут SGLT2i

Главну улогу у одржавању хомеостазе глукозе имају бубрези, и у том процесу учествују три пута: глуконеогенеза, преузимање глукозе из циркулације и реапсорпција глукозе (243). У еугликемичним условима, функционално очувани бубрези могу да филтрирају 140-160g глукозе дневно, од чега се приближно 99% реапсорбује у проксималним реналним тубулима (244). На апикалној површини проксималних реналних тубула налазе се натријум-глукозног котранспортери (енгл. *Sodium-Glucose Cotransporters* - SGLTs), мембрански протеини одговорни за реапсорпцију глукозе (245), посредујући у натријум-глукозном (1:1) котранспорту (246). SGLT1 транспортери су локализовани у S2/S3 сегменту проксималних реналних тубула и одговорни су за око 10% укупне реапсорпције глукозе. Насупрот томе, SGLT2 транспортери се налазе у почетном делу S1 сегмента проксималних реналних тубула и имају примарну улогу у процесу реапсорпције глукозе, обезбеђујући више од 90% овог процеса (247). Након тога, глюкоза прелази у интерстицијум посредством глюкозног транспортера 2 (енгл. *Glucose transporter 2* - GLUT2) у S1 сегменту или преко глюкозног транспортера 1 (енгл. *Glucose transporter 1* - GLUT1) у S2 и S3 сегменту (Слика 21) (247).



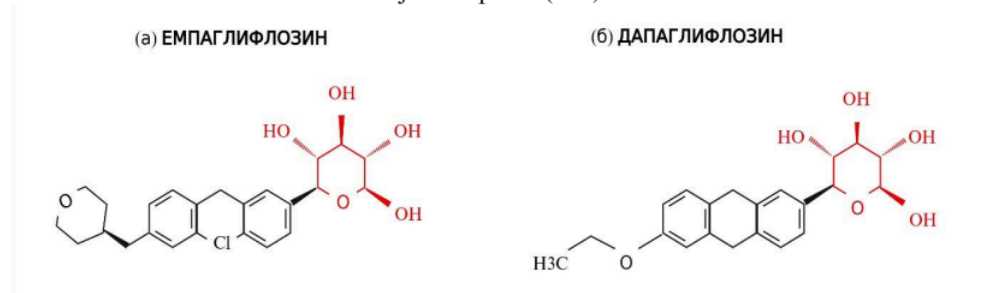
Слика 21. Реапсорпција глукозе у бубрезима.

Иако је максимални капацитет реапсорпције глукозе у бубрезима око 275 mg/min, код еугликемичних особа стопа филтрације глукозе износи око 125 mg/min, што спречава настанак гликозурије (248). Међутим, реални праг за гликозурију је значајно нижи и одражава критичне нивое глукозе у плазми (10 mmol/l или 180 mg/dl), изнад којих се глукоза излучује урином (249). Претходне студије су показале да пацијенти са ДМТ2 имају виши праг за гликозурију и повећан капацитет за реапсорпцију глукозе, што може да буде резултат адаптивног механизма који укључује повећану експресију SGLT2 у бубрезима (250).

Природни претходник SGLT2i је супстанца флоризин, која је први пут екстрахована из коре дрвета јабуке 1835. године од стране француског научника (249). Иако флоризин има неселективан механизам деловања и тиме инхибира и SGLT1 и SGLT2 транспортере, што доводи до бројних нежељених ефеката као што су гастроинтестиналне тегобе, лоша гастроинтестинална апсорпција и ниска орална биорасположивост (251, 252), његово откриће је било кључни корак у развоју селективнијих SGLT2i.

SGLT2i имају специфичан механизам деловања који је независан од инсулина. Они блокирају SGLT2 у проксималним реналним тубулима, што доводи до смањења реапсорпције глукозе и последичне гликозурије, што резултира смањењем вредности гликемије и гликозилираног хемоглобина (HbA1c) (244). Поред емпаглифлозина и дапаглифлозина (Слика 22), представници ове класе лекова укључују и канаглифлозин,

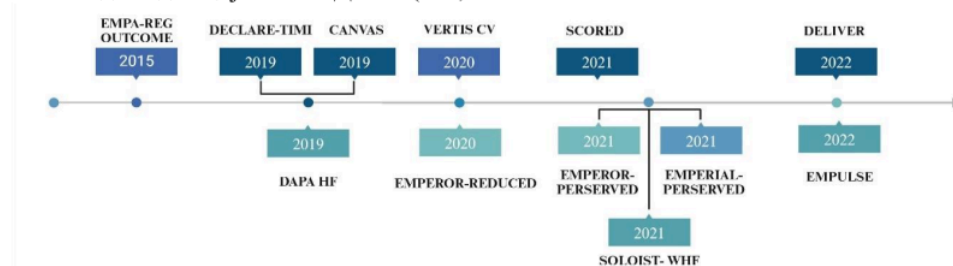
ертуглифлозин, ипраглифлозин, тофуглифлозин, лусеоглифлозин, сотаглифлозин и бексаглифлозин. Селективност за SGLT2 у поређењу са SGLT1 варира међу различитим агенсима у овој класи лекова. Највећа селективност за SGLT2 уочена је код емпаглифлозина (2.500 пута) и ертуглифлозина (2.000 пута), у односу на дапаглифлозин (1.200 пута) и канаглифлозин (250 пута), који имају значајно нижу селективност (253). SGLT2i имају централну улогу у лечењу пацијената са ДМТ2, али не само због њиховог хипогликемијског ефекта (254).



Слика 22. Хемијска структура емпаглифлозина (а) и дапаглифлозина (б).

1.8.2.1. Примена SGLT2 инхибитора код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2 и придруженом срчаном инсуфицијенцијом

КВБ су честа компликација у дијабетесу и представљају примарни узрок смртог исхода у око 80% ових пацијената (255). Из тог разлога, лечење пацијената са ДМТ2 представља велики изазов, будући да актуелни антидијабетици, иако ефикасни у регулацији гликемијског статуса, показују варијабилност у погледу утицаја на ризик од КВБ (254). Метформин, који је прва терапијска опција за пацијенате са ДМТ2 (256), нема значајан утицај на смањење стопе КВБ морталитета, АИМ или можданог удара код пацијената са високим КВБ ризиком (257). Озбиљна хипогликемија може повећати ризик од нежељених КВБ догађаја. Третман лековима из групе сулфонилуреа такође је показао контроверзе у погледу КВБ безбедности, посебно због ризика од тешке хипогликемије током лечења овим лековима (258). Употреба инсулина или тиазолидинедiona повезана је са повећањем телесне масе и ретенцијом течности (259). Поред тога, третман саксаглиптином, инхибитором дипептидил пептидазе 4 (енгл. *Dipeptidyl peptidase-4* - DDP4), повезан је са повећаним ризиком од хоспитализације због срчане инсуфицијенције (260). Међутим, пре неколико година, нова класа антидијабетика, SGLT2i, испитивана је у великим клиничким студијама са акцентом на КВБ безбедност и ефикасност (Слика 23). Ови лекови су показали значајно кардиопротективно дејство, јер, поред тога што повећавају ризик од хипогликемијских епизода, смањују нежељене КВБ исхода код пацијената са ДМТ2 (254).



Слика 23. Хронолошки приказ великих клиничких студија које су испитивале SGLT2i.

У претходној деценији спроведене су три велике клиничке студије које су испитивале КВ безбедност SGLT2i код пацијената са ДМТ2. Иако су се студије разликовале у проценту пацијената са већ установљеним КВБ на почетку истраживања - 99% у EMPA-REG OUTCOME (енгл. *The Empagliflozin Cardiovascular Outcome Event Trial in Type 2 Diabetes Mellitus Patients—Removing Excess Glucose*) студији, 66% у CANVAS Program (Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study) студији и 41% у DECLERE-TIMI 58 (Dapagliflozin Effects on Cardiovascular Events) студији - сви резултати указују на изванредне КВ бенефите SGLT2i (153, 154, 261).

EMPA-REG OUTCOME студија је била прва велика студија која је испитивала утицај SGLT2i на КВ исходе (153). Ова рандомизована, двоструко слепа, плацебом-контролисана студија укључивала је 7020 пацијената са ДМТ2 и КВБ. Након три године праћења, резултати су показали да је емпаглифлозин смањио инциденцу MACE (као што су КВ смрт, не-фатални ИМ или не-фатални мождани удар) за 14% и релативни ризик од КВ морталитета за 38% у односу на пацијенте који су примали плацебо. Међутим, није уочен значајан ефекат на атеросклеротске исхемијске догађаје. У погледу главних секундарних исхода (који укључују примарни исход уз хоспитализацију због нестабилне ангине пекторис), значајне разлике између емпаглифлозина и плацеба нису примећене (153). Емпаглифлозин је значајно снизио стопу КВ морталитета или морталитета услед других узрока, као и хоспитализацију због срчане инсуфицијенције. Такође, уочено је лако повишење хематокрита и хемоглобина, снижење телесне масе и артеријског крвног притиска, без значајног утицаја на срчану фреквенцију (153). *Post hoc* анализе EMPA-REG OUTCOME студије показале су повезаност између повишених вредности хематокрита и хемоглобина и сниженог ризика од хоспитализација због срчане инсуфицијенције, што се објашњава побољшаном функцијом миокарда и побољшаним снабдевањем кисеоником уз смањење преоптерећења (енгл. *preload*) и накнадног оптерећења (енгл. *afterload*) (262). Ова студија је била прва која је показала супериорност једног антидијабетика у погледу КВ исхода, чиме је поставила нове стандарде у лечењу пацијената са ДМТ2.

Америчка асоцијација за дијабетес (енгл. *The American Diabetes Association* - ADA) препоручује примену SGLT2i као додатну терапију за ДМТ2 који имају срчану инсуфицијенцију или су у високом ризику за развој исте (263). Према ESC и АНА/ACC/Удружења за срчану инсуфицијенцију Америке (енгл. *HF Society of America* - HFSA), употреба SGLT2i, укључујући емпаглифлозин и дапаглифлозин, је препоручена за лечење стабилних пацијената са HFrEF-ом. Ова препорука важи независно од присуства ДМТ2 и класификована је као препорука највише класе (I) за смањење инциденце КВ морталитета и хоспитализација услед срчане инсуфицијенције (22, 23). Третман емпаглифлозином и дапаглифлозином се спроводи са једнодневним дозним режимом од 10 mg, без потребе за титрацијом дозе и без потребе за честим лабораторијским мониторингом (264).

CANVAS Program студија која је укључивала преко 10.000 пацијената са ДМТ2 и високим КВ ризиком или постојећом КВБ, испитивала је ефикасност канаглифлозина у поређењу са плацебом (261). Резултати студије показали су да је канаглифлозин смањио инциденцу MACE за 14%. Иако ризик од КВ морталитета и морталитета због других узрока нису били значајно снижени, примећена је значајна редуција релативног ризика од хоспитализација услед срчане инсуфицијенције, и то за 33% (261).

Трећа велика клиничка студија, DECLARE-TIMI 58, обухватила је највећи број пацијената са ДМТ2 - више од 17.000 - са атеросклеротским КВБ (енгл. *Established atherosclerotic cardiovascular disease* - ASCVD) или вишеструким ризиком за развој истог (154). У овој студији, дапаглифлозин није показао супериорност или инфериорност у односу на плацебо када је у питању MACE. Међутим, лечење

дапаглифлозином било је повезано са значајним смањењем композитног исхода од 17%, који укључује КВ морталитет⁶ хоспитализације услед срчане инсуфицијенције.

VERTIS-CV (енгл. *the Evaluation of Ertugliflozin Efficacy and Safety Cardiovascular Outcomes*) студија испитивала је КВ и реналне исходе код преко 14.000 пацијената са ДМТ2 и присутним ASCVD-ом лечених ертуглифлозином (265). Резултати ове студије су показали су да је ертуглифлозин потврдио класни ефекат SGLT2i у смањењу броја хоспитализација због срчане инсуфицијенције. Међутим, у поређењу са плацебом, овај лек није значајно снизио инциденцу MACE-а (265). Разлике у КВ исходима између великих клиничких студија које су испитивале SGLT2i још увек нису у потпуности разјашњене (265). Описана хетерогеност може бити последица индивидуалних карактеристика различитих SGLT2i, укључујући специфичност за SGLT2 у односу на SGLT1 транспортере и додатне механизме дејства који надмашују њихове примарне ефекте (266).

Након завршетка великих клиничких студија, SGLT2i су показали обећавајуће резултате који превазилазе њихову примарну улогу у лечењу ДМТ2. Једна мета-анализа је открила да SGLT2i смањују релативни ризик од хоспитализације услед срчане инсуфицијенције за 31%, без обзира на присуство ASCVD-а или претходну срчану инсуфицијенцију (267). Ова открића су указала на кардиопротективни потенцијал SGLT2i изван њиховог примарног хипогликемијског дејства. Следеће клиничке студије су се стога усмериле на процену ефеката ових лекова на КВ исходе код пацијената без дијабетеса, како би се утврдило њихово потенцијално коришћење у ширем клиничком контексту.

1.8.2.2. Примена SGLT2i у лечењу срчане инсуфицијенције

У клиничкој студији² DAPA-HF (енгл. *Dapagliflozin and Prevention of Adverse Outcomes in Heart Failure*), испитивана је ефикасност дапаглифлозина у односу на плацебо код 4.744 пацијента са HFrEF-ом, укључујући пацијенте са или без присуства ДМТ2. Резултати ове студије су показали да је дапаглифлозин значајно снизио учесталост примарних крајњих исхода, који су обухватили погоршање срчане инсуфицијенције или КВ морталитет (268). Ова побољшања су била значајна и независна од присуства ДМТ2 код испитиване популације пацијената, што указује на кардиопротективне ефекте дапаглифлозина који превазилазе његову примарну улогу у регулацији вредности гликемије.

EMPEROR-Reduced (енгл. *Empagliflozin Outcome Trial in Patients with Chronic Heart Failure and a Reduced Ejection Fraction*) студија је испитивала је ефекте емпаглифлозина код 3.730 пацијената са хроничном срчаном инсуфицијенцијом (NYHA класа II-IV, EF $\leq$ 40%). Главни циљ ове студије био је процена утицаја терапије на инциденцу КВ морталитета и прву хоспитализацију због срчане инсуфицијенције, као и на укупан број хоспитализација због срчане инсуфицијенције (269). Резултати студије су показали да је емпаглифлозин значајно снизио релативни ризик од КВ морталитета и хоспитализација због срчане инсуфицијенције за 25% у поређењу са плацебом. Ови ефекти су били независни од присуства ДМТ2. Поред тога, терапија емпаглифлозином је значајно побољшала КВ и реналне исходе, што указује на његову кардиопротективну и ренопротективну улогу која није ограничена само на пацијенте са ДМТ2 (270).

EMPA-Tropism (енгл. *Are the „Cardiac Benefits” of Empagliflozin Independent of Its Hypoglycemic Activity? [ATRU-4]*) студија се бавила испитивањем утицаја емпаглифлозина на хроничну срчану инсуфицијенцију код пацијената са HFrEF-ом који

нису имали ДМТ2 (271). У ову студију је укључено више од 700 пацијената, а основна питања су била усмерена на побољшање ехокардиографских параметара, капацитета физичке активности и квалитета живота. Резултати након шестомесечног праћења показали су значајно побољшање ових параметара код пацијената који су лечени емпаглифлозином у односу на плацебо (271, 272). Посебно су уочена побољшања у ехокардиографским мерењима, што указује на побољшану функцију срца, као и у капацитету физичке активности и општем квалитету живота. Ови резултати су потврдили да позитивни ефекти емпаглифлозина нису ограничени само на пацијенте са ДМТ2, већ се препознају и у контексту срчане инсуфицијенције независно од гликемијског статуса.

Иако су други SGLT2 инхибитори, као што су дапаглифлозин и канаглифлозин, такође показали ефикасност у смањењу инциденце хоспитализација због срчане инсуфицијенције и напредовања бубрежне болести (267), емпаглифлозин се истиче као супериорнији у смањењу КВ морталитета и морталитета због других узрока код пацијената са ASCVD-ом (273, 274). Мета-анализе као што је она коју су спровели *Usman* и сарадници, који су обухватили више од 90.000 пацијената лечених са SGLT2i или плацебом, додатно су потврдиле ефикасност ових лекова. Показано је да терапија SGLT2i конзистентно смањује стопу КВ морталитета и нежељених догађаја повезаних са срчаном инсуфицијенцијом, било да се ради о пацијентима са срчаном инсуфицијенцијом, бубрежном инсуфицијенцијом, ДМТ2, или комбинацијом ових стања (275).

EMPEROR-Preserved (енгл. *Empagliflozin outcome trial in Patients With chrOnic heaRt Failure with Preserved Ejection Fraction*) студија испитивала је ефекте емпаглифлозина код пацијената са хроничном срчаном инсуфицијенцијом и очуваном EF (> 40%). У студији је учествовало више од 3.700 пацијената који су имали клиничке симптоме срчане инсуфицијенције (NYHA класа II-IV). Резултати су показали да је третман емпаглифлозином значајно смањio инциденцију примарних исхода, који су укључивали погоршање срчане инсуфицијенције и КВ морталитет, у поређењу са плацебом. Такође, емпаглифлозин је смањio број хоспитализација услед срчане инсуфицијенције и КВ морталитет, и то независно од присуства ДМТ2 (276). АНА/ACC/HFSA препоручује употребу емпаглифлозина код пацијената са HFmrEF-ом и HFpEF-ом (класа препорука II, ниво доказа A) (264). DELIVER (енгл. *Dapagliflozin Evaluation to Improve the LIVEs of Patients with Preserved Ejection Fraction Heart Failure*) студија је испитивала ефекте дапаглифлозина у популацији пацијената са HFmrEF-ом и HFpEF-ом. У овој студији, која је укључивала преко 6.000 пацијената, показано је да је дапаглифлозин значајно снизио инциденцу КВ морталитета и хоспитализација услед срчане инсуфицијенције. Ови резултати потврђују да SGLT2i имају значајно место у лечењу хроничне срчане инсуфицијенције, не само код пацијената са смањеном EF, већ и код оних са очуваном EF (277).

SOLOIST-WHF (енгл. *Effect of Sotagliflozin on Cardiovascular Events in Patients With Type 2 Diabetes Post Worsening Heart Failure*) студија, испитивала је неселективни SGLT2i, сотаглифлозин, код преко 1.200 пацијената са ДМТ2 који су имали погоршање срчане инсуфицијенције (278). Резултати су показали да је сотаглифлозин значајно смањio укупни КВ морталитет, као и хоспитализације и хитне посете због срчане инсуфицијенције за 33% у односу на плацебо (278). EMPERIAL (*Effect of EMPagliflozin on ExeRcise ability and HF symptoms in patients with chronic heArt faiLure*) студије су испитивале ефекте емпаглифлозина на физичку способност и исходе пријављене од стране пацијената са HFmrEF-ом и HFpEF-ом, са или без ДМТ2 (279). Резултати ових студија су потврдили да су SGLT2i безбедни за примену код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом, са или без ДМТ2 (279).

1.8.2.3. Примена SGLT2i у лечењу инфаркта миокарда

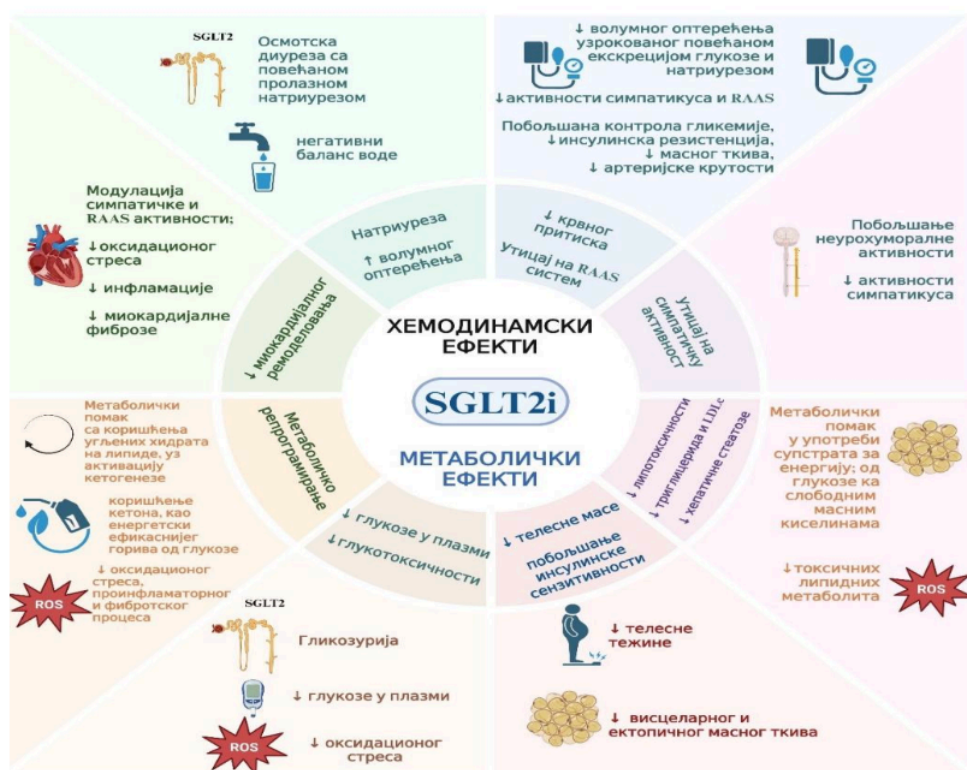
Истраживања о примени SGLT2i у популацији пацијената након АИМ-а указују на њихову различиту ефикасност, што потврђује сложеност примене ових лекова у овом клиничком контексту.

ЕММУ (енгл. *The Empagliflozin in Patients with Acute Myocardial Infarction*) студија је обухватила пацијенте који су примили емпаглифлозин након 72 сата од урађене PCI. У студији су уочене снижене вредности NT-proBNP-а у серуму код пацијената лечених емпаглифлозином у поређењу са плацебом (280). У ЕМПАСТ-МИ (енгл. *Empagliflozin on Hospitalization for Heart Failure and Mortality in Patients with Acute Myocardial Infarction*) студији, истраживан је утицај емпаглифлозина на ризик од прве хоспитализације услед срчане инсуфицијенције и морталитета услед других узрока код пацијената са АИМ-ом. Резултати ове студије нису показали значајан ефекат терапије емпаглифлозином у смањењу ових исхода у односу на плацебо (281), што указује на потребу за даљим истраживањем и потврђивањем могућих користи ових лекова у овом клиничком сценарију. У DAPA-МИ (енгл. *Dapagliflozin Effects on Cardiovascular Events in Patients with an Acute Heart Attack*) студији, испитивани су ефекти дапаглифлозина код пацијената са АИМ. Иако су примећене одређене кардиометаболичке предности током примене дапаглифлозина, није било значајног смањења инциденце КВ морталитета или хоспитализација због срчане инсуфицијенције, у поређењу са плацебом (282).

1.8.2.4. Хемодинамски и метаболички ефекти SGLT2i у клиничким студијама

Инциденца КВ морбидитета и морталитета значајно се повећава у присуству фактора ризика за КВБ, као што су хипертензија, дислипидемија, инсулинска резистенција и/или ДМТ2 (283). Иако су кардиопротективни ефекти SGLT2i прилично истражени, прецизни механизми који стоје иза ових ефеката још увек нису у потпуности разјашњени. Сматра се да се ови ефекти не могу у потпуности приписати хипогликемијском дејству SGLT2i.

У следећим поглављима биће детаљно описани неки од основних хемодинамских и метаболичких ефеката, који могу делимично објаснити кардиопротективни утицај ове терапије (Слика 24).



Слика 24. Хемодинамски и метаболички ефекти SGLT2i.

1.8.2.4.1. Хемодинамски ефекти SGLT2i

Неколико великих студија показало је значајан утицај SGLT2i на факторе ризика за КВБ. Поред основног хипогликемијског ефекта, ови агенси демонстрирају и антихипертензивна својства, која се огледају у смањењу систолног крвног притиска за 3-5mmHg и дијастолног крвног притиска за 2-3mmHg (284). Пад артеријског крвног притиска није био праћен повећањем срчане фреквенције, што може указивати на блокаду рефлексне симпатичке активности (285). Са друге стране, директни ефекти SGLT2i на синоатријални (енгл. *Sinoatrial* - SA) чвор нису још увек довољно истражени (254).

Иако антихипертензивни ефекти SGLT2i нису још увек у потпуности разјашњени, постоји више механизма који се сматрају важним за њихову способност да сниже крвни притисак. Један од кључних механизма је смањење реадсорпције натријума у проксималним реналним тубулима, што доводи до побољшане диурезе, губитка телесне масе и побољшања васкуларне функције (285). Ипак, иако редукција артеријског крвног притиска остаје стабилна током хроничног третмана са SGLT2i, волумен урина има тенденцију да се врати на почетне вредности. Ово запажање сугерише да антихипертензивни ефекат SGLT2i не зависи искључиво од њиховог диуретског и натриуретског потенцијала, већ да постоји и други механизам који је потенцијално омогућава дугорочну контролу артеријског крвног притиска услед примене ових лекова (286). Са друге стране, губитак телесне масе од 1,6 до 2,5kg, који се углавном односи на адипозно ткиво код дијабетичара (287-289), може допринети

снижењу артеријског крвног притиска. Међутим, истраживања су показала да канаглифлозин доприноси само 40% редукцији систолног крвног притиска путем овог механизма (290). Ефекти емпаглифлозина у редукцији артеријског крвног притиска укључују протективно дејство овог агенса на крутост артеријских крвних судова и васкуларну резистенцију (291).

Повезаност између повећаног конзумирања натријума и хипертензије давно је установљена (292), као и корелација између акумулације натријума у кожи и развоја хипертрофије леве коморе (293). У једној плацебо-контролисаној студији, показано је да дапаглифлозин снижава количину натријума у кожи, што је праћено повољним ефектима на телесену масу и артеријски крвни притисак код пацијената са ДМТ2 (294). Ово сугерише да снижење количине натријума у кожи може бити важан параметар кардиопротективних својстава SGLT2i. Повећана диуреза и смањење артеријског крвног притиска током примене SGLT2i могу довести до смањења *preload*-а и *afterload*-а (295, 296). Ови ефекти доприносе смањењу акумулације течности у организму, што је уједно један од најчешћих узрока за честе хоспитализације пацијената са хроничном срчаном инсуфицијенцијом (397). У DAPA LVH (енгл. *Does Dapagliflozin Regress Left Ventricular Hypertrophy in Patients with Type 2 Diabetes?*) студији, третман дапаглифлозином је значајно смањио масу леве коморе, што је потврђено на cMRI-у код пацијената са ДМТ2 и хипертрофијом леве коморе. Овај ефекат се може приписати различитим механизмима, укључујући натриурезу и диурезу, који су праћени позитивним утицајем на вредности артеријског крвног притиска и смањење гојазности (298). Поред тога, у EMPA-HEART CardioLink-6 (енгл. *Effects of Empagliflozin on Cardiac Structure in Patients with Type 2 Diabetes*) студији, показано је да емпаглифлозин има протективне ефекте у смислу смањења ремоделовања леве коморе и индекса масе леве коморе (енгл. *Left ventricular mass index - LVMI*), што је потврђено на cMRI-у код пацијената са ДМТ2 и коронарном артеријском болешћу (енгл. *Coronary artery disease - CAD*) (299). Насупрот томе, у EMPA-HEART 2 CardioLink-7 (енгл. *Empagliflozin and Cardiac Remodelling in People Without Diabetes*) студији, третман емпаглифлозином није показао значајне ефекте на LVMI код особа без дијабетеса и срчане инсуфицијенције, али са факторима ризика за ремоделовање миокарда (300).

Рано након увођења SGLT2i у терапију, настаје пораст вредности хематокрита који се одржавао током лечења, што се делимично може објаснити хемоконцентрацијом која настаје због побољшане диурезе и смањења запремине екстрацелуларне течности (153, 301). Натриуретски и диуретски ефекти дапаглифлозина смањују запремину плазме за 7% (4,8–12,4%) код дијабетичара, што је праћено смањењем 24-часовног артеријског крвног притиска и порастом хематокрита за 2,2% у 12. недељи лечења (302). Међутим, третман дапаглифлозином такође повећава лучење еритропоетина и броја ретикулоцита, што може бити логично објашњење за повећање вредности хематокрита и хемоглобина код пацијената лечених овим агенсом (302). Слично томе, третман емпаглифлозином код пацијената са ДМТ2 и CAD-ом довео је до повећања хематокрита, вероватно због раног пораста нивоа еритропоетина и појачане еритропоезе (303). Штавише, показано је да канаглифлозин спречава појаву тубулоинтерстицијалног оштећења код пацијената са ДМТ2 и оштећењем бубрега (304), што може објаснити повећану производњу еритропоетина која је посредована ћелијама сличним фибробластима код пацијената са оштећеном функцијом бубрега (305).

Поред повољног утицаја на митохондријску функцију у кардиомиоцитима, пролиферацију ћелија, инфламаторне процесе и ангиогенезу, повишени нивои еритропоетина могу бити кардиопротективни због пораста хематокрита и последичног побољшања снабдевања ткива кисеоникаом (303). Интересантно је напоменути да је у

EMPA-REG студији однос повећања вредности хемоглобина и хематокрита током примене емпаглифозина било повезано са смањењем стопе КВ mortalитета (306).

Иако појединачни ефекти SGLT2i на различите КВ факторе ризика можда не доводе до одмах уочљиве или снажне кардиопротекције, кумулативни утицај ових лекова на хемодинамске и метаболичке параметре може имати значајну улогу у њиховој укупној кардиопротективној ефективности (307).

1.8.2.4.2. Метаболички ефекти SGLT2i

Од тренутка открића, SGLT2i су показали јединствен двоструки ефекат: повећање екскреције глукозе и губитак телесне масе. Поред директне инхибиција реапсорпције глукозе у реналним епителним ћелијама проксималних тубула (S1 сегмент), што доводи до снижења концентрације глукозе у плазми, SGLT2i имају и индиректне ефекте који доприносе снижењу гликемије (254). Ови лекови побољшавају инсулинску резистенцију, смањују секрецију инсулина из β -ћелија и повећавају секрецију глукагона из α -ћелија панкреасних острваца (308). Пад концентрације глукозе наште у плазми може изгледати парадоксално с обзиром на то да се ендогена продукција глукозе повећана током примене SGLT2i (309). Међутим, студије су показале да постоји прецизан баланс између ендогене продукције глукозе и њене екскреције урином (310). Дневна секреција глукозе не би требало да надмаши њен дневни губитак (309), што, у комбинацији са претходно описаним механизмом, спречава појаву хипогликемије. Специфичнија експресија SGLT2 пронађена је у α -ћелијама панкреасних острваца (311), што указује на могући компензаторни механизам глуконеогенезе који се јавља као одговор на њихов примарни гликозурични ефекат.

Од увођења SGLT2i у терапију, показано је да ови лекови смањују телесну масу пацијената са ДМТ2 у поређењу са плацебом, и то у дозно-зависном распону од 1,6 kg до 2,8 kg (287). Повећана екскреција глукозе урином, која укључује дневну елиминацију од 60 g до 100 g глукозе, резултира калоријском дефицијенцијом и додатно подстиче губитак телесне тежине код дијабетичара лечених са SGLT2i (312). Међутим, у CANTATA-SU (енгл. *CANagliflozin Treatment and Trial Analysis-Sulfonylurea*) студији, примећено је да је губитак телесне масе током лечења канаглифозином био сличан без обзира на дозу примењеног лека (100 mg/300 mg дневно), што сугерише да након постизања одређене границе клиничке ефикасности, губитак телесне масе са SGLT2i може ући у плато фазу (313). Канаглифлозин такође узрокује смањење телесне масе пацијената са прекомерном тежином или гојазношћу без дијабетеса, што је повезано са повећаном екскрецијом глукозе и смањењем од приближно 4 kcal/g глукозе (314). Иако SGLT2i изазивају само скромне и непостојане ефекте на телесну масу, што сугерише да сами ови метаболички ефекти можда не објашњавају у потпуности кардиопротекцију уочену код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (296), ови лекови утичу на смањење висцералног адипозног ткива, што може допринети побољшању кардиометаболичког ризика код пацијената са ДМТ2 (289). Те претпоставке су додатно поткрепљене чињеницом да SGLT2i имају позитиван ефекат на не-алкохолну болест масне јетре (енгл. *Non-alcoholic fatty liver disease* - NAFLD), што је видљиво као смањење количине масти у јетри на MRI или другим техникама снимања, као и на биомаркере јетре код пацијената са ДМТ2 (315). NAFLD је коморбидитет код пацијената са ДМТ2 и повезан је са хиперинсулинемијом и прекомерном акумулацијом масног ткива, што су и предиспонујући фактори за развој ове болести (316). Поред тога, NAFLD је повезан са повећаним ризиком за КВБ (317), које су један од главних узрока смртности у популацији пацијената са NAFLD-ом (318).

Стога, хепатопротективни ефекти SGLT2i могу додатно допринети њиховој укупној кардиопротекцији и унапредити кардиометаболички ризик код пацијената са ДМТ2 (254).

Резултати чувене Фрамингамске студије (енгл. *The Framingham Heart Study*) показали су да је хиперурикемија независан фактор ризика за развој ДМТ2 (319). SGLT2i су показали способност да смање концентрацију мокраћне киселине у серуму гликозурија-посредованим повећањем елиминације мокраћне киселине, што је ефекат који је снажан, брз и упоран, са редукцијом концентрације мокраћне киселине у серуму од 37 до 46 $\mu\text{mol/L}$ код пацијената са ДМТ2 (320). У једној проспективној студији која је укључивала особе које живе у заједници показано је да је хиперурикемија независан фактор ризика за развој срчане инсуфицијенције (321). Поред пацијената са HFrEF-ом, хиперурикемија је присутна и код пацијената са HFpEF-ом и хипертензијом и укључена је у патофизиолошку каскаду овог синдрома преко бројних механизма (322).

Дислипидемија је често присутна код пацијената са ДМТ2, погађајући више од 50% ове популације (323). Код дијабетичара, нерегулисан липидни статус најчешће се огледа у повишеним нивоима триглицерида и смањењу липопротеина високе густине (енгл. *High-Density Lipoprotein* - HDL), иако повишене вредности липопротеина ниске густине (енгл. *Low-Density Lipoprotein* -LDL) нису неуобичајене (324). Показано је да SGLT2i доводе до скромних промена у липидном статусу, укључујући смањење HDL-а и концентрације триглицерида, али такође и до пораста концентрације LDL-а (325). Упркос овом благо повећаним вредностима LDL-а, примећено је снижење партикула LDL-а мале густине за 20-30% (326), што може потенцијално смањити атерогени ризик, чак и када су укупне вредности LDL-а ниже (327). Према томе, и мале промене у концентрацији липида у серуму могу значајно побољшати профил КВ ризика код пацијената на хроничном третману са SGLT2i (254).

Као што је већ напоменуто, срчана инсуфицијенција често подразумева поремећај енергетског метаболизма, који се манифестује кроз смањену употребу масних киселина и повећану гликолизу, која је у овом случају примаран процес за продукцију енергије (328). На овај начин, услед преласка са β -оксидације масних киселина на катаболизам глукозе, као главни процес за производњу енергије, продукује се мања количина АТР, који је неопходан оштећеном срчаном мишићу (329). Примена SGLT2i повећава концентрацију кетонских тела у циркулацији, што корелира са смањењем вредности глукозе у плазми (330). Повећана продукција кетона може представљати заштитни механизам у срчаној инсуфицијенцији. Неки истраживачи су указали на могуће заједничко кардиопротективно дејство повећаног снабдевања кисеоником, хемоконцентрацију и повољан избор енергетског супстрата (331).

Упркос бројним хемодинамским и метаболичким променама које су повезане са применом SGLT2i, главни ефекат који омогућава кардиопротективне ефекте ових лекова није у потпуности разјашњен. Евалуација сваког од системских ефеката SGLT2i и превасходно молекуларних механизма одговорних за њихово дејство омогућила би бољи увид у потенцијал синергистичког ефект ових лекова и њихове улоге у побољшању КВ здравља код пацијената са ДМТ2 и срчаном инсуфицијенцијом ових лекова и њихове улоге у побољшању КВ здравља код пацијената са ДМТ2 и срчаном инсуфицијенцијом.

1.8.2.5. Нежељена дејства, токсичност и контраиндикације за примену SGLT2i

Најчешћи нежељени ефекти који су забележени током примене SGLT2i су микотичне инфекције женских гениталних органа, инфекције уринарног тракта,

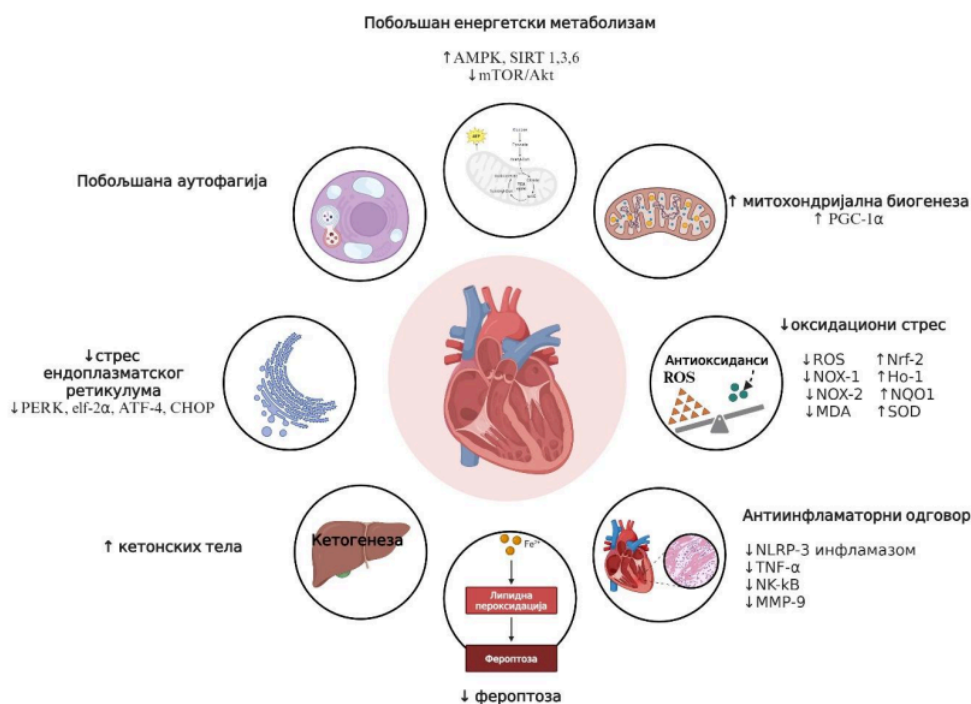
појачано мокрење, повраћање и опстипација (332), као и појава реакција хиперсензитивности у виду еритема, осипа, пруритуса и ангиоедема (333). SGLT2i, посебно канаглифлозин, повезан је са повећаним ризиком од ампутације доњих екстремитета и то у већој мери него емпаглифлозин, док се примена дапаглифлозина повезује са повећаним ризиком од ампутације прстију (334). У студијама CANVAS (енгл. *The Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study*) и CANVAS-R (енгл. *the Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study-Renal*) примећена је двоструко већа инциденца ампутације доњих екстремитета и прстију током примене канаглифлозина у поређењу са плацебом (261). Третман SGLT2i носи и ризик за развој оштећења бубрега, иако јасан механизам за настанак овог стања током примене ових лекова није у потпуности разјашњен. Показано је да је велики број пацијената имао бубрежну инсуфицијенцију након примене SGLT2i (335), што се код неких манифестовало месец дана од почетка лечења. Ризик за настанак дијабетесне кетоацидозе је скоро три пута већи током примене SGLT2i, и то у највећој мери током терапије канаглифлозином, а потом емпаглифлозином и дапаглифлозином (336). Контраиндикације за примену SGLT2i су третман дијализом, као и појава хиперсензитивних реакција попут анафилаксе (333).

До сада није формулисана антидот терапија за SGLT2i, нити се ови лекови могу уклонити из организма дијализом (337). Описани случајеви тровања овим агенсима не подразумевају хипогликемију, осим када је у питању била педијатријска популација (338). Главни симптоми тровања су били мучнина, повраћање и вртоглавица. Са друге стране намерно предозирање SGLT2i може да узрокује хипогликемију, повраћање, конфузију, хипертензију, тахикардију и уринарну инконтиненцију (338).

Непосредно пре почетка третмана са SGLT2i, неопходан је мониторинг хидратације, провера густине костију, процена КВ профила пацијената, као и процена функције јетре и бубрега. Преписивање SGLT2i треба ограничити, посебно ако пацијент има историју дијабетеса тип 1, ДМТ2 подложног кетоацидозе, као и уколико је брзина гломерулске филтрације < 60 mL/min (339).

1.8.2.6. Кардиопротективни ефекти SGLT2i у експерименталним студијама

Након што су велике клиничке студије показале да кардиопротективно дејство SGLT2i превазилази њихов познати хипогликемијски ефекат, логичан след догађаја је био експанзија претклиничких студија које истражују молекулске механизме ових лекова (254). Иако тачан механизам који посредује у позитивним ефектима SGLT2i на КВ систем још увек није у потпуности разјашњен, у наредним поглављима биће представљени најважнији механистички аспекти деловања ових лекова (**Слика 25**).



Слика 25. Механизам дејства и протективни ефекти SGLT2i.

1.8.2.6.1. Ефекти SGLT2i на фиброзу, хипертрофију и ремоделовање миокарда у анималним моделима кардиоваскуларних болести

Претходне студије су показале да хипергликемија повећава ниво ROS-а, што доводи до поремећаја контрактилне функције миокарда и развоја фиброзе у левој комори дијабетичних пацова (340, 341). Настанак фиброзе миокарда, услед продукција ROS, условљен је продукцијом профибротских фактора, као што је TGF- β , и активацијом епителног мезенхимског прелазног процеса који поспешује диференцијацију срчаних фибробласта у миофибробласте који производе ECM (342). Антифибротски ефекти SGLT2i показани су у различитим анималним моделима. У својој студији, Li и сарадници, су показали антифибротски потенцијал емпаглифлозина у моделу дијабетичних мишева. Овај ефекат је највероватније резултат инхибиције формирања колагена преко TGF- β /Smad сигналне каскаде и смањења оксидационог стреса транслокацијом нуклеарног фактора еритроид-2 (енгл. *The nuclear factor erythroid 2-related factor 2* - Nrf2) у нуклеус и активацијом Nrf2/елемент који реагује на антиоксиданс (енгл. *Antioxidant responsive element* - ARE) сигналне каскаде (343). Повољни ефекти емпаглифлозина у дијабетесној кардиомиопатији огледају се у очувању структуре и функције миокарда (343). У моделу не-дијабетичних мишева третираних DOX-ом, емпаглифлозин побољшава функцију миокарда смањујући фероптозу, фиброзу, оксидациони стрес и инфламацију преко протеин 3 рецептора сличног домену који везује нуклеотиде (енгл. *Nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3* - NLRP3) и сигналних каскада примарног одговора мијелоидне диференцијације 88 (енгл. *Myeloid differentiation primary response*

88 - MyD88) (344). Штавише, дапаглифлозин је ублажио фиброзу ткива миокарда и смањio инфилтрацију миофибробласта током ремоделовања након АИМ код пацова (345). Највероватнији механизам одговоран за ове ефекте је активација STAT3 посредована дејством ROS-a, која подстиче поларизацију макрофага у правцу антиинфламаторног M2 фенотипа. У моделу дијабетеса код зечева, дапаглифлозин смањује фиброзу у ткиву миокарда и дијастолну дисфункцију леве коморе преко сигналног пута серумом и глукокортикоидом регулисане киназе 1 (енгл. *Serum- and glucocorticoid-induced kinase 1* - SGK1) (346). Процес фиброзе је делом регулише TGF- β , преко протеина Smad који делује унутар ћелије. Емпаглифлозин смањује експресију колагена I и III, као и α SMA депозите у ткиву миокарда што је последица активације Nrf2/ARE и инхибиције TGF- β /Smad сигнализације (343).

1.8.2.6.2. Ефекти SGLT2i на оксидациони стрес, инфламацију и апоптозу у анималним моделима кардиоваскуларних болести

Значајан број експерименталних студија на кардиометаболичким моделима испитивао је утицај SGLT2i на инхибицију или активацију различитих сигналних каскада које регулишу равнотежу између про- и антиоксиданаса, као и њихову способност да спрече оксидациона оштећења и апоптозу у моделима KB патологија (254). Иницијалне студије које су истраживале ефекте SGLT2i на хипергликемију у моделу DMT2 указале су на способност ових лекова да смање оксидациони стрес (347). Аутори су открили да третман емпаглифлозином, дапаглифлозином и канаглифлозином побољшава функцију ендотела аорте мишева. Ово побољшање је последица спречавања преузимања глукозе и смањења продукције ROS-a, што је резултат деловања на рецептор 2 који активира протеазу (енгл. *Protease Activated Receptor 2* - PAR-2) (347). Штавише, протективни ефекат емпаглифлозина на ћелије изложене хипергликемији огледа се у смањењу продукције ROS-a, независно од транспорта глукозе (348).

Сматра се да хомеостаза оксидо-редукционе равнотеже и вредности антиоксиданаса једним делом зависе од активности транскрипционог фактора 2 повезаног са Nrf2 (349). У анималном моделу дијабетеса мишева, емпаглифлозин је значајно снижио вредности маркера оксидационог стреса, као што су липид хидропероксид и малондиалдехид, и повећао антиоксидациону заштитну способност повећањем активности SOD и GPx у ткиву миокарда. Ова побољшања су резултат смањења експресије NOX4 експресије, најзаступљеније изоформе NAD(P)H оксидазе у кардиомиоцитима (350), што је највероватније последица активације Nrf2 који се везује за ARE (354). Слично запажање је примећено у ткиву преткомора дијабетичних и не-дијабетичних глодара (351). Хронични третман емпаглифлозином такође је спречио дијабетесну кардиомиопатију код мишева, смањујући експресију Nrf2 и побољшавајући функцију митохондрија у ткиву миокарда (352). Антиоксидациони ефекти емпаглифлозина, који укључују смањење продукције ROS-a, деловањем на сигналну каскаду 5' аденозин монофосфат-активирани протеин киназе (енгл. *Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase* - AMPK), смањује инциденцију атријалне фибрилације код дијабетичних пацова (351). У *in vitro* условима, емпаглифлозин редукује стрес ендоплазматског ретикулума и последично снижава оксидациони стрес, инфламацију и апоптозу кардиомиоцита у моделу DOX-индуковане кардиомиопатије пацова (353). У овом моделу, емпаглифлозин смањује митохондријалну дисфункцију регулацијом оксидационог стреса и метаболизма кетонских тела (354). Штавише, антиоксидациони и антиапоптотски ефекти емпаглифлозина не зависе од инхибиције

SGLT2 транспортера (355). Емпаглифлозин такође показује кардиопротективно дејство у моделу трастузимабом-индуковане кардиотоксичности код мишева, спречавајући оштећење дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) и фероптозу (356). Поред тога, дапаглифлозин смањује продукцију ROS-а, SOD и нитротирозина, што је резултат ROS-зависне активације STAT3 сигналне каскаде (344). Интеракција између васкуларне инфламације и оксидационог стреса је уско повезана са КВ морбидитетом и морталитетом (357). Хронични третман емпаглифлозином доводи до снижења нивоа SOD-а у ткиву миокарда код предиабетичних пацова са метаболичким синдромом, што утиче на смањење хипертрофије и фиброзе миокарда (358).

С обзиром да су ДМТ2 и КВБ праћене хроничном инфламацијом ниског степена (359), циљање различитих инфламацијских каскада могло да буде кључни механизам за побољшање терапијских стратегија (254). SGLT2i показују антиинфламацијски потенцијал, што је и показано у неким експерименталним студијама. NLRP3 инфламазом, сигнални комплекс који подстиче секрецију проинфламацијских цитокина, као што је IL-1 β , доприноси патофизиолошкој каскади различитих хроничних болести као што су дијабетес (360) и срчана инсуфицијенција (361). У моделу дијабетеса код *BTBR ob/ob* мишева, дапаглифлозин је испољио повољне ефекте на фиброзу, ремоделовање и функцију леве коморе, AMPK-зависним механизмом (362). Овај ефекат је праћен смањеном активацијом NLRP3 инфламазома и сниженим нивоима IL1- β , IL-6, TNF- α , и CASP-1. Штавише, лечење са емпаглифлозином такође је утицало на сигнализацију NLRP3 инфламазома и последично ублажило контрактилну дисфункцију у моделима HFrEF-а и HFpEF-а код нормогликемичних глодара (363). Емпаглифлозин је показао своје антиинфламаторне ефекте смањењем инфилтрације макрофага, што је довело до смањења интерстицијалне фиброзе у ткиву миокарда код пацова са предиабетичким метаболичким синдромом (358), као и код мишева са генетски-индукованим дијабетесом/гојазношћу (364). Кардиопротективни ефекти су такође примећени и код других животињских врста, као што је модел срчане инсуфицијенције код риба зебрица, где је емпаглифлозин смањио експресију IL-1 β и циклооксигеназе-2, без обзира на присуство дијабетеса (365). Код мишева са индукованом дијабетичком кардиомиопатијом, дапаглифлозин је испољио своја антифибротске и антиинфламаторне ефекте, уз смањење уласка калцијума и производње ROS у изолованим кардиомиоцитима (366).

Показано је SGLT2i делује преко AMPK, ензима који познатог као регулатор метаболичке хомеостазе, промовишући катаболизам и инхибирајући анаболизам (367). Као медијатор различитих хормонских сигнала, AMPK има заштитне ефекте на митохондрије и смањује инфламаторне процесе, апоптозу, фиброзу, те побољшава оксидационо-редукциони статус. Поремећаји у AMPK сигнализацији добро су утврђени у дијабетесу, док његова активација највероватније побољшава хомеостазу глукозе и осетљивост на инсулин (368). Емпаглифлозин активира AMPK/Drp1 сигналну каскаду код мишева са дијабетесом индукованим стрептозотоцином (енгл. *Streptozotocin* - STZ), штитећи митохондрије кроз ублажавање митохондријске фисије и производње митохондријских ROS-а, уз побољшање функције васкуларне баријере, фосфорилације ендотелне NO синтазе (енгл. *endothelial NO synthase* - eNOS) и микроваскуларне повреде коронарних ендотелних ћелија (369). Експерименталне студије су показале да емпаглифлозин успешно превенира ремоделовање миокарда утицајем на повећање експресије срчане гуанозин трифосфат циклохидролазе 1 (енгл. *Cardiac GTP cyclohydrolase 1* - cGCH1) и следствене активације неуроналне NO синтазе (енгл. *Neuronal NO synthase* - nNOS) и eNOS и инхибиције индуцибилне NO синтазе (енгл. *Inducible NO synthase* - iNOS) (370).

Као крајњи исход, наступа повећање концентрације NO, што је један од претпостављених механизма који посредује у наведеној кардиопротекцији током примене емпаглифлозина код дијабетичних пацова са ИМ (370). Штавише, у моделу IRI и хипоксије/реоксигенације (енгл. hypoxia/reoxygenation - H/R) у изолованим кардиомиоцитима, емпаглифлозин је смањio величину инфарктног подручја и побољшао срчану контрактилност, утичући на AMPK сигналне путеве (371). Са друге стране, TGF- β /Smad, који је снажно укључен у регулацију ткивне фиброзе, је још један сигнални пут који је погођен емпаглифлозином, који инхибира његову активност и смањује фиброзу ткива миокарда (343).

Антиапоптозни ефекти SGLT2i су показани у анималним моделима преддијабетеса и дијабетеса са IRI миокарда. У овим моделима, и акутна и хронична примена SGLT2i показала је способност да снизи однос про- и антиапоптозних маркера (Bax/Bcl-2) и да смањи величину инфарктног подручја (372, 373). Једна студија је показала да је третманом емпаглифлозином значајно смањio вредности екстрацелуларне сигналом-регулисане киназе 1/2 (енгл. *The extracellular signal-regulated kinase 1/2* - ERK1/2) и проапоптозног гена Bax. Такође, уочено је снижење вредности pSTAT3, који утиче на експресију антиапоптозног протеина Bcl-2. Овај третман је побољшао поменути дисбаланс, чиме је смањен степен апоптозе кардиомиоцита (374).

1.9. АНИМАЛНИ МОДЕЛИ СРЧАНЕ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈЕ

Употреба анималних модела у претклиничким истраживањима значајно је унапредило разумевање патофизиологије КВБ, као и развој дијагностичких метода и валидацију различитих превентивних и терапијских стратегија, укључујући фармаколошке третмане и интервентне приступе (375). Током 2018. године, у Европској Унији је изведено скоро 11 милиона експеримената на кичмењацима и око 4 милиона експерименталних процедура на сисарима (не рачунајући мишеве и пацове). Две године касније, у САД је урађено око 20 милиона експерименталних процедура на малим и 800.000 на великим анималним моделима (376). Међутим, још увек постоји потреба за смањењем јаза између лабораторијских истраживања и клиничких студија, како би се осигурала директна применљивост резултата на хуману популацију у клиничкој пракси (375).

Као крајњи патофизиолошки догађај, срчана инсуфицијенција може настати као последица различитих КВБ, укључујући трајно оптерећење леве коморе притиском или волуменом, АИМ или исхемију и кардиомиопатије (190). Базичне студије са анималним моделима срчане инсуфицијенције су од великог значаја за испитивање и идентификовање нових терапијских могућности (376). Још 1959. године *Thomas* и *Hartroft* су били међу првим истраживачима који су указали на развој срчане дисфункције која је настала као последица исхране богате мастима (377). Изузетан значај експерименталних студија за усмеравање испитивања фармаколошких агенаса у хуманој популацији уочио се посебно након студије *Pfeffer* и сарадника. Ови аутори су спровели прву студију у којој су утврђени кардиопротективни ефекти ACEi у моделу АИМ пацова (378), што је био камен темељац за каснија клиничка истраживања и увођење ових лекова као златног стандарда у лечењу пацијената са HFGrEF.

До данас, уобичајени анимални модели који се примењују за истраживања срчане инсуфицијенције сврстани су у четири главне категорије: модели изазвани применом фармаколошких агенаса, хируршки модели, модели хипертензије и модели изазвани генетским модификацијама (379). Избор анималног модела за одређено

истраживање зависи од бројних и разноврсних фактора, укључујући изводљивост, цену и доступност ресурса и објеката, као и искуство и вештине истраживача. Велики и мали анимални модели разликују се у многим аспектима и оба истраживачка приступа имају своје предности и мане. Велики анимални модели, као што је свиња, која је уједно и најчешће коришћена, имају веће сличности са хуманом КВ анатомијом и физиологијом, док су мали анимални модели економичнији и са краћим гестацијским периодом што умногоме олакшава извођење експерименталних студија.

1.9.1 Велики анимални модели срчане инсуфицијенције

Повећање употребе великих анималних модела срчане инсуфицијенције је од изузетне важности за откривање нових механизма који леже у основи патофизиологије овог синдрома, као и за пружање драгоцених информација у вези са безбедношћу и ефикасношћу нових терапија, чиме се побољшава превод резултата анималних истраживања у клиничку праксу (380). Пацијенти са КВБ представљају широку и хетерогену популацију, у којој индивидуалне карактеристике попут генетских и фактора животне средине могу прилично да утичу на презентовање КВБ и његов ток (381). Анимални модели нису у могућности да у потпуности изнесу ову биолошку разноликост хумане популације, с обзиром да су у питању генетски идентичне врсте и да бораве у контролисаним условима животне средине (381). Међутим, одабир анималног модела пре свега зависи од неопходних комбинација патофизиолошких карактеристика које су потребне ради задовољавања специфичних истраживачких циљева, као и претходно поменутих техничких могућности за спровођење анималне студије (382).

1.9.1.1. Модели миокардијалне исхемије/инфаркта миокарда

Међу првим истраживачима, *Reimer* и *Jennings* су спроводили студије на моделу АИМ код паса како би прецизније разумели иреверзибилно оштећење миокарда узроковано продуженим периодом исхемије (383). Аутори су дошли до закључка да исхемија миокарда узрокује смрт кардиомиоцита, са карактеристичним ширењем по обрасцу „таласног фронта”, крећући се од субендокардијума ка епикарду. Такође, показано је и да рано спроведена реперфузија има протективни ефекат на ткиво миокарда (384). Након АИМ, оштећење срчаног мишића се испољава у виду промене у величини, облику и функцији леве коморе. Ове промене, познате као ремоделовање миокарда, су у почетку компензаторне, али током времена доводе до штетне каскаде молекуларних и ћелијских догађаја који доприносе развоју срчане слабости (385). Проширење инфарктног подручја у раној фази предвиђа касну дилатацију и губитак функције леве коморе (386). Велики анимални модели су превасходно коришћени у сврху испитивања молекуларних механизма одговорних за проширење АИМ и ремоделовање леве коморе, који следствено доприносе настанку срчане инсуфицијенције (385). У анималном моделу АИМ који је изазван лигацијом предње леве силазне коронарне артерије утврђено је да претретман валсартаном смањује величину инфаркта и побољшава ЕФ леве коморе (387). Међутим, важно је напоменути да пси имају изузетно развијену колатералну циркулацију у ткиву миокарда што значајно мења ток АИМ код ових животиња и тиме омета доследност превођења овог модела у хуману популацију (388). Други модел миокардне исхемије подразумева понављану микроемболизацију леве коронарне артерије и то интракоронарном инјекцијом агенаса као што су микросфере, која за крајњи исход има значајно снижење

EF (< 35%) и дилатацију леве коморе (389). Иако модел микроемболизације код паса осликава клинички фенотип исхемијске кардиомиопатије и широко је коришћен за испитивање фармаколошких агенаса у поменутој патологији, постављање модела је прилично сложено, јер захтева формирање већег броја инфарктних подручја и носи ризик од настанка малигних аритмија које могу утицати на ток експеримената и тумачење добијених резултате (385). Са друге стране употреба анималних модела АИМ на свињама и овцама за испитивање исхемије миокарда и ремоделовања леве коморе је сигурнија опција због повољнијих анатомских карактеристика коронарне циркулације, као и због могућности формирања ИМ-а предвиђене величине и локализације (390). Клинички фенотип срчане инсуфицијенције се најефикасније изводи тоталном оклузијом коронарне артерије (385). У циљу испитивања срчане инсуфицијенције настале на терену САД-а, поред хируршких анималних модела коронарне лигације и микроемболизације у употреби су и примена хидрауличног оклудера или амерондног прстенастог констриктора, као и модели исхемије узроковане криоповредама (381). У последње време све је популарнија употреба различитог нивоа брзог срчаног пејсинга са циљем индукције срчане инсуфицијенције, који је примењиван код паса, свиња и оваца. Брз пејсинг изазива бивентрикуларну дилатацију са општећењем контрактилности миокарда, с обзиром да у одговору на инотропну стимулацију контрактилна резерва бива озбиљно снижена (391). Међутим, у овом моделу обично не долази до фибротских промена у ткиву миокарда, као што је то случај у HFrEF-у (392, 393).

1.9.1.2. Модели оптерећења леве коморе притиском/волуменом

КВБ, као што су аортна стеноза или системска артеријска хипертензија изазивају оптерећење притиском које временом може да услови развој срчане инсуфицијенције (380). Повећан срчани рад који настаје са циљем превазилажења хроничног повећања *afterload*, временом неминовно изазива структурне и функционалне промене које резултују патолошким ремоделовањем миокарда. Пацијенти који су у компензованом стадијуму најчешће развијају HFrEF (380).

Постоје разноврсни модели оптерећења притиском који су се примењивали ради индукције срчане слабости, као што је констрикција аорте у пределу излазног тракта у близини срца, дистално од каротидне бифуркације или проксимално од реналних артерија. Касније је разматрано да би анимални модели постепене и прогресивне аортне констрикције боље симулирали хипертензивну болест срца код људи и HFrEF (382). Најновија запажања говоре у прилог коришћењу аортног подвезивања или стентирања, индукције реналне хипертензије и хипертензије узроковане минералокортикоидима као најрелевантнијим процедурама за моделирање HFrEF (394). С обзиром да артеријска хипертензија настаје деловањем више фактора, анимални модели нису у могућности да пренесу све узроке истовремено, већ само један узрок за настанак хипертензије (376).

Оптерећење волуменом у великим анималним моделима најчешће се изазива руптуром хорди митралних валвула што резултира митралном регургитацијом која узрокује хронично оптерећење волуменом и последичну дилатацију леве коморе и срчану слабост. Предност овог модела је минимална инвазивност, мада се његова валидност често сматра спорном (395). Хронично волумно оптерећење може се изазвати и аорто-кавалним шантом, познатим као артерио-венска фистула, који резултира развојем асцитеса, едема и плућне конгестије (395).

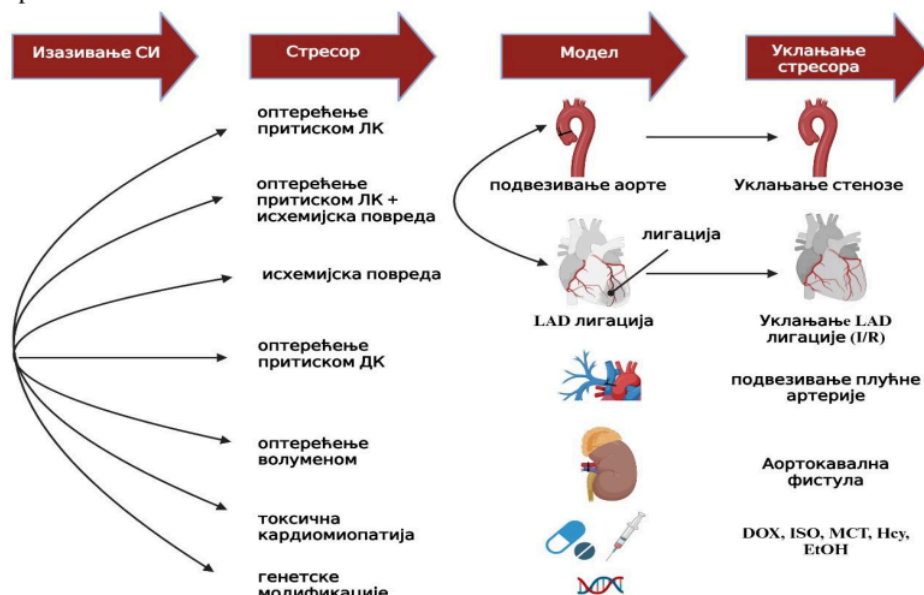
1.9.1.3. Модели дилатативне кардиомиопатије

Највише истраживан анимални модел дилатативне кардиомиопатије јесте модел тахикардије изазван пејсингом (396). Срчани пејсинг фреквенције 120-260 откуцаја у минути резултује симптомима HFrEF-а, укључујући снижену EF, дилатацију и стањење зидова комора, пораст кардиоспецифичних биомаркера у плазми и друго (380). Интересантно запажање у овом моделу су алтерације неурохуморалног система, које се карактеришу раним порастом, а потом платоом, вредности катехоламина у плазми, док се пораст вредности ренина и ендотелина догађа у каснијој фази узнатредовале дисфункције леве коморе (385). Овај тренд пораста ендотелина у узнатредовалој фази срчане слабости је описан и у хуманој популацији (385).

Као што је већ речено, разноврсни велики анимални модели се увелико користе ради индукције HFrEF-а, док за изазивање HFpEF-а постоји само мали број модела који се сматра валидним. Један од модела који се користи за изазивање HFpEF-а подразумева примену деокси-кортикостерон ацетата (енгл. *11-Deoxy-17-hydrocorticosterone 21-acetate* - DOCA) и одговарајуће слане дијете у комбинацији са дијетом богатом шећером и натријумом (387). Сложенији модели HFpEF-а подразумевају изазивање више различитих коморбидитета, као што су хипертензија, бубрежна дисфункција, дијабетес и хиперхолестеролемија (398).

1.9.2 Мали анимални модели срчане инсуфицијенције

У наредним поглављима биће описани мали анимални модели срчане инсуфицијенције (Слика 26), и то превасходно HFrEF-а, иако у неким од ових модела пре самог развоја систолне дисфункције и HFrEF-а, долази до развоја карактеристика HFpEF-а.



Слика 26. Мали анимални модели срчане инсуфицијенције.

1.9.2.1. Модели миокардијалне исхемије/инфаркта миокарда

Један од првих анималних модела АИМ изазван је субкутаном применом ISO, која доводи до дифузне некрозе миокарда (399). Након тога, *Pfeffer* и његови сарадници су развили модел коронарне лигације који се сматра вероватно најзаступљенијим моделом срчане инсуфицијенције и ИМ-а (400). Ова група аутора је убрзо показала пропорционални пораст волумена леве коморе са порастом величине инфарктног подручја (401). Лигација коронарних артерија се примењује и код мишева, при чему срчана слабост настаје 4 недеље након лигације леве коронарне артерије и умногоме зависи од генетске позадине животиња (402). Међутим, модели трајне лигације коронарних артерија не осликавају у потпуности ово стање, које се код пацијената развија као последица споре прогресије исхемијске болести срца и има могућност реканализања и поновног успостављања протока у захваћеном крвном суду (403). Стога су касније развијени IRI модели, који привременом оклузијом леве главне коронарне артерије доводе до мањег оштећења ткива миокарда. Мада, за изазивање овог модела најчешће се користе млађе експерименталне животиње што је опет супротно ситуацији у хуманој популацији, код које су пацијенти са овом патологијом обично старије животне доби и са бројним коморбидитетима (403).

1.9.2.2. Модели оптерећења леве коморе притиском/волуменом

Познато је да дуготрајно оптерећење леве коморе притиском, које се експериментално изазива различитим хируршким процедурама и имитира стање дуготрајне хипертензије и стенозе аортне валвуле у хуманој популацији, изазива срчану инсуфицијенцију код глодара (403). Први анимални ТАС модел изазван је на мишевима у циљу стварања оптерећења леве коморе притиском (404). Овом хируршком методом повећава се *afterload* леве коморе, настаје концентрична хипертрофија и HFrEF-а (403). Највећа предност ТАС модела је могућност одређивања градијента притиска који настаје преко аортне стриктуре, чиме се омогућава процена степена хипертрофије леве коморе (405). На овај начин, нагло настала хипертензија изазива увећање масе леве коморе за око 50% током само 2 недеље (405). На основу иницијалних хируршких процедура, данас су успешно развијене минимално инвазивне хируршке методе, које подразумевају извођење мале инцизије у проксималном делу стернума, и постављање хируршких копчи или шавова ради спречавања протока крви кроз аортни лук (403). Такође, најновије методе подразумевају постављање прстенова са фиксним унутрашњим пречником око аспедентне аорте код мишева (406). Упркос бројним предностима, ова метода не осликава у потпуности постепен развој хипертензије или аортне стенозе код људи, имајући у виду да у ТАС моделу, оптерећење леве коморе притиском настаје одмах (403). Са друге стране, абдоминална аортна констрикција омогућава спорију прогресију срчане слабости (407). Важно је напоменути да постоји значајна варијабилност у одговору ремоделовања леве коморе код различитих сојева мишева којима је урађена ТАС процедура (405). Познато је да *C57BL/6J* мишеви брже развијају срчану слабост након ове процедуре (408), као и то да имају сличну експресију гена дилатативне кардиомиопатије у хуманој популацији у односу на *129S1/SvImJ* мишеве (409).

Хронично оптерећење леве коморе волуменом код малих анималних модела имитира патолошка збивања у митралној регургитацији у хуманој популацији, која се карактеришу повећаним дијастолним зидним стресом и ексцентричном хипертрофијом (410). Овај модел се код глодара успоставља формирањем аортно-кавалног шанта (403).

1.9.2.3. Модели токсичне кардиомиопатије

С обзиром на негативне ефекте антитуморске терапије на срчани мишић, поједини агенси из ове категорије се примењују у експерименталним истраживањима у циљу индукције токсичне кардиомиопатије. Један од њих је антрациклин DOX, хемотерапеутик који се широко примењује још од 1969. године у различитим малигним обољењима (411). Примена DOX-а изазива дилатативну кардиомиопатију (412), код које оксидациони стрес као доминантан механизам изазива оштећења једра и митохондрија (413, 414). Администрација DOX-а једном недељно током шест недеља или сваког другог дана током две недеље изазива кардиомиопатију и срчану инсуфицијенцију, мада, чак и једнократна администрација DOX-а код мишева узрокује значајну дисфункцију леве коморе (415). Кардиомиопатија изазвана овим агенсом одликује се стањењем зидова и дилатацијом комора уз оштећење систолне и дијастолне функције миокарда, ретенцију течности и неуроухуморалну активацију (416). У циљу испитивања ефеката бројних фармаколошких и природних супстанци на развој и побољшање дилатативне кардиомиопатије, DOX се широко примењује у малим анималним моделима, посебно код мишева и пацова (393). Овај модел је технички лак за извођење, неинвазиван и економичан, што су уједно и главне предности његове примене. Са друге стране, примена DOX варијабилно утиче на степен оштећења срчане функције и повезана је са појавом малигних аритмија (416).

Други модел токсичне кардиомиопатије подразумева стимулацију β -рецептора применом ISO, синтетског β -агонисте, што доводи до хипертрофије и фиброзе миокарда мишева и пацова (393). Познато је да високе дозе катехоламина доводе до дифузног оштећења миокарда праћеног значајним развојем фиброзе и некрозом кардиомиоцита (416). У овом моделу хиперконтрактилност миокарда узрокује неравнотежу између повећане енергетске потражње и метаболичких потреба (393). У литератури су описани различити протоколи примене ISO у циљу индукције ИМ-а и срчане слабости. Примена високих доза ISO (8 mg/kg) субкутано, најчешће током 2 дана, један је од најчешће описиваних протокола у експерименталним студијама на пацовима (417) и мишевима (418). Међутим, високе дозе овог агенса носе са собом ризик од високе стопе смртности испитиваних животиња, до преко 30% (417). Са друге стране примењују се и протоколи који подразумевају апликацију нижих доза ISO (5 или 10 mg/kg) свакодневно током дужег временског периода (419-421). Оба поменута модела изазивају дозно-зависну дилатацију и срчану инсуфицијенцију, услед значајног оштећења миокарда и смрти кардиомиоцита (422).

1.9.2.3. Модели генетског инжењеринга

Моделирање срчане инсуфицијенције је велики изазов обзиром на хетерогеност пацијената са овим обољењем, и то пре свега у погледу прогнозе и клиничке презентације (423). Поред срчане инсуфицијенције која је исхемијске етиологије или последица примене хемотерапије, постоје бројни други окидачи за развој овог синдрома у хуманој популацији, укључујући и генетске болести срца, као што су фамилијална хипертрофична и дилатативна кардиомиопатија (424). Ове кардиомиопатије су примарно последица мутације гена који кодирају протеине укључене у генерисање снаге контракције срчаног мишића (424). Развој молекуларне биологије омогућио је спровођење истраживања која укључују прекомерену експресију или делецију специфичних гена који учествују у патофизиологији срчане инсуфицијенције (416). Генетски модификовани анимални модели срчане инсуфицијенције подразумевају функционалне модификације молекуларних и ћелијских

процеса који доводе до клинички релевантних фенотипа, као и развој трансгених модела (нокаут) код глодара (393). *Li* и сарадници су показали да трансгени мишеви са повећаном експресијом калсеквестрина, протеина који помаже складиштење калцијума унутар саркоплазматског ретикулума, развијају хроничну срчану инсуфицијенцију праћену сниженим фракционим скраћењем (енгл. *Fractional shortening* - FS) леве коморе и кахексијом (425).

Анимални модели имају непроцењив значај за истраживање функције миокарда у различитим стадијумима срчане инсуфицијенције, као и за проучавање хемодинамских и неуроуморалних ефеката нових фармаколошких интервенција, као и ефеката на преживљавање у експерименталним условима. Литературни подаци показују да су глодари најчешће коришћени анимални модели за испитивање кардиопротективних својстава SGLT2i (426). Будуће студије би требало да буду усмерене ка развијању релевантних анималних модела срчане инсуфицијенције, посебно HFpEF фенотипа.

II ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

2.1 ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

На темељу претходно представљених података и анализе резултата бројних литературних извора, утврђен је општи циљ, као и специфични задаци овог истраживања:

Општи циљ

Општи циљ овог истраживања био је усмерен ка испитивању утицаја хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на морфолошке и функционалне параметре миокарда, као и на оксидациони статус у моделу срчане инсуфицијенције изазване применом ISO код пацова.

На основу претходно изнесених тврдњи, постављени су специфични задаци истраживања:

1. Испитати утицај хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на *in vivo* функцију миокарда и *ex vivo* параметаре изолованог срца пацова у моделу срчане инсуфицијенције изазване применом ISO код пацова.
2. Испитати антиоксидативни, антиинфламаторни, антифибротски и антиапоптотски потенцијал хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана у моделу срчане инсуфицијенције изазване применом ISO код пацова.
3. Испитати утицај хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на *JAK2/STAT3* сигнални пут у моделу срчане инсуфицијенције изазване применом ISO код пацова.

2.2. ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

1. Хронична коадминистрација емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана испољава веће кардиопротективно дејство у односу на монотерапију, у погледу *in vivo* функције миокарда и *ex vivo* параметара изолованог срца пацова у моделу срчане инсуфицијенције изазване применом ISO код пацова.
2. Хронична коадминистрација емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана испољава веће кардиопротективно дејство у односу на монотерапију регулацијом оксидационог статуса у моделу срчане инсуфицијенције изазване применом ISO код пацова.
3. Хронична коадминистрација емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана испољава веће антиинфламаторно, антифибротско и антиапоптотско дејство у односу на монотерапију у моделу срчане инсуфицијенције изазване применом ISO код пацова.
4. Кардиопротективно дејство хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана у моделу срчане инсуфицијенције изазване применом ISO код пацова, посредовано је дејством на *JAK2/STAT3* сигнални пут.

III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Ово хронично, експериментално истраживање је спроведено на материјалу анималног порекла у условима *in vivo* и *ex vivo*. Све експерименталне процедуре спроведене су у складу са предвиђеним експерименталним протоколом у Центру за изучавање редокс равнотеже у кардиоваскуларним и метаболичким поремећајима Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Истраживање је одобрено од стране Етичког комитета за добробит и заштиту лабораторијских животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (број: 01-12766, датум одобрења: 16. новембар 2023. године). Такође, све експерименталне процедуре изведене у нашем истраживању биле су у складу са етичким принципима и важећим прописима (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*), као и са принципима Добре лабораторијске праксе (2004/9/EC, 2004/10/EC).

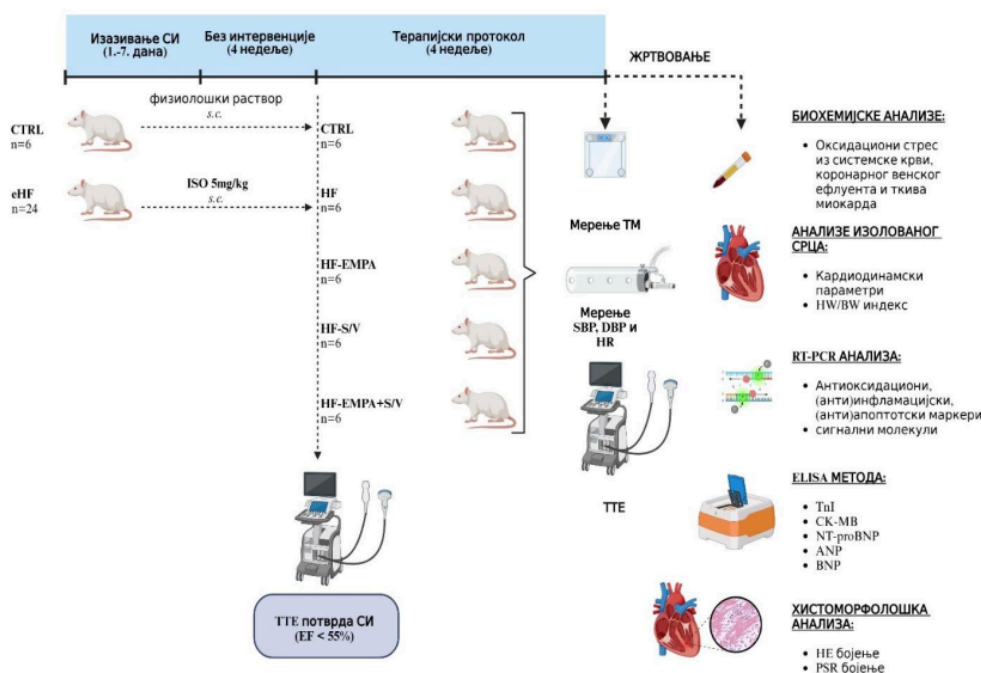
Супстанце коришћене у нашем истраживању су *pro analysis* квалитета, произведене од стране *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (Немачка). Емпаглифлозин је набављен као комерцијално доступан производ фармацеутске компаније *Boehringer Ingelheim* (Ингелхајм на Рајни, Немачка), док је сакубитрил/валсартан набављен као комерцијално доступна фиксна комбинација фармацеутске компаније *Novartis Pharma AG* (Базел, Швајцарска).

3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ

Наше истраживање је укључило 30 пацова *Wistar albino* соја, мушког пола, старости 10-12 недеља, који су у тренутку започињања експерименталног протокола имали просечну вредност телесне масе (енгл. *Body Weight* - BW) од 250 ± 20 грама. Животиње су обезбеђене из виваријума релевантне институције која се бави узгојем лабораторијских животиња, Војномедицинске академије (Београд, Србија). Пре започињања експерименталног протокола, а у циљу прилагођавања на ново окружење и проверу здравственог статуса, сви пацови су боравили седам дана у карантину са строго контролисаним условима (температура просторије $21 \pm 2^\circ\text{C}$, влажност ваздуха $55 \pm 5\%$, циклус светлост:тама 12:12 часова) и приступом храни за глодаре и води према потреби (*ad libitum*). Након периода прилагођавања, пацови су насумично подељене у две групе:

1. Контролна група здравих пацова - **CTRL група** (шест пацова у групи) и
2. Експериментална група пацова са срчаном инсуфицијенцијом - **eHF група** (двадесет и четири пацова у групи).

Дизајн нашег хроничног, експерименталног истраживања приказан је на **Слици 27**.



Слика 27. Схематски приказ дизајна експерименталног истраживања

3.2. ИНДУКЦИЈА СРЧАНЕ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈЕ

Упркос значајним напрецима у терапији и развоју нових лекова који циљају различите патофизиолошке механизме срчане инсуфицијенције, овај синдром и даље представља један од највећих изазова савремене медицине са значајним утицајем на морбидитет и морталитет широм света (1). Експериментална истраживања која користе анималне моделе срчане инсуфицијенције играју кључну улогу у разумевању патофизиолошких процеса који стоје у основи овог синдрома (376). Осим тога, ове студије су од изузетног значаја за процену ефикасности различитих терапијских стратегија за превенцију и лечење срчане инсуфицијенције, чиме доприносе развоју иновативних третмана који могу побољшати исходе и квалитет живота пацијената са овим обољењем.

ISO је синтетски, не-селективни β -агониста, који се широко примењује у експерименталним студијама за изазивање модела срчане дисфункције код глодара, која је праћена инфламацијом и фиброзом миокарда са следственим ремоделовањем леве коморе (427). У нашем истраживању, срчана инсуфицијенција је изазвана свим пацовима у **eHF** групи субкутаном апликацијом ISO у дози од 5mg/kg BW-а који је растворен у 0.2 mL физиолошког раствора (Слика 28). Третман ISO је трајао седам узастопних дана, при чему је овај агенс примењиван увек у исто време (08:00 сати) (419). Током периода примене ISO, свим пацовима у **eHF** групи је свакодневно одређиван BW, ради прилагођавања дозе овог агенса. Током истог периода, свим пацовима из **CTRL** групе је субкутано апликован физиолошки раствор у истој запремини (0.2mL), како би се осигурали исти услови манипулације код свих животиња укључених у наше истраживање. Овакав експериментални дизајн омогућио је да

потенцијално добијене разлике у резултатима могу бити приписане дејству ISO, а не разликама у методама манипулације.



Слика 28. Фотографија субкутаног апликовања ISO у нашем истраживању.

Након четири недеље од последње ISO дозе свим пацовима укљученим у ову студију је урађена трансторакална ехокардиографија (ТТЕ), како би се проценила функција леве коморе и вредност EF (видети одељак 3.4.2). Вредност EF мања од 55% била је критеријум за потврду модела срчане инсуфицијенције, што је у складу са постојећим литературним подацима (428). Након потврде модела срчане инсуфицијенције, пацови из **еНФ групе** су насумично подељени у четири подгрупе (по шест пацова у свакој групи), у зависности од терапијског протокола који је примењиван оралном гаважом током наредне четири недеље:

1. Група пацова са срчаном инсуфицијенцијом третирана дестилованом водом у запремини од 0,2 mL - **НФ група**
2. Група пацова са срчаном инсуфицијенцијом третирана оралном суспензијом емпagliфлозина раствореног у 0,2 mL дестиловане воде - **НФ-ЕМПА група**
3. Група пацова са срчаном инсуфицијенцијом третирана оралном суспензијом сакубитрил/валсартана раствореног у 0,2 mL дестиловане воде - **НФ-S/V група**
4. Група пацова са срчаном инсуфицијенцијом третирана оралном суспензијом емпagliфлозина раствореног у 0,2 mL дестиловане воде и оралном суспензијом сакубитрил/валсартана раствореног у 0,2 mL дестиловане воде - **НФ-ЕМПА+S/V група**

3.3. ХРОНИЧНИ ТЕРАПИЈСКИ ПРОТОКОЛИ

Емпagliфлозин и сакубитрил/валсартан, оба комерцијално доступна у облику филм таблета, коришћени су у нашем истраживању у виду оралне суспензије. Филм таблете емпagliфлозина и сакубитрил/валсартана су растваране у дестилованој води и примењиване оралном гаважом у количини од 0,2 mL суспензије, свакодневно током четири недеље. Емпagliфлозин је примењиван у дози од 10 mg/kg BW код свих пацова из групе **НФ-ЕМПА** и **НФ-ЕМПА+S/V**, док је сакубитрил/валсартан примењиван у дози од 68 mg/kg BW код свих пацова из групе **НФ-S/V** и **НФ-ЕМПА+S/V** (Слика 29). Током истог периода, све животиње из **CTRL** и **НФ** групе су добијале исту количину дестиловане воде од 0,2 mL оралном гаважом, како би се осигурали исти услови

манипулације код свих животиња. Током периода третмана, BW свих животиња је одређиван два пута недељно ради прилагођавања доза примењиваних лекова. Дозе емпagliфлозина и сакубитрил/валсартана, као и дужина трајања терапијског протокола, изабрани су на основу релевантних литературних података (429, 430).



Слика 29. Фотографија примене третмана емпagliфлозином и сакубитрил/валсартаном оралном гаважом у нашем истраживању.

3.4.1. Испитивање *in vivo* функције миокарда

TTE је широко коришћена метода за неинвазивну процену срчане функције, како у клиничким, тако и у експерименталним истраживањима. Напредак у развоју ехокардиографске опреме омогућио је адаптацију ове методологије са људи на глодаре, чиме је омогућена процена тежине и прогресије КВБ, као и утицај фармаколошких агенаса на *in vivo* функцију миокарда. TTE је посебно корисна у анималним моделима због своје неинвазивности, безбедности, доступности и економичности (431). Ове предности чине TTE методом избора за процену срчане функције у претклиничким истраживањима, јер омогућавају добијање прецизних и репродуктивних података о срчаној функцији без потребе за хируршким интервенцијама или другим инвазивним поступцима. Имајући то у виду, у нашем истраживању је спроведена TTE која је омогућила свеобухватну процену срчане функције у различитим фазама истраживања, пружајући важне информације о развоју срчане инсуфицијенције и ефектима хроничне коадминистрације емпagliфлозина и сакубитрил/валсартана у односу на монотерапију.

Мониторинг срчане функције у нашем истраживању обављен је спровођењем TTE код свих пацова помоћу Hewlett-Packard Sonas 5500 (Андовер, МА, САД), са сондом од 15,0 MHz (Слика 30) (432). TTE је обављена у три кључне фазе истраживања:

1. **Пре почетка свих експерименталних процедура** - у циљу потврде хомогености и здравственог статуса пацова,
2. **Након четири недеље од последње ISO дозе** - у циљу потврде модела срчане инсуфицијенције и процене степена срчане дисфункције и
3. **На крају експерименталног протокола, непосредно пре жртвовања** - у циљу евалуације примењених терапијских протокола и процене коначног стања срчане функције.



Слика 30. Фотографија извођења трансторакалне ехокардиографије у нашем истраживању

Пре започињања ТТЕ мониторинга, све животиње су подвргнуте инхалационој анестезији применом изофлурана уз коришћење компактнoг апарата за анестезију (RWD Life Science Co., Ltd.) (Слика 31). Након увођења у анестезију, свим животињама је уклоњено крзно са предње стране грудног коша. Анализа функције леве коморе добијена је из ултразвучног прозора дуге парастерналне осе (енгл. *Parasternal Long-Axis View* - PLAX) у дводимензионалном (2D)-режиму и М-режиму рада. У 2D режиму, курсор сонде је постављен перпендикуларно у односу на интервентрикуларни септум (енгл. *Intraventricular septum* - IVS) и задњи зид леве коморе (енгл. *Left ventricular posterior wall* - LVPW) и то у нивоу папиларних мишића. Потом, из М-режима је добијен запис у стварном времену из којег су након замрзавања слике добијене вредности следећих параметара:

1. дебљина зида IVS на крају дијастоле (енгл. *IVS thickness at end diastole* - **IVSd**),
2. унутрашња димензија леве коморе на крају дијастоле (енгл. *Left ventricle internal dimension at end diastole* - **LVIDd**),
3. дебљина LVPW на крају дијастоле (енгл. *LVPW thickness at end diastole* - **LVPWd**),
4. дебљина зида IVS на крају систоле (енгл. *IVS wall thickness at end systole* - **IVSs**),
5. унутрашња димензија леве коморе на крају систоле (енгл. *Left ventricle internal dimension at end systole* - **LVIDs**),
6. дебљина LVPW на крају систоле (енгл. *LVPW thickness at end systole* - **LVPWs**) и
7. проценат фракционог скраћења леве коморе (енгл. *Fractional shortening* - **FS**).



Слика 31. Фотографије примене инхалационе анестезије у нашем истраживању: (а) увођење животиње у анестезију (б) одржавање животиње у анестезији током извођења трансторакалне ехокардиографије.

Просечна ехокардиографска мерења су добијена анализом пет или више узастопних срчаних циклуса како би се осигурала прецизност и поузданост резултата. Вредност EF-а леве коморе је израчуната коришћењем следеће формуле:

$$EF(\%) = (LVEDV - LVESV) / LVEDV * 100$$

У горе наведеној једначини, **LVESV** (енгл. *Left ventricular end-systolic volume*) представља вредност волумена леве коморе на крају систоле, а **LVEDV** (енгл. *Left ventricular end-diastolic volume*) вредност волумена леве коморе на крају дијастоле (431). Вредности LVESV-а добијена је коришћењем следеће формуле:

$$LVESV = [7 / (2.4 + LVIDs)] / LVIDs^3$$

Вредности LVESD-а добијена је коришћењем следеће формуле:

$$LVEDV = [7 / (2.4 + LVIDd)] / LVIDd^3$$

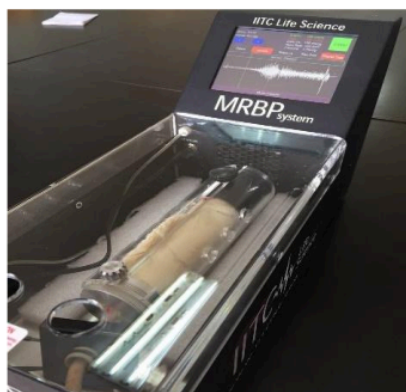
3.4.2 Испитивање *in vivo* хемодинамских параметара

Хемодинамски ефекти индивидуалне примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана описани су у бројним претходним истраживањима (254, 433). Имајући то у виду, у овој студији су испитивани ефекти хроничне коадминистрације ових агенаса на вредности артеријског крвног притиска (енгл. *Blood Pressure* - BP) и срчане фреквенције (енгл. *Heart Rate* - HR) у односу на монотерапију.

На крају експерименталног протокола, дан пре планираног жртвовања, све животиње су подвргнуте неинвазивној методи репне плетизмографије (тзв. *tail-cuff* метода), која се примењује за одређивање вредности систолног крвног притиска (енгл. *Systolic blood pressure* - SBP) и дијастолног крвног притиска (енгл. *Diastolic blood pressure* - DBP), као и HR (Слика 32). Ова метода, користећи Rat Tail Cuff Method Blood Pressure Systems - MRBP-R (ИТC Life Science Inc., САД), подразумева

постављање манжетне на реп пацова како би се детектовале промене притиска у крвном суду репа.

Да би се осигурало да резултати мерења нису последица потенцијалног стреса којем су животиње изложене током извођења ове методе, свака животиња је три дана пре мерења провела 30 минута у комори за мерење. Мерење је спроведено серијом од 8 до 10 понављања, а аритметичка средина ових вредности коришћена је као коначна вредност испитиваних параметара (434).



Слика 32. Фотографија мерења хемодинамских параметара у нашем истраживању.

3.4.3 Метод рада *Langendorff* апарата

Крајем 19. века, истраживачи су се активно бавили усавршавањем метода за проучавање изолованог срца. Године 1895., *Oskar Langendorff* (1853-1908) развио је технику за истраживање изолованог перфундованог срца сисара, која је данас позната као *Langendorff* техника. Ова техника је значајно допринела разумевању фундаменталних аспеката кардиоваскуларне физиологије, укључујући:

- контрактилну функције срца,
- регулацију коронарног крвотока и
- срчаног метаболизма.

Предности *Langendorff* технике су једноставност извођења, ниска цена, поновљивост и могућност изучавања срца које је изоловано и у контролисаним условима, без могућности утицаја других органа и ендокрине контроле, који се могу одразити на добијена физиолошка мерења (435). Основни принцип рада *Langendorff* апарата је одржавање активности срца перфузијом коронарних артерија. Ово се постиже увођењем аортне каниле у усходни део аорте, што омогућава испоруку перфузионог раствора директно у срце. Метод перфузије подразумева ретроградну перфузију, при чему се перфузиони раствор преко каниле допрема у аорту, чиме се затвара аортни залистак и омогућава да перфузиони раствор уђе у коронарне артерије током дијастоле. Овај метод може бити вођен хидростатским притиском (модел константног притиска) или пумпом (модел константног протока). Током дијастоле, перфузиони раствор се усмерава у коронарне артерије, а током систоле, коронарне артерије скоро да се и не исхрађују због високог интрамуралног притиска који је већи од перфузионог притиска. Након проласка кроз коронарну циркулацију, перфузиони раствор улази у десну преткомору преко коронарног синуса, а затим се избацује из десне коморе и плућне артерије (436).

У нашем истраживању коришћен је *Langendorff* апарат марке LF-01 F-P (Experimetria Ltd., Будимпешта, Мађарска) (Слика 33), који је специјализован за перфузију изолованог срца. Овај апарат се састоји од две стаклене вертикалне цеви - цев са мањим пречником је постављена унутар цеви са већим пречником. Водено купатило загрева воду која пролази између поменутих цеви чиме се загрева читав систем. Процес рада *Langendorff* апарата у нашем истраживању укључује следеће:



Слика 33. Фотографија *Langendorff* апарата који је коришћен у нашем истраживању.

Процес рада *Langendorff* апарата у нашем истраживању укључује следеће:

- *Krebs-Henseleit*-ов раствор, који се налази у стакленој боци, али и у самом систему и гасира се мешавином гасова, O_2 и CO_2 у односу 95:5%.
- Вода, која циркулише између цеви и загрева се св⁴ док *Krebs-Henseleit*-ов раствор у мањој цеви не достигне температуру од $37^{\circ}C$.
- На крају излаза мање цеви налази се канила на коју се поставља срце (436).

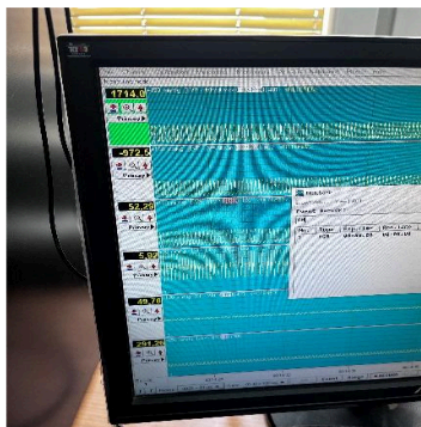
Krebs Hensenleit-ов раствор састоји се од 118 mmol/L натријум хлорида (NaCl), 4,7 mmol/L калијум хлорида (KCl), 1,66 mmol/L магнезијум сулфата ($MgSO_4$), 24,88 mmol/L натријум х⁴дроген карбоната ($NaHCO_3$), 1,18 mmol/L калијум дихидроген фосфата (KH_2PO_4), 5,55 mmol/L глукозе и 2,52 mmol/L калцијум хлорида ($CaCl_2$), при чему рН раствора износи 7,4. Овакав састав раствора омогућава одговарајућу перфузију и несметан рад срца, јер обезбеђује исхрану миокарда имитирајући екстрацелуларну течност.

3.4.3.1. Испитивање *ex vivo* функције миокарда методом ретроградне перфузије срца *Langendorff* техником

Након обављене ТТЕ, све животиње су жртвоване декапитацијом на гиљотини. Након прикупљања пуне крве, приступило се отварању грудног коша и припреми срца. Перикард је пресечен у пределу врха срца, затим су пресечени крвни судови базе срца, изузев усходне аорте, и извршена је ексцизија срца. Све време срце је преливано хладним физиолошким раствором ($+4^{\circ}C$). По вађењу срца из грудне дупље, исто је потопљено у ледено хладан физиолошки раствор ($-4^{\circ}C$ - $-10^{\circ}C$) у циљу свођења

метаболичких потреба миокарда на минимум („физиолошка клешта”), како би се омогућила презервација миокарда током препарације срца и канулације усходне аорте.

Помоћу конца, усходна аорта је причвршћена за аортну канилу *Langendorff* апарата. По постављању срца на *Langendorff* апарат извршено је одстрањење леве аурикуле, пресецање леве преткоморе и прокидање митралних залистака пинцетом. На овај начин, притисак у левој преткомори се свео на нулу, чиме се спречавају утицаји на коронарну циркулацију и омогућавају се одговарајући услови за спровођење ретроградне перфузије. У нашем истраживањем коришћен је експериментални модел ретроградне перфузије по *Langendorff*-у, и то при константном притиску (70 cmH₂O), док је проток био променљива компонента. Континуирано регистровање функције миокарда обављено је помоћу сензора (енгл. *transducer* BS4 73-0184) који се пласира у леву комору и одговарајућег софтвера који податке приказује на монитору (Слика 34а).



(а)



(б)

Слика 34. Фотографија ретроградне перфузије срца *Langendorff* техником у нашем истраживању: континуирано регистровање кардиодинамских параметара (а) и мерење коронарног венског ефлуента методом флоуметрије (б).

На овај начин, прикупљени су подаци о следећим кардиодинамским параметрима:

- **dp/dt max** – максимална стопа развоја притиска у левој комори,
- **dp/dt min** – минимална стопа развоја притиска у левој комори,
- **SLVP** – систолни притисак у левој комори,
- **DLVP** – дијастолни притисак у левој комори и
- **HR** – срчана фреквенција.

Сви наведени параметри изражени су у mmHg/s, осим HR која се изражава као број откуцаја у минути (енгл. *Beats per minute* - bpm). Коронарни проток (енгл. *Coronary Flow* - CF) се изражава у mL/min и мери се флоуметријском методом (Слика 34б).

3.4.4. Мерење телесне масе и масе срца и одређивање индикатора хипертрофије срца

Вредност BW је одређивана у више временских тренутака током експерименталног протокола ради прилагођавања дозе третмана, као и праћења ефеката истих на овај параметар. На крају експерименталног протокола, непосредно пре

жртвовања измерена је вредност BW-а свих животиња. По завршетку *ex vivo* испитивања срчане функције измерена је маса срца (енгл. *heart weight* – HW). Индекс хипертрофије је приказан као однос HW и BW (енгл. *HW/BW ratio*), и то коришћењем следеће формуле:

$$\text{HW/BW ratio} = \text{HW/BW} \times 100$$

3.4.5. Биохемијске анализе

На крају експерименталног протокола, параметри оксидационог стреса одређивани су у крви, коронарном венском ефлуенту (енгл. *coronary venous effluent* - CVE) и хомогенату ткива миокарда и то помоћу *Shimadzu UV-1800* спектрофотометра (Јапан) (Слика 35).



Слика 35. Фотографија спектрофотометра који је коришћен за одређивање параметара оксидационог стреса у нашем истраживању.

3.4.5.1. Припрема узорак крви, коронарног венског ефлуента и хомогената ткива миокарда за одређивање параметара оксидационог стреса

У тренутку жртвовања пацова узорци пуне крви за биохемијске анализе сакупљани су у одговарајуће епрувете са антикоагулансом. Потом су узорци центрифугирани на 3000 обртаја у циљу раздвајања еритроцита од плазме. Током процеса првог центрифугирања еритроцити се таложе на дну епрувете, док плазма остаје на површини, након чега се издваја у одговарајуће микротубе. Еритроцити се још три пута испирају физиолошким раствором и центрифугирају. Након трећег испирања, одлије се супернатант, а талог еритроцита се лизира три пута већом запремином ледене дестиловане воде и складишти у одговарајуће микротубе. Узорци плазме и лизата еритроцита чували су се на температури од -20°C до момента одређивања биохемијских параметара.

Током *ex vivo* испитивања срчане функције, CVE је прикупљан у тренутку достизања сваке вредности коронарног перфузионог притиска (енгл. *Coronary perfusion*

pressure – CPP). Прикупљени узорци CVE су складиштени у одговарајуће епрувете на температури од -20°C до момента одређивања биохемијских параметара.

По завршетку *ex vivo* испитивања срчане функције, делови срца свих животиња су коришћена за одређивање параметара оксидационог стреса у ткиву миокарда. 0.3 g ткива леве коморе је хомогенизовано у десетоструко већем волумену ледено хладаног физиолошког раствора пуферованог фосфатом (pH 7.4) помоћу електричног хомогенизатора. Хомогенати су потом центрифугирани на 1200× g на температури од 4°C током 20 минута. Добијени супернатанти су одвојени и одмах складиштени на температури од -80°C до тренутка извођења биохемијских анализа (437).

3.4.5.1.1. Одређивање параметара оксидационог стреса из крви пацова

Из узорака плазме одређиване су концентрације следећих прооксидативних параметара:

- индекса липидне пероксидације мереног као ниво реактивних супстанци тиобарбитурне киселине (енгл. *thiobarbituric acid reactive substances* - TBARS),
- азота монооксида у форми нитрита (енгл. *nitrites* - NO₂⁻),
- супероксид анјон радикала (енгл. *superoxide anion radical* - O₂⁻) и
- водоник пероксида (енгл. *hydrogen peroxide* - H₂O₂).

Из лизата еритроцита одређивана је активност следећих антиоксиданаса:

- каталазе (енгл. *catalase* - CAT),
- супероксид дисмутазе (енгл. *superoxide dismutase* - SOD),
- редукваног глутатиона (енгл. *reduced glutathione* - GSH).

4

3.4.5.1.1.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мереног као TBARS)

Одређивање индекса липидне пероксидације у плазми спроведено је индиректним методом којом се добијају продукти реакције липидне пероксидације, настали као производ малонилалдехида са тиобарбитурном киселином (енгл. *Thiobarbituric Acid* - TBA).

Овај поступак је спроведен мешањем 0,8 mL узорка плазме са 0,4 mL 28% трихлоросирћетне киселине, који су пипетирани у епрувету. Након тога, узорци су хлађени на леду током 15 минута, а потом центрифугирани при брзини од 6000 rpm (енгл. *Revolutions per minute* - rpm). Из узорака је издвојено 0,4 ml супернатанта који је у даљој процедури помешан са 0,1 ml 1% TBA у 0,05 NaOH. Након 15 минута загревања узорка у воденом купатилу на 100°C и 10 минута инкубације на собној температури одређивана је концентрација TBARS при таласној дужини од 530 nm, и то коришћењем следеће једначине:

$$\mu\text{mol TBARS/ml plasma} = \Delta A(\Delta A_s - \Delta A_{bt}) / 1,56 \times 1,25$$

где су:

ΔA – финална апсорбанца,

A_s – апсорбанца узорка,

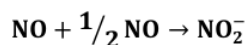
A_{bt} – апсорбанца следеће пробе и

1,56 и 1,25 – фактори корекције.

За слепу пробу, уместо узорка плазме, коришћена је дестилована вода, а добијене вредности су изражене у $\mu\text{M/mL}$ (438).

3.4.5.1.1.2. Одређивање концентрације нитрита (NO_2^-)

Одређивање концентрације ослобођених нитрита спроведено је индиректном методом за одређивање азот монооксида (NO) који интерагује са молекулским кисеоником, што је представљено следећом хемијском реакцијом:



На почетку процедуре, у епрувету је пипетирано 0,1 mL 3 N перхлорне киселине, 0,4 mL 20 mM етилендиаминотетрасирћетне киселине и 0,2 mL узорка плазме. Након мешања на vortex мешалици, узорци су хлађени на леду током 15 минута, а потом центрифугирани 15 минута при брзини од 6000 rpm. Након изливања супернатанта, у добијени талог је додато 220 μL калијум карбоната (K_2CO_3). Потом је у нову микротубу пипетирано 200 mL ове смеше и додато је 250 μl свеже припремљеног Griess-овог реагенса (125 μL N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохлорида и 125 μL сулфанилне киселине) и 125 μl реагенса за NO . Припремљен узорак је инкубиран током 15 минута. Концентрација NO_2^- је мерена на таласној дужини од 550 nm, а као слепа проба, уместо узорка плазме, коришћена је дестилована вода.

Одређивање вредности концентрације ослобођених нитрита спроведено је помоћу калибрационе криве, чија конструкција је добијена на основу узорака са добро познатом концентрацијом NaNO_2 и чије су апсорбанце мерене при таласној дужини од 550 nm. У узорцима плазме, прорачун вредности концентрације нитрита спроведен је помоћу одређивања стандардног фактора (F) из следеће једначине:

$$\frac{\text{екстинција стандарда} - \text{екстинција слепе пробе}}{\text{концентрација } \text{NaNO}_2 \text{ у стандардима}}$$

Приказана једначина је коришћена за сваки од одређиваних стандарда (F1, F2, F3, и F4), при чему је коначни стандардни фактор (F), добијен као њихова средња вредност, коришћен у даљој анализи за прорачун узорка. Концентрација ослобођених нитрита у узорку плазме израчуната је коришћењем следеће једначине:

$$\eta\text{molNO}_2/\text{ml плазме} = \Delta E(E_s - E_{bt})/F$$

где су:

ΔE – коначна (финална) апсорбанца,

E_s – апсорбанца узорка и

E_{bt} – апсорбанца слепе пробе.

Добијене вредности су изражаване у nM/mL (439).

3.4.5.1.1.3. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала (O_2^-)

Одређивање концентрације O_2^- спроведено је извођењем реакције нитро плавог тетразолијума (енгл. *Nitro blue tetrazolium* - NBT) са O_2^- , током које настаје нитро формазап плави (енгл. *Nitro formazon blue*). Поступак одређивања концентрације O_2^- извршен је тако што је у 50 μ l плазме додато 950 μ l есејне смеше *ex tempore*. Мерење је спроведено три пута уз мешање, и то у интервалима од по 60 секунди на таласној дужини од 550 nm, а као слепа проба је коришћена дестилована вода (440). За израчунавање концентрације O_2^- коришћена је следећа једначина:

$$\Delta E = E_{2s} - E_{1s} \text{ (за узорке)}$$

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

$$\Delta E = E_s - E_{bt}$$

$$\eta \text{mol } O_2^- / \text{ml плазме} = \Delta E / 0,015 \times 1 / 0,05$$

где су:

E_s - коначна (финална) апсорбанца,
 E_s - апсорбанца узорка,
 E_{bt} - апсорбанца слепе пробе и
 0,015 и 0,05 - корекциони фактори коришћени у овом есеју.

3.4.5.1.1.4. Одређивање концентрације водоник пероксида (H_2O_2)

Одређивање концентрације H_2O_2 заснива се на оксидацији фенол црвеног (енгл. *Phenol Red*) применом хидроген пероксида, у реакцији у којој се ензим пероксидаза из рена (енгл. *HorseRadish Peroxidase* - HRP) користи као катализатор. 200 μ l узорка плазме перципитовано је са 800 μ l свеже припремљеног раствора фенол црвеног (енгл. *Phenol Red Solution* - PRS), у који је додато 10 μ l (1:20) HRP. Концентрација H_2O_2 је мерена на таласној дужини од 610 nm, а као слепа проба је коришћена дестилована вода (441). Мерење је извршено у временском интервалу од 5 до 60 минута, јер у том периоду настаје и ослобађа се H_2O_2 .

Коришћењем стандардне криве, која је конструисана стандардним *Stock* раствором H_2O_2 . Поступак је изведен тако што је у три епрувете пипетирано по 5, 10 и 20 μ l стандарда H_2O_2 , потом је додато 200 μ l дестиловане воде, 800 μ l PRS и 10 μ l HRP. Коначне концентрације су мерене након инкубације, док је за израчунавање количине и концентрације H_2O_2 коришћена следећа једначина:

$$\Delta A = A_s - A_{bt}$$

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

$$\eta \text{mol } H_2O_2 / \text{ml плазме} = \Delta A / F$$

где су:

F - фактор апсорбанце/ $\eta\text{mol H}_2\text{O}_2$,

ΔA - коначна (финална) апсорбанца,

A_s - апсорбанца узорка и

A_{bt} - апсорбанца слепе пробе.

3.4.5.1.1.5. Одређивање активности каталазе (CAT)

Ензим CAT на активном месту садржи хем групу и претвара два молекула H_2O_2 у кисеоник и воду. Концентрација CAT је одређивана у лизату еритроцита са уделом воде 1:7 и етанола 0,1:1. Поступак је спроведен мешањем 50 μl CAT пуфера, 100 μl узорка и 1 ml 10 mM H_2O_2 . Мерење концентрације CAT је спроведено шест пута на таласној дужини од 360 nm, а као слепа проба је коришћена дестилована вода. Коришћењем одговарајуће схеме која подразумева одузимање, а потом и одређивање аритметичке средине, добијена је коначна активност CAT. Добијене вредности су изражаване у $\text{U/g Hb} \times 10^3$ (442).

3.4.5.1.1.6. Одређивање активности супероксид дизмутазе (SOD)

SOD представљају групу металоензима која игра веома важну улогу у одбрани организма од штетних дејстава ROS. Наиме, овај ензим катализује дисмутацију O_2^- у молекуларни кисеоник и H_2O_2 и снижава ниво O_2^- , који у високим концентрацијама доводи до ћелијског оштећења. Ова реакција је праћена наизменичном оксидацијом-редукцијом јона метала присутних у активном месту SO_4 на основу којих се SOD класификују у четири различите групе: SOD које садрже бакар и цинк (Cu-Zn-SOD), SOD које садрже гвожђе (Fe-SOD), манган (Mn-SOD) или никл (443).

Одређивање активности SOD обављено је епинефрин методом по Beutler-у (444). У епрувету је пипетирано 100 μl узорка и 1000 μl карбонатног пуфера, а потом је, након мешања, додато 100 μl епинефрина. Мерење је извршено на таласној дужини од 470 nm, а као слепа проба је коришћена дестилована вода.

3.4.5.1.1.7. Одређивање активности редукованог глутатиона (GSH)

GSH је врло важан неензимски антиоксиданс у ћелијама сисара који делује не само као директан антиоксиданс, штитећи ћелије од слободних радикала и прооксиданата, већ и као кофактор за антиоксидативне и детоксикационе ензиме, укључујући GPx, глутатион S-трансферазе и глиоксалазе. GPx су одговорне за детоксикацију пероксида, што укључује оксидацију GSH до глутатион дисулфида (енгл. *glutathione disulfide* - GSSG) (445).

Одређивање концентрације GSH заснива се на спектрофотометријској методи која се заснива на реакцији оксидације глутатиона са 5,5-дитиобис-6,2-нитробензоичне киселине методом 4 према Beutler-у. GSH екстракт се добија пипетирањем 50 μl узорка, затим се додаје 200 μl 0,1% етилендиаминететраацетата (енгл. *Ethylenediaminetetraacetate* - EDTA) и 385 μl преципитационог пуфера. Након тога, врши се инкубација на леду током 15 минута, а потом се након 10 минута центрифугирања при брзини од 4000 rpm добија екстракт. У епрувету се пипетира 300 μl екстракта, затим се додаје 750 μl натријум дифосфата и 100 μl 5,5-дитиобис-6,2-нитробензојеве киселине. Након

инкубације током 10 минута, извршено је мерење на таласној дужини од 412 nm, а као слепа проба коришћена је дестилована вода у смеши са наведеним растворима.

За одређивање концентрације GSH, коришћена је калибрациона крива која је конструисана помоћу четири стандарда са познатим концентрацијама глутатиона (446).

3.4.5.1.2. Одређивање параметара оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту

Из узоракa CVE одређиване су концентрације следећих прооксидативних параметара: TBARS, NO_2^- , H_2O_2 и O_2 , и то у циљу евалуације оксидационог стреса у ендокарду леве коморе и ендотелу коронарних крвних судова. Поступак за одређивање прооксидативних параметара из узоракa CVE се у неколико корака разликује у односу на поступак испитивања истих из узоракa плазме.

⁴ 3.4.5.1.2.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (мереног као TBARS)

Одређивање TBARS у узорцима CVE извршено је пипетирањем 200 μL 0,1 М раствора 1% TBA у NaOH у микротубе, у које је потом додато 800 μL узорка. Потом су узорци инкубирани на 100°C током 15 минута, а затим на собној температури током 10 минута. Мерење је спроведено на таласној дужини од 530 nm, а као слепа проба коришћена је *Krebs-Henseleit*-ов раствор. Коначне вредности су добијене коришћењем истих једначина као у случају одређивања овог параметра у узорку плазме (видети одељак 3.4.5.1.1.1.) (438).

3.4.5.1.2.2. Одређивање концентрације нитрита (NO_2^-)

Одређивање нитрита у узорцима CVE извршено је пипетирањем ⁴ 1000 μL узорка, 250 μL свеже припремљеног *Griess*-овог реагенса и 125 μL пуфера за NO у епрувету. Након инкубације на собној температури током 15 минута, мерење је спроведено на таласној дужини од 550 nm, а као слепа проба коришћена је *Krebs-Henseleit*-ов раствор. Коначне вредности су добијене коришћењем истих једначина као у случају одређивања овог параметра у узорку плазме (видети одељак 3.4.5.1.1.2.) (439).

3.4.5.1.2.3 Одређивање концентрације супероксид анјон радикала (O_2^-)

За одређивање ⁴ O_2^- у узорцима CVE извршено је пипетирањем 50 μL узорка у епрувету, у коју је додато 950 μL есејне смеше *ex tempore*. Мерење је уз мешање спроведено три пута у интервалима од по 60 секунди на таласној дужини од 550 nm, а као слепа проба је коришћена *Krebs-Henseleit*-ов раствор. Коначне вредности су добијене коришћењем истих једначина као у случају одређивања овог параметра у узорку плазме (видети одељак 3.4.5.1.1.3.) (440).

3.4.5.1.2.4. Одређивање концентрације водоник пероксида (H_2O_2)

За одређивање H_2O_2 у узорцима CVE извршено је пипетирањем 200 μL узорка у епрувету, у коју је додато 800 μL раствора фенол црвеног и 10 μL пероксидазе (енгл.

Peroxidase - POD). Након инкубације на собној температури током 10 минута мерење је спроведено на 610 nm, а као слепа проба коришћена је *Krebs-Henseleit*-ов раствор (447).

3.4.5.1.3. Одређивање параметара оксидационог стреса у хомогенату ткива миокарда

Из хомогената ткива миокарда одређивани су следећи параметри оксидационог стреса: TBARS, CAT, SOD, and GSH, као што је претходно описано (448). Поступак за одређивање поменутих параметара је исти као код одређивања ових параметара из крви, што је детаљно описано раније (видети одељак 3.4.5.1.1.), осим што је у овом случају испитивани узорак хомогенат ткива миокарда.

3.4.5.2. Одређивање концентрације кардиоспецифичних маркера и натриуретских пептида ELISA методом

По завршетку експерименталног протокола, све животиње су подвргнуте инхалационој анестезији и жртване декапитацијом на гиљотини. У тренутку жртвовања пацова, узорци пуне крви скупљени су у одговарајуће епрувете са сепарационим гелом за скупљање серума. Узорци серума су центрифугирани на 3000 обртаја по минути, а потом је серум издвојен у одговарајуће микротубе. Узорци серума чували су се на температури од -20°C до момента одређивања различитих маркера, ензимским имуноесејем високе сензитивности и селективности (енгл. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA). У циљу испитивања оштећења миокарда у моделу срчане инсуфицијенције изазване применом ISO, у овој студији одређивана је концентрација кардиоспецифичних маркера оштећења миокарда, и то: cTnI (pg/ml), креатин киназа изоформа MB (енгл. creatine kinase isoform MB - CK-MB) (pg/ml), и NT-proBNP (pg/ml). Такође, обзиром на утицај сакубитрил/валсартана на концентрацију натриуретских пептида, у овој студији је одређивана концентрација ANP (pg/ml) и BNP (pg/ml). Поменути маркери су одређивани применом комерцијалних ELISA китова према инструкцијама произвођача:

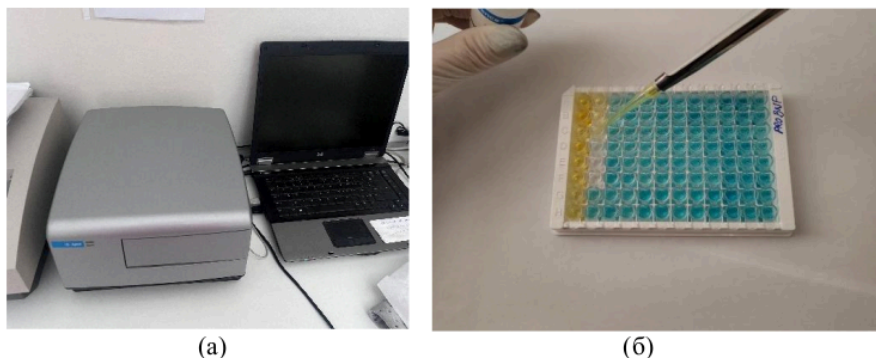
- Rat TNNI3/cTn-I (Troponin I Type 3, cardiac) ELISA Kit (Elabscience, Houston, Texas, USA, каталошки број: E-EL-R1253)
- Rat CK-MB ELISA Kit (FineTest, Wuhan, China, каталошки број: ER0841)
- Rat NT-proBNP ELISA Kit (Elabscience, Houston, Texas, USA, каталошки број: E-EL-R3023)
- Rat ANP ELISA Kit (FineTest, Wuhan, China каталошки број: ER0738)
- Rat BNP ELISA Kit (Elabscience, Houston, Texas, USA, каталошки број: E-EL-R0126)

У нашем истраживању, за квантитативну детекцију наведених маркера примењена је ELISA *sandwich* метода код које се циљани антиген налази везан између два антитела. Једно анитело се користи за „хватање” антигена (енгл. *Capture antibody*), а друго за детекцију тог истог антигена (енгл. *Detection antibody*) коњуговано са ензимом, у овом случају HRP. У склопу комерцијалних ELISA китова који су коришћени у нашем истраживању, налазила се припремљена микротитар плоча која садржи 96 бунарчића, импрегнирана са *Capture antibody*, које је неопходно за иницијално „хватање” антигена у узорку серума. Процес извођења ELISA методе обухватао је следеће кораке:

- На почетку, пре самог пипетирања узорка, стандарди у опадајућим концентрацијама се пипетирају у бунарчиће микротитар плоче у дупликату, ради

- конструисања калибрационе криве и даље квантификације испитиваног антигена у испитиваним узорцима серума.
- Узорци серума се разблажују у одговарајућем запреминском односу (1:4 код одређивања концентрације СК-MB и ANP, а за остале 1:100), а затим се пипетирају у дупликату и инкубирају према упутству произвођача.
 - Након инкубације, плоча се испира према упутству произвођача, и то додавањем пуфера за испирање (*Wash buffer*) како би се уклонило све што се није везало за *Capture antibody*.
 - Потом се додаје *Detection* антитело и плоча се поново инкубира у инкубатору (37°C), у трајању које је одређено у упутству произвођача.
 - Плоча се поново испира *Wash buffer*-ом, а затим се додаје ензим обележен стрептавидином, који ће се везати за биотиниловано детекционо антитело (стрептавидин-HRP). Затим се понавља процес инкубације и испирања у циљу уклањања ензима стрептавидин-HRP који се нису везали за *Detection* антитело.
 - У следећем кораку, додаје се хромоформни супстрат (тзв. 3,3',5,5'-тетраметилбензидин - TMB) који реагује са HRP, производећи плаву боју у зависности од количине везаног антигена.
 - Реакција се зауставља додавањем јаке киселине попут хлороводоничне (HCl) или сумпорне киселине (H₂SO₄) (тзв. *Stop solution*) што се детектује променом боје у жуту.
 - На крају, мере се апсорбанце на ELISA читачу (BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, California, USA) на специфичној таласној дужини према упутству произвођача.
 - Калибрациона крива се конструише и користи за квантификацију концентрације антигена у узорцима.

Ова процедура омогућава прецизно мерење концентрације антигена у узорцима серума путем реакције између антигена, антитела и ензимског супстрата (**Слика 36**)



Слика 36. Фотографија (а) ELISA читача (BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, California, USA) који је коришћен у нашем истраживању; (б) ELISA плоче и промене боје након додавања *Stop Solution* у овом истраживању.

3.4.6. Патохистолошка анализа ткива миокарда

Након жртвовања, срца пацова су измерена, а потом пресечена на две половине, тако да свака садржи и десну и леву половину миокарда. Лева половина ткива миокарда коришћена је за патохистолошку анализу. Ткива срца су уроњена у 4% пуферисан

неутрални раствор параформалдехида и остављена на собној температури, током 24 часа. Након фиксације ткива, уследила је дехидрација у растућим концентрацијама етанола (70%, 96%, и 100%). Потом су ткива миокарда уроњена у ксилену 2х по 60 минута након чега су урањања у парафин и остављена да преноће у термостату на температури од 56-60 °С. Добијени парафински блокови/калупи са ткивима миокарда су непосредно пре спровођења патохистолошке анализе серијски исечени на микротому на секције дебљине 5 μm . Иза тога, пресеци ткива миокарда су закривљеном пинцетом постављене у водено купатило под температуром од 45°C ради утврђивања репрезентативности узорка, те су репрезентативни исечци ткива миокарда положени на покровно стакло/плочицу. Добијени препарати се остављају на собној температури да се осуше како би били припремљени за даље хистолошке процедуре.

3.4.6.1. Бојење ткива миокарда хематоксилин/еозин (Н/Е) техником

У нашој студији коришћена је најзаступљенија хистолошка метода хематоксилин/еозин (Н/Е). Помоћу Н/Е технике омогућена је морфометријска анализа кардиомиоцита, као и евалуација морфолошких карактеристика ткива миокарда, при чему се једра боје тамно плавом до црном бојом, а цитоплазма розе до бледо љубичастом бојом. Исечци ткива, припремљени као што је претходно описано (видети одељак 3.4.6.) су депарафинизовани загревањем у термостату на температури од 56°C током 45 минута, а потом урањани у ксилол два пута у трајању од по 5 минута. Затим су ткива срца рехидратисана у опадајућим концентрацијама етанола (100%, 96% и 70%) и испрани у дестолованој води. Бојење плочица са ткивима миокарда је извршено 2% раствором Mayer-овог хематоксилина потапањем плочица у боју током 10 минута, а затим су пресеци испрани дестилованом водом током 10 минута. По обављеном испирању, плочице су потопљене у боју еозин током 3 минута. Даљи процес је обухватило поновно испирање плочица дестилованом водом, затим дехидратацију плочица у сада растуће концентрације етанола (96%, и 100%), након чега су плочице потопљене у ксилол два пута по 5 минута. На крају су ткивни пресеци прекривени покровним стаклима коришћењем DPX. Сушење плочица је трајало 24 часа на собној температури, након чега су препарати даље анализирани.

Морфометријска анализа кардиомиоцита подразумевала је процену површине попречног пресека кардиомиоцита (енгл. *Cross-sectional area* - CSA), као и дијаметра уздужног пресека (енгл. *Longitudinal section diameter* - LSD), што је обављено у програму за анализу слике *Axiovision image analysis program* (Zeiss, USA), и то анализом 100-120 ћелија по животињи (449). *Image Pro-Plus programs* (Media Cybernetics, USA) коришћен је за нализу густине ћелијског инфилтрата, која је урађена на укупно 10 пресека, од укупног броја серијских пресека ткива миокарда (450). Заправо, извршена је анализа сваког 20. пресека ткива миокарда, што одговара растојању од 100 μm између анализираних пресека. Морфометријска мерења у овој студији извршена су у трипликату, а просечна вредност три мерења је узета за коначну вредност. Добијени резултати су приказани у %.

3.4.6.2. Бојење ткива миокарда *Picrosirius red* техником

Метода бојења *Picrosirius red* (PSR) је техника која се користи за детекцију садржаја колагених влакана у испитиваним ткивима миокарда. У овој техници бојења, колагена влакна се боје црвено, док се мишићна влакна и цитоплазма боје жуто а једра црно. Протокол за извођење ове технике подразумевао је депарафинизацију и

рехидратацију ткива миокарда, као што је претходно описано (видети одељак 3.4.6.1.). Након рехидратације, плочице се урањају у раствор Weigerts-овог хематоксилина у трајању од 5 минута, испирају у дестилованој води у трајању од 10 минута и урањају у раствор PSR боје у трајању од 60 минута. Потом је извршено испирање боје два пута у интервалима од по 5 минута у 2% глацијалној сирћетној киселини. Након тога је извршена поновна дехидратација ткива миокарда у растућим концентрацијама алкохола (96% и 100%) у трајању од по 5 минута, да би се на крају ткива уронила у ксилол 3х по 5 минута. Обојени исечци ткива миокарда су фиксирани за покривна стакла DPX-ом и сушени 24 часа на собној температури. Препарати ткива миокарда су снимани дигиталном камером под светлосним микроскопом (Olympus BX51 light microscope), док је анализа садржаја колагена извршена у програму Image Pro-Plus programs (Media Cybernetics, USA), и то на 10 различитих пресека ткива миокарда (451). Добијени резултати су приказани у %.

4

3.4.7. Одређивање релативне експресије антиоксидационих, (анти)апоптотских и (анти)инфламацијских гена, као и релативне експресије гена сигналних молекула JAK2 и STAT2 у левој комори срца методом квантитативне полимеразне ланчане реакције у реалном времену (qRT-PCR)

qRT-PCR (енгл. *Quantitative Real Time - Polymerase Chain Reaction* - qRT-PCR) метода је спроведена коришћењем одговарајућих прајмера (Табела 1), чиме је одређена релативна експресија антиоксидационих (SOD-1 или Cu/Zn SOD и SOD-2 или Mn SOD, eNOS, iNOS), (анти)инфламацијских (NFkB, TNF α , IL-6, IL1beta, IL-17, IL-10, IL-13), и (анти)апоптотских (Bax, Bcl-2, каспазе-3 и каспазе-9) гена, као и релативна експресија гена сигналних молекула JAK2 и STAT3 који потенцијално учествују у сигналној каскади у срчаној инсуфицијенцији. Извођење qRT-PCR методе подразумевало је три следећа корака:

1. Изолацију укупне рибонуклеинске киселине из ткива миокарда

Половина миокарда сваке животиње чувана је на температури од -80°C, до момента извођења qRT-PCR анализе. За одређивање релативне експресије гена из узорак ткива миокарда употребом TRIzol се издваја иРНК. Укупна РНК из леве коморе ткива миокарда је изолована применом *Extractme Total RNA kit* (Blirt S.A., Gdansk, Poland, Каталожки број EM09.2, EM11.2) према упутствима произвођача.

2. Реверзну транскрипцију, односно преводње информационе РНК у комплементарну дезоксирибонуклеинску киселину

Реверзна транскрипција РНК (μ g) је спроведена коришћењем комплета за комплементарну ДНК (iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA, Каталожки број 1708841) према инструкцијама произвођача.

3. Квантитативну полимеразну ланчану реакцију у реалном времену - qRT-PCR

PCR реакција је спроведена коришћењем SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA, Каталожки број 172-5270) система и иРНК специфичних, комерцијално доступних прајмера од интереса (Invitrogen, Carlsbad, CA). β -актин је коришћен као *housekeeping* ген (Invitrogen, Carlsbad, CA). PCR је пађен у CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), док су подаци накнадно анализирани и израчуната је релативна експресија гена према $2^{-\Delta\Delta Ct}$ методи коришћењем следеће формуле (РЕФ):

$$\Delta Ct = Ct(\text{испитиваног гена}) - Ct(\text{housekeeping гена})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(HF \text{ група}) - Ct(CTRL \text{ група})$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{релативна промена ниво експресије гена у HF у односу на CTRL групу}$$

У нашем истраживању, за сваки испитивани узорак коришћена је средња вредност дупликата мерења, док је релативна експресија иРНК за сваки испитивани узорак представљена као количник експресије испитиваног и *housekeeping* гена (452).

Маркер	Леви прајмер (F)	Десни прајмер (R)
β -actin	GATCAGCAAGCAGGAGTACGAT	GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAT
SOD-1	TGAAGAGAGGCATGTTGGAGAC	CACACGATCTTCAATGGACACA
SOD-2	AATCAACAGACCCAAGCTAGGC	CACAATGTCACTCCTCTCCGAA
eNOS	GAGGGAGTCAGCCTAAATCCTG	ATCAAAGCATACGAAGAGGGCA
iNOS	TCAGGCTTGGGTCTTGTTAAGC	CTTGTGGTGAAGGGTGTCGT
NF- κ B	GTTTGGTTTGAGACATCCCTGC	CTGTCTTATGGCTGAGGTCTGG
TNF- α	GAAAGCATGATCCGAGATGTGG	CAGGAATGAGAAGAGGCTGAGG
IL-6	GATACCACCCACAACAGACCAG	GTGCATCATCGCTGTTCATACA
IL-1 β	GCAAGTGTCTGAAGCAAGCTATG	TCTGTCAGCCTCAAAGAACAGG
IL-17	GCAAGAGATCCTGGTCTGAAG	AGGTCTCTGTTTAGGACGCATG
IL-10	CTTACTGGCTGGAGTGAAGACC	CTGGGAAGTGGGTGCAGTTATT
IL-13	GCAAGTGTCTGAAGCAGCTATG	TCTGTCAGCCTCAAAGAACAGG
Bax	GCTACAGGGTTTCATCCAGGAT	ATGTTGTTGTCCAGTTCATCGC
Bcl-2	GCAAAGCACATCCAATAAAAGCG	GTACTTCATCACGATCTCCCGG
CASP-3	GGAAGATCACAGCAAAAGGAGC	GCAGTAGTCGCCTCTGAAGAAA
CASP-9	TGTACTCCAGGGAAGATCGAGA	CGTTGTTGATGATGAGGCAGTG
JAK2	TCCACCCAATCATGTCTTCCA	ATGGTGTGCATCCGCAGTTA
STAT3	CTGAGGTACAATCCCGCTCG	TCGGTCAGTGTCTTCTGCAC
mTOR	TGCTGGTGTCTTTGTGAAG	TTGTGCTCTGGATTGAGGTG
PPAR γ	TTCAGAAGTGCTTGCTGTG	CCAACAGCTTCTCCTTCTCG

F - forward; R - reverse; β -actin - *housekeeping* ген; SOD-1 – супероксид дисмутаза-1; SOD-2 – супероксид дисмутаза - 2; eNOS - ендотелна NO синтаза; iNOS - индуцибилна NO синтаза; NF- κ B - нуклеарни фактор капа-појачивача лаког ланца активираних В хелија; TNF- α - фактор некрозе тумора- α ; IL-6 - интерлеукин-6; IL-1 β - интерлеукин -1 β ; IL-17 - интерлеукин -17; IL-10 - интерлеукин-10; IL-13 - интерлеукин-13; Bax - Bcl-2-повезани X протеин; Bcl-2 - B-ћелијски лимфом 2; CASP-3 - каспаза-3; CASP-9 - каспаза-9; JAK2 - Јанус киназа-2 ; STAT3 - преносилац сигнала и активатор транскрипције; mTOR - сисарски циљ за рапамицин; PPAR γ – рецептор гама активиран пролифератором пероксизома;

Табела 1. Списак комерцијално доступних прајмера коришћених за RT-PCR анализу у нашем истраживању.

3.5. СТАТИСТИЧКЕ АНАЛИЗЕ

3.5.1 Снага студије

Резултати претходно публиковане студије (419), у којој је праћен утицај росувастатина на хемодинамске и морфолошке параметре у моделу срчане инсуфицијенције индуковане применом изопротеренола код пацова, коришћени су за прорачун укупног узорка. За прорачун је коришћен t-тест за независне узорке, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2) уз коришћење одговарајућег рачунарског програма (453). Узимајући у обзир да неке животиње могу током хроничног третмана испасти из студије, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 30 (по 6 животиња у свакој групи).

3.5.2. Статистичка обрада података

За статистичку обраду података коришћен је софтверски пакет GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla California, САД) за оперативни систем Windows. Нормалност расподеле испитиваних података је процењена коришћењем *Kolmogorov-Smirnov* и *Shapiro-Wilk* тестова као и конструисањем хистограма и нормалног QQ графика. У зависности од природе варијабле и нормалности расподеле података за испитивање постојања разлика међу групама коришћен је одговарајући параметарски (Independent-Samples T test, Paired-Samples T test, One-way/Two-way ANOVA) или непараметарски (Mann-Whitney U Test, Wilcoxon signed-rank test, Kruskal-Wallis test) тестови. За испитивање повезаности међу варијаблама коришћени су Пирсонов или Спирманов тест корелације. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (енгл. *Standard deviation* - SD). Вредност $p < 0,05$ сматра се статистички значајном.

IV РЕЗУЛТАТИ

4.1. ПРОЦЕНА *IN VIVO* ФУНКЦИЈЕ СРЦА ПАЦОВА ПРЕ ПОЧЕТКА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ ПРОЦЕДУРА

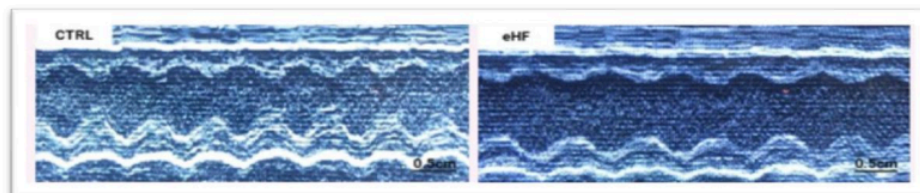
Процена *in vivo* функције срца спроведена је пре почетка експерименталних процедура на свим пацовима који су били укључени у наше истраживање. За добијање параметара функције леве коморе, као стандардна метода, коришћена је ТТЕ. Овом методом је омогућена потврда хомогености и здравственог статуса пацова, што је кључно за ваљаност експерименталног дизајна и интерпретацију добијених резултата. Резултати анализе ТТЕ су приказани у Табели 2, где су представљене просечне вредности кључних параметара функције леве коморе пацова из CTRL и eHF групе. Сви пацови укључени у истраживање имали су уједначене вредности ТТЕ параметара, који су били у оквиру референтних вредности. Такође, није било статистички значајних одступања ни једног од испитиваних параметара унутар група, као ни између CTRL и eHF групе, чиме су створени одговарајући услови за даље спровођење истраживања. Вредност EF леве коморе код свих животиња укључених у овај експеримент била је већа од 75%, што је указивало на добар функционални статус срца у почетној фази истраживања.

Параметар	CTRL (n=6)	eHF (n=24)
IVSd (cm)	0.111±0.01	0.117±0.01
IVSs (cm)	0.593±0.04	0.586±0.07
LVIDd (cm)	0.123±0.01	0.120±0.00
LVIDs (cm)	0.138±0.02	0.147±0.01
LVPWd (cm)	0.328±0.02	0.328±0.04
LVPWs (cm)	0.160±0.02	0.156±0.00
LVEDV (mL)	44.7±2.45	43.8±1.80
LVESV (mL)	0.491±0.10	0.484±0.17
FS (%)	0.091±0.01	0.093±0.03
EF (%)	81.3±2.34	80.8±1.24
Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (SD).		

Табела 2. Параметри *in vivo* функције леве коморе пацова укључених у истраживање, пре почетка свих експерименталних процедура.

4.2. ПОТВРДА МОДЕЛА СРЧАНЕ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈЕ КОД ПАЦОВА

Срчана инсуфицијенција је изазвана свим пацовима из eHF групе, као што је претходно описано (видети одељак 3.2). Након четири недеље од последње дозе ISO, свим пацовима је урађена ТТЕ, како би се проценила функција леве коморе и вредност EF (видети одељак 3.4.2). На Слици 37 приказане су фотографије репрезентативних записа у М-режиму PLAX свих експерименталних група, четири недеље након последње дозе ISO.



Слика 37. Приказ репрезентативних записа у М-режиму снимљених методом ТТЕ четири недеље након последње дозе ISO.

Као што је приказано у **Табели 3**, четири недеље након последње дозе ISO, пацови из eHF групе су имали статистички значајно мање вредности IVSd, LVPWd, и LVPWs у поређењу са CTRL групом. Такође, уочене су веће димензије LVIDd и LVIDs, као и вредности LVEDV и LVESV у HF групи у односу на CTRL групу. Значајано снижење процената FS и EF (мање од 55%) уочено је код свих пацова из eHF групе у односу на CTRL групу, што је био критеријум за потврду модела срчане инсуфицијенције. Ови резултати су потврдили да је модел срчане инсуфицијенције успешно изазван у eHF групи, са значајним променама у структури и функцији леве коморе код свих пацова.

Параметар	CTRL (n=6)	eHF (n=24)
IVSd (cm)	0.129±0.01	0.111±0.01*
IVSs (cm)	0.170±0.02	0.150±0.02
LVIDd (cm)	0.664±0.02	0.881±0.05*
LVIDs (cm)	0.378±0.04	0.668±0.07*
LVPWd (cm)	0.150±0.01	0.124±0.01*
LVPWs (cm)	0.201±0.02	0.161±0.02*
LVEDV (mL)	0.670±0.04	1.469±0.21*
LVESV (mL)	0.139±0.04	0.689±0.16*
FS (%)	43.2±5.74	24.3±2.24*
EF (%)	79.3±6.24	53.4±4.33*
Вредности су приказане као средња вредност ± SD. Статистичка значајност је изражена као p<0,05. * CTRL vs. eHF.		

Табела 3. Параметри *in vivo* функције леве коморе пацова са срчаном инсуфицијенцијом четири недеље од последње дозе ISO.

4.3. ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ХРОНИЧНЕ КОАДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТА НА ХЕМОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ

Имајући у виду да срчана инсуфицијенција може бити праћена снижењем ВР и HR, вредности SBP, DBP, MAP, и HR су измерене на крају експерименталног протокола, свим пацовима укљученим у наше истраживање.

Значајно ниже вредности SBP, DBP и MAP су забележене у HF групи у односу на CTRL групу (**График 1А, Б, В**). Терапијски протоколи који су примењивани у HF-EMPA и HF-EMPA+SV групи спречили су значајан пад SBP у поређењу са вредностима уоченим у HF групи (**График 1А**). Важно је напоменути да је у HF-EMPA-S/V групи уочен посебно изражен ефекат на одржавање вредности SBP, које су биле приближне вредностима забележеним у CTRL групи. Насупрот томе, уочене су значајно ниже вредности SBP код пацова третираних монотерапијом (HF-EMPA и HF-S/V група) у односу на здраве пацове (CTRL група). Посматрајући групе у којима је примењиван терапијски протокол, значајно ниже вредности SBP су забележене у HF-S/V групи у односу на HF-EMPA и HF-EMPA+S/V групе. Штавише, вредност SBP у HF-EMPA+S/V групи је била значајно већа у односу на HF-EMPA групу, што указује на потенцијални синергистички ефекат који се јавља у групи која је примала двојну терапију.

Показано је да је вредност DBP била приближна у групама код којих се примењивао терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V група) у односу

на CTRL групу, али значајно виша у односу на HF групу (График 1Б). Поред тога вредност MAP је била повишена у HF-EMPA и HF-EMPA+S/V групи у односу на HF групу, док је у HF-S/V групи била значајно нижа у односу на CTRL групу (График 1В).

Значајан пад вредности HR забележен је у HF групи у односу на CTRL групу (График 1Г). Такође, значајно ниже вредности HR забележене су у свим групама код којих се примењивао терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V група) у односу на CTRL групу. Међутим, у поређењу са HF групом, вредности HR су биле значајно више само у HF-EMPA групи, што указује на позитиван ефекат који је монотерапија емпаглифлозином имала на HR.

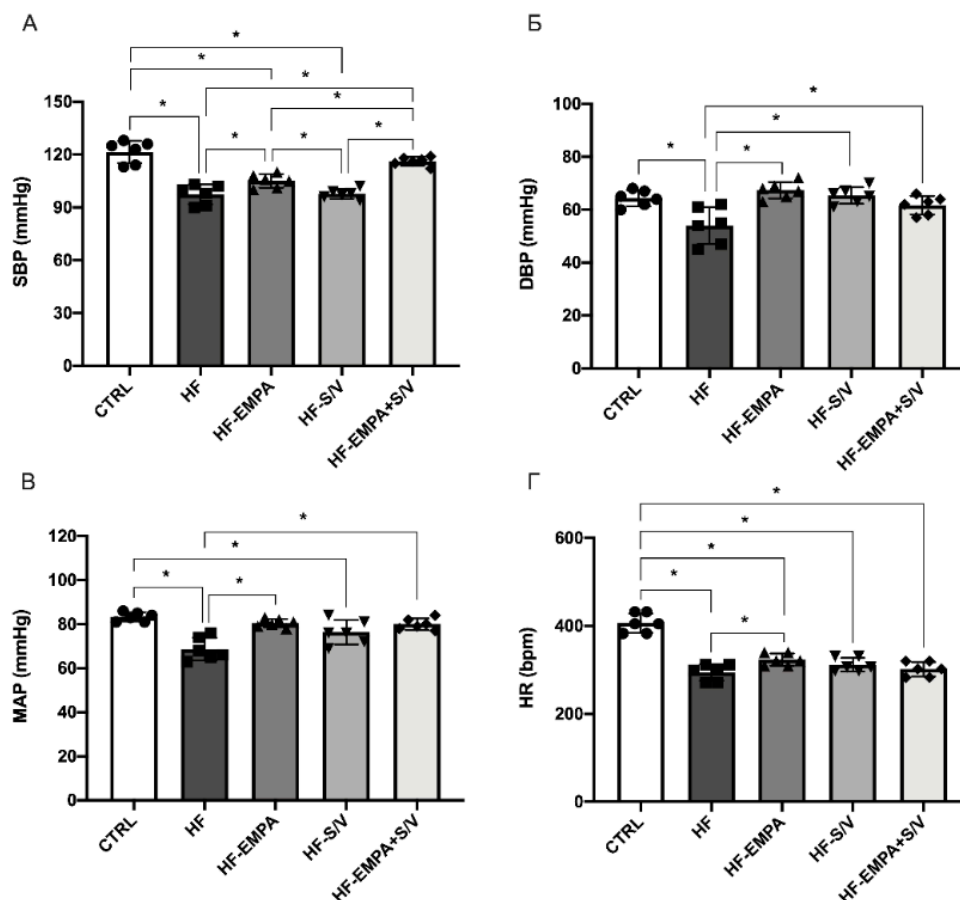
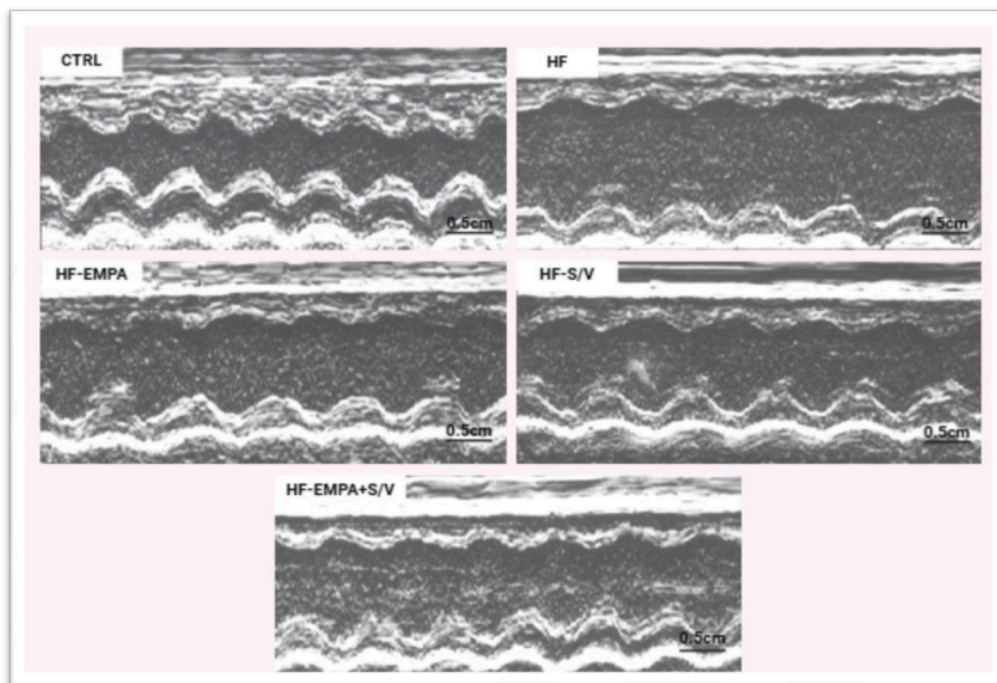


График 1. Утицај примењених терапијских протокола на хемодинамске параметре пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) систолни крвни притисак (SBP); (Б) дијастолни крвни притисак (DBP); (В) средњи артеријски притисак (MAP); (Г) срчана фреквенција (HR). Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

4.4 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ХРОНИЧНЕ КОАДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТАНА НА *IN VIVO* ФУНКЦИЈУ СРЦА ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ

У циљу процене ефеката терапијских протокола на *in vivo* срчану функцију, код свих пацова је спроведена ТТЕ непосредно пре жртвовања. На **Слици 38** приказане су фотографије репрезентативних записа у М-режиму PLAX свих експерименталних група на крају експерименталног протокола.



Слика 38. Приказ репрезентативних записа у М-режиму снимљених методом ТТЕ на крају експерименталног протокола.

У HF групи је уочена дилатација и оштећење функције леве коморе, што се манифестовало повећањем LVIDd и LVIDs, као и смањењем процената FS и EF у поређењу са CTRL групом (**График 2В, Г, Е, Ж**). Значајно смањење LVIDd уочено је само у HF-S/V и HF-EMPA+S/V групи, док је вредност LVIDs значајно снижена, а проценти FS и EF значајно повећани у свим групама код којих се примењивао терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V група) у поређењу са HF групом. У HF-EMPA групи уочене су значајно више вредности LVIDd и LVIDs, као и значајно нижи проценти FS и EF у односу на HF-S/V и HF-EMPA+S/V. Такође, значајно виша вредност LVIDs, као и нижи проценти FS и EF уочени су у HF-EMPA групи у односу на CTRL групу. Вредности IVSd, LVPWd, IVSs и LVPWs су биле мање у HF групи у поређењу са CTRL групом, иако је значајна разлика примећена само за вредност LVPWs (**График 2А, Б, Д, Љ**). Међутим, у HF-EMPA+S/V групи је спречено смањење IVSs у поређењу са HF групом. Такође, у групама HF-EMPA и HF-EMPA+S/V спречено је смањење LVPWs у поређењу са HF групом, док је HF-S/V група имала значајно мању вредност LVPWs у односу CTRL и HF-EMPA+S/V групу.

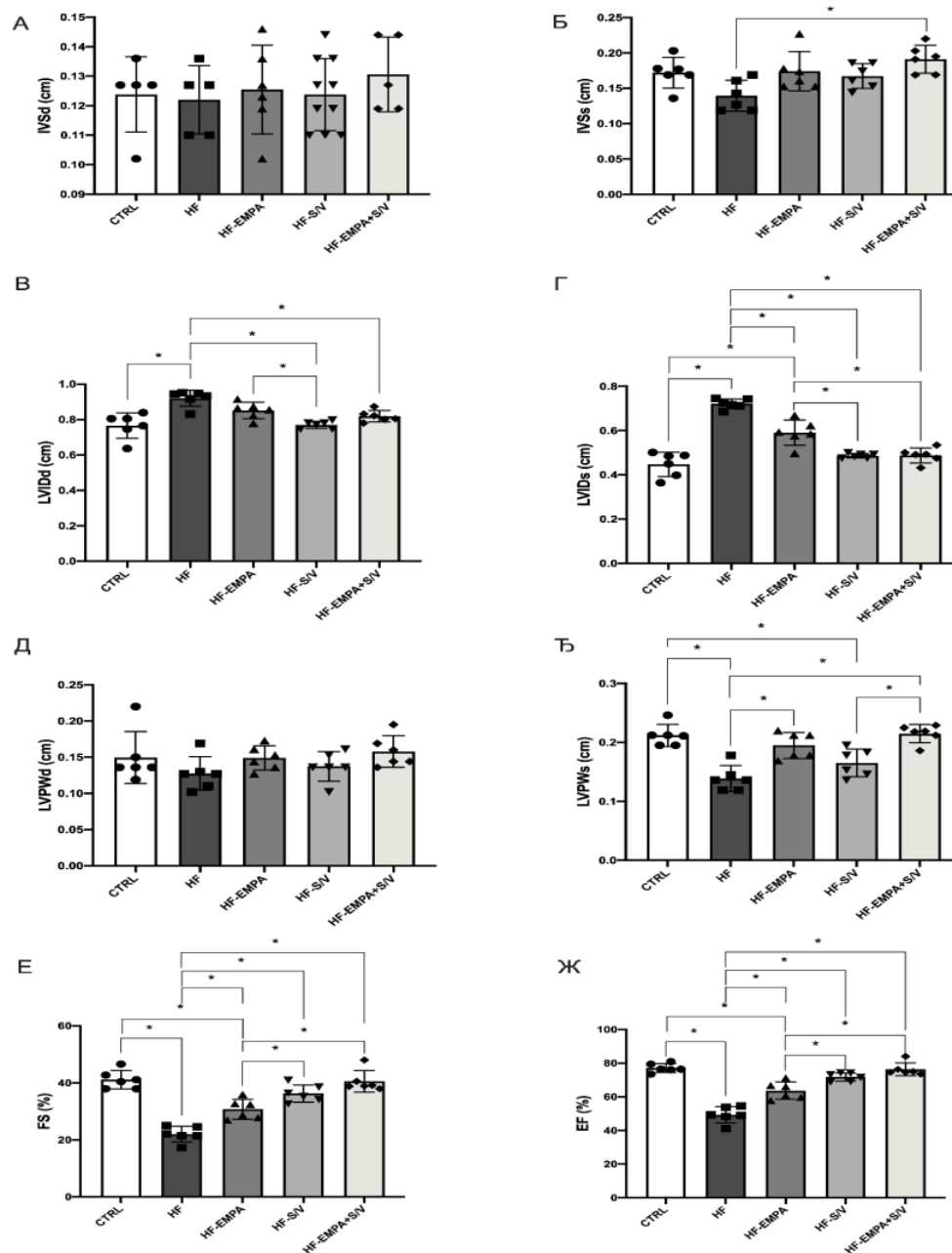


График 2. Утицај примењених терапијских протокола на *in vivo* функцију срца пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) дебљина зида интервентрикуларног септума на крају дијастоле (IVSd); (Б) дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле (IVSs); (В) унутрашња димензија леве коморе на крају дијастоле (LVIDd); (Г) унутрашња димензија леве коморе на крају систоле (LVIDs); (Д) дебљина задњег зида леве коморе на крају дијастоле (LVPWd); (Ђ) дебљина задњег зида леве коморе на крају систоле (LVPWs); (Е) фракција скраћења леве коморе (FS); (Ж) ејекциона фракција леве коморе (EF). Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

4.5 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ХРОНИЧНЕ КОАДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТАНА НА EX VIVO ФУНКЦИЈУ СРЦА ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ

Промене кардиодинамских параметара и CF праћене су у свим испитиваним групама током протокола ауторегулације на различитим CPP у опсегу од 40 до 120 cmH₂O (**График 3**).

Вредност dp/dt max при свим вредностима CPP је била значајно нижа у HF групи у односу на CTRL групу (**График 3А**). Поред тога, уочена је значајно нижа вредност dp/dt max у HF-ЕМПА групи при вредности CPP од 120 cmH₂O, као и у HF-S/V групи при вредности CPP од 100 и 120 cmH₂O у односу на CTRL групу. Вредност dp/dt max је била значајно виша у HF-ЕМПА+S/V групи при вредностима CPP од 60-120 cmH₂O у односу на HF групу, док је у HF-S/V групи вредност dp/dt max била значајно виша једино при вредности CPP од 60 cmH₂O у односу на HF групу. Интересантно је да није уочена статистички значајна разлика у вредности dp/dt max између HF-ЕМПА и HF групе при свим вредностима CPP.

Вредност dp/dt min при вредностима CPP од 60-120 cmH₂O је била значајно виша у HF и HF-ЕМПА+S/V групи у односу на CTRL групу (**График 3Б**). Поред тога, значајно нижа вредност dp/dt min забележена је у HF-ЕМПА групи при вредности CPP од 80 cmH₂O, као и у HF-S/V групи при вредности CPP од 120 cmH₂O у односу на HF групу.

Вредност SLVP при вредностима CPP од 100 и 120 cmH₂O је била значајно нижа у HF групи у односу на CTRL групу (**График 3В**), док статистички значајна разлика у вредности овог параметра није уочена између других испитиваних група. Такође, у нашем истраживању нису уочене статистички значајне разлике између испитиваних група у односу на вредност DLVP (**График 3Г**).

Вредност HR је била значајно нижа у HF и HF-ЕМПА групи при вредности CPP од 40 и 100 cmH₂O у односу на CTRL групу, док статистички значајна разлика у вредности овог параметра није уочена између других испитиваних група (**График 3Д**).

Вредност CF је била значајно виша у HF групи при вредностима CPP од 80-120 cmH₂O у односу на CTRL групу (**График 3Ђ**). Вредност CF је била значајно нижа у HF-S/V групи при вредностима CPP од 60-120 cmH₂O, као и у HF-ЕМПА+S/V групи при вредностима CPP од 80-120 cmH₂O у односу на HF групу. У групи HF-ЕМПА, вредност CF је била значајно нижа у односу на HF групу само при вредности CPP од 120 cmH₂O.

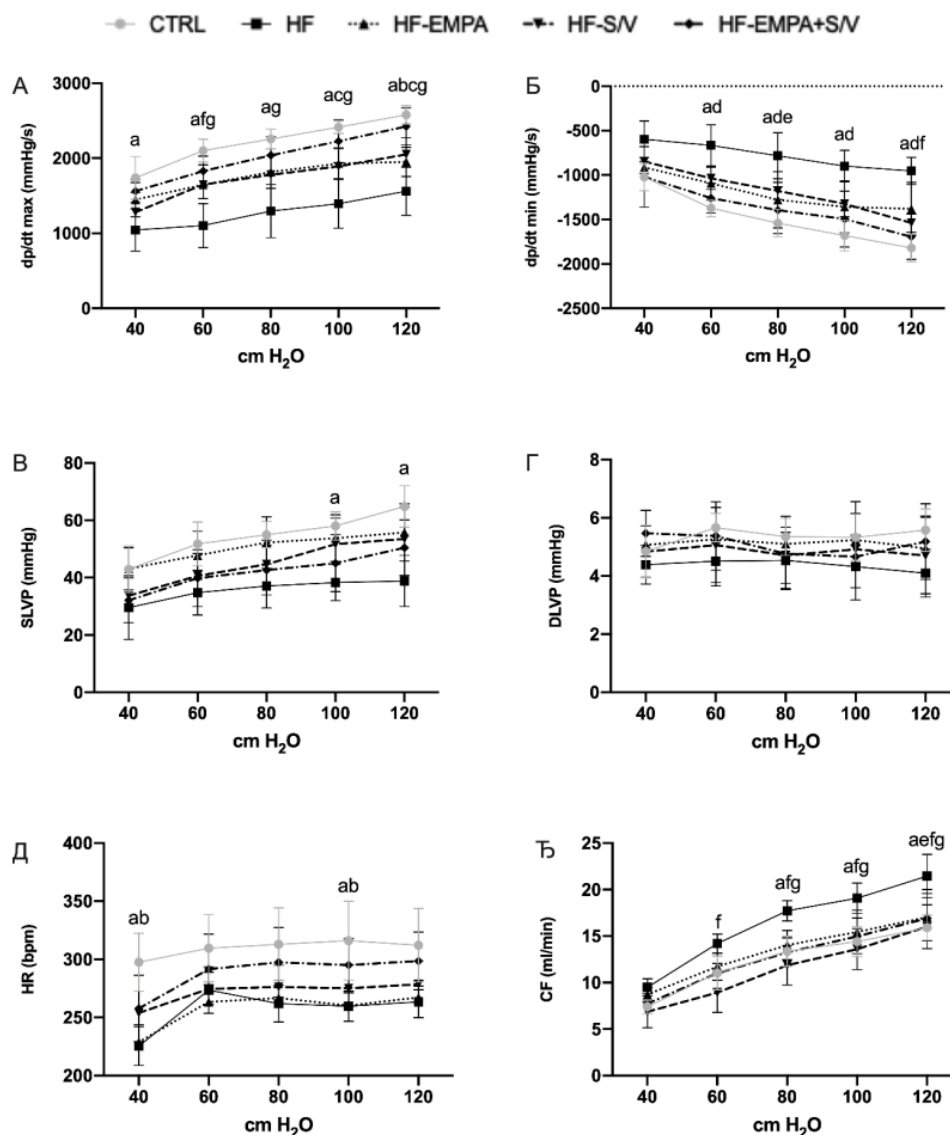


График 3. Утицај примењених терапијских протокола на *ex vivo* функцију срца пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) максимална стопа развоја притиска у левој комори (dp/dt max); (Б) минимална стопа развоја притиска у левој комори (dp/dt min); (В) систолни притисак у левој комори (SLVP); (Г) дијастолни притисак у левој комори (DLVP); (Д) срчана фреквенција (HR). Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. Статистичка значајност је изражена као $p < 0.05$. ^aCTRL vs. HF; ^bCTRL vs. HF-EMPA; ^cCTRL vs. HF-S/V; ^dCTRL vs. HF-EMPA+S/V; ^eHF vs. HF-EMPA; ^fHF vs. HF-S/V; ^gHF vs. HF-EMPA+S/V; ^hHF-EMPA vs. HF-S/V; ⁱHF-EMPA vs. HF-EMPA+S/V; ^jHF-S/V vs. HF-EMPA+S/V.

Посматрајући вредност $dp/dt \max$, није уочена статистички значајна разлика унутар испитиваних група, када је срце поново подвргнуто протоколу ауторегулације (График 4).

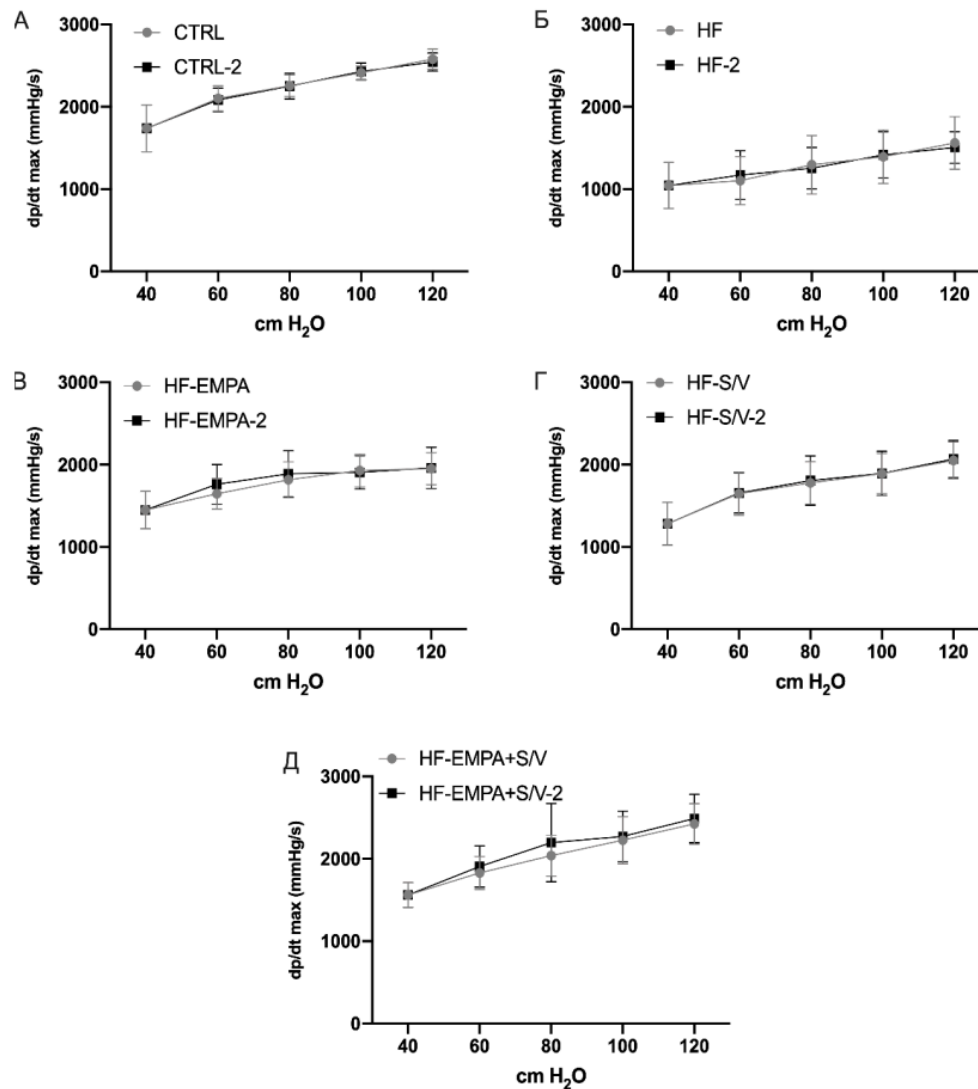


График 4. Утицај примењених терапијских протокола (унутар групе) на вредност максималне стопе развоја притиска у левој комори ($dp/dt \max$) срца пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) CTRL група; (Б) HF група; (В) HF-EMPA група; (Г) HF-S/V група; (Д) HF-EMPA+S/V група. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

У односу на вредност $dp/dt \text{ min}$, статистички значајна разлика унутар испитиваних група уочена је само у HF-S/V групи при вредности CPP од 80 cmH_2O када је уочена значајно нижа вредност овог параметра приликом поновног излагања срца протоколу ауторегулације (График 5Г).

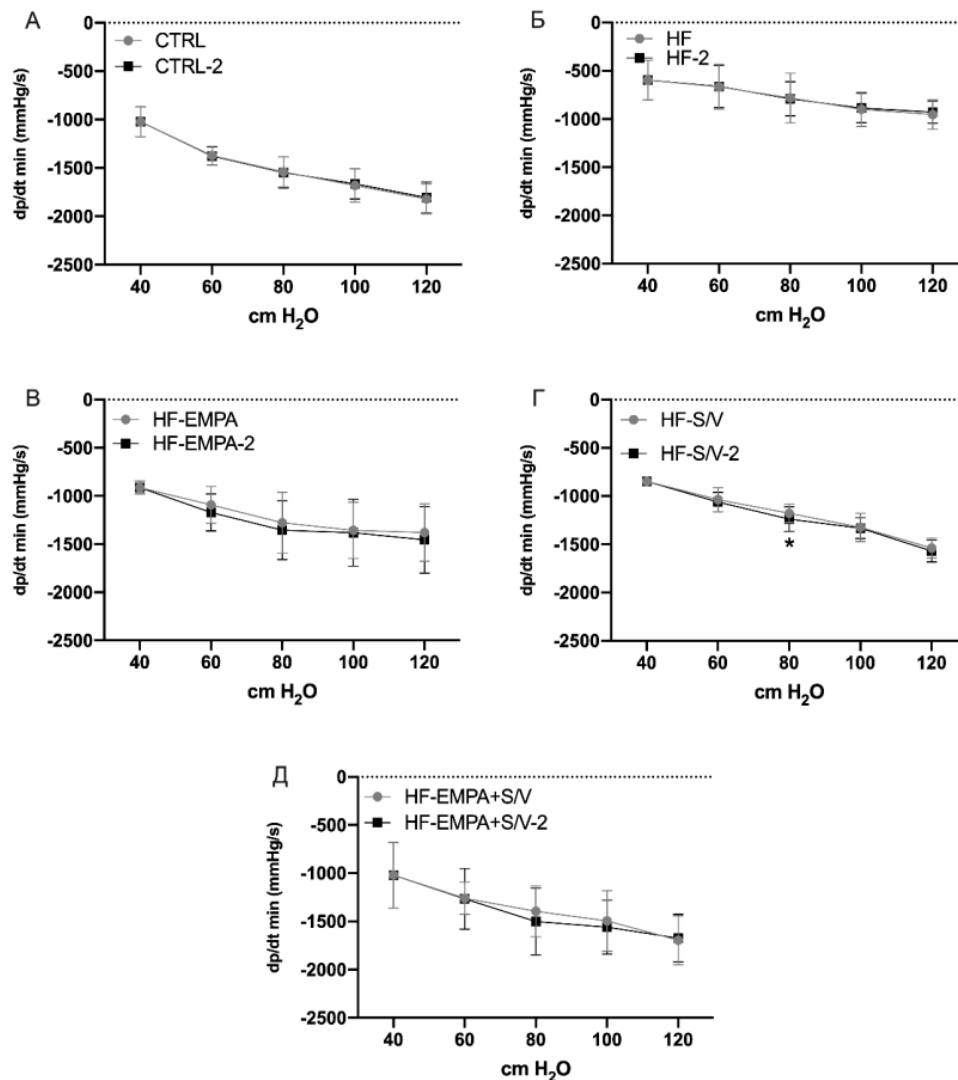


График 5. Утицај примењених терапијских протокола (унутар групе) на вредност минималне стопе развоја притиска у левој комори ($dp/dt \text{ min}$) срца пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) CTRL група; (Б) HF група; (В) HF-EMPA група; (Г) HF-S/V група; (Д) HF-EMPA+S/V група. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

Посматрајући вредност SLVP, није уочена статистички значајна разлика унутар испитиваних група, када је срце поново подвргнуто протоколу ауторегулације (График 6).

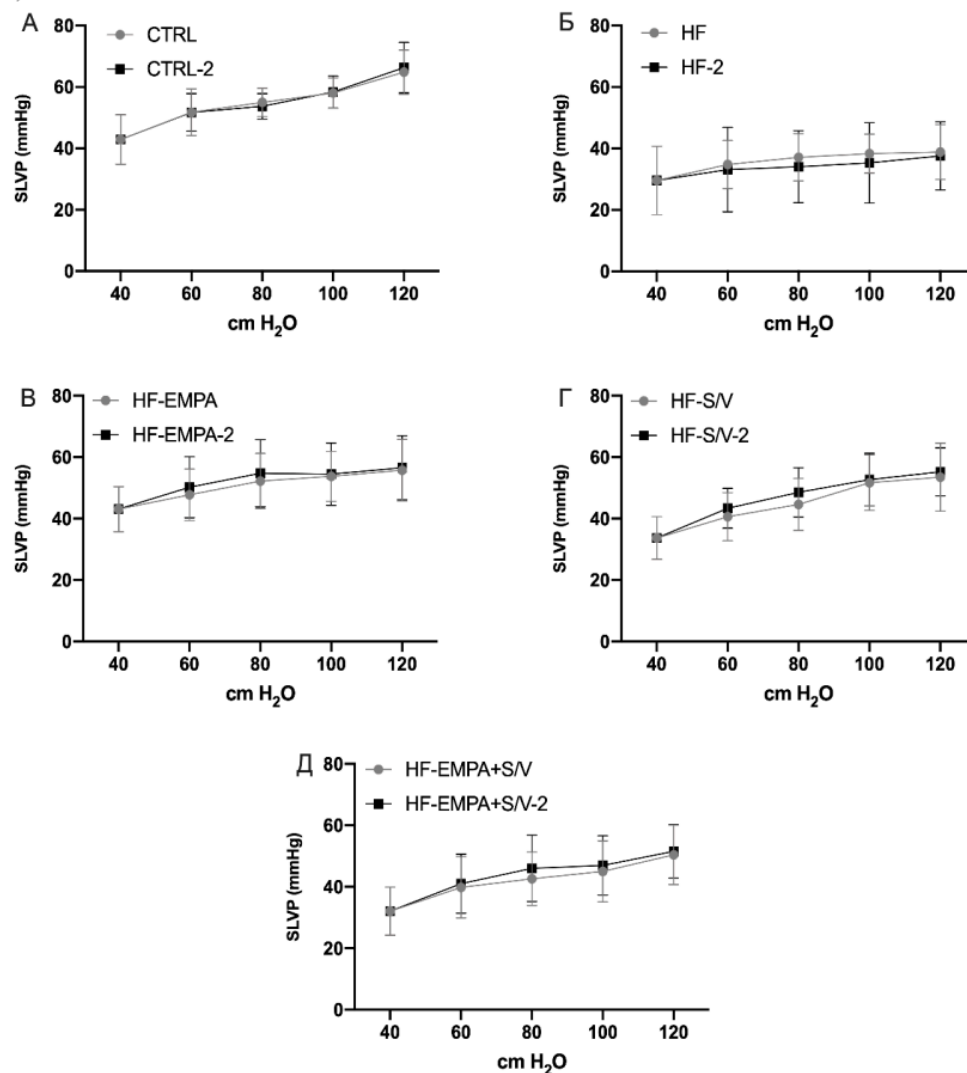


График 6. Утицај примењених терапијских протокола (унутар групе) на вредност систолног притиска у левој комори (SLVP) срца пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) CTRL група; (Б) HF група; (В) HF-EMPA група; (Г) HF-S/V група; (Д) HF-EMPA+S/V група. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

Посматрајући вредност DLVP, није уочена статистички значајна разлика унутар испитиваних група, када је срце поново подвргнуто протоколу ауторегулације (График 7).

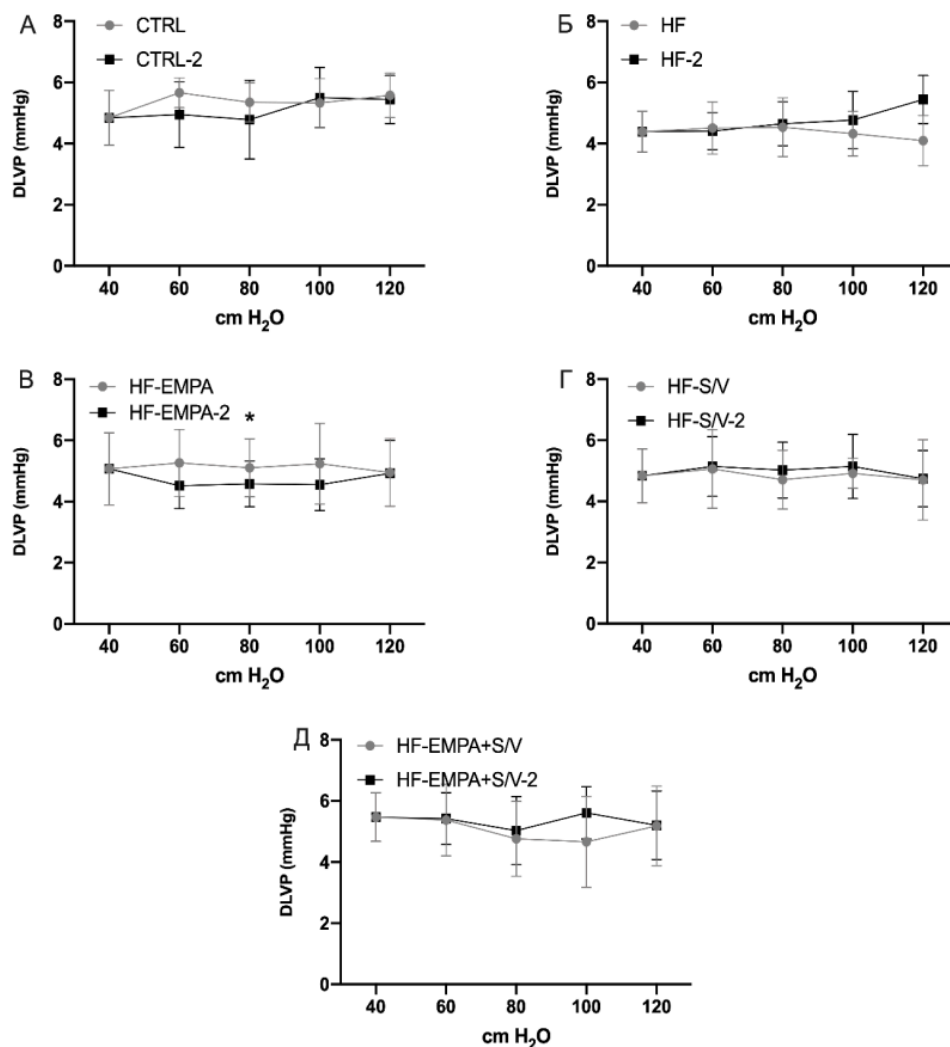


График 7. Утицај примењених терапијских протокола (унутар групе) на вредност дијастолног притиска у левој комори (DLVP) срца пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) CTRL група; (Б) HF група; (В) HF-EMPA група; (Г) HF-S/V група; (Д) HF-EMPA+S/V група. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

У HF групи уочена је значајно нижа вредност HR приликом поновног излагања срца протоколу ауторегулације, и то при вредностима CPP од 60 и 80 cmH₂O (**График 8Б**). Поред тога, значајно нижа вредност HR уочена је у HF-EMPA и HF-EMPA+S/V групи приликом поновног излагања срца протоколу ауторегулације, и то при вредностима CPP од 60 cmH₂O (**График 8Б** и **Д**).

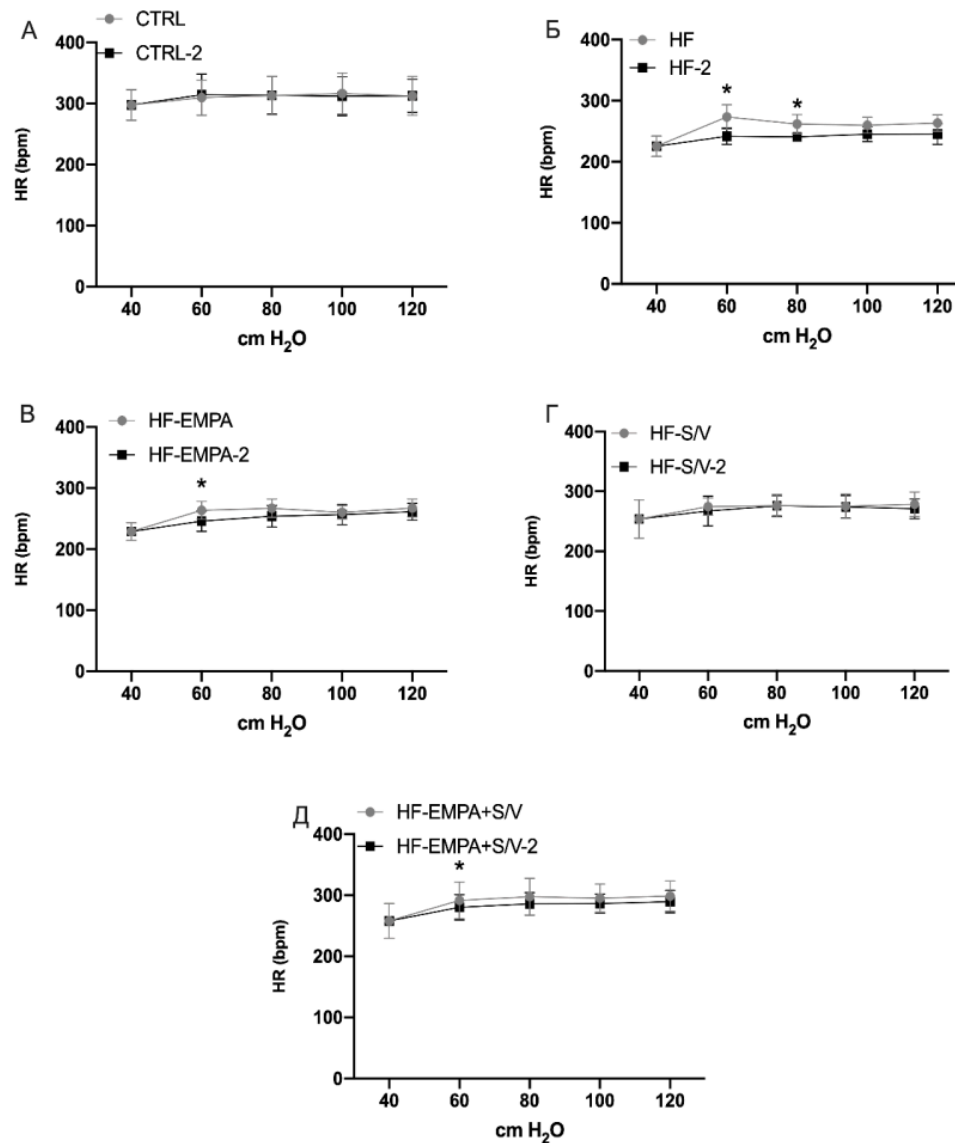


График 8. Утицај примењених терапијских протокола (унутар групе) на вредност срчане фреквенције (HR) пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) CTRL група; (Б) HF група; (В) HF-EMPA група; (Г) HF-S/V група; (Д) HF-EMPA+S/V група. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

У нашем истраживању, значајно нижа вредност CF забележена је у HF групи приликом поновног излагања срца протоколу ауторегулације при вредности CPP од 120 cmH₂O (График 9Б). Са друге стране, значајно више вредности CF уочене су у HF-EMPA при вредности CPP од 120 cmH₂O (График 9В), као и у HF-S/V групи при вредности CPP од 100 cmH₂O, током поновног излагања срца протоколу ауторегулације (График 9Г).

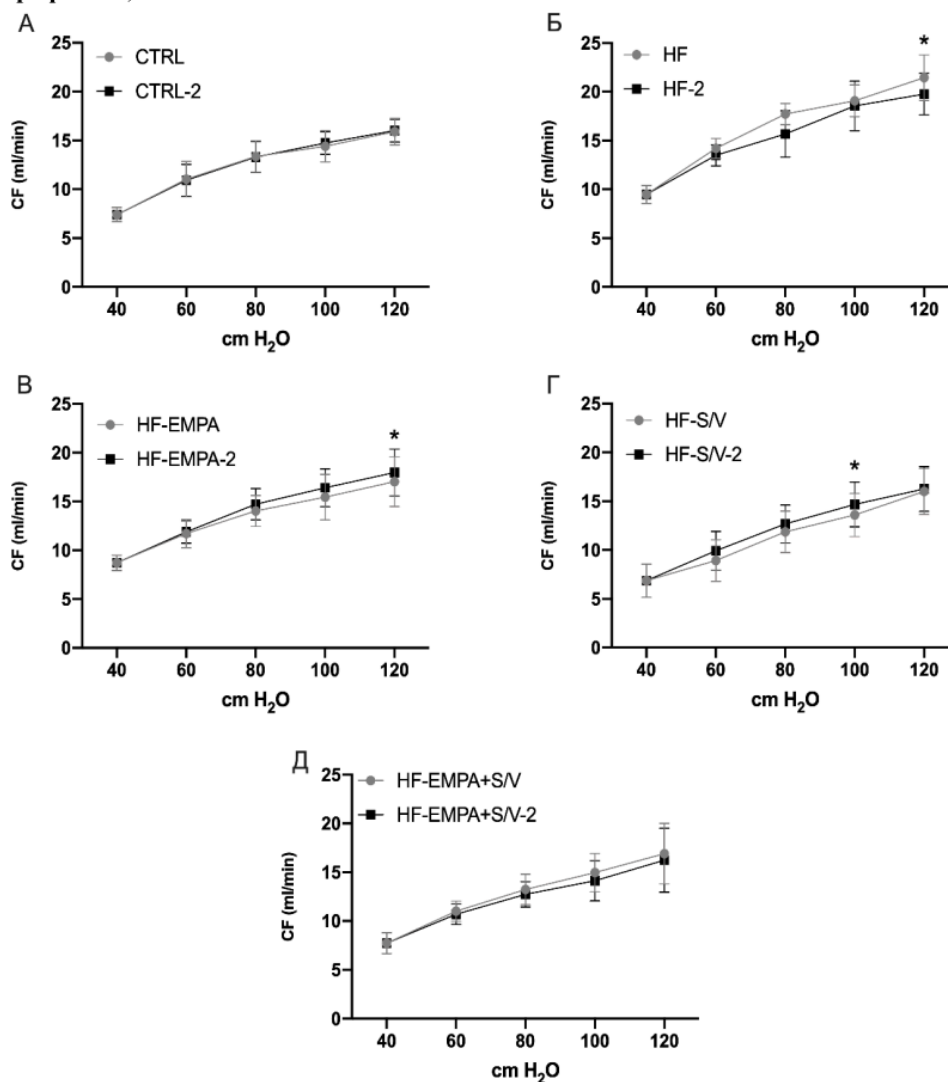


График 9. Утицај примењених терапијских протокола (унутар групе) на вредност коронарног протока (CF) пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) CTRL група; (Б) HF група; (В) HF-EMPA група; (Г) HF-S/V група; (Д) HF-EMPA+S/V група. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

4.6. ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ХРОНИЧНЕ КОАДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТАНА НА ТЕЛЕСНУ МАСУ, МАСУ СРЦА И ИНДЕКС ХИПЕРТРОФИЈЕ СРЦА ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ

На почетку, као и током трајања истраживања, мерен је BW свих пацова у више наврата, и то циљу прилагођавања дозе примењиваних агенаса, као и ради праћења ефеката примењене терапије. На **Графику 10** приказано је кретање вредности BW пацова у више тренутака током експерименталног протокола. На почетку експерименталног протокола (1. дан), као и последњег дана примене ISO (7. дан), нису уочене значајне разлике у вредности BW међу испитиваним групама (CTRL и eHF група) (**График 10**). Уочено је да су четири недеље од последње ISO дозе пацови из eHF групе имали значајно веће вредности BW у односу на CTRL групу. Две недеље од почетка примене терапијских протокола (35. дан), као и на крају експерименталног протокола (63. дан) овај тренд је настављен, те је уочено да су пацови из HF групе имали значајно повећање вредности BW у односу на CTRL групу. Две недеље од почетка примене терапијских протокола (35. дан), сви пацови из група које су подвргнуте терапијском протоколу (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) имали су значајно вишу вредност BW у односу на CTRL групу. Такође, две недеље од почетка примене терапије (35. дан) у групи HF-S/V уочена је мања вредност BW у односу на HF, HF-EMPA и HF-EMPA+S/V групу. На крају експерименталног протокола (63. дан) уочен је значајан пораст BW у HF-EMPA и HF-EMPA+S/V групи у односу на CTRL групу, као и значајно снижење BW у свим групама код којих се примењивао терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) у односу на HF групу. Поред тога, HF-S/V група је имала значајно нижи BW на крају експерименталног протокола (63. дан) у односу на HF-EMPA-S/V групу.

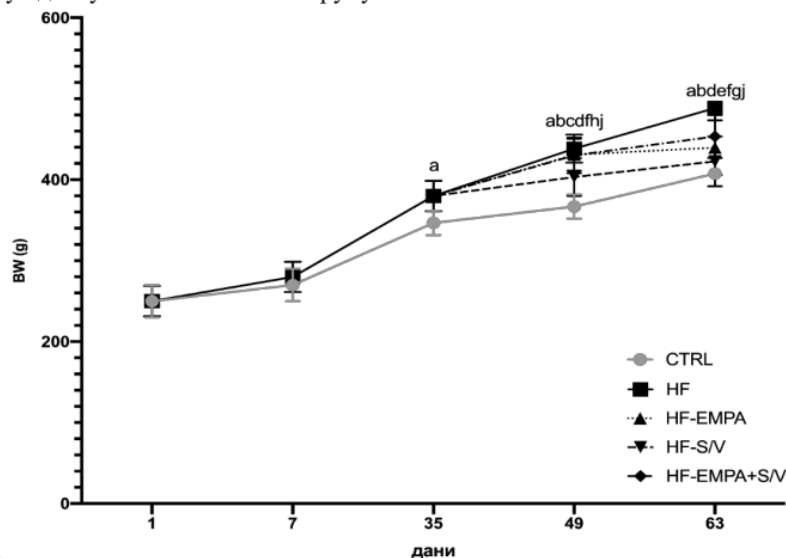


График 10. Кретање вредности BW пацова током експерименталног протокола. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. Статистичка значајност је изражена као $p < 0.05$. ^aCTRL vs. HF; ^bCTRL vs. HF-EMPA; ^cCTRL vs. HF-S/V; ^dCTRL vs. HF-EMPA+S/V; ^eHF vs. HF-EMPA; ^fHF vs. HF-S/V; ^gHF vs. HF-EMPA+S/V; ^hHF-EMPA vs. HF-S/V; ⁱHF-EMPA vs. HF-EMPA+S/V; ^jHF-S/V vs. HF-EMPA+S/V.

HW/BW индекс је коришћен као показатељ хипертрофије миокарда. У HF групи уочена је значајно већа вредност HW, као и HW/BW индекса у односу на CTRL групу (Табела 4). У односу на HF групу, сви пацови из група које су подвргнуте терапијском протоколу (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) имали су значајно мање вредности HW и HW/BW индекса, које су биле приближне вредностима забележеним у CTRL групи. У односу на CTRL групу, највећи пораст вредност HW забележен је у HF-EMPA+S/V групи, док је вредност овог параметра била значајно нижа у HF-S/V групи у односу на HF-EMPA+S/V групу. Иако нису уочене статистички значајне разлике у вредности HW/BW индекса између група које су имале терапијски протокол, важно је напоменути да је у HF-EMPA+S/V групи постојала тенденција највећег снижења овог параметра. Ови резултати указују на ефикасност свих терапијских протокола у смањењу индикатора хипертрофије миокарда, са потенцијално највећом ефикасношћу оствареном током примене двојне терапије емпаглифлозином и сакубитрил/валсартаном (HF-EMPA+S/V група).

Параметар	CTRL	HF	HF-EMPA	HF-S/V	HF-EMPA+S/V
HW (g)	1.42±0.05	1.96±0.14 ^a	1.52±0.09 ^b	1.46±0.14 ^b	1.55±0.02 ^{a,b,d}
HW/BW индекс	0.35±0.01	0.40±0.03 ^a	0.35±0.03 ^b	0.35±0.02 ^b	0.34±0.02 ^b

Вредности су приказане као средња вредност ± SD. Статистичка значајност је изражена као p<0,05. ^a vs. CTRL; ^b vs. HF; ^d vs. HF-S/V.

Табела 4. Утицај примењених терапијских протокола на масу срца и индекс хипертрофије миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом.

4.7 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ХРОНИЧНЕ КОАДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТАНА НА ПАРАМЕТРЕ СИСТЕМСКОГ РЕДОКС СТАТУСА ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ

4.7.1 Испитивање ефекта хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на системске прооксидационе параметре пацова са срчаном инсуфицијенцијом

По завршетку експерименталног протокола, у узорцима плазме пацова из HF групе детектоване су значајно више концентрације TBARS, O₂⁻ и H₂O₂ у односу на CTRL групу (График 11А, В, Г). Такође, значајно више концентрације TBARS биле су присутне у плазми пацова HF-EMPA и HF-S/V групе у односу на CTRL групу. Са друге стране пацови из HF-EMPA-S/V групе су имали значајно нижу концентрацију TBARS у односу на HF групу, које су биле сличне вредностима уоченим у CTRL групи (График 11А). У групама код којих се примењивао терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V група) уочене су значајно ниже концентрације O₂⁻ и H₂O₂ у односу на HF групу. Штавише, вредности O₂⁻ у HF-S/V и HF-EMPA+S/V групи су биле приближне вредностима уоченим у CTRL групи, што није случај са HF-EMPA групом (График 11В). За разлику од HF-EMPA и HF-S/V групе, HF-EMPA-S/V група је имала концентрацију H₂O₂ које се није значајно разликовале од вредности у CTRL групи. (График 11Г). У овој студији нису уочене значајне разлике у концентрацији NO₂⁻ међу испитиваним групама (График 11Б).

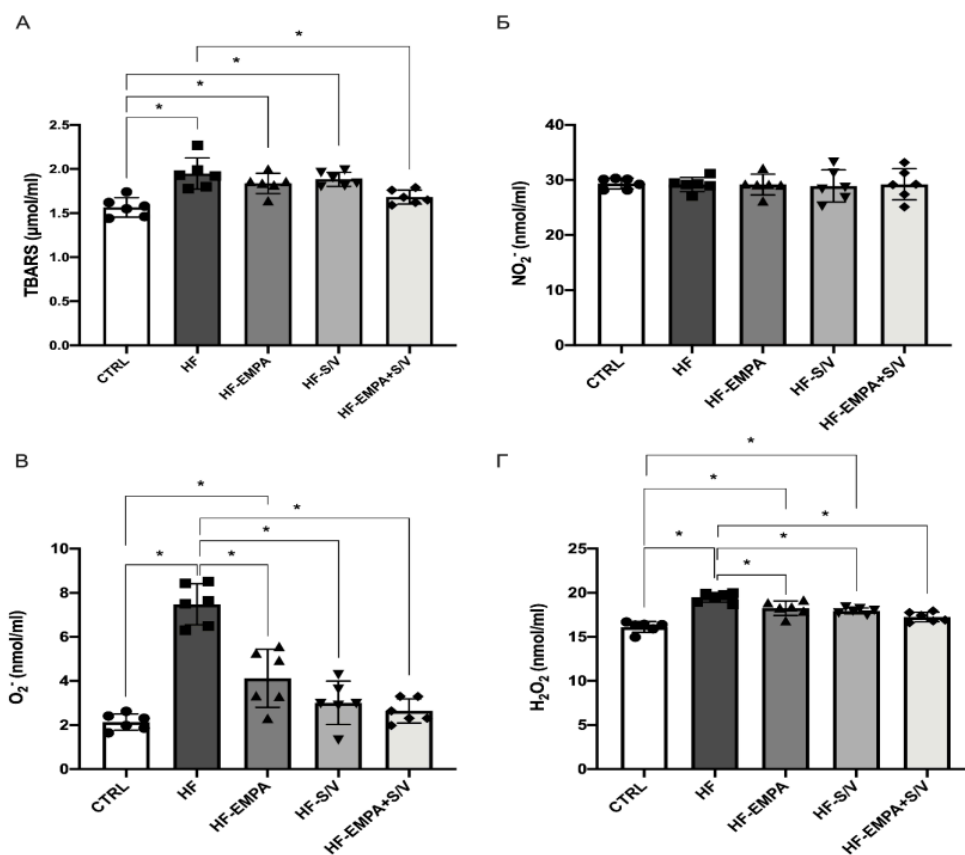


График 11. Утицај примењених терапијских протокола на концентрацију системских прооксидационих параметра у плазми пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS); (Б) супероксид анјон радикал (O_2^-); (В) водоник пероксид (H_2O_2); (Г) азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-). Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

4.7.2 Испитивање ефеката хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на системске антиоксидационе параметре пацова са срчаном инсуфицијенцијом

По завршетку експерименталног протокола, у узорцима серума пацова из HF групе детектована је значајно нижа активност антиоксидационих ензима CAT, SOD, као и нижи ниво GSH у односу на CTRL групу (График 12А, Б, В). У групама код којих се примењивао терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V група) није уочена значајна разлика у активности CAT у односу на HF групу, мада је значајно нижа активност овог ензима регистрована у поменутих групама у поређењу са CTRL групом (График 12А). Значајно виша активност SOD уочена је у HF-EMPA+S/V групи у односу на CTRL и HF групу, као и на групе третиране монотерапијом (HF-EMPA и HF-S/V група) (График 12В). Посматрајући групе код којих се примењивао терапијски протокол, ниво GSH је био значајно виши једино у HF-EMPA+S/V групи у односу на HF групу (График 12Г).

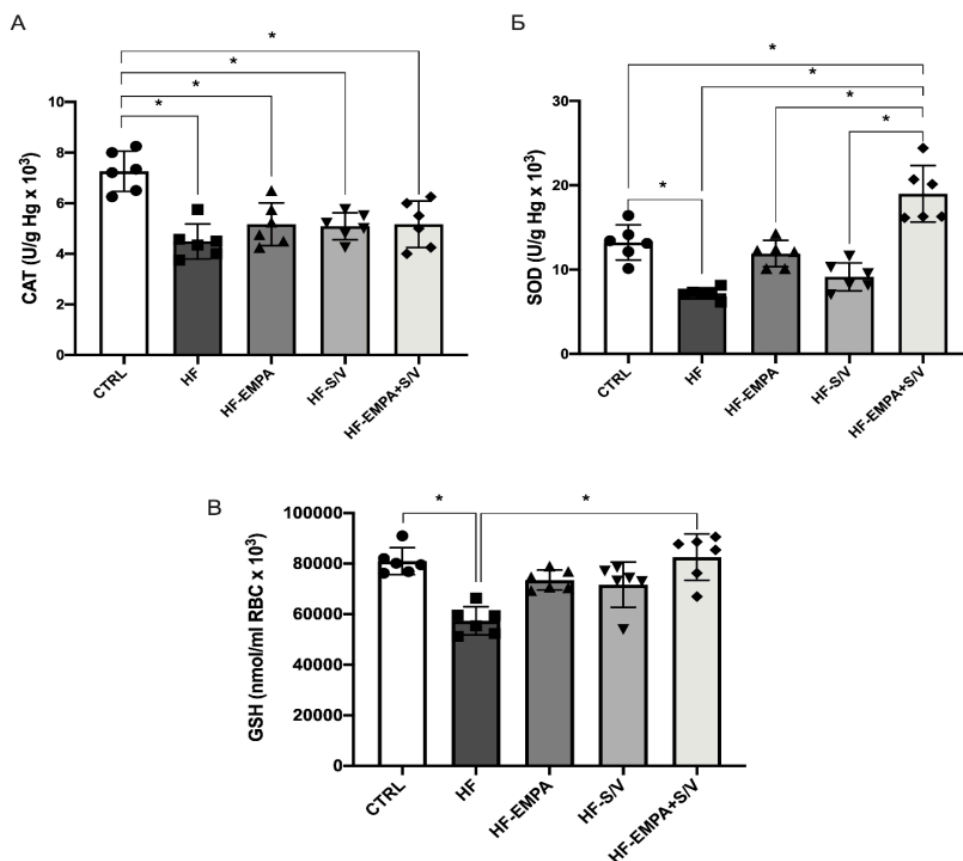


График 12. Утицај примењених терапијских протокола на системске антиоксидационе параметре пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) каталаза (CAT); (Б) супероксид дизмутаза (SOD); (В) редуковани глутатион (GSH). Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

4.8. ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ХРОНИЧНЕ КОАДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТАНА НА ПРООКСИДАЦИОНЕ ПАРАМЕТРЕ ИЗ КОРОНАРНОГ ВЕНСКОГ ЕФЛУЕНТА ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ

По завршетку експерименталног протокола, у узорцима CVE пацова из HF групе детектована је значајно виша концентрација TBARS при свим вредностима притиска (40, 60, 80, 100, и 120 cmH₂O) у односу на CTRL групу (**График 13А**). Значајно снижење концентрације TBARS у односу на HF групу, уочено је при свим вредностима притиска у HF-EMPA групи, при вредностима притиска од 60-120 cmH₂O у HF-S/V групи, као и при вредностима притиска од 80-120 cmH₂O у HF-EMPA+S/V групи. Концентрација NO₂⁻ је била значајно виша у HF групи при вредностима притиска од 60-120 cmH₂O у односу на CTRL групу (**График 13Б**). Сви терапијски протоколи (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V група) су значајно снижили концентрацију NO₂⁻ при вредностима притиска од 80-120 cmH₂O, док је у HF-S/V групи уочено снижење концентрације NO₂⁻ и при вредности притиска од 60 cmH₂O у поређењу са HF групом. Концентрација O₂⁻ је била значајно повишена у HF групи, и то при вредностима

притиска од 60-120 cmH₂O у односу на CTRL групу (График 13В). Такође, значајно више вредности O₂⁻ забележене су у HF-S/V групи при вредности притиска од 120 cmH₂O у односу на CTRL групу. При вредностима притиска од 80-120 cmH₂O, сви терапијски протоколи (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V група) су ефикасно снизили концентрацију O₂⁻, док су HF-S/V и HF-EMPA+S/V имале значајно нижу концентрацију овог параметра и при вредности притиска од 60 cmH₂O у односу на HF групу. Концентрација H₂O₂ је била значајно виша у HF групи при вредностима притиска од 60-120 cmH₂O у односу на CTRL групу (График 13Г). Такође, концентрација H₂O₂ је била значајно виша у HF-S/V групи при вредностима притиска од 100 и 120 cmH₂O у односу на CTRL групу. У HF-EMPA+S/V групи је забележена значајно нижа концентрација H₂O₂ при вредностима притиска од 80-120 cmH₂O у односу на HF групу. Са друге стране у HF-EMPA групи, снижење концентрације овог параметра забележено је само при вредности притиска од 120 cmH₂O, а у HF-S/V групи при вредности притиска од 80 cmH₂O у односу на HF групу. Поред тога, концентрација H₂O₂ је била значајно нижа у HF-EMPA+S/V групи при вредностима притиска од 100 и 120 cmH₂O у односу на HF-S/V групу.

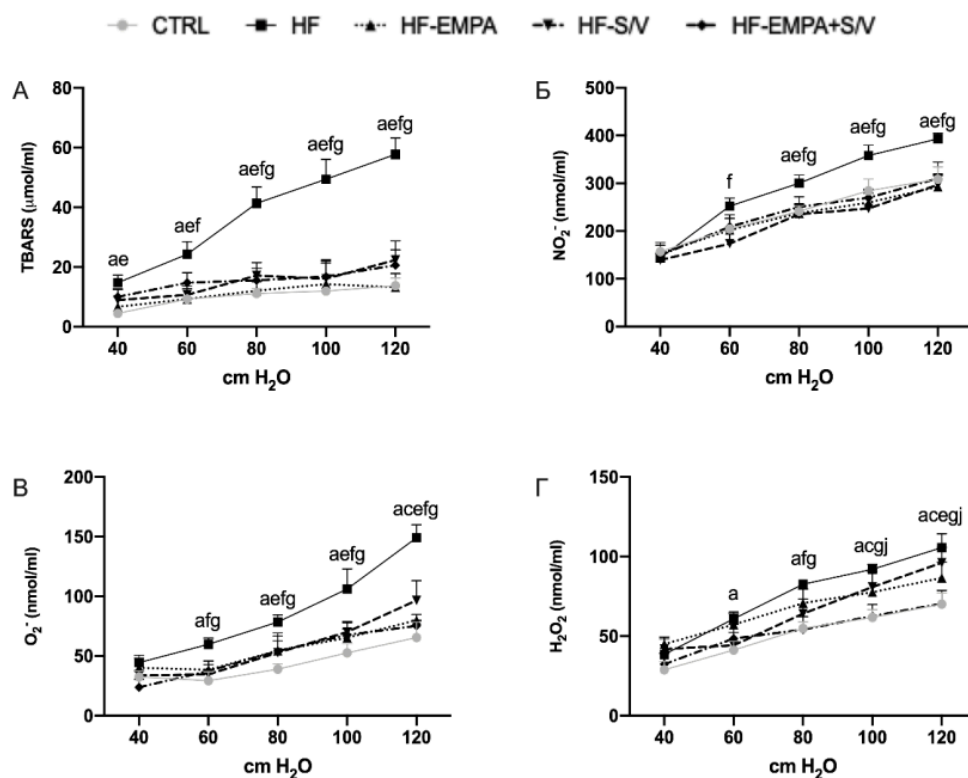


График 13. Утицај примењених терапијских протокола на прооксидационе параметре из коронарног венског ефлуента пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS); (Б) нитрити (NO₂⁻); (В) супероксид анјон радикал (O₂⁻); (Г) водоник пероксид (H₂O₂). Вредности су приказане као средња вредност ± SD. Статистичка значајност је изражена као p<0,05. ^aCTRL vs. HF; ^bCTRL vs. HF-EMPA; ^cCTRL vs. HF-S/V; ^dCTRL vs. HF-EMPA+S/V; ^eHF vs. HF-EMPA; ^fHF vs. HF-S/V; ^gHF vs. HF-EMPA+S/V; ^hHF-EMPA vs. HF-S/V; ⁱHF-EMPA vs. HF-EMPA+S/V; ^jHF-S/V vs. HF-EMPA+S/V.

Испитивајући утицај примењених терапијских протокола на концентрацију TBARS, уочено је да је у HF групи при притиску од 100 и 120 cmH₂O уочена значајно нижа концентрација TBARS у CVE, када је срце поново подвргнуто протоколу ауторегулације (**График 14Б**). Такође, при поновном протоколу ауторегулације дошло је до пораста концентрације TBARS у HF-S/V групи (**График 14Г**), али до пада концентрације TBARS у HF-EMPA+S/V групи при притиску од 60 cmH₂O (**График 14Д**). У оквиру других испитиваних група, није било статистички значајне разлике у концентрацији TBARS између два узастопна протокола ауторегулације којем је подвргнуто изоловано срце пацова.

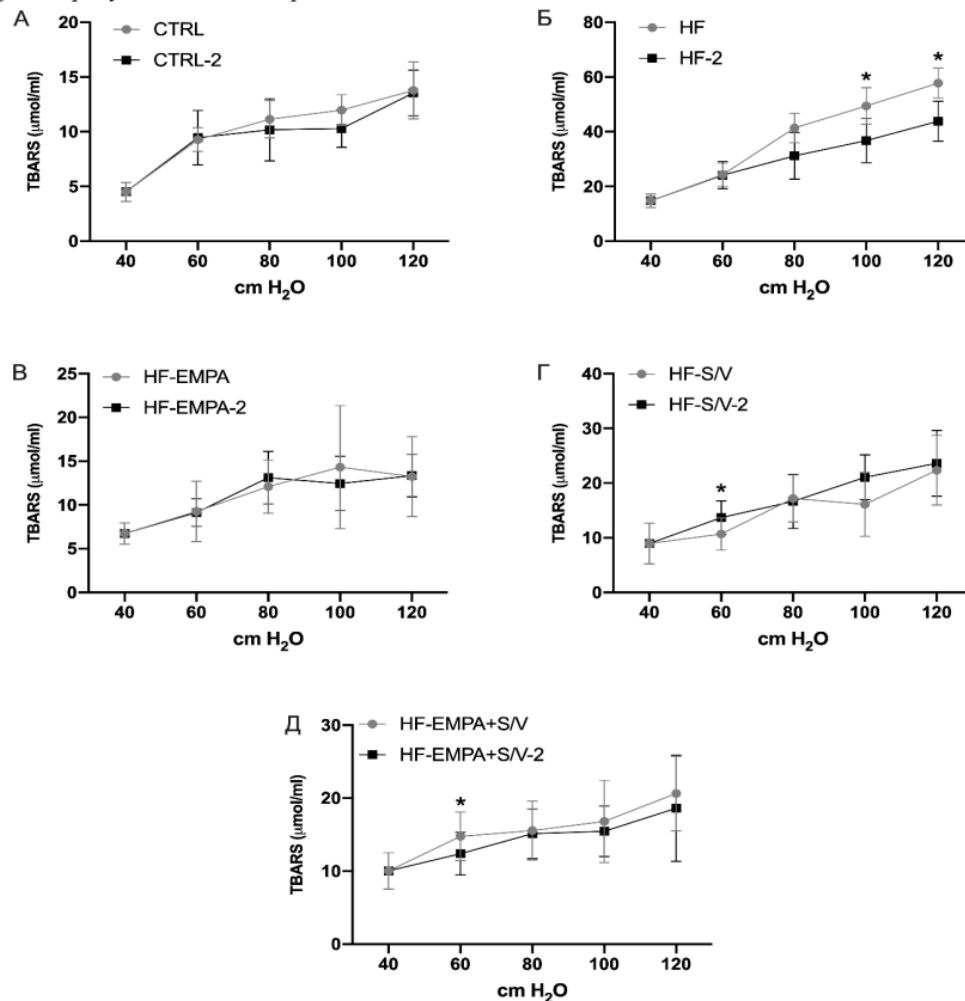


График 14. Утицај примењених терапијских протокола (унутар групе) на индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS) из коронарног венског ефлуента пацова са срчаном инсуфицијенцијом током два узастопна протокола ауторегулације. (А) CTRL група; (Б) HF група; (В) HF-EMPA група; (Г) HF-S/V група; (Д) HF-EMPA+S/V група. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

Уочено је да је у HF-EMPA групи при притиску од 100 и 120 cmH₂O била значајно виша концентрација NO₂⁻ у CVE, када је срце поново подвргнуто протоколу ауторегулације (**График 15Б**). Такође, при поновном протоколу ауторегулације дошло је до пораста концентрације NO₂⁻ у HF-S/V групи (**График 15Г**), али до пада концентрације NO₂⁻ у HF-EMPA+S/V групи при притиску од 100 cmH₂O (**График 15Д**). У оквиру других испитиваних група, није било статистички значајне разлике у концентрацији NO₂⁻ између два узастопна протокола ауторегулације којем јеподвргнуто изоловано срце пацова.

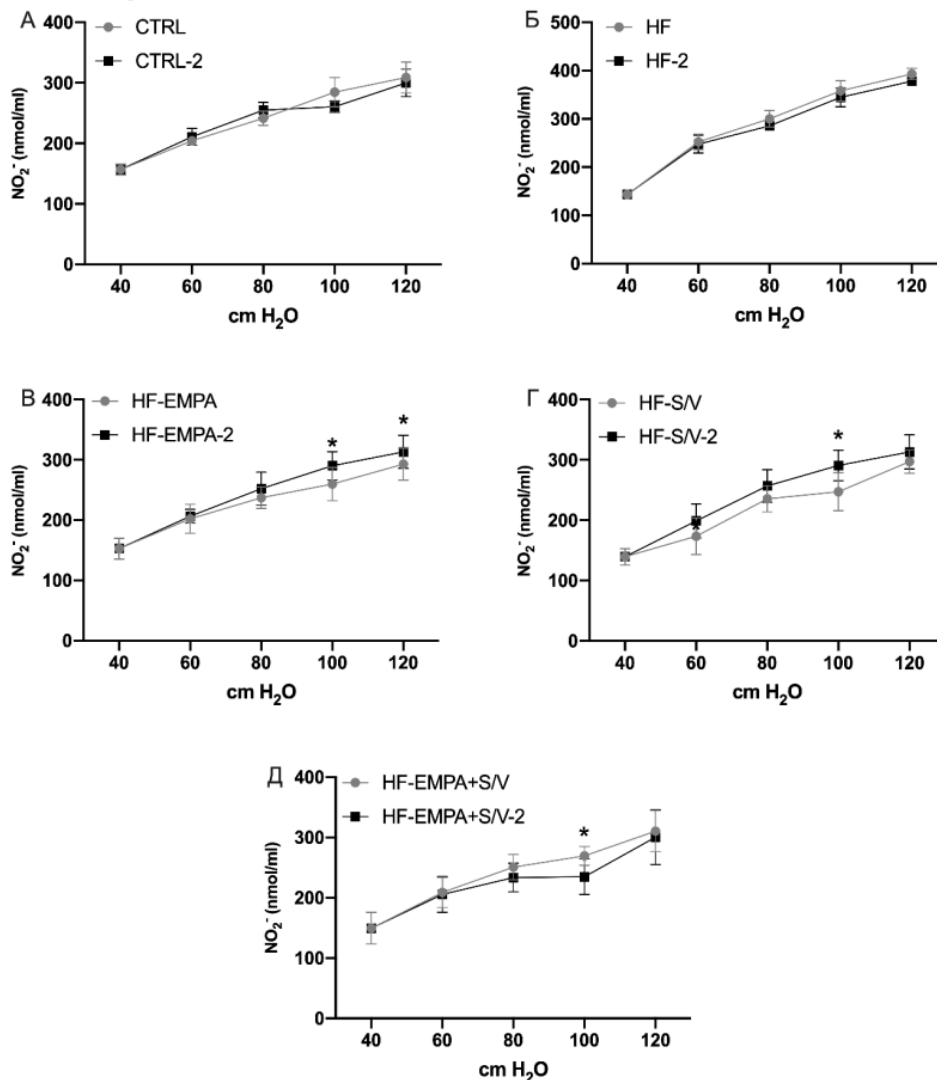


График 15. Утицај примењених терапијских протокола (унутар групе) на концентрацију нитрита (NO₂⁻) у коронарном венском ефлуенту пацова са срчаном инсуфицијенцијом током два узастопна протокола ауторегулације. (А) CTRL група; (Б) HF група; (В) HF-EMPA група; (Г) HF-S/V група; (Д) HF-EMPA+S/V група. Вредности су приказане као средња вредност ± SD. * p<0,05.

Резултати показују да је концентрацију O_2^- у CTRL групи при притиску од 60 и 80 cmH₂O била значајно виша када је срце поново подвргнуто протоколу ауторегулације (График 16А). Такође, при поновном протоколу ауторегулације дошло је до пораста концентрације O_2^- у HF-EMPA групи при притиску од 60 cmH₂O (График 16В), као и у HF-S/V групи при притиску од 60 и 80 cmH₂O (График 16Г). У оквиру других испитиваних група, није било статистички значајне разлике у концентрацији O_2^- између два узастопна протокола ауторегулације којем је подвргнуто изоловано срце пацова.

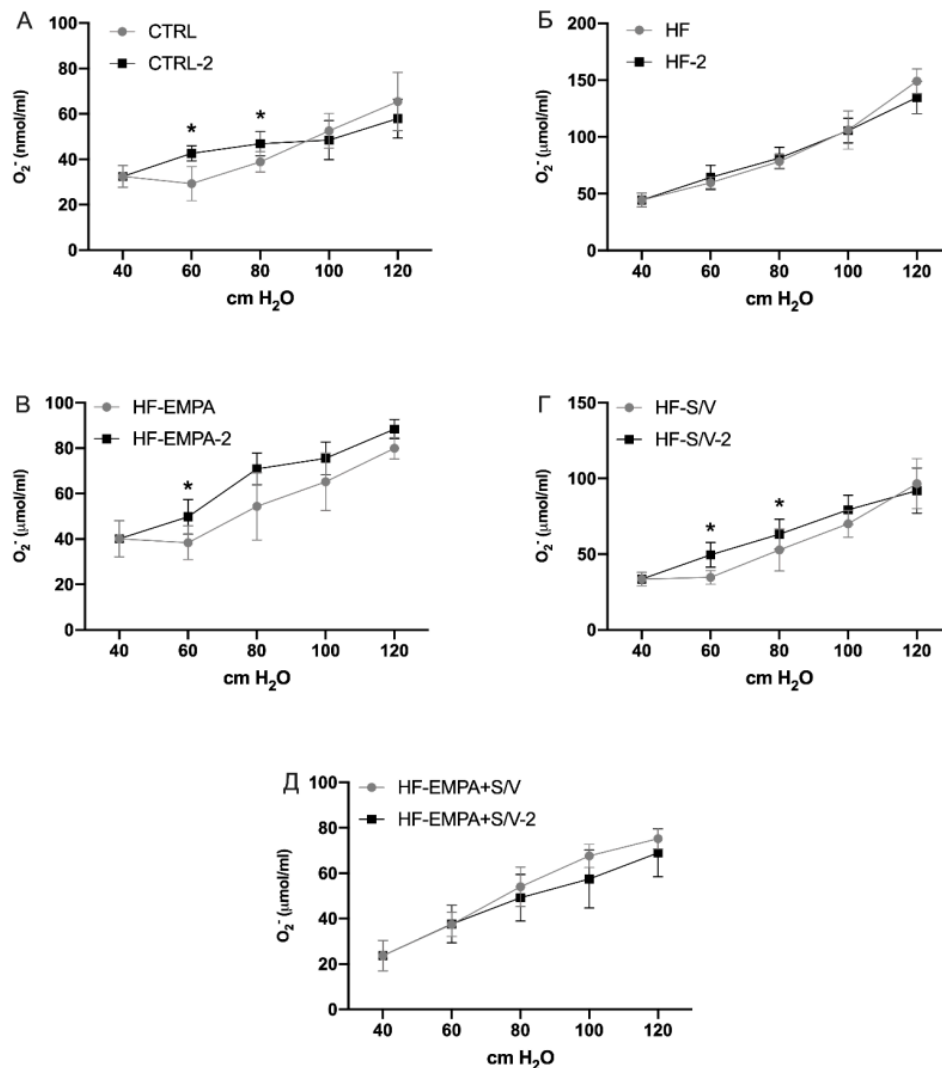


График 16. Утицај примењених терапијских протокола (унутар групе) на концентрацију супероксид анјон радикала (O_2^-) у коронарном венском ефлуенту пацова са срчаном инсуфицијенцијом током два узастопна протокола ауторегулације. (А) CTRL група; (Б) HF група; (В) HF-EMPA група; (Г) HF-S/V група; (Д) HF-EMPA+S/V група. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

Концентрација H_2O_2 у CTRL групи при притиску од 80 cmH_2O била је значајно нижа када је срце поново подвргнуто протоколу ауторегулације (График 17А). Такође, при поновном протоколу ауторегулације дошло је до пораста концентрације H_2O_2 у HF-S/V групи при притиску од 60 cmH_2O (График 17Г), као и у HF-EMPA+S/V групи при притиску од 80 и 100 cmH_2O (График 17Д). У оквиру других испитиваних група, није било статистички значајне разлике у концентрацији H_2O_2 између два узастопна протокола ауторегулације којем је подвргнуто изоловано срце пацова.

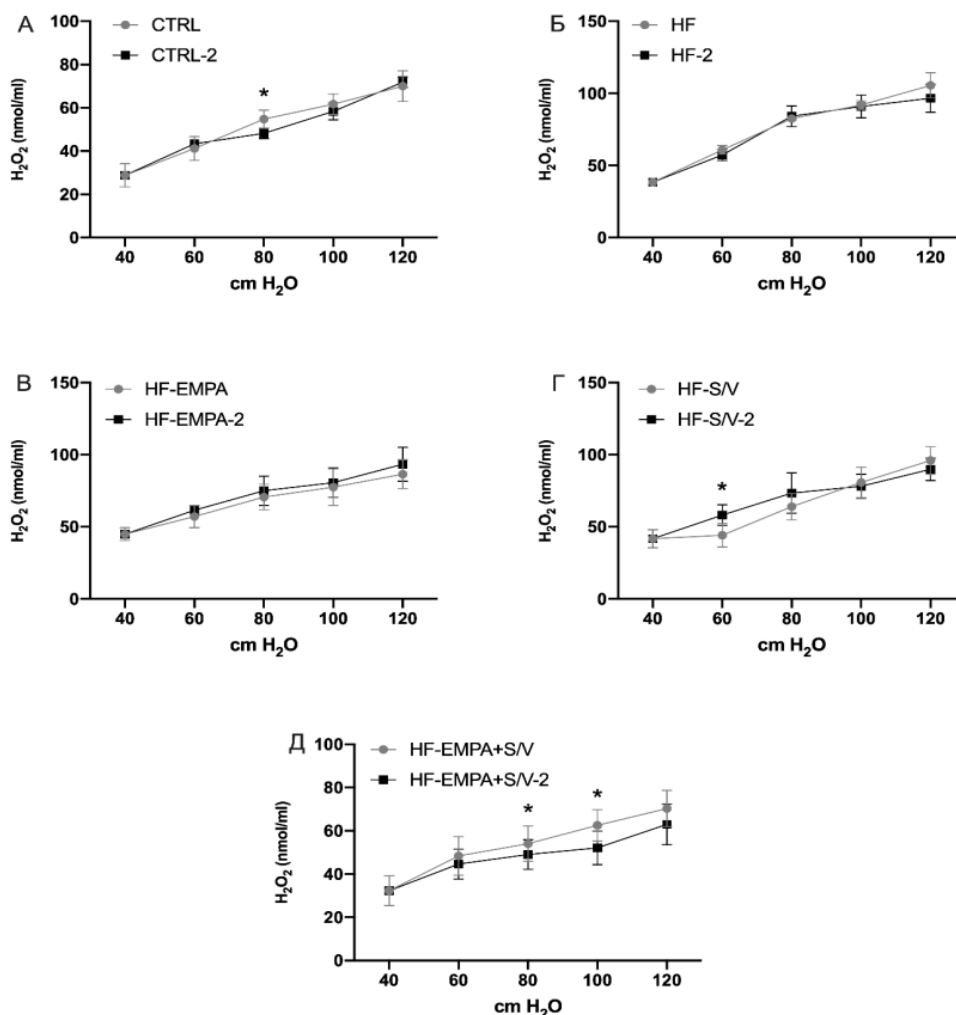


График 17. Утицај примењених терапијских протокола (унутар групе) на концентрацију водоник пероксида (H_2O_2) у коронарном венском ефлуенту пацова са срчаном инсуфицијенцијом током два узастопна протокола ауторегулације. (А) CTRL група; (Б) HF група; (В) HF-EMPA група; (Г) HF-S/V група; (Д) HF-EMPA+S/V група. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

4.9 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ХРОНИЧНЕ КОАДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТАНА НА ПАРАМЕТРЕ РЕДОКС СТАТУСА У ХОМОГЕНАТУ ТКИВА МИОКАРДА ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕЦИЈОМ

По завршетку експерименталног протокола, у узорцима хомогената ткива миокарда пацова из HF групе детектоване су значајно више вредности TBARS у односу на CTRL групу (График 18А). Са друге стране, значајно ниже вредности TBARS уочене су у једино у HF-EMPA+S/V групи у односу на HF групу. У узорцима хомогената ткива миокарда пацова из HF групе детектована је значајно нижа активност антиоксидационих ензима CAT, SOD, као и нижи ниво GSH у односу на CTRL групу (График 18Б, В, Г). У групама код којих се примењивао терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V група), уочена је значајно виша активност антиоксидационих ензима CAT и SOD у односу на HF групу (График 18Б и В). У групама HF-S/V и HF-EMPA+S/V регистрован је значајно виши ниво GSH у односу на HF групу, док је најизраженије ефекат на ниво GSH у хомогенату ткива миокарда примећен у HF-EMPA+S/V групи, која је имала значајно више вредности овог параметра у односу на HF-EMPA и HF-S/V групу (График 18Г). Са друге стране, значајно нижи ниво GSH уочен је у HF-EMPA групи у односу на CTRL групу, који се при том није значајно разликовао од вредности детектованих у HF групи.

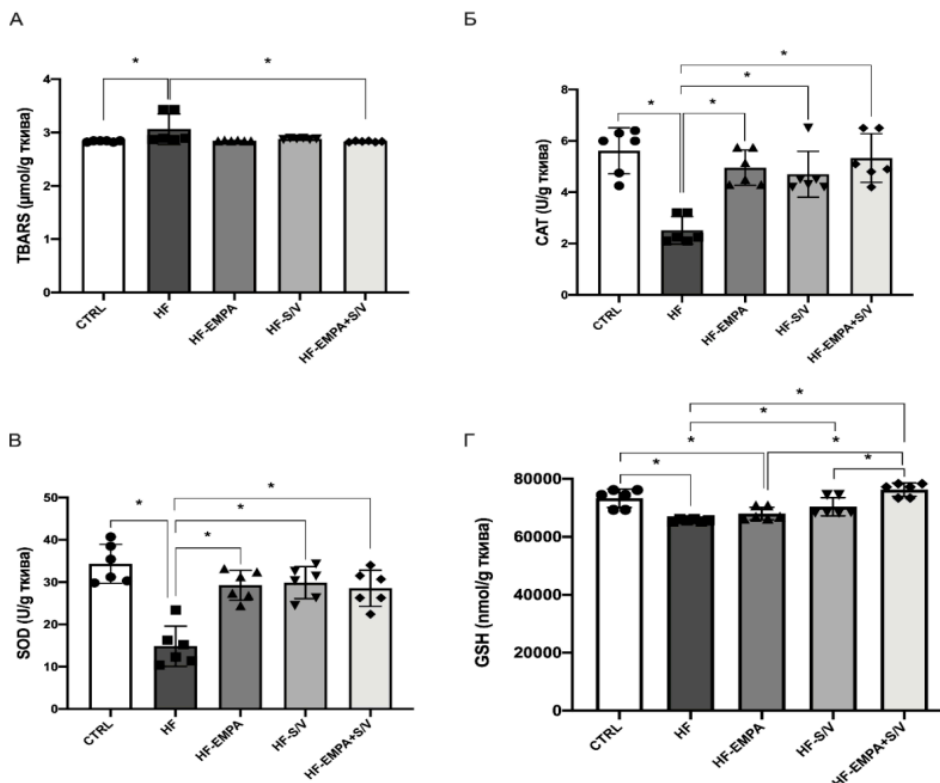


График 18. Утицај примењених терапијских протокола на параметре редокс статуса у хомогенату ткива миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS); (Б) каталаза (CAT); (В) супероксид дизмутаза (SOD); (Г) редуковани глутатион (GSH). Вредности су приказане као средња вредност ± SD. * $p < 0,05$.

4.10 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ХРОНИЧНЕ КОАДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТАНА НА КОНЦЕНТРАЦИЈУ КАРДИОСПЕЦИФИЧНИХ МАРКЕРА И НАТРИУРЕТСКИХ ПЕПТИДА У СЕРУМУ ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕЦИЈОМ

По завршетку експерименталног протокола, из узоракa серума свих животиња одређиване су концентрације кардиоспецифичних маркера (сTnI, СК-МВ и NT-proBNP), као и натриуретских пептида (ANP и BNP). У односу на CTRL групу, значајно више вредности кардиоспецифичних маркера (сTnI, СК-МВ и NT-proBNP) забележене у HF групи (График 19А, Б, В). Сви примењивани терапијски протоколи (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) су имали значајно више вредности сTnI и NT-proBNP у односу на CTRL групу, које се нису значајно разликовале од вредности забележених у HF групи (График 19А и В). Са друге стране, вредност СК-МВ је значајно снижена једино у HF-S/V групи у односу на HF групу (График 19Б).

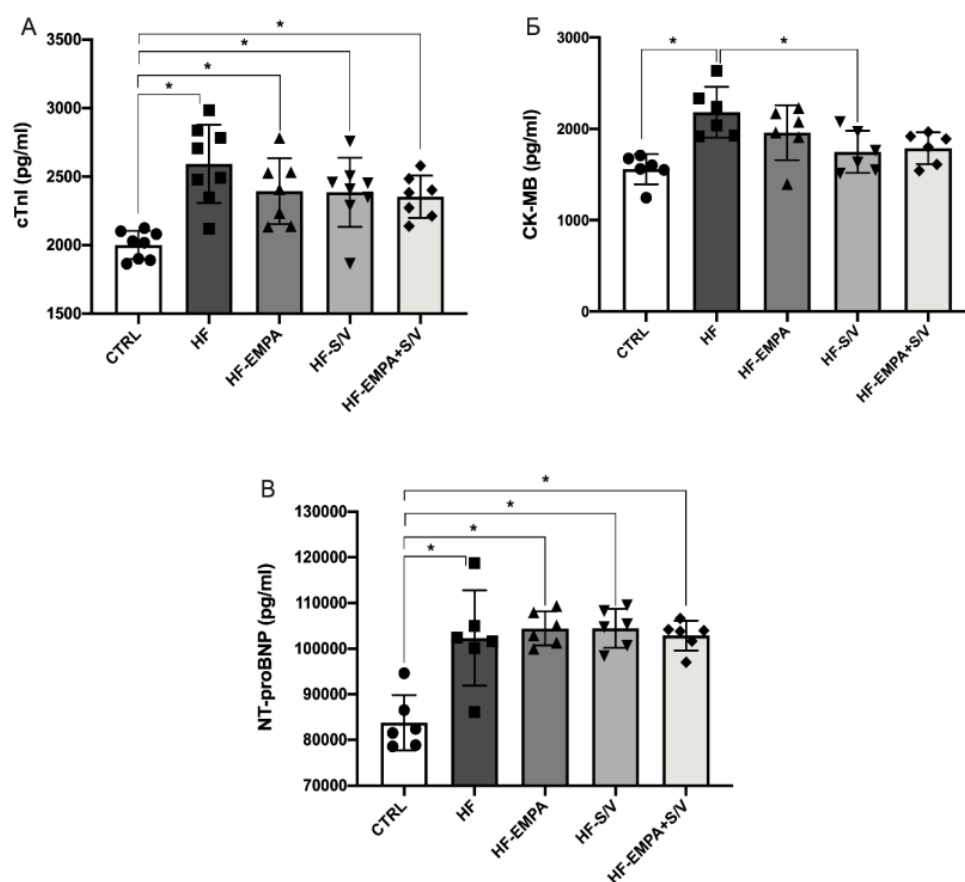


График 19. Утицај примењених терапијских протокола на концентрацију кардиоспецифичних маркера у серуму пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) срчани тропонин I (сTnI); (Б) креатин киназа изоформа МВ (СК-МВ); (В) Н-терминални про В-тип натриуретски пептид (NT-proBNP). Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

Вредност ANP је била значајно **виша** у HF групи, као и у свим групама у којима се примењивао терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) у односу на CTRL групу (**График 20А**). Поред тога, сви терапијски протоколи су значајно снизили вредност ANP у односу на HF групу. У HF-S/V групи, уочене су значајно више вредности ANP у односу на HF-EMPA и HF-EMPA+S/V групу, док је вредност ANP била значајно виша у HF-EMPA+S/V групи у односу на HF-EMPA групу. Иако није забележена значајна разлика у вредности BNP између CTRL и HF групе, сви терапијски протоколи који су се примењивали (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) довели су до значајног снижења овог параметра у односу на HF групу (**График 20Б**).

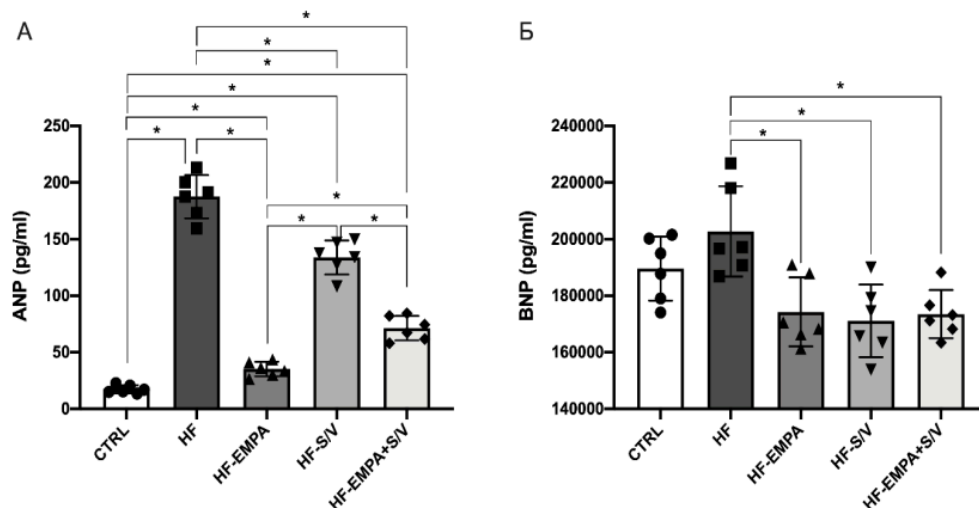


График 20. Утицај примењених терапијских протокола на концентрацију натриуретских пептида у серуму пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) атријални натриуретски пептид (ANP); (Б) натриуретски пептид Б-типа (BNP). Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p<0,05$.

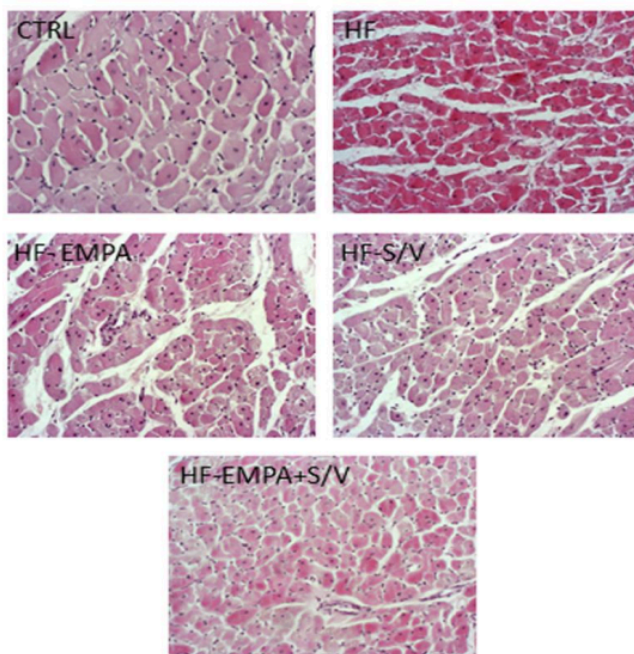
4.11 ПАТОХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА МИОКАРДА

4.11.1 Испитивање ефеката хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на структуру миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом - техника HE бојења

HE бојење је коришћено за процену морфологије кардиомиоцита (**Слика 39**). CTRL група је имала регуларну морфолошку структуру без едема кардиомиоцита, инфилтрације инфламаторних ћелија или интерстицијалног едема. HF група је показала некрозу, дилатирани интерстицијум, повећану целуларност са моноклеарним инфламацијским ћелијама и ћелијама типа фибробласт-фиброцит. Морфологија срца у третираним групама (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V) је била побољшана у поређењу са HF групом, уз умерене промене као што су дискретан интерстицијални едем, инфламаторни инфилтрат и хипертрофија појединачних кардиомиоцита.

У поређењу са CTRL групом, вредност CSA кардиомиоцита у HF групи била је значајно већа (за 70%), као и вредност LSD (за 62%) (**График 21А и Б**). У групама у којима се примењивао терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) уочено је значајно смањење вредности CSA кардиомиоцита (за 20%, 46% и 40%, редом)

и LSD (за 20%, 42% и 35%, редом) у односу на HF групу. Иако није било значајне разлике између HF-S/V и HF-EMPA+S/V група у погледу вредности CSA и LSD кардиомиоцита, обе групе су имале значајно ниже вредности ових параметара у поређењу са HF-EMPA групом. Међутим, све групе у којима се примењивао терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) су имале значајно више вредности CSA и LSD у односу на CTRL групу.



Слика 39. Приказ репрезентативних микрографија пресека ткива миокарда - HE бојење.

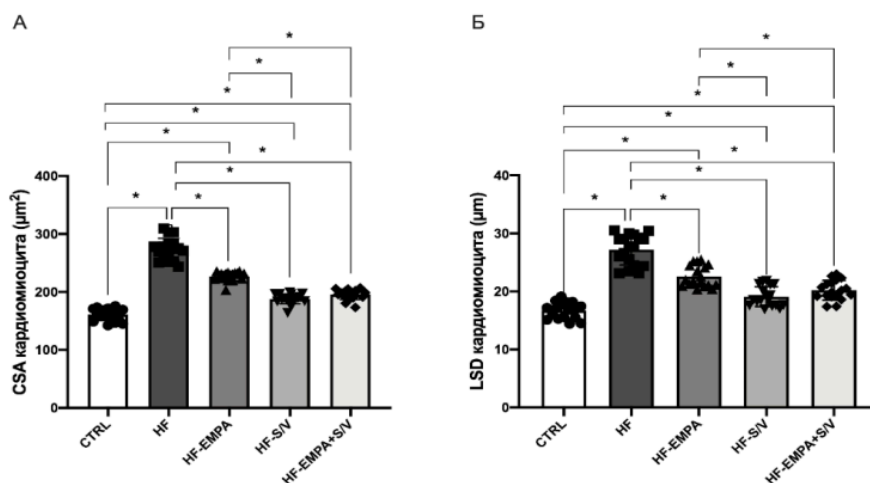
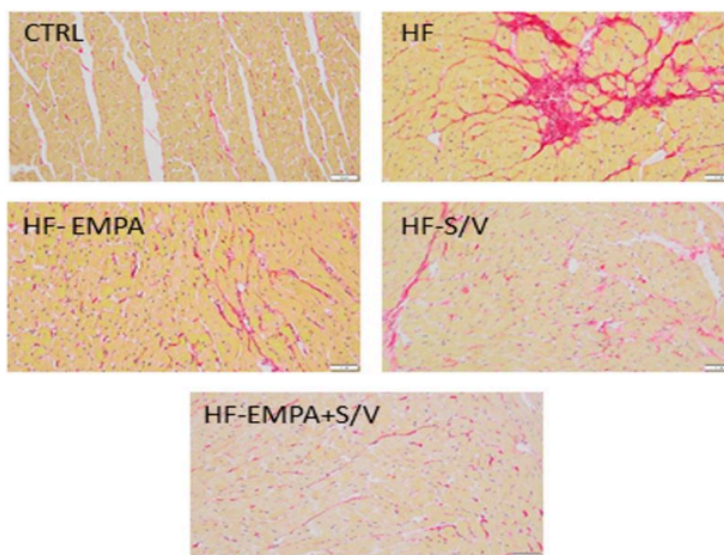


График 21. Утицај примењених терапијских протокола на површину попречног пресека и дијаметар уздужног пресека кардиомиоцита пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) површина попречног пресека (CSA) кардиомиоцита; (Б) дијаметар уздужног пресека (LSD) кардиомиоцита. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

4.11.2 Испитивање ефеката хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на фиброзу миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом - техника PSR бојења

Код PSR бојења, колагена влакна се боје црвеном бојом, што је у контрасту са жуто пребојеним миокардним ткивом (Слика 40). У нашем истраживању, HF група је имала скоро петоструко повећање садржаја колагена у срцу (463%) у поређењу са CTRL групом (График 22). Поред тога, групе у којима се примењивао терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) су показале значајно већи садржај колагена у поређењу са CTRL групом (за 234%, 182% и 178%, редом), али је овај проценат био смањен у односу на HF групу. HF-EMPA+S/V група је имала најизраженије смањење садржаја колагена (за 68%) у поређењу са HF групом.



Слика 40. Приказ репрезентативних микрографија пресека ткива миокарда - PSR бојење.

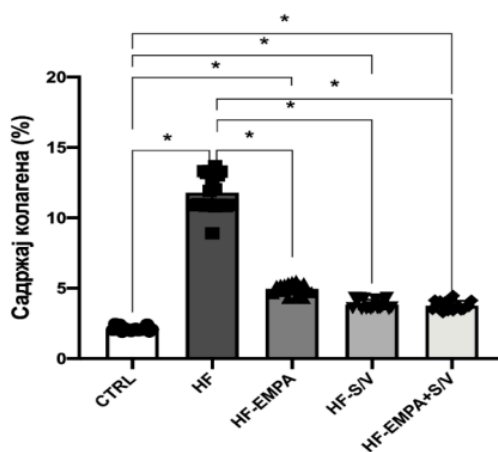


График 22. Утицај примењених терапијских протокола на проценат садржаја колагена у ткиву миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом. Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

4.12 ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ХРОНИЧНЕ КОАДМИНИСТРАЦИЈЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТАНА НА РЕЛАТИВНУ ЕКСПРЕСИЈУ СПЕЦИФИЧНИХ ГЕНА У УЗОРЦИМА ТКИВА МИОКАРДА ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ

Експресија гена за SOD-1, SOD-2 и eNOS била је значајно нижа у HF групи у поређењу са CTRL (График 23А, Б, В). Експресија гена за SOD-1 била је значајно виша у HF-EMPA и HF-EMPA+S/V групама у поређењу са HF групом, док је у HF-S/V групи експресија гена за SOD-1 била нижа у поређењу са CTRL групом (График 23А). Сва три терапијска протокола (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V групе) су имала значајно нижу експресију гена за SOD-2 у поређењу са CTRL групом, док је једино HF-EMPA+S/V група показала значајно повећање експресије гена за SOD-2 у односу на HF групу (График 23Б). Поред тога, сва три терапијска протокола (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V групе) су имала значајно нижу експресију гена за eNOS у поређењу са CTRL групом, али уједно значајно вишу експресију овог гена у односу на HF групу (График 23В). Интересантно је да је у HF-EMPA+S/V групи забележена најнижа експресија гена за eNOS у односу на друге две терапијске групе, што је у односу на вредности експресије гена за овај параметар у HF-S/V групи имало статистичку значајност. Значајно повећање експресије гена за iNOS забележено је у HF групи у односу на CTRL групу, док су сва три терапијска протокола (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V групе) значајно снижила експресију гена за iNOS у поређењу са HF групом (График 23Г).

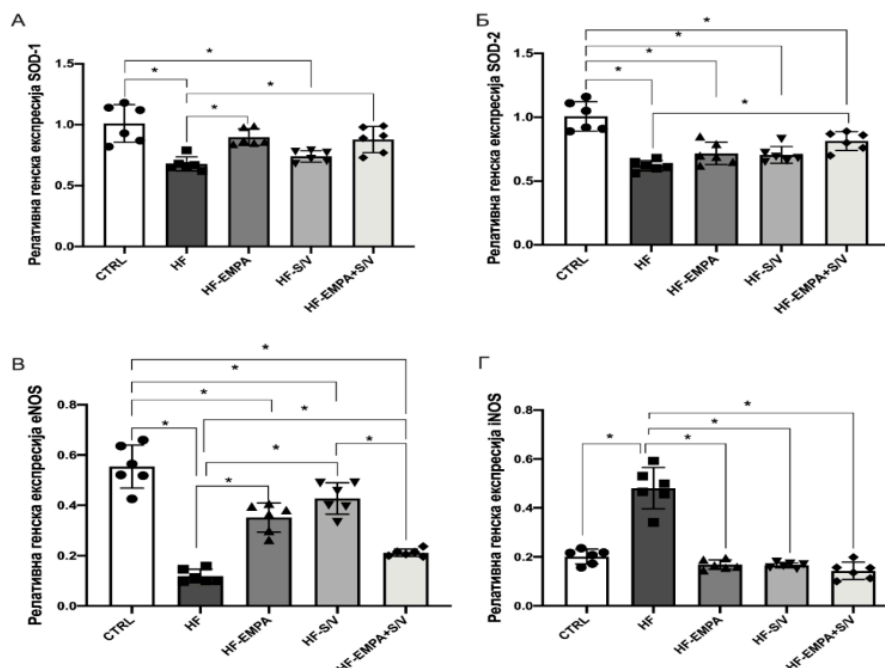


График 23. Утицај примењених терапијских протокола на релативну генску експресију антиоксидационих маркера у ткиву миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) релативна генска експресија супероксид дизмутаза-1 (SOD-1); (Б) релативна генска експресија супероксид дизмутаза-2 (SOD-2); (В) релативна генска експресија ендотелне NO синтазе (eNOS); (Г) релативна генска експресија индуцибилне NO синтазе (iNOS). Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

HF група је имала повећану експресију гена за NF- κ B у поређењу са CTRL групом (**График 24А**). Сва три терапијска протокола (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V групе) су имала значајно вишу експресију гена за NF- κ B у поређењу са CTRL групом, али уједно значајно нижу експресију овог гена у односу на HF групу.

Показано је да су експресије гена за TNF- α , IL-6, IL-1 β , и IL-17 биле значајно повећане у HF групи у односу на CTRL групу (**График 24Б, В, Г, Д, и Ђ**). Иако су сва три терапијска протокола (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V групе) имала значајно вишу експресију гена за TNF- α у односу на CTRL групу, у односу на HF групу, експресија гена за овај параметар је била значајно нижа (**График 24Б**). Такође, уочене су и разлике у оквиру самих група животиња које су примале терапију. Наиме, у HF-EMPA групи примећена је значајно виша експресија за TNF- α , у односу на HF-S/V и HF-EMPA+S/V, док је двојна терапија (HF-EMPA+S/V група) била најефикаснија у снижењу експресије гена за TNF- α , у односу на остале терапијске протоколе. Сва три терапијска протокола (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V групе) су имала значајно нижу експресију гена IL-6 у односу на HF групу (**График 24В**). Такође, сва три терапијска протокола (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V групе) су имала значајно нижу експресију гена за IL-1 β у односу на HF групу, али је у HF-EMPA групи експресија за IL-1 β била значајно виша у односу на CTRL групу, што није био случај са друге две групе са терапијским протоколом (**График 24Г**). Експресија гена за IL-17 била је значајно нижа у све три групе са терапијским протоколом (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V групе) у односу на HF групу (**График 24Д**). Што се тиче експресије гена за IL-10, између HF групе и група са терапијским протоколом није било статистички значајне разлике. Међутим, примећено је да је експресија гена за IL-10 била значајно нижа у HF-EMPA групи у односу на CTRL групу (**График 24Ђ**). Међу испитиваним групама, статистички значајна разлика у експресији гена за IL-13 није уочена (**График 24Е**).

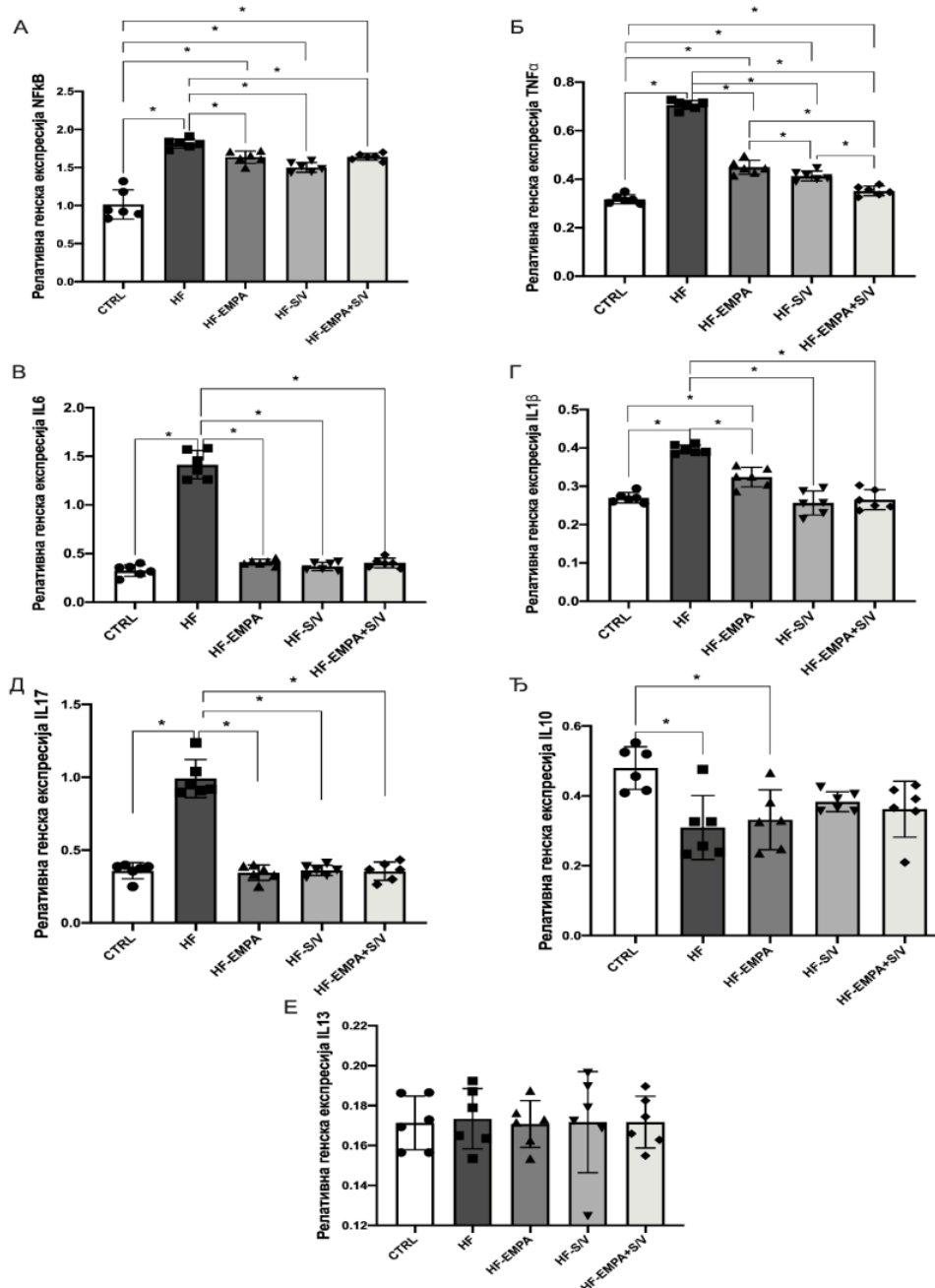


График 24. Утицај примењених терапијских протокола на релативну генску експресију (анти)инфламационих маркера у ткиву миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) релативна генска експресија нуклеарног фактора капа-појачивача лаког ланца активираних В ћелија (NF-κB); (Б) релативна генска експресија фактора некрозе тумора-α (TNF-α); (В) релативна генска експресија ендотелне NO синтазе (eNOS); (Г) релативна генска експресија индуцибилне NO синтазе (iNOS). Вредности су приказане као средња вредност ± SD. * $p < 0,05$. Вредности су приказане као средња вредност ± SD. * $p < 0,05$.

У нашем истраживању испитивана је релативна генска експресија (анти)апоптотских маркера код пацова са срчаном инсуфицијенцијом, као и утицај примењених терапијских протокола. Уочено је да HF група показује нижу експресију Bcl-2 у односу на CTRL групу (График 25А). Поред тога, сви терапијски протоколи (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V групе) су значајно повећали релативну генску експресију Bcl-2 у односу на HF групу. Релативна генска експресија Вах је била значајно повишена у HF групи у односу на CTRL групу, док су сва три терапијска протокола (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V групе) ефикасно снижила релативну генску експресију Вах (График 25Б). Релативне генске експресије CASP-3 и CASP-9 су биле значајно повишене у HF групи у односу на CTRL групу (График 25В и 25Г). Иако су сва три терапијска протокола (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V групе) имала значајно вишу релативну генску експресију CASP-3 и CASP-9 у односу на CTRL групу, уједно су и ефикасно снижили ове параметре у односу на HF групу.

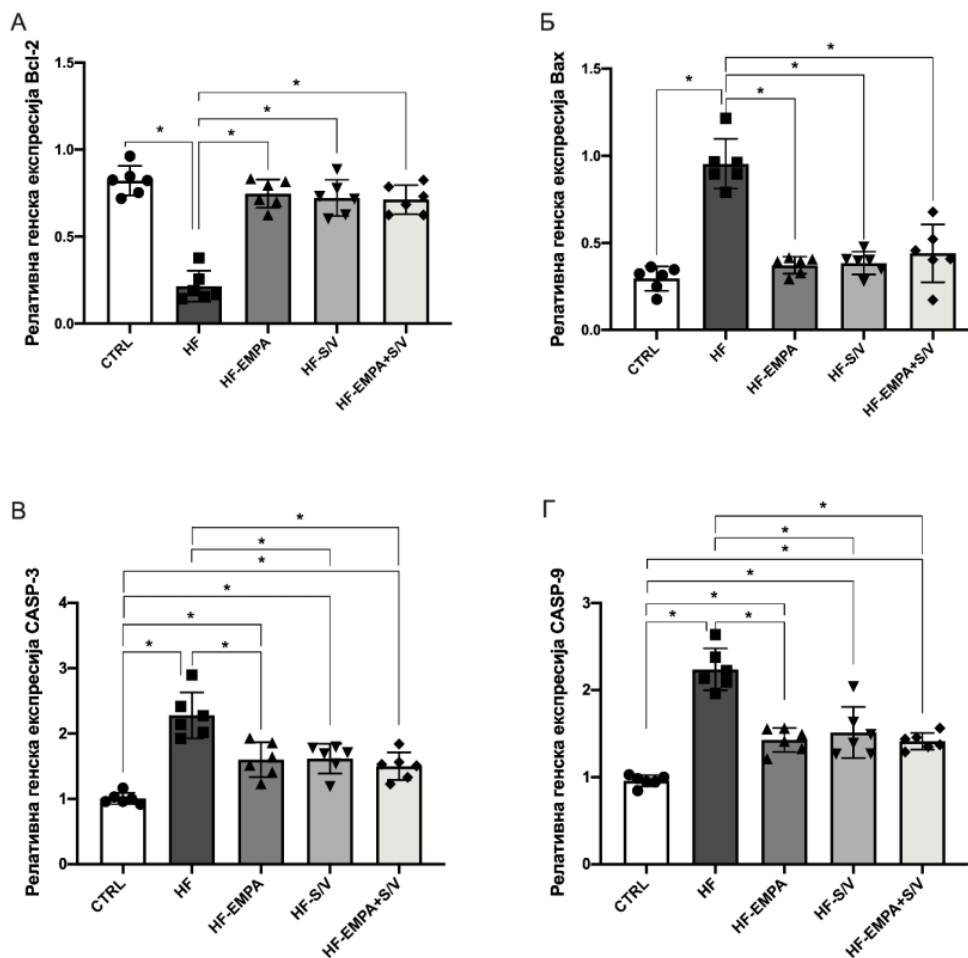


График 25. Утицај примењених терапијских протокола на релативну генску експресију (анти)апоптотских маркера у ткиву миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) релативна генска експресија -2 (Bcl-2); (Б) релативна генска експресија Bcl-2-повезаног X протеина (Вах); (В) релативна генска експресија каспазе-3 (CASP-3); (Г) релативна генска експресија каспазе-9 (CASP-9). Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

У нашем истраживању испитивана је релативна генска експресија одређених сигналних молекула код пацова са срчаном инсуфицијенцијом, као и ефекат промењених терапијских протокола. Резултати су показали да је релативна генска експресија JAK2 била значајно повишена у HF групи у поређењу са CTRL групом (**График 26А**). Сви терапијски протоколи (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V групе) су довели до значајног снижења релативне генске експресије JAK2 у односу на HF групу, иако су ове вредности биле значајно повишене у односу на CTRL групу. Слично томе, релативна генска експресија STAT3 је била значајно повишена у HF групи и свим групама које су имале терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V групе) у односу на CTRL групу (**График 26Б**). Такође, терапијски протоколи (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V групе) су успешно снижили релативну генску експресију STAT3 у односу на HF групу. Са друге стране, релативна генска експресија mTOR је била значајно снижена у HF групи и свим групама које су имале терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V групе) у односу на CTRL групу (**График 26В**). Међутим, у HF-S/V и HF-EMPA+S/V групи забележено је значајно повећање релативне генске експресије mTOR у односу на HF групу, што није био случај у HF-EMPA групи. Штавише, HF-EMPA група је имала значајно нижу релативну генску експресију mTOR у односу на HF-EMPA+S/V групу. Релативна генска експресија PPAR γ је била значајно снижена у HF групи и свим групама које су имале терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V групе) у односу на CTRL групу (**График 26Г**). Интересантно је да је релативна генска експресија PPAR γ повећана само у HF-EMPA+S/V групу у односу на HF групу, као и да су HF-EMPA и HF-S/V имале значајно нижу релативну генску експресију PPAR γ у односу на HF-EMPA+S/V групу.

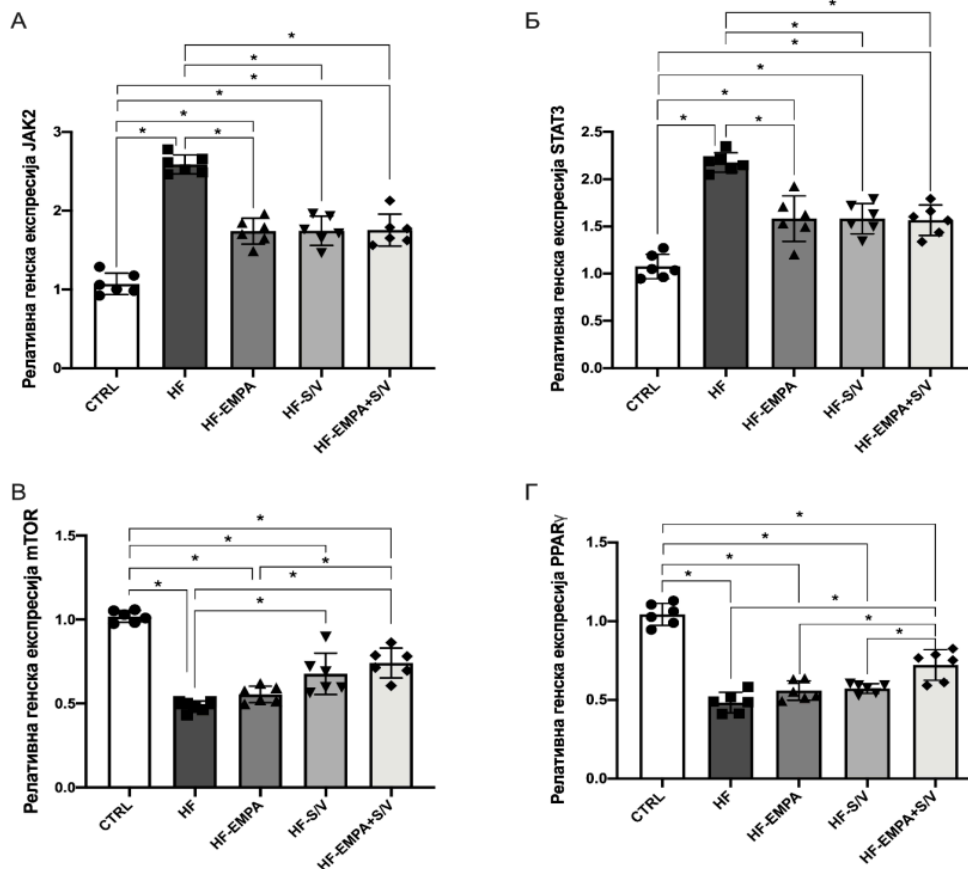


График 26. Утицај примењених терапијских протокола на релативну генску експресију сигналних молекула у ткиву миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом. (А) релативна генска експресија Јанус киназе 2 (JAK2); (Б) релативна генска експресија преносиоца сигнала и активатор транскрипције-3 (STAT3); (В) релативна генска експресија сисарског циља за рапамицин (mTOR); (Г) релативна генска експресија рецептора гама активираниог пролифератором пероксизома (PPAR γ). Вредности су приказане као средња вредност $\pm$ SD. * $p < 0,05$.

V ДИСКУСИЈА

Упркос значајним напрецима који су последњих деценија остварени у дијагностици и лечењу пацијената са срчаном инсуфицијенцијом, овај клинички ентитет и даље представља један од водећих узрока хоспитализације и смртности широм света. Процењује се да срчана инсуфицијенција погађа преко 64 милиона људи глобално, а њена преваленца наставља да расте, нарочито у старијој популацији (4). Поред тога, овај синдром значајно нарушава квалитет живота оболелих, узрокујући ограничену физичку активност, замор и честе хоспитализације због погоршања симптома. Истовремено, срчана инсуфицијенција представља огроман терет за здравствени систем, како због потребе за дуготрајним лечењем и интензивним терапијским приступом, тако и због учесталих рехоспитализација које додатно оптерећују здравствене ресурсе. Развој нових терапијских стратегија и боље разумевање молекуларних механизма укључених у патофизиологију ове болести од кључног је значаја, како за унапређење лечења оболелих, тако и за оптимизацију здравствених трошкова (8).

У последњих неколико година, резултати великих клиничких студије су значајно унапредили терапијске смернице за лечење срчане инсуфицијенције, што је довело до увођења нових класа лекова у стандардну терапију HFrEF. Традиционални терапијски приступ који укључује примену ACEi, ARB, BB и MRA, унапређен је додавањем две нове класе лекова: SGLT2i, као што су емпаглифлозин и дапаглифлозин, и ARNI, чији је главни и једини представник сакубитрил/валсартан. Примена ових лекова показала је значајне бенефите у погледу смањења смртности и хоспитализација, што је довело до препоруке у актуелним водичима за њихову употребу за лечење пацијената са HFrEF (1, 22, 23). SGLT2i су првобитно развијени као антидијабетички лекови, али су касније студије показале да њихова кардиопротективна улога значајно превазилази ефекте на гликемијску контролу, укључујући побољшање срчане функције, смањење фиброзе миокарда и смањење оптерећења волуменом (254). Слично томе, сакубитрил/валсартан је показао супериорност у односу на ACEi у погледу смањења морталитета и хоспитализација код пацијената са HFrEF, што је потврђено у великим клиничким испитивањима (168). Ипак, ефекти истовремене примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана још увек нису довољно испитани, нити је јасно да ли њихова комбинована примена може да пружи додатне кардиоваскуларне бенефите у односу на монотерапију овим агенасима у популацији пацијената са срчаном инсуфицијенцијом.

Управо из тог разлога, циљ нашег истраживања био је да се процене ефекти комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана у експерименталном моделу срчане инсуфицијенције пацова, као и да се ефекти ове комбиноване терапије упореде са ефектима које остварује сваки од ових лекова када се примењује самостално. Полазне хипотезе нашег истраживања засноване су на претпоставци да коадминистрација емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана има потенцијал да оствари позитиван синергистички ефекат, пружајући додатне кардиоваскуларне бенефите у односу на монотерапију овим лековима. Овим истраживањем, те хипотезе су тестиране и у значајној мери разјашњене, што ће допринети бољем разумевању могућих механизма деловања, као и оптимизацији терапијских приступа код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом. Добијени резултати могу имати значајан клинички значај, доприносећи бољем разумевању механистичких аспеката двојне терапије емпаглифлозин и сакубитрил/валсартаном у HFrEF, и усмеравању будућих истраживања ка креирању персонализованих терапијских стратегија за ову популацију пацијената.

Стимулација β -рецептора применом ISO, синтетског β -агонисте, представља широко примењиван метод за изазивање хипертрофије и фиброзе миокарда код експерименталних животиња, најчешће мишева и пацова (428). Након везивања

агониста, β_1 -адренорецептор се повезује са Gas протеином, који затим стимулише активност аденилил циклазе, услед чега се повећава концентрација цикличног аденозинмонофосфата (енгл. *Cyclic adenosine monophosphate* - cAMP) у ћелији и прекомерне стимулације протеин киназе А (енгл. *Protein kinase A* - PKA). PKA фосфорилише неколико кључних протеина укључених у регулацију срчане фреквенције и контрактилности, што има позитивне хронотропне и инотропне ефекте, уз повећан улазак Ca^{2+} у кардиомиоците, узрокујући хиперконтрактилност миокарда и повећану енергетске потрошње (454). Прекомерна активација β -адренорецептора не само да индукује срчану хипертрофију и некрозу кардиомиоцита, већ и активира фибробласте, чиме се изазива интерстицијална и периваскуларна фиброза миокарда (455). Примена високих доза ISO један је од најчешће коришћених протокола у експерименталним студијама на пацовима (417) и мишевима (418). Међутим, познато је да овакав протокол носи ризик од високе стопе смртности испитиваних животиња, чак и преко 30% (417), што може бити последица изненадних, леталних срчаних аритмија. Са друге стране, апликација нижих доза ISO током дужег временског периода сматра се безбеднијом у погледу преживљавања експерименталних животиња и такође се користи у експерименталним студијама (419-421). Оба протокола примене ISO узрокују дозно-зависну дилатацију и срчану инсуфицијенцију, која настаје као последица значајног оштећења миокарда и смрти кардиомиоцита (422). У бројним експерименталним студијама описан је модел срчане инсуфицијенције изазван субкутаном применом ISO, који се карактерише појавом некрозе миокарда, развојем хипертрофије кардиомиоцита, пролиферацијом фибробласта и наглашеном интерстицијалном фиброзом, уз прогресивно погоршање систолне и дијастолне функције срца (428). Овај модел се у акутној фази често користи као експериментални приказ стресом-индуковане кардиомиопатије, док у својој хроничној форми опонаша карактеристике узнапредовале срчане инсуфицијенције каква се виђа у хуманој популацији (456). У нашем истраживању, субкутана примена ISO према претходно описаном протоколу (419) довела је до развоја срчане инсуфицијенције код пацова, што је потврђено ехокардиографским мониторингом (TTE метода). Четири недеље након примене последње дозе ISO, уочена је значајна дилатација леве коморе у третираној групи пацова (eHF групи) у односу на групу контролних, здравих животиња (CTRL група), која је праћена снижењем вредности LVIDd и LVIDs и стањењем зидова леве коморе (IVSd, LVPWd, и LVPWs), као и повећањем запремине леве коморе у систоли и дијастоли (LVESV и LVEDV). Поред тога, уочено је оштећење систолне функције срца, која се огледала кроз снижење вредности FS и EF, и то испод 55% у eHF групи у поређењу са CTRL групом. Сличне налазе описали су *Keihanian* и сарадници, који су показали да 7-дневна примена ISO у дози од 10 mg/kg изазива значајан пад EF, праћен структурним ремоделовањем леве коморе (457). Резултати других студија које су користиле сличне протоколе за изазивање миокардног оштећења применом ISO такође су показали смањење FS и EF (428). Ови подаци су у складу са резултатима нашег истраживања, додатно потврђујући валидност примењеног модела срчане инсуфицијенције.

5.1 УТИЦАЈ КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТАНА НА ХЕМОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ

Према подацима из досадашњих истраживања, снижене вредности ВР присутне су код око 10-15% пацијената са срчаном инсуфицијенцијом, али подаци из клиничке

праксе сугеришу да је тај проценат чак и виши (458). Код пацијената са сниженим вредностима EF, вредности SBP и пулсног притиска највише зависе од ударног волумена леве коморе, док су вредности DBP и MAP превасходно одређени укупним циркулишућим волуменом крви и нивоом периферне вазодилатације (458). Због повезаности хемодинамских параметара са развојем и напредовањем срчане инсуфицијенције, у нашем истраживању смо одређивали вредности SBP, DBP, и MAP на крају експерименталног протокола. Вредности SBP, DBP, и MAP биле су значајно ниже у HF групи у односу на здраве пацове (CTRL група), што је указивало на присуство контрактилне дисфункције миокарда. Слична запажања забележена су и у претходним експерименталним студијама на пацовима (419). Код пацијената са HFrEF, снижење BP може бити повезано како са применом диуретске терапије, тако и са прогресијом дисфункције миокарда и појачаном вазореактивношћу услед удружености са коморбидитетима, попут ДМТ2 (458). Важно је нагласити да је хипотензија код пацијената са манифестном срчаном инсуфицијенцијом важан предиктор неповољног исхода, посебно у присуству систолне дисфункције леве коморе (459). Резултати нашег истраживања показали су да комбинована примена емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана (HF-EMPA+S/V група) спречава значајно ³ снижење вредности SBP. Са друге стране, сви примењивани терапијски протоколи (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) показали су позитиван ефекат на вредности DBP, које су биле приближне вредностима уоченим у групи здравих пацова (CTRL група). Вредност MAP, који одражава средњу вредност артеријског BP током једног срчаног циклуса, такође је био значајно ³ снижен у HF групи у односу на CTRL групу. Примена свих терапијских протокола (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) спречила је даљи пад вредности MAP, одржавајући га на нивоу блиском вредностима у CTRL групи. У клиничким студијама је показано да сакубитрил/валсартан има чак и повољнији антихипертензивни ефекат у односу на терапију ACEi (168) и ARB лековима (460). Самостална инхибиција неприлизина изазива пораст концентрације Ang-II у циркулацији и последични пораст вредности BP (461), али у оквиру комбиноване терапије са валсартаном, овај ефекат је уравнотежен додатном натриурезом, вазодилатацијом и супресијом алдостерона (462). Са друге стране, антихипертензивни ефекти SGLT2i добро су описани у претходним студијама (284). Показано је да хемодинамски ефекти ових агенаса нису последица само њиховог диуретског и натриуретског деловања, већ и додатних механизма који су одговорни за дугорочну контролу артеријског BP током ³ примене ових лекова (286). У нашем истраживању, примењени терапијски протоколи (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) нису довели до додатног снижења вредности BP у односу на HF групу, већ су, напротив, допринели одржавању BP на оптималном нивоу, који је приближан вредностима код здравих животиња (CTRL група). Овај ефекат је највероватније последица побољшања срчане функције, нарочито у групи са комбинованом терапијом емпаглифлозином и сакубитрил/валсартаном (HF-EMPA+S/V група). Ово запажање је у складу са претходним студијама, које су показале кардиопротективне ефекте истовремене примене валсартана и емпаглифлозина у превенцији ремоделовања и дилатације миокарда код дијабетичних пацова са хипертензијом (463). Са друге стране, у нашем истраживању, изостанак даљег снижења вредности BP током примене терапијских протокола, пре свега комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана (HF-EMPA+S/V група) је највероватније последица синергистичког дејства ових агенаса, и то превасходно емпаглифлозина и инхибитора неприлизина, сакубитрила. Терапијски протоколи који су примењивани у овом истраживању (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) нису имали значајан утицај на вредности HR, које су биле значајно снижене у HF групи у односу на групу здравих пацова (CTRL група). Ови

результати су у складу са претходним истраживањима која су показала да емпаглифлозин, иако има умерен антихипертензиван ефекат, нема значајан утицај на вредности HR (153). Овај ефекат може бити последица блокаде рефлексне симпатичке активности (285), али и потенцијалних директних ефекта на SA чвор, који су још увек недовољно испитани (254). Одсуство компензаторне тахикардије током примене SGLT2i, упркос њиховом диуретском и натриуретском дејству, указује на повољан хемодинамски профил ових агенаса. Такође, у једној кохортној студији, примена SGLT2i била је повезана са смањењем ризика од аритмија за 17% код пацијената са дијабетесом (464), што додатно указује на њихов потенцијални антиаритмијски ефекат.

5.2 УТИЦАЈ КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТАНА НА *IN VIVO* СРЧАНУ ФУНКЦИЈУ ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ

Мерења ехокардиографских параметара добијена у нашем истраживању су у складу са вредностима SBP, DBP и MAP, што указује на блиску повезаност структурних и функционалних промена у миокарду са системским хемодинамским оптерећењем. Ово је од посебног значаја јер потврђује да оштећења у структури и функцији леве коморе нису изоловани феномен, већ директно рефлектују хемодинамске поремећаје који су пратили развој срчане инсуфицијенције у нашем моделу. На крају експерименталног протокола, уочено је да пацови из HF групе имају значајно повећање вредности LVIDd и LVIDs у односу на CTRL групу, што указује на развој дилатације леве коморе као последице прогресије срчане инсуфицијенције. Истовремено, примећено је значајно снижење вредности FS и EF у HF групи у поређењу са CTRL групом, што указује на компромитовану контрактилну функцију и присуство систолне дисфункције. У HF-EMPA групи, вредности LVIDd нису се значајно разликовале, док су вредности LVIDs значајно снижене у поређењу са HF групом, из чега закључујемо да самостална примена емпаглифлозина делимично побољшава систолну функцију леве коморе пацова са срчаном инсуфицијенцијом. Најпроминентнији протективни ефекат уочен је у групама које су примале сакубитрил/валсартан (HF-S/V група) и комбинацију емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана (HF-EMPA+S/V група), што се огледа значајним побољшањем систолне функције и спречавањем настанка прогресивне дилатације леве коморе. Поред тога, примећено је да примена ISO према описаном протоколу смањује вредности LVPWs у односу на CTRL групу, што је у складу са фенотипом дилатативне кардиомиопатије и HFrEF. Вредности дебљине зидова леве коморе (IVSs, IVSd и LVPWd) су показале тенденцију снижења у HF групи, у поређењу са CTRL групом, иако статистички значајна разлика није уочена. Комбинована примена емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана (HF-EMPA+S/V група) је показала највећи потенцијал у превенцији снижења вредности IVSs и LVPWs у поређењу са монотерапијом. Такође, најбољи ефекат на вредности FS и EF је остварен код пацова који су примали двојну терапију (HF-EMPA+S/V група), што указује да комбинована примена емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана остварује синергистички ефекат у погледу побољшања систолне функције леве коморе код пацова са срчаном инсуфицијенцијом. У експерименталном моделу IRI, примена дапаглифлозина и сакубитрил/валсартана је значајно побољшала вредност EF у односу на монотерапију овим агенсима (465), што је у складу са резултатима добијеним у нашем истраживању. У студији спроведеној од стране *Jianga* и сарадника, показано је да у односу на монотерапију сакубитрил/валсартаном, примена овог агенса у комбинацији са дапаглифлозином има протективне ефекте на функцију миокарда у виду смањења дијаметра леве преткоморе и снижења вредности NT-proBNP (466). Аутори су такође

навели да би ова комбинација лекова могла бити применљива у свакодневној клиничкој пракси, након спровођења мултицентричних студија које би укључивале велики број пацијената са HFrEF (466). Имајући у виду ове резултате у досадашњој литератури, логично је закључити да би истовремена примена сакубитрил/валсартана и емпаглифлозина, односно дапаглифлозина била још ефикаснија у смањењу морбидитета и mortalитета код ове популације пацијената. Претходно спроведена ретроспективна анализа ефеката ARNI и SGLT2i код пацијената са ДМТ2 и HFrEF показала је да, у поређењу са монотерапијом, рано увођење оба агенса из ове две класе лекова корелира са израженијим побољшањем вредности ехокардиографских параметара и срчане функције (467). Такође, резултати једне мета-анализе показали су да увођење SGLT2i у комбинацији са сакубитрил/валсартаном пружа додатне кардиопротективне ефекте, што је у складу са претходно споменутом студијом (468). *Mustapic* и сарадници су показали да примена SGLT2i током три месеца побољшава систолну функцију леве коморе, укључујући и вредност 3D-EF, код пацијената са хроничном срчаном инсуфицијенцијом који су лечени у оптималном терапијом (BB, MRA и сакубитрил/валсартан) у амбулантним условима, у односу на пацијенте који нису лечени са SGLT2i, што додатно оправдава истовремену употребу ARNI и SGLT2i у срчаној инсуфицијенцији (469).

5.3 УТИЦАЈ КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТАНА НА EX VIVO СРЧАНУ ФУНКЦИЈУ ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ

У истраживању смо пратили кардиодинамске параметре изолованог срца пацова са срчаном инсуфицијенцијом које је подвргнуто протоколу ауторегулације на *Langendorff* апарату, који је подразумевао излагање миокарда вредностима CPP у опсегу од 40 до 120 cmH₂O. Најизраженији ефекти примене ISO и терапијских протокола примењени су у односу на контрактилност миокарда пацова, која је представљена максималном брзином пораста интравентрикуларног притиска током систоле (dp/dt max - мера контрактилне способности срца) и максималном брзином опадања интравентрикуларног притиска током дијастоле (dp/dt min - мера релаксационе способности срца). Показано је да примена ISO у нашем истраживању узрокује значајне поремећаје контрактилне способности изолованог срца пацова, који се огледа кроз пад вредности dp/dt max при свим вредностима притиска (40-60 cmH₂O), односно пораст вредности dp/dt min при вредностима притиска од 60-120 cmH₂O. Примена монотерапије емпаглифлозином (HF-EMPA) није довела до значајног побољшања dp/dt max у односу на HF групу, док је монотерапија сакубитрил/валсартаном (HF-S/V) побољшала контрактилност миокарда једино при вредности CPP од 60 cmH₂O у односу на HF групу. Штавише, оба протокола монотерапије су имала значајно ниже вредности dp/dt max при највишим вредностима CPP у односу на здраве, контролне животиње (CTRL група). Са друге стране, примена двојне терапије (HF-EMPA+S/V група) је показала највећу способност очувања контрактилности миокарда са вишим вредностима dp/dt max при CPP од 60-120 cmH₂O у односу на пацове са срчаном инсуфицијенцијом без третмана (HF група). Међутим, када је изоловано срце поново подвргнуто протоколу ауторегулације, нису уочене статистички значајне разлике унутар испитиваних група. Посматрајући утицај примењених терапијских протокола на dp/dt min, показано је да је група са двојном терапијом (HF-EMPA+S/V) имала значајно више вредности dp/dt min при вредности CPP од 60-120 cmH₂O у односу на здраве пацове (CTRL група). Поред тога, монотерапија емпаглифлозином (HF-EMPA група) је

довела до значајног снижења вредности $dp/dt \min$ при вредности CPP од 80 cmH_2O у односу на HF групу, док је монотерапија сакубитрил/валсартаном (HF-S/V група) значајно снизила вредности $dp/dt \min$ при вредности CPP од 120 cmH_2O у односу на HF групу. Важно је напоменути да је приликом поновног излагања изолованог срца протоколу ауторегулације, једино монотерапија сакубитрил/валсартаном (HF-S/V група) значајно снизила вредности овог параметра при вредности CPP од 80 cmH_2O .

Иако је претходно показано да акутна примена ниских доза емпаглифлозина код здравих пацова изазива пораст вредности $dp/dt \max$ и снижење вредности $dp/dt \min$ у односу на вредности пре третмана (470), у нашем истраживању је овај ефекат изостао. У поменутој студији, ефекти емпаглифлозина се могу донекле објаснити повећањем регулације SERCA2a и смањењем регулације MMP9 и измењивача натријум/протон 1 (NHE1) које се постижу применом овог агенса (470). Експерименталне и клиничке студије су показале да смањену експресију SERCA2a у срчаној инсуфицијенцији, што узрокује поремећај регулације Ca^{2+} и слабење контрактилности миокарда (471). С тим у вези, могуће је да самостална примена емпаглифлозина није довољана да преокрене ове поремећаје. У генетском, експерименталном моделу ДМТ2, показано је да примена емпаглифлозина не утиче на експресију SERCA2a, мада повећава фосфорилацију фосфоламбан (енгл. *Phospholamban* - PLN), малог протеина саркоплазматског ретикулума, који игра важну улогу у регулацији функције SERCA2a (472). Ови ефекти емпаглифлозина могу указивати на индиректно појачану активност SERCA2a и побољшану дијастолну дисфункцију која је уочена у овој студији (472). Слично томе, примена сакубитрил/валсартана није довела до повећања експресије SERCA2a, нити до побољшања фосфорилисани (p)-PLN/PLN односа у моделу ДМТ2 код пацова (473). Обзиром да у нашем истраживању није испитиван утицај примењених терапијских протокола на активност SERCA2a, било би од великог значаја испитати да ли коадминистрација емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана испољава синергистичко дејство и повећава активност SERCA2a и ниво PLN у моделу срчане инсуфицијенције изазване применом ISO код пацова.

У нашем истраживању уочено је снижење SLVP при вишим вредностима CPP у HF групи у поређењу са CTRL групом, што указује на то да су болесне животиње имале значајно оштећену систолну функцију леве коморе. Примењени терапијски протоколи нису утицали на вредност SLVP, док вредности DLVP нису биле подложне променама нити у групи пацова са срчаном инсуфицијенцијом без третмана (HF група), нити након примене терапијских протокола. Поред тога, када је срце поново подвргнуто протоколу ауторегулације, у нашем истраживању није уочена статистички значајна разлика у вредности SLVP и DLVP унутар испитиваних група.

Вредност HR је била значајно нижа у HF и HF-EMPA групи при вредности CPP од 40 и 100 cmH_2O у односу на CTRL групу, док статистички значајна разлика у вредности овог параметра није уочена између других испитиваних група. Овај резултат може указивати на то да пораст HR изостаје код изолованог срца пацова са срчаном инсуфицијенцијом, и то независно од примене монотерапије емпаглифлозином, што може бити последица поремећене регулације симпатичког нервног система или других механизма који регулишу HR у испитиваном моделу. Штавише, у HF групи уочена је значајно нижа вредност HR при вредностима CPP од 60 и 80 cmH_2O приликом поновног пораста перфузионог притиска током ауторегулације. Такође, значајно нижа вредност HR уочена је у групама које су третиране емпаглифлозином (HF-EMPA и HF-EMPA+S/V група), и то при вредностима CPP од 60 cmH_2O .

У HF групи CF је, при већим вредностима CPP (80-100 cmH_2O) је био знатно виши у односу на здрава срца, указујући на смањену реактивност коронарних крвних судова и ендотелну дисфункцију. Вредност CF је била значајно нижа у HF-S/V групи

при вредностима CPP од 60-120 cmH₂O, као и у HF-EMPA+S/V групи при вредностима CPP од 80-120 cmH₂O у односу на HF групу. Са друге стране монотерапија емпаглифлозином (HF-EMPA) је значајно снизила CF у односу на HF групу при вредности CPP од 120 cmH₂O. Међутим, значајно нижа вредност CF забележена је у HF групи приликом поновног излагања срца порасту перфузионог притиска током ауторегулације при вредности CPP од 120 cmH₂O, што сугерише да срце у стању срчане инсуфицијенције не може одржати адекватну функцију, нарочито при високом CPP. Вредности CF су знатно приближније вредностима у контролној групи, у поређењу са групама где је примењен монотерапијски приступ, указујући на синергистички ефекат примењених терапеутика у превенцији оштећења ендотелне функције и реактивности крвних судова.

5.4 УТИЦАЈ КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТАНА НА МОРФОМЕТРИЈСКЕ ПАРАМЕТРЕ И ИНДЕКС ХИПЕРТРОФИЈЕ ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ

У нашем истраживању праћен је утицај примењених терапијских протокола на вредности BW у више временских тренутака током трајања експерименталног протокола, и то 1., 7., 35., 49. и 63. дана. На почетку експерименталног протокола (1. дан), као и последњег дана примене ISO (7. дан), кретање вредности BW је било стабилно у смислу да нису детектоване значајне разлике између групе пацова са срчаном инсуфицијенцијом (eHF група) и здравих, контролних пацова (CTRL група). Већ након четири недеље од последње ISO дозе (35. дан) пацови из eHF групе имали значајно веће вредности BW у односу на CTRL групу. Две недеље од почетка примене терапијских протокола (49. дан), као и на крају експерименталног протокола (63. дан) овај тренд је настављен, те је уочено да су пацови из HF групе имали значајно повећање вредности BW у односу на CTRL групу. Две недеље од почетка примене терапијских протокола (49. дан), сви пацови из група које су подвргнуте терапијском протоколу (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) имали су значајно вишу вредност BW у односу на CTRL групу. Такође, две недеље од почетка примене терапије (35. дан) у групи HF-S/V уочена је мања вредност BW у односу на HF, HF-EMPA и HF-EMPA+S/V групу. На крају експерименталног протокола (63. дан) уочен је значајан пораст BW у HF-EMPA и HF-EMPA+S/V групи у односу на CTRL групу, као и значајно снижење BW у свим групама код којих се примењивао терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) у односу на HF групу. Поред тога, HF-S/V група је имала значајно нижи BW на крају експерименталног протокола (63. дан) у односу на HF-EMPA-S/V групу.

На крају експерименталног протокола, уочено је да су примена ISO, као и терапијских протокола, значајно утицали на вредности HW и HW/BW индекса. У HF групи је забележен значајан пораст вредности HW и HW/BW индекса у поређењу са CTRL групом. Претходне експерименталне студије су такође потврдиле да хронична примена ISO узрокује хипертрофију миокарда, што је приказано кроз пораст вредности индикатора хипертрофије, као што је HW/BW индекс (428). Овакви резултати, заједно са претходно добијеним ехокардиографским мерењима, указују на то да претерана адренергичка стимулација води ка дисфункцији и ремоделовању миокарда (474). Са друге стране, у свим групама код којих је примењиван терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) дошло је до значајног снижења HW, при чему се монотерапија сакубитрил/валсартаном (HF-S/V) показала као најефикаснијом. Такође, сви терапијски протоколи примењивани у нашем истраживању (HF-EMPA, HF-S/V и

HF-EMPA+S/V група) су повољно утицали на вредност HW/BW индекса у поређењу са HF групом, при чему се двојна терапија (HF-EMPA+S/V) показала као најефикаснија.

У експерименталној студији која је испитивала оштећење миокарда које је изазвано применом ISO, показано је да примена сакубитрил/валсартана повољно утиче на вредности HW и HW/BW индекса, што је највероватније последица побољшане хомеостазе Ca^{2+} услед повећаног присуства Ca^{2+} АТРаза 2а и Na-Ca^{2+} измењивача-1 (475). Међутим, ефекти примене емпаглифлозина, самостално или у комбинацији са сакубитрил/валсартаном на вредности HW или HW/BW индекса у моделу срчане инсуфицијенције изазване применом ISO, још увек недостају. У експерименталном моделу дијабетеса изазваног стрептозоцином код пацова уочен је сличан механизам постигнут применом емпаглифлозина на ремоделовање миокарда, као што је то описано са сакубитрил/валсартаном у претходно поменутој студији (429). У овој студији, примена емпаглифлозина снизила је HW и HW/BW индекс, побољшањем регулације Ca^{2+} и Na^{+} струја и функције $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -измењивача. Са друге стране, поједини аутори су показали снижење BW услед оштећења миокарда које је узроковано применом ISO (476), што је супротно резултатима добијеним у нашој студији. Ове разлике су вероватно последица примене различитих експерименталних протокола, с обзиром да је трајање нашег протокола било осам недеља у поређењу са протоколима који су трајали углавном четири недеље или краће. У нашем истраживању, пораст BW се донекле може схватити као последица акумулације течности (477) што је и очекивано код пацијената са HFrEF (297).

5.5 УТИЦАЈ КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТАНА НА ВРЕДНОСТ КАРДИОСПЕЦИФИЧНИХ МАРКЕРА И НАТРИУРЕТСКИХ ПЕПТИДА ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ

cTnT и cTnI су специфични и осетљиви биомаркери оштећења кардиомиоцита, који се широко примењују у експерименталним студијама. Више истраживања спроведених на пацовима је описало повезаност између нивоа cTnT или cTnI у серуму и тежине кардиотоксичности изазване применом ISO (478, 479). Примена ниских доза ISO (8–64 $\mu\text{g/kg}$) код пацова довела је до пораста серумске концентрације cTnT у року од три сата након примене, без значајних морфолошких оштећења миокарда (480). Међутим, примена већих доза ISO (125–500 $\mu\text{g/kg}$) изазвала је значајна оштећења миокарда, која су праћена апоптозом и некрозом, што је резултирало већим скоком вредности cTnT (480). Аутори су такође закључили да је пораст iNOS имунореактивности корелирало са тежином оштећења миокарда, што сугерише да стварање NO путем повећане експресије iNOS може имати значајну улогу у патогенези оштећења кардиомиоцита (480). У моделу ИМ изазваног применом ISO, забележен је значајан пораст cTnI, cTnT, и CK-MB у односу на контролне, здраве животиње (481). Такође, у студији коју су спровели Li и сарадници, 7-дневни ISO третман (у дози од 5 mg/kg дневно) значајно је повећао вредности NT-proBNP у групи пацова са срчаном инсуфицијенцијом у односу на здраве животиње (482), што је у складу са нашим резултатима. У нашој студији, уочене су значајно више вредности кардиоспецифичних маркера (cTnI, CK-MB и NT-proBNP) на крају експерименталног протокола у HF групи у поређењу са CTRL групом. Терапијски протоколи примењивани у нашем истраживању (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) резултирали су значајно вишим вредностима cTnI и NT-proBNP у односу на CTRL групу, које се притом нису значајно разликовале од вредности забележених у HF групи. Овакви резултати могу

указивати на то да примењена терапија у нашем истраживању, иако испољава позитивне ефекте у погледу побољшања функције и структуре миокарда, можда није довољна да потпуно преокрене биохемијски дисбаланс уочен код пацова са срчаном инсуфицијенцијом изазваном применом ISO.

У студији коју су спровели *Zhang* и сарадници, истражен је ефекат четворонедељне терапије сакубитрил/валсартаном на ниво NT-proBNP у моделу HFpEF. Резултати ове студије су показали да терапија сакубитрил/валсартаном значајно смањује концентрацију NT-proBNP, што су истраживачи повезали антифибротским потенцијалом овог агенса, који је посредован TGFβ1/Smad3 сигналном каскадом (483). Клинички ефекти комбиноване терапије емпagliфлозином и сакубитрил/валсартаном описани су и у претходним студијама на хуманој популацији. Наиме, у једној ретроспективној студији показано је да коадминистрација емпagliфлозина и сакубитрил/валсартана значајно снижава вредности cTnI и NT-proBNP код хипертензивних пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (484). Иако у нашем истраживању нису уочене значајне разлике између група са терапијским протоколима и HF групе у погледу серумске концентрације cTnI и NT-proBNP, двојна терапија (HF-EMPA+S/V група) је имала тенденцију најефикаснијег снижења концентрације ових кардиоспецифичних маркера. Са друге стране, монотерапија сакубитрил/валсартаном (HF-S/V група) је једини третман у нашем истраживању који је успео да снизи вредност серумске концентрације CK-MB у односу на HF групу.

5.6 УТИЦАЈ КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТАНА НА ОКСИДАЦИОНИ СТАТУС ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ

5.6.1 Утицај комбиноване примене емпagliфлозина и сакубитрил/валсартана на системски оксидациони статус пацова са срчаном инсуфицијенцијом

На основу досадашњих истраживања о улози оксидационог стреса и инфламације у срчаној инсуфицијенцији, јасно је да су ови процеси кључни за развој и прогресију овог синдрома. Оксидациони стрес и инфламација нису само међусобно повезани, већ и појачавају своје ефекте у ткиву миокарда, што изазива озбиљне структурне и функционалне промене. Разумевање ових механизма и њихове интеракције је од пресудне важности за развој нових терапијских стратегија које ће моћи да циљају и оксидациони стрес и процес инфламације. Терапије које могу да преломе ову патолошку петљу и поправе равнотежу између оксидационог оштећења и антиоксидационе одбране, као и да регулишу инфламацијски одговор, могу да буду кључне за лечење срчане инсуфицијенције и побољшање исхода болести ових пацијената (50). На крају експерименталног протокола у нашем истраживању, одређивали смо системски оксидациони статус пацова са срчаном инсуфицијенцијом у циљу процене ефикасности комбиноване примене емпagliфлозина и сакубитрил/валсартана у односу на монотерапију овим агенсима.

У нашем истраживању, по завршетку експерименталног протокола, у узорцима плазме пацова из HF групе детектоване су значајно више концентрације TBARS, O₂⁻ и H₂O₂ у односу на контролне, здраве животиње (CTRL група). У нашем истраживању, значајно више концентрације TBARS биле су присутне у плазми пацова HF-EMPA и HF-S/V групе у односу на CTRL групу. Са друге стране пацови који су третирани двојном терапијом (HF-EMPA-S/V група) су имали значајно нижу концентрацију TBARS у односу на HF групу, које су биле сличне вредностима уоченим у CTRL групи. Такође, значајно ниже концентрације O₂⁻ и H₂O₂ уочене су у групама код којих се

примењивао терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V група) у односу на HF групу. Штавише, најпроминентнији ефекат на вредности O_2^- у плазми остварен је применом монотерапије сакубитри/валсартаном (HF-S/V група) и двојном терапијом (HF-EMPA+S/V група). Важно је напоменути да је двојна терапија (HF-EMPA+S/V група) најефикасније снизила концентрацију H_2O_2 у плазми која је била приближна вредностима детектованим у групи здравих животиња (CTRL група). Интересантно је да у нашој студији нису уочене значајне разлике у концентрацији NO_2^- међу испитиваним групама.

По завршетку експерименталног протокола, у узорцима серума пацова из HF групе детектована је значајно нижа активност антиоксидационих ензима CAT, SOD, као и нижи ниво GSH у односу на CTRL групу. У студији коју су спровели Imran и сарадници показано је да пацови са ИМ који је изазван применом ISO имају значајно ниже вредности укупне антиоксидационе активности у серуму пацова са ИМ у односу на контролне пацове (234), што је у складу са нашим резултатима. Иако у нашем истраживању није уочена значајна разлика у активности CAT између група код којих се примењивао терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V група) и групе болесних пацова (HF група), значајно нижа активност овог ензима регистрована је у свим групама третираним терапијским протоколом у поређењу са CTRL групом. Такође, Xing и сарадници су показали да дводневна примена ISO код пацова узрокује оштећење структуре и поремећај функције миокарда, које је праћено значајним снижењем серумске активности SOD и порастом серумске концентрације малониалдехида (енгл. *Malondialdehyde* - MDA) у третираној групи животиња у односу на контролу (481), потврђујући да је оксидациони стрес један од механизма негативног дејства ISO на срчани мишић. Значајно виша активност SOD уочена је у HF-EMPA+S/V групи у односу на CTRL и HF групу, као и на групе третиране монотерапијом (HF-EMPA и HF-S/V група). Посматрајући групе код којих се примењивао терапијски протокол, ниво GSH је био значајно виши једино у HF-EMPA+S/V групи у односу на HF групу, указујући на појачан антиоксидациони потенцијал двојне терапије у односу на монотерапију емпаглифлозином и сакубитрил/валсартаном. У досадашњим изворима литературе описано је неколико сигналних каскада које посредују у антиоксидационој активности емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана. Примена емпаглифлозина у експерименталном моделу IRI кардиомиоцита изложених хипогликемији довела је до активације JAK2/STAT3 сигналног пута и снижења оксидационог стреса (485). Значај ове сигналне каскаде у кардиопротекцији коју остварује емпаглифлозин потврђен је смањењем протективних способности овог агенса током нисходне регулације STAT3. Поред тога, примена емпаглифлозина је довела до смањења интрацелуларних ROS, побољшања MMP и смањења експресије iNOS у експерименталном моделу срчане инсуфицијенције изазване лигацијом коронарне артерије (486). Активација AMPK/PGC-1 α је још један сигнални пут који је препознат да посредује у антиоксидационом дејству емпаглифлозина (356). Са друге стране, један од главних механизма који посредује у кардиопротективним својствима сакубитрил/валсартана је управо антиоксидациона способност овог агенса и последично побољшање активности митохондрија. Показано је да примена сакубитрил/валсартана смањује експресију митофузина 2 (енгл. *Mitofusin 2* - Mfn2) и фосфорилисаног Drp1 повезаних са митохондријском функцијом, као и NADPH оксидаза повезаних са оксидационим стресом у експерименталном моделу кардиореналног синдрома (487). Резултати нашег истраживања показали су да је управо антиоксидациони потенцијал емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана један од кључних механизма који су одговорни за кардиопротективна својства ових агенаса.

5.6.2 Утицај комбиноване примене емпagliфлозина и сакубитрил/валсартана на оксидациони статус ткива миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом

Код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом повећани су маркери оксидационог стреса у ткиву миокарда и плазми, што корелира са дисфункцијом леве коморе. Наиме, ROS имају негативан утицај на регулацију динамике Ca^{2+} у миокарду, што је праћено појавом аритмија, апоптозе, некрозе и ремоделовања миокарда (488). Примена ISO у нашем истраживању узроковала је поремећај оксидационог статуса у ткиву миокарда, који се огледао кроз пораст концентрације TBARS, снижење активности антиоксидационих ензима CAT и SOD, као и снижење нивоа GSH у групи пацова са срчаном инсуфицијенцијом (HF група), у односу на контролне, здраве пацове (CTRL група). Претходне студије су показале да код пацова са ИМ, који је изазван применом ISO, долази до значајног нарушавања система антиоксидационе заштите, који је праћен значајним падом вредности SOD, CAT, глутатион редуктазе (GR), GPx, глутатион-S-трансферазе (GST) и GSH у ткиву миокарда у болесној групи животиња у поређењу са здравим пацовима (234).

За разлику од монотерапије емпagliфлозином (HF-EMPA група) и сакубитрил/валсартаном (HF-EMPA+S/V група), примена двојне терапије (HF-EMPA+S/V група) је довела до значајног снижења концентрације TBARS у ткиву миокарда у поређењу са HF групом. Са друге стране, сви терапијски протоколи (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V група) су унапредили антиоксидациони систем заштите у ткиву миокарда, узрокујући значајно вишу активност антиоксидационих ензима CAT и SOD у односу на HF групу. Међутим, једино су групе код којих је примењиван сакубитрил/валсартан (HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) довеле до пораста нивоа GSH у односу на HF групу у ткиву миокарда, са најизраженијим ефектом примењеним током примене двојне терапије (HF-EMPA+S/V група). Са друге стране, монотерапија емпagliфлозином (HF-EMPA) није остварила очекиване ефекте, штавише у овој групи пацова је уочен значајно нижи ниво GSH у односу на CTRL групу.

Примена сакубитрил/валсартана код пацова са ИМ значајно је смањила оштећење миокарда и редуковала величину инфарктног подручја, што је највероватније последица способности овог агенса да смањи оксидациони стрес (234). Штавише, Croteau и сарадници су показали да је сакубитрил/валсартан ефикаснији од валсартана у погледу смањења оксидационог стреса у ткиву миокарда. Овај ефекат је највероватније посредован смањењем оксидованог липид 4-хидрокси-2-ноненала код мишева са метаболичком болешћу срца (235). У експерименталном моделу дијабетесне кардиомиопатије код мишева, показано је да примена сакубитрил/валсартана повећава ниво GSH и однос GSH/GSSG у ткиву миокарда, што је праћено побољшањем функције и степена ремоделовања миокарда. Аутори су закључили да је антиоксидациони потенцијал овог агенса највероватније повезан са инхибицијом фосфорилације JNK/p38MAPK, као и транслокацијом NF- κ B у једру (237). Са друге стране, примена емпagliфлозина у *in vitro* условима смањује стрес ендоплазматског ретикулума и последично снижава оксидациони стрес, инфламацију и апоптозу кардиомиоцита код пацова са кардиомиопатијом изазваном применом DOX (353). Емпagliфлозин је показао значајан антиоксидациони потенцијал смањењем ROS продукције и нивоа MDA и повећањем активности антиоксидационих ензима (CAT, SOD, и GPx) у миокарду дијабетичних мишева (354). Обзиром да је Nrf2 главни регулатор антиоксидационог статуса, аутори су закључили да примена емпagliфлозина промовише транспорт Nrf2 у једру, као и да повећава mRNA смањену експресију гена за Nrf2 каскаду, што је један од механизма којим емпagliфлозин остварује своје антиоксидационе ефекте у моделу дијабетичне кардиомиопатије (354). Сличне резултате

су представили *Li* и сарадници, који су додатно показали да примена емпаглифлозина смањује ниво NOX4 у ткиву миокарда дијабетичних пацова, и то смањењем активности NADPH оксидазе (343). Поред тога, показано је да антиоксидациони ефекти емпаглифлозина посредовани дејством на AMPK сигналну каскаду смањује инциденцију атријалне фибрилације код дијабетичних пацова (351). Иако антиоксидациона својства комбиноване терапије емпаглифлозином и сакубитрил/валсартаном нису довољно истражена, показано је да примена ова два агенса у виду монотерапије и комбиновано има значајан антиоксидациони потенцијал у моделу кардиотоксичности изазване применом метотрексата и хипоксије ембрионалних H9C2 кардиомиоцита (489). Резултати нашег истраживања указују да су сви терапијски протоколи имали утицај на смањење оксидационог стреса у ткиву миокарда пацова са срчаном инсуфицијенцијом, али да је двојна терапија емпаглифлозином и сакубитрил/валсартаном (HF-EMPA+S/V) била најефикаснија.

5.6.3 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на оксидациони статус у коронарном венском ефлуенту пацова са срчаном инсуфицијенцијом

У нашем истраживању је показано да срчана инсуфицијенција код пацова (HF група) узрокује значајан пораст прооксидационог маркера, TBARS (при свим вредностима CPP), NO₂ (при вредностима CPP од 80-120 cmH₂O), O₂⁻ (при вредностима CPP од 60-120 cmH₂O) и H₂O₂ (при вредностима CPP од 60-120 cmH₂O), при чему различити терапијски протоколи имају варијабилан утицај на њихово смањење у односу на CTRL групу. Најефикасније снижење вредности TBARS уочено је у HF-EMPA групи, и то при свим вредностима CPP, док су монотерапија сакубитрил/валсартаном (HF-S/V група), као и двојна терапија (HF-EMPA+S/V група) биле ефикасне у снижавању TBARS углавном при вишим вредностима CPP у односу на HF групу. Сви терапијски протоколи (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V група) су допринели снижењу концентрација NO₂⁻ O₂⁻ при већим вредностима CPP, при чему је монотерапија сакубитрил/валсартаном (HF-S/V група) била најделотворнија у снижењу концентрације NO₂⁻, а обе групе третиране сакубитрил/валсартаном (HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) испољиле су најефикасније снижење O₂⁻ у поређењу са HF групом. Двојна терапија (HF-EMPA+S/V група) показала је највећу ефикасност у смањењу H₂O₂, нарочито при високим вредностима CPP.

Наше истраживање показало је да поновно излагање изолованог срца протоколу ауторегулације узрокује специфичне промене у концентрацији прооксидационих параметара у CVE, зависно од примене различитих терапијских протокола. Смањење концентрације TBARS у HF групи при вишим вредностима CPP и у HF-EMPA+S/V групи при нижим вредностима CPP указује на потенцијалну адаптивну реакцију, док је у HF-S/V групи уочен пораст овог маркера, што може указивати на прооксидациони ефекат при нижим вредностима CPP. Концентрација NO₂⁻ значајно је повећана у HF-EMPA и HF-S/V групама при вишим вредностима CPP током поновног излагања протоколу ауторегулације, док је у HF-EMPA+S/V групи дошло до њеног смањења, што сугерише да различити терапијски режими имају варијабилан утицај на продукцију NO у условима поновљене ауторегулације. Што се тиче O₂⁻, његова концентрација је порасла у CTRL, HF-EMPA и HF-S/V групама при нижим вредностима CPP, што може указивати на повећану продукцију O₂⁻ услед оксидационог стреса изазваног поновљеним стимулусом ауторегулације. Сличан тренд је примећен и код H₂O₂, где је поновна ауторегулација довела до његовог смањења у CTRL групи, али и до повећања у

HF-S/V и HF-EMPA+S/V групама при специфичним вредностима CPP, што може указивати на различите ефекте терапије на продукцију овог маркера оксидационог стреса.

Наши резултати сугеришу да поновљена промена перфузионог притиска током ауторегулације може модификовати оксидациони статус у зависности од примене одређених терапијских стратегија, што може имати значајне импликације у разумевању механизма срчане дисфункције и потенцијалних терапијских интервенција. CVE, који одводи дезоксигенисану крв из миокарда, представља кључан медијум за процену маркера оксидационог стреса у срчаном мишићу. *Li* и сарадници су показали да емплаглифозин спречава активацију NOX и продукцију ROS, што се постиже инхибицијом активности протеин киназе C (енгл. *Protein kinase C* - PKC) у хуманим коронарним артеријским ендотелним ћелијама (енгл. *Coronary artery endothelial cells* - HCAECs) изложеним механичком напрезању, што је ефекат посредован инхибицијом NHE/Na⁺/Na⁺/Ca²⁺ измењивач (NCX)/Ca²⁺ каскаде (490). Моделу срчане инсуфицијенције изазване оптерећењем притиском код пацова, показано је да примена сакубитрил/валсартана може ублажити оксидациони стрес и апоптозу регулацијом сиртуин 3 (енгл. *Sirtuin 3* - Sirt3)/MnSOD сигналне каскаде (242).

Поред тога, једна клиничка студија је процењивала краткорочне ефекте сакубитрил/валсартана на ендотелну функцију и артеријску крутост код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом. Након шест месеци терапије, уочено је значајно смањење маркера оксидационог стреса, укључујући NOX-2 и 8-изопростана у серуму (491). Иако ова студија није директно процењивала маркере оксидационог стреса у коронарном васкуларном кориту, системско смањење маркера оксидационог стреса указује на могућност да сакубитрил/валсартан такође смањује оксидациони стрес унутар коронарне циркулације.

И сакубитрил/валсартан и SGLT2 инхибитори независно доприносе смањењу оксидационог стреса у кардиоваскуларним обољењима. Комбинација ових терапија може пружити појачане кардиопротективне ефекте истовременим деловањем на различите путеве укључене у оксидациони стрес и ремоделовање миокарда.

5.7 УТИЦАЈ КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТАНА НА ХИСТОМОРФОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ МИОКАРДА ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ

Фиброза и ремоделовање леве коморе имају значајан утичу на функцију срца и ток болести код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом. Акумулација фиброзног ткива у миокарду леве коморе доводи до губитка нормалне функције миокарда и поремећаја контрактилности, чиме се смањује способност срца да ефикасно “пумпа” крв. Код пацијената са HFrEF, фиброза настаје углавном као последица губитка кардиомиоцита, што доводи до систолне дисфункције леве коморе.

У нашем истраживању, HE бојење је коришћено за процену морфологије миокарда. CTRL група је имала регуларну морфолошку структуру без едема кардиомиоцита, инфилтрације инфламацијских ћелија или интерстицијалног едема, док је HF група показала некрозу, дилатиран интерстицијум, повећану ћелијску густину са моноклеарним инфламацијским ћелијама и ћелијама типа фибробласт-фиброцит. Морфологија срца у леченим групама била је побољшана у поређењу са HF групом, са умереним променама као што су дискретни интерстицијални едем, запаљенска инфилтрација и хипертрофија појединачних кардиомиоцита. У поређењу са CTRL

групом, површина пресека (CSA) кардиомиоцита у HF групи била је значајно већа (за 70%), као и LSD (за 62%). Групе HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V показале су значајно смањење CSA кардиомиоцита (за 20%, 46% и 40%, респективно) и LSD (за 20%, 42% и 35%, респективно) у поређењу са HF групом. Док није било значајне разлике између HF-S/V и HF-EMPA+S/V група у погледу CSA кардиомиоцита и LSD, обе су значајно смањиле ове параметре у поређењу са HF-EMPA групом. Ипак, лечене групе су имале значајно већу CSA и LSD у поређењу са CTRL групом.

Примена сакубитрил/валсартана (HF-S/V група) је имала приближно исте протективне ефекте комбинована примена емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана (HF-EMPA+S/V група), док је монотерапија емпаглифлозином (HF-EMPA) показала мање протективно дејство на морфологију и фиброзу миокарда. У једној експерименталној студији, примена ISO је узроковала појаву интерстицијалног едема и субендокардијалне фиброзе, које су биле праћене дегенерацијом и смрћу кардиомиоцита, повећаним садржајем колагена и хелијским инфилтратом (492). У студији *Chung*-а и његових сарадника, уочени су слични ефекти емпаглифлозина на фиброгенезу миокарда, као у нашем истраживању. Наиме, третман емпаглифлозином је смањио миграцију и продукцију колагена у хуманим кардиомиоцитима срчаних преткоморација и унапредио регулацију Ca^{2+} (493). У другом делу поменуте студије, који је подразумевао коришћење експерименталног модела срчане инсуфицијенције изазване применом ISO код пацова, показано је да овај агенс побољшава систолну и смањује фиброзу миокарда (493). Примена емпаглифлозина код мишева са изазваним дијабетесом испољава антифибротска својства, која су посредована инхибицијом продукције колагена преко TGF- β /Smad и Nrf2/ARE сигналне каскаде, што се манифестује побољшањем структуре и функције миокарда (343). Поред тога, емпаглифлозин значајно смањује експресију колагена у ткиву миокарда, превасходно смањењем про-Coll1 α 1 и MMP-9 код мишева третираних са DOX (344). Слично томе, третман сакубитрил/валсартаном је смањио садржај Coll1 и Col3 у ткиву миокарда пацова са HFpEF (494). Аутори ове студије су указали да је инхибиција TGF- β 1/Smad3 сигналне каскаде један од важних механизма за антифибротско дејство сакубитрил/валсартана. Побољшање срчане функције уочено код пацова са ИМ који су третиран сакубитрил/валсартаном, ефекат је који се повезује управо са антихипертрофичким и антифибротским дејством овог агенса (222). Прецизније, смањење фиброзе применом сакубитрил/валсартана повезано је са смањењем интерстицијалне, али не и периваскуларне фиброзе (222). Поред тога, антифибротски ефекти сакубитрил/валсартана су у великој мери повезани са дејством сакубитрил компоненте. Наиме, значајно снижење mRNA експресије TGF- β 1 и Coll1 α 1 уочено је при примени сакубитрил/валсартана у односу на монотерапију валсартаном (224).

У нашем истраживању, најпроминентнији протективни ефекат на морфологију и фиброзу миокарда уочен је у групама животиња које су третиране сакубитрил/валсартаном (HF-S/V и HF-EMPA+S/V група), што указује на снажно дејство овог агенса на патохистолошке промене миокарда у срчаној инсуфицијенцији изазваној применом ISO. Обзиром да нема довољно података о ефектима коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на хистоморфолошке карактеристике миокарда у моделу срчане инсуфицијенције, из досадашњих истраживања можемо закључити да се сакубитрил/валсартан показао као ефикаснији у спречавању фиброзе миокарда, највероватније путем инхибиције TGF- β 1/Smad3 сигналне каскаде. Са друге стране, емпаглифлозин такође утиче на TGF- β 1/Smad3 сигнализацију, али доприноси редукцији фиброзе и хипертрофије делимично и смањењем експресије колагена и побољшањем хомеостазе Ca^{2+} . Комбинована примена емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана би могла бити најповољнија по очување

хистоморфологије миокарда, обзиром да на синергистички ефекат ових агенаса потенциран циљањем различитих молекуларних сигналних каскада.

5.8 УТИЦАЈ КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И САКУБИТРИЛ/ВАЛСАРТАНА НА РЕЛАТИВНУ ГЕНСКУ ЕКСПРЕСИЈУ ОДРЕЂЕНИХ МАРКЕРА КОД ПАЦОВА СА СРЧАНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ

5.8.1 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на релативну генску експресију антиоксидационих маркера код пацова са срчаном инсуфицијенцијом

Као што је претходно описано, оксидациони стрес је у уско повезан са патофизиологијом срчане инсуфицијенције, обзиром да је неколико молекуларних механизма препознато у вези са оксидационим оштећењем миокарда (495). Резултати нашег истраживања показали су да је експресија гена за SOD-1, SOD-2 и eNOS значајно снижена у HF групи у односу на CTRL групу, што указује на смањену антиоксидативну заштиту и потенцијално оштећену ендотелну функцију у условима срчане инсуфицијенције. Примена ISO узрокује значајно смањење експресије SOD-1 и SOD-2 код пацова (496), што је у складу са резултатима добијеним у нашем истраживању. Код пацијената са кардиоваскуларним болестима показан је постепени пад активности екстрацелуларне SOD у односу на развој поремећаја геометрије леве коморе, указујући да овај маркер може да буде повезујући чинилац ремоделовања леве коморе и развоја срчане инсуфицијенције код ове популације пацијената (497). Поред тога, у студији коју су спровели Deger и сарадници, примена ISO код пацова узроковала је значајан пораст експресије iNOS и eNOS у односу на здраве животиње, што је праћено оштећењем кардиомиоцита и развојем некротичних подручја у ткиву миокарда (498). Међутим, иако је експресија гена за eNOS у нашем истраживању била значајно снижена у HF групи у односу на CTRL групу, експресија гена за iNOS је била значајно повишена.

У нашем истраживању, примена терапијских протокола (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V група) је изазвала различите ефекте на експресију гена за SOD-1, SOD-2 и eNOS. Експерименталне групе третиране емпаглифлозином (HF-EMPA и HF-EMPA+S/V група) су имале значајно већу експресију SOD-1 у поређењу са HF групом, што указује на потенцијални антиоксидативни ефекат емпаглифлозина, било у монотерапији или у комбинацији са сакубитрил/валсартаном. Међутим, у HF-S/V групи, експресија SOD-1 је била нижа у поређењу са CTRL групом, што може сугерисати да овај третман нема исту способност повећања антиоксидативне одбране као у случају комбиноване терапије са емпаглифлозином. Када је у питању експресија SOD-2, сви терапијски протоколи (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V група) су показали значајно нижи ниво у односу на CTRL групу, али је само група третирана двојном терапијом (HF-EMPA+S/V група) показала значајно повећање експресије гена за SOD-2

у поређењу са HF групом. Овај налаз указује да комбинована терапија може имати предност у погледу регулације SOD и смањења оксидативног оштећења.

У експерименталној студији, *Cotrin* и сарадници су показали да примена емпаглифлозина ефикасно повећава генску експресију SOD-1 и SOD-2 и доводи до ефикасне превенције ремоделовања миокарда код мишева на масној дијети (499), што је у складу са нашим резултатима. Са друге стране, ефекти сакубитрил/валсартана на генску експресију SOD-1 и SOD-2 нису довољно испитани у моделима кардиоваскуларне патологије и срчане инсуфицијенције изазване применом ISO. Међутим, примена сакубитрил/валсартана узрокује повећање експресије SOD у моделу дијабетесне нефропатије код пацова (500), што је праћено превенцијом прогресије бубрежне патологије. Поред тога, сматра се да је главни механизам ренопротективних ефеката сакубитрил/валсартана инхибиција NLRP3-CASP-1 сигналне каскаде и последичног смањења инфламације, оксидационог стреса и фиброзног процеса (500).

У нашем истраживању, сви терапијски протоколи (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) су довели до значајног пораста генске експресије за eNOS у поређењу са HF групом. Интересантно је да је у групи која је третирана двојном терапијом (HF-EMPA+S/V група) забележена најнижа експресија гена за eNOS у односу на друге две терапијске групе, са статистичком значајношћу уоченом у односу на HF-S/V групу. Такође, третман емпаглифлозином је повећао експресију cGCH1, што је праћено повећаном активацијом nNOS и eNOS, као и смањеном активацијом iNOS и коначно превенцијом ремоделовања миокарда код дијабетичних пацова са ИМ (370). Сматра се да је један од механизма који је одговоран за кардиопротективне ефекте емпаглифлозина повезан са повећањем концентрације NO у наведеној студији (370). Претходно је показано да је активација iNOS у периферним крвним судовима уско повезана са проинфламаторним цитокинима и да може имати значајну улогу у патогенези срчане инсуфицијенције ³ неповољним исходом (501). У нашем истраживању сви терапијски протоколи (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V група) су довели до значајног снижења генске експресије iNOS у односу на HF групу. Иако нису уочене значајне разлике између терапијских протокола, двојна терапије (HF-EMPA+S/V група) је имала тенденцију највеће ефикасности у снижењу генске експресије iNOS. Претходне студије су показале повишену активност iNOS у срчаној инсуфицијенцији, као и у дијабетесној кардиомиопатији, што је даље праћено порастом продукције NO и ROS (502). Ови резултати су у великој мери у складу са резултатима који су проистекли из нашег истраживања. У студији *Chauhan* и сарадника, уочена је повећана протеинска експресија iNOS и плазма концентрација NOx у моделу ендотелне дисфункције узроковане применом липополисахаридом (енгл. *Lipopolysaccharide* - LPS) код мишева, док код iNOS нокаут мишева није дошло до промене у концентрацији NOx (503). Ови резултати указују на повезаност између iNOS активности и ендотелне дисфункције (503). Поред тога, *Koyani* и сарадници су показали да примена емпаглифлозина смањује активацију iNOS у кардиомиоцитима мишева који су третирани LPS, што је праћено побољшањем кардиоваскуларне функције (504). Са друге стране, ефекти сакубитрил/валсартана на генску експресију eNOS и iNOS у моделима кардиоваскуларне патологије нису довољно истражени, иако постоје индиције да овај агенс може модификовати NOS сигналну каскаду у одређеним патолошким стањима. Протективни ефекти сакубитрил/валсартана испитивани су у моделу оштећења плућа узрокованог применом циклофосамида код пацова (505). Аутори су показали да сакубитрил/валсартан значајно смањује експресију маркера инфламације и ублажава фиброзу плућног ткива (505). Иако у овој студији није директно одреживана генска експресија eNOS и iNOS, описани антиинфламаторни ефекти сакубитрил/валсартана могу указивати на потенцијалну модулацију NOS сигнализације.

Резултати нашег истраживања потврђују да је срчана инсуфицијенција праћена смањењем експресије антиоксидативних ензима (SOD-1, SOD-2) и eNOS-a, као и повећањем iNOS експресије, што указује на поремећену NO сигнализацију и повећан оксидативни стрес. Сви испитивани терапијски протоколи допринели су побољшању ових параметара у различитој мери. Емпаглифлозин је посебно утицао на повећање SOD-1, док су eNOS нивои умерено повећани у свим третираним групама. Са друге стране, комбинована терапија емпаглифлозином и сакубитрил/валсартаном је показала највећу ефикасност у нормализацији експресије SOD-2 и iNOS. Резултати указују да комбинована терапија има највећи потенцијал у смањењу оксидативног стреса и побољшању NO сигнализације код срчане инсуфицијенције изазване ISO код пацова.

5.8.2 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на релативну генску експресију (анти)инфламационих маркера код пацова са срчаном инсуфицијенцијом

Инфламаторни процес представља један од кључних механизма у патофизиологији срчане инсуфицијенције. Код HFrEF, инфламација се развија као последица „индексног” догађаја и периферне хиперперфузије ткива (70). Идентификација повишених нивоа проинфламаторних цитокина код пацијената са HFrEF означила је нову еру у истраживањима улоге имунолошког система у овој болести (69).

Резултати претходних истраживања указују на значајну улогу NF- κ B у прогресији срчане инсуфицијенције, са смањењем његове активности након побољшања срчане функције, на пример кроз употребу помоћног уређаја за леву комору (енгл. *Left ventricle assist device* - LVAD) (506). У нашем истраживању показано је примена ISO узрокује повећану експресију гена за NF- κ B у HF групи поређењу са CTRL групом, што указује на појачану инфламацију у нашем моделу срчане инсуфицијенције. Такође, у студијама сличног дизајна показано је да примена ISO узрокује инсуфицијенцију антиоксидационог система, оксидационог оштећења и пораста проинфламацијских маркера, укључујући NF- κ B (507, 508). У нашем истраживању, сви терапијски протоколи (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) су имала значајно нижу експресију гена за NF- κ B у односу на HF групу, што указује на изразит антиинфламацијски потенцијал примењених агенаса. Наши резултати су у складу са претходним студијама које су показале да емпаглифлозин (509), као и сакубитрил/валсартан (510) могу смањити активацију NF- κ B и тиме ублажити инфламаторне процесе у организму.

Пре скоро три деценије, Seta и колеге су поставили “citoкинску хипотезу”, која прогресију срчане инсуфицијенције повезује са повећањем концентрације ендогених цитокина (511). У једној мета-анализи која је укључивала 28 студија откривено је да пацијенти са хроничном срчаном инсуфицијенцијом имају значајно повећане нивое TNF- α , IL-6, IL-1 β и C-реактивног протеина (енгл. *C-reactive protein* - CRP) у периферној крви у поређењу са здравим особама (512). Примена ISO у нашем истраживању изазвала је значајан пораст проинфламацијских цитокина (TNF- α , IL-6, IL-1 β , и IL-37) у HF групи у односу на CTRL групу. Иако су сва три терапијска протокола (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) значајно снизила експресију гена за TNF- α у односу на CTRL групу, експресија гена за овај параметар је била значајно нижа у поређењу са HF групом, са највећом ефикасношћу уоченом током примене двојне терапије (HF-EMPA+S/V група). Поред тога, сви терапијски протоколи у нашем истраживању (HF-EMPA, HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) узроковали су

значајно ниже експресије гена за IL-6, IL-1 β и IL-17 у односу на HF групу. Што се тиче експресије гена за антиинфламацијске цитокине (IL-10 и IL-13) уочена је значајно нижа експресија гена за IL-10 у HF групи у поређењу са CTRL групом, док примењени терапијски протоколи нису показали значајан утицај на антиинфламацијске цитокине у односу на HF групу, што може значити да ови третмани примарно делују на сузбијање проинфламацијских механизма, али не и на повећање антиинфламацијског одговора.

Једна проспективна студија је показала да терапија емпagliфлозином током три месеца значајно смањује нивое IL-6 код пацијената са срчаном слабошћу и ДМТ2, што је праћено побољшањем квалитета живота и функционалног капацитета ових пацијената (513). У студији коју су спровели Gan и колеге, примена сакубитрил/валсартана је побољшала срчану функцију и смањила ремоделовање миокарда инхибицијом триптофан/кинурина метаболизма и смањењем инфламације код пацова са срчаном инсуфицијенцијом (514). Ова студија је уједно забележила и значајно смањење експресије инфламаторних фактора као што су IL-1 β , TNF- α и IL-6 након третмана сакубитрил/валсартаном (514). Иако до сада није довољно испитан ефекат комбиноване примене емпagliфлозина и сакубитрил/валсартана на про- и антиинфламацијске маркере код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом, студије о овим лековима примењеним самостално указују на њихове потенцијалне антиинфламацијске ефекте. Наши резултати додатно потврђују значајну улогу инфламацијских механизма у патогенези срчане инсуфицијенције. Примењени терапијски протоколи, посебно комбинована терапија емпagliфлозином и сакубитрил/валсартаном, показали су изражен антиинфламацијски ефекат, што се огледа у смањењу експресије кључних инфламацијских маркера. Ови налази указују на потенцијал комбиноване примене емпagliфлозина и сакубитрил/валсартана у клиничкој пракси који је усмерен на модулацију инфламацијског одговора код пацијената са HFrEF.

5.8.3 Утицај комбиноване примене емпagliфлозина и сакубитрил/валсартана на релативну генску експресију (анти)апоптотских маркера код пацова са срчаном инсуфицијенцијом

У нашем истраживању уочено је да HF група показује нижу експресију Bcl-2, као и повишену експресију Bax у односу на CTRL групу. Поред тога, генске експресије CASP-3 и CASP-9 су биле значајно повишене у HF групи у односу на CTRL групу. Сви терапијски протоколи који су примењени у нашем истраживању (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V групе) су значајно повећали релативну генску експресију Bcl-2 у односу на HF групу. Сва три терапијска протокола (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V групе) ефикасно су смањили релативну генску експресију Bax. Иако су сва три терапијска протокола (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V групе) имала значајно вишу релативну генску експресију CASP-3 и CASP-9 у односу на CTRL групу, уједно су и ефикасно снижили ове параметре у односу на HF групу.

Резултати претходних студија показали су да примена емпagliфлозина превенира ћелијску смрт у моделима И/Р повреде и дијабетичке кардиомиопатије активирајући антиапоптотске факторе и смањујући ROS-зависну ћелијску смрт, као и однос про- и антиапоптотских молекула (254). Поред тога, неколико претклиничких студија показало је да сакубитрил/валсартан (C/B) има антиапоптотске ефекте који се манифестују смањењем експресије апоптотских маркера као што су Bax и Bcl-2, као и смањењем активности каспазе-3, што указује на његов потенцијал у заштити миокарда (190). Иако у нашем истраживању није уочена статистички значајна разлика између терапијских група у погледу генске експресије испитиваних (анти)апоптотских маркера,

примена двојне терапије је имала тенденцију да буде најефикаснија у снижењу генске експресије Bcl-2, CASP-3 и CASP-9, као и повећања генске експресије Bax, што указује на потенцијалну способност овог терапијског приступа у модулацији апоптотских путева и заштити од ћелијске смрти у срчаној инсуфицијенцији.

5.8.4 Утицај комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана на релативну генску експресију одређених сигналних молекула код пацова са срчаном инсуфицијенцијом

У нашем истраживању испитивана је релативна генска експресија одређених сигналних молекула код пацова са срчаном инсуфицијенцијом, као и ефекат промењених терапијских протокола. Резултати су показали да је релативна генска експресија JAK2 и STAT3 била значајно повишена у HF групи у поређењу са CTRL групом. Сви терапијски протоколи (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V групе) су довели до значајног снижења релативне генске експресије JAK2 и STAT3 у односу на HF групу, иако су ове вредности биле значајно повишене у односу на CTRL групу.

Претходне студије су указале на потенцијалне ефекте емпаглифлозина на JAK2/STAT3 сигналну каскаду. Наиме, третман емпаглифлозином је значајно снизио ниво IL-6 код пацијената са кардиореналним синдромом тип 2, што је било праћено повећањем нивоа JAK2 и STAT3 (515). Ови резултати сугеришу да емпаглифлозин може имати антиинфламаторне ефекте који су повезани са активацијом JAK2/STAT3 сигналних путева (515). Поред тога, у експерименталном моделу H/R изолованих кардиомиоцита изложених условима високог нивоа глукозе, примена емпаглифлозина је активирала JAK2/STAT3 сигнални пут, што је допринело заштити кардиомиоцита од H/R повреде (485). Међутим, након смањења експресије STAT3, заштитни ефекат емпаглифлозина је био ослабљен, што указује на важност овог пута у његовој заштитној активности (485). Са друге стране, директни ефекти сакубитрил/валсартана на JAK2/STAT3 сигнализацију нису довољно истражени.

Резултати неколико студија које су испитивале кардиомиопатију узроковану дијабетесом и HF су утврдили повишену активност mTORC1, док инхибиција mTORC1 доводи до повољних кардиопротективних ефеката, што сугерише значајну улогу прекомерне активације mTORC1 у овој патологији (516). Међутим, у нашем истраживању, релативна генска експресија mTOR је била значајно снижена у HF групи и свим групама које су имале терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V група) у односу на CTRL групу. Међутим, у групама код којих се примењивао сакубитрил/валсартан (HF-S/V и HF-EMPA+S/V група) забележено је значајно повећање релативне генске експресије mTOR у односу на HF групу, што није био случај у HF-EMPA групи, која је имала значајно нижу релативну генску експресију mTOR у односу на HF-EMPA+S/V групу.

У нашем истраживању, релативна генска експресија PPAR γ је била значајно снижена у HF групи и свим групама које су имале терапијски протокол (HF-EMPA, HF-S/V, и HF-EMPA+S/V групе) у односу на CTRL групу. Интересантно је да је релативна генска експресија PPAR γ повећана само у HF-EMPA+S/V групу у односу на HF групу, као и да су HF-EMPA и HF-S/V имале значајно нижу релативну генску експресију PPAR γ у односу на HF-EMPA+S/V групу. Недавна истраживања су показала да сакубитрил/валсартан повећава серумске нивое фибробластног раста фактора 21 (енгл. *Fibroblast growth factor 21* - FGF21) код пацијената са акутним инфарктом миокарда, посредујући свој кардиопротективни ефекат преко интеракције са PPAR рецепторима (517).

VI ЗАКЉУЧЦИ

- Резултати овог истраживања су у сагласју са другим истраживањима која су имала сличне циљеве и методолошки приступ. Примена ISO је индуковала значајно смањење параметара срчане функције, SBP, DBP и MAP, чиме је практично потврђено индуковање HF. Све терапијске опције у истраживању, емпаглифлозин, сакубитрил/валсартан, као и њихова комбинована примена, позитивно су утицале на вредности наведених параметара. Међутим, комбинована примена емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана је имала супериорнији ефекат у поређењу са самосталном применом ових лекова. Са друге стране ефекти на HR су изостали, тако да је вредност HR остала знатно нижа у односу на здраву контролу.
- Анализом *in vivo* функције срца кроз ехокардиографске параметре потврђује се супериорнији ефекат комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана у односу на монотерапијски приступ. Наиме, ова два лека имају синергистички ефекат у унапређењу вредности FS и EF и превенцији настанка дилатације леве коморе.
- Ретроградном перфузијом изолованих срца пацова користећи протокол ауторегулације на *Langendorff* апарату потврђена је ефикасност комбиноване апликације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана у превенцији функционалног оштећења миокарда. Наиме, показано је да је двојна терапија имала најзначајнији позитивни ефекат на инотропну и луситропну функцију миокарда, SBP, HR и CF.
- Хистоморфолошка анализа препарата миокарда бојених H/E и PSR техником указала је на чињеницу да је очување функционалних способности срца услед примене двојне терапије емпаглифлозином и сакубитрил/валсартаном потврђено морфолошким анализом. Наиме, најмање оштећења миокарда уочава се у групи где су примењени емпаглифлозин и сакубитрил/валсартан, као и најмањи степен фиброзе. Анализом промена BW, HW и HW/BW индекса такође се потврђује знатнији протективни ефекат комбиноване примене испитиваних лекова у односу на монотерапијски приступ.
- Вредности кардиоспецифичних маркера cTnI и NT-proBNP били су знатно виши у групама у којима је примењен ISO. Ни један од примењених терапијских модалитета није редуковао маркере оштећења миокарда у довољној мери да би се разликовали од групе без терапије, тако да су остали знатно виши у односу на контролну групу.
- Комбинована примена емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана имала је најизраженији антиоксидациони ефекат кроз редукцију прооксидационих маркера и повећање ефикасности система антиоксидационе заштите. Антиоксидациони ефекти примењених терапијских модалитета међусобно корелирају у различитим узорцима - плазма и лизат еритроцита (системски оксидациони статус) и хомогенату миокарда и коронарном венском ефленту (кардиогени оксидациони статус). Овакви резултати указују на значај оксидационог стреса у петогенези HF, а самим тим и оксидациони стрес као терапијску мету.

- Испитивањем релативне генске експресије гена који кодирају факторе значајне за оксидациони статус (SOD-1, SOD-2, eNOS, iNOS) и инфламацијски одговор (NF-κB, TNFα, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17) уочава се сличан антиоксидациони и антиинфламацијски потенцијал испитиваних терапијских модалитета, уз наглашенији протективни потенцијал комбиноване примене емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана. Наведена чињеница говори у прилог повезаности запаљенског одговора и оксидационог стреса.
- Испитивањем релативне генске експресије апоптотских маркера (Bcl-2, Bax, CASP-3, CASP-9), показано је да сви испитивани терапијски модалитети имају антиапоптотски ефекат, при чему нема значајних разлика у зависности од тога да ли је примењен емпаглифлозин или/и сакубитрил/валсартан. Овакви резултати указују на чињеницу да је део протективног ефекта постигнут кроз регулацију апоптотских механизма.
- Анализом укупних резултата истраживања, уочава се значајан кардиопротективни потенцијал и емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана, али њихова комбинована примена има већи потенцијал у лечењу HF на експерименталном моделу који је примењен у овој студији.

VII РЕФЕРЕНЦЕ

1. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*. 2016;37(27):2129-2200.
2. Braunwald E. Shattuck lecture—cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med*. 1997;337:1360-1369.
3. Roger VL. Epidemiology of Heart Failure: A Contemporary Perspective. *Circ Res*. 2021;128(10):1421-1434.
4. GBD 2017 Disease and injury incidence and prevalence collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392:1789-1858.
5. Bragazzi NL, Zhong W, Shu J, Abu Much A, Lotan D, Grupper A, et al. Burden of heart failure and underlying causes in 195 countries and territories from 1990 to 2017. *Eur J Prev Cardiol* 2021;28:1682-1690.
6. Martin SS, Aday AW, Allen NB, Almarzooq ZI, Anderson CAM, Arora P, et al. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Committee. 2025 Heart Disease and Stroke Statistics: A Report of US and Global Data From the American Heart Association. *Circulation*. 2025;151(8):e41-e660.
7. van Riet EE, Hoes AW, Wagenaar KP, Limburg A, Landman MA, Rutten FH. Epidemiology of heart failure: the prevalence of heart failure and ventricular dysfunction in older adults over time. A systematic review. *Eur J Heart Fail*. 2016;18:242-252.
8. Savarese G, Becher PM, Lund LH, Seferovic P, Rosano GMC, Coats AJS. Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology. *Cardiovascular research*. 2023;118(17):3272-3287.
9. Dweck MR, Bularga A, Hahn RT, Bing R, Lee KK, Chapman AR, et al. Global evaluation of echocardiography in patients with COVID-19. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2020;21:949-958.
10. Blecker S, Paul M, Taksler G, Ogedegbe G, Katz S. Heart failure-associated hospitalizations in the United States. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:1259-1267
11. Nieminen MS, Brutsaert D, Dickstein K, Drexler H, Follath F, Harjola VP, et al. EuroHeart Failure Survey II (EHFS II): a survey on hospitalized acute heart failure patients: description of population. *Eur Heart J*. 2006;27:2725-2736.
12. Schmidt M, Ulrichsen SP, Pedersen L, Bøtker HE, Sørensen HT. Thirty-year trends in heart failure hospitalization and mortality rates and the prognostic impact of comorbidity: a Danish nationwide cohort study. *European journal of heart failure*. 2016;18(5):490-499.
13. Mamas MA, Sperrin M, Watson MC, Coutts A, Wilde K, Burton C, et al. Do patients have worse outcomes in heart failure than in cancer? A primary care-based cohort study with 10-year follow-up in Scotland. *European journal of heart failure*. 2017;19(9):1095-1104.
14. Shah KS, Xu H, Matsouaka RA, Bhatt DL, Heidenreich PA, Hernandez AF, et al. Heart Failure With Preserved, Borderline, and Reduced Ejection Fraction: 5-Year Outcomes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2017;70(20):2476–2486.
15. Ponikowski P, Anker SD, AlHabib KF, Cowie MR, Force TL, Hu S, et al. Heart failure: preventing disease and death worldwide. *ESC Heart Fail*. 2014;1(1):4-25.
16. Koh AS, Tay WT, Teng THK, Vedin O, Benson L, Dahlstrom U, et al. A comprehensive population-based characterization of heart failure with mid-range ejection fraction. *Eur J Heart Fail*. 2017;19:1624-1634.
17. Tanai E, Frantz S. Pathophysiology of Heart Failure. *Comprehensive Physiology*. 2015; 6(1):187-214.

18. Cook C, Cole G, Asaria P, Jabbour R, Francis DP. The annual global economic burden of heart failure. *Int J Cardiol.* 2014;171:368-376.
19. Davis RC, Hobbs FD, Lip GY. ABC of heart failure. History and epidemiology. *BMJ.* 2000;320(7226):39-42.
20. Bianucci R, Loynes RD, Sutherland ML, Lallo R, Kay GL, Froesch P, et al. Forensic analysis reveals acute decompensation of chronic heart failure in a 3500-year-old Egyptian diaphragm. *J Forensic Sci.* 2016;61:1378-1381.
21. Swedberg K, Held P, Kjeksus J, Rasmussen K, Rydén L, Wedel H. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *The New England journal of medicine* 1987;316(23):1429-1435.
22. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, et al. ESC Scientific Document Group. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2021;21;42(36):3599-3726.
23. Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, Allen LA, Byun JJ, Colvin MM, et al. AHA/ACC/HFSA guideline for the management of heart failure: a report of the American college of cardiology/American heart association joint committee on clinical practice guidelines. *Circulation.* 2022;145(18):e895-1032
24. Al-Khatib SM, Stevenson WG, Ackerman MJ, Bryant WJ, Callans DJ, Curtis AB, et al. 2017 AHA/ACC/HRS guideline for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on clinical practice guidelines and the Heart Rhythm Society. *Circulation.* 2018;138:e272-e391.
25. Bozkurt B, Coats AJS, Tsutsui H, Abdelhamid CM, Adamopoulos S, Albert N, et al. Universal definition and classification of heart failure: a report of the Heart Failure Society of America, Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Japanese Heart Failure Society and Writing Committee of the Universal Definition of Heart Failure: Endorsed by the Canadian Heart Failure Society, Heart Failure Association of India, Cardiac Society of Australia and New Zealand, and Chinese Heart Failure Association. *Eur J Heart Fail.* 2021;23(3):352-380.
26. Suthahar N, Meijers WC, Silljé HHW, de Boer RA. From Inflammation to Fibrosis-Molecular and Cellular Mechanisms of Myocardial Tissue Remodelling and Perspectives on Differential Treatment Opportunities. *Curr Heart Fail Rep.* 2017;14(4):235-250.
27. Hummel A, Empe K, Dörr M, Felix SB. De novo acute heart failure and acutely decompensated chronic heart failure. *Deutsches Arzteblatt international* 2015;112(17):298-310.
28. Schwinger RHG. Pathophysiology of heart failure. *Cardiovascular diagnosis and therapy.* 2021;11(1):263-276.
29. Crespo-Leiro MG, Metra M, Lund LH, Milicic D, Costanzo MR, Filippatos G, et al. Advanced heart failure: a position statement of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail.* 2018;20:1505-1535.
30. Stevenson LW, Pagani FD, Young JB, Jessup M, Miller L, Kormos RL, et al. INTERMACS profiles of advanced heart failure: the current picture. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation.* 2009;28(6):535-541.
31. Killip T 3rd, Kimball JT. Treatment of myocardial infarction in a coronary care unit. A two year experience with 250 patients. *Am J Cardiol.* 1967;20:457-464.
32. Caraballo C, Desai NR, Mulder H, Alhanti B, Wilson FP, Fiuzat M, et al. Clinical Implications of the New York Heart Association Classification. *Journal of the American*

Heart Association. 2019;8(23):e014240.

33. Nohria A, Tsang SW, Fang JC, Lewis EF, Jarcho JA, Mudge GH, et al. Clinical assessment identifies hemodynamic profiles that predict outcomes in patients admitted with heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1797–1804.

34. Huang WM, Feng JY, Cheng HM, Chen SZ, Huang CJ, Guo CY, et al. The role of pulmonary function in patients with heart failure and preserved ejection fraction: Looking beyond chronic obstructive pulmonary disease. *PloS one*. 2020;15(7):e0235152.

35. Lewis EF, Moya LA, Rouleau JL, Sacks FM, Arnold JMO, Warnica JW, et al. Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: the CARE study. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1446–53.

36. Solomon SD, Anavekar N, Skali H, McMurray JJV, Swedberg K, Yusuf S, et al. Influence of ejection fraction on cardiovascular outcomes in a broad spectrum of heart failure patients. *Circulation*. 2005;112:3738–44.

37. Chioncel O, Lainscak M, Seferovic PM, Anker SD, Crespo-Leiro MG, Harjola VP, et al. Epidemiology and one-year outcomes in patients with chronic heart failure and preserved, mid-range and reduced ejection fraction: an analysis of the ESC Heart Failure Long-Term Registry. *European journal of heart failure*. 2017;19(12):1574–1585.

38. Давидовић ГТ. Патфизиолошке osnove savremene terapije srčane insuficijencije: monografija. Kragujevac: Univerzitet, Medicinski fakultet; 2008. 284 p.

39. Mann DL. The evolution of modern theory and therapy for heart failure. *Progress in Pediatric Cardiology* 2014;37(1-2):9–12.

40. Packer M. How should physicians view heart failure? The philosophical and physiological evolution of three conceptual models of the disease. *The American Journal of Cardiology*. 1993;71(9):C3–C11.

41. Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, et al. Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *The New England journal of medicine*. 1991;325(21):1468-1475.

42. Louridas GE, Lourida KG. Systems biology and biomechanical model of heart failure. *Curr Cardiol Rev*. 2012;8(3):220-30.

43. Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation*. 2005;111:2837-49.

44. Ge Z, Li A, McNamara J, dos Remedios C, Lal S. Pathogenesis and pathophysiology of heart failure with reduced ejection fraction: translation to human studies. *Heart Failure Reviews*. 2019;24(5):743-758.

45. Baman JR, Ahmad FS. Heart Failure. *JAMA*. 2020;8;324(10):1015.

46. G-CHF Investigators, Joseph P, Roy A, Lonn E, Störk S, Floras J, et al. Global Variations in Heart Failure Etiology, Management, and Outcomes. *JAMA*. 2023;329(19):1650-1661.

47. McMurray JJ, Pfeffer MA. Heart failure. *The Lancet*. 2005;365(9474):1877-1889.

48. Shah SJ, Borlaug BA, Kitzman DW, McCulloch AD, Blaxall BC, Agarwal R, et al. Research Priorities for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group Summary. *Circulation*. 2020;141(12):1001-1026.

49. Rastogi A, Novak E, Platts AE, Mann DL. Epidemiology, pathophysiology and clinical outcomes for heart failure patients with a mid-range ejection fraction. *Eur J Heart Fail*. 2017;19(12):1597-1605.

50. Simmonds SJ, Cuijpers I, Heymans S, Jones EAV. Cellular and Molecular Differences between HFpEF and HFrEF: A Step Ahead in an Improved Pathological Understanding. *Cells*. 2020;9(1):242.

51. Savarese G, Stolfo D, Sinagra G, Lund LH. Heart failure with mid-range or mildly reduced ejection fraction. *Nature reviews. Cardiology*. 2022;19(2):100-116.

52. Metra M, Cotter G, Gheorghiade M, Dei Cas L, Voors AA. The role of the kidney in heart failure. *Eur Heart J*. 2012;33(17):2135-42.
53. Witman MA, Garten RS, Gifford JR, Groot HJ, Trinity JD, Stehlik J, et al. Further Peripheral Vascular Dysfunction in Heart Failure Patients With a Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device: The Role of Pulsatility. *JACC Heart Fail*. 2015;3(9):703-11.
54. Kinugawa S, Takada S, Matsushima S, Okita K, Tsutsui H. Skeletal Muscle Abnormalities in Heart Failure. *Int Heart J*. 2015;56(5):475-84.
55. Hartupee J, Mann DL. Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(1):30-38.
56. Maruyama K, Imanaka-Yoshida K. The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis: A Review of Recent Progress. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(5):2617.
57. Rienks M, Papageorgiou AP, Frangogiannis NG, Heymans S. Myocardial extracellular matrix: an ever-changing and diverse entity. *Circ Res*. 2014;114(5):872-88.
58. Onursal C, Dick E, Angelidis I, Schiller HB, Staab-Weijnitz CA. Collagen Biosynthesis, Processing, and Maturation in Lung Ageing. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:593874.
59. Sygitowicz G, Maciejak-Jastrzębska A, Sitkiewicz D. A Review of the Molecular Mechanisms Underlying Cardiac Fibrosis and Atrial Fibrillation. *J Clin Med*. 2021;27;10(19):4430.
60. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991;83:1849-65.
61. Yousefi F, Shabaninejad Z, Vakili S, Derakhshan M, Movahedpour A, Dabiri H, et al. TGF- β and WNT signaling pathways in cardiac fibrosis: non-coding RNAs come into focus. *Cell Commun Signal*. 2020;18:87.
62. Westermann D, Kasner M, Steendijk P, Spillmann F, Riad A, Weitmann K, et al. Role of left ventricular stiffness in heart failure with normal ejection fraction. *Circulation*. 2008;117: 2051-2060.
63. Saadat S, Nouredini M, Mahjoubin-Tehran M, Nazemi S, Shojaie L, Aschner M, et al. Pivotal Role of TGF- β /Smad Signaling in Cardiac Fibrosis: Non-coding RNAs as Effectual Players. *Front Cardiovasc Med*. 2021;7:588347.
64. van der Pol A, van Gilst WH, Voors AA, van der Meer P. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. *Eur J Heart Fail*. 2019;21(4):425-435.
65. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(6):H2181-90.
66. Gallo G, Rubattu S, Volpe M. Mitochondrial Dysfunction in Heart Failure: From Pathophysiological Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci*. 2024;25(5):2667.
67. Bugger H, Pfeil K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(7):165768.
68. Klimczak-Tomaniak D, Haponiuk-Skwarlińska J, Kuch M, Pączek L. Crosstalk between microRNA and Oxidative Stress in Heart Failure: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23):15013.
69. Adamo L, Rocha-Resende C, Prabhu SD, Mann DL. Reappraising the role of inflammation in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(5):269-285.
70. Aimo A, Castiglione V, Borrelli C, Saccaro LF, Franzini M, Masi S, et al. Oxidative stress and inflammation in the evolution of heart failure: From pathophysiology to therapeutic strategies. *Eur J Prev Cardiol*. 2020;27(5):494-510.
71. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: A report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol*

- 1996;27(5):1201-1206.
72. Lommi J, Pulkki K, Koskinen P, Näveri H, Leinonen H, Härkönen M, et al. Haemodynamic, neuroendocrine and metabolic correlates of circulating cytokine concentrations in congestive heart failure. *Eur Heart J*. 1997;18(10):1620-1625.
73. Kologrivova I, Shtatolkina M, Suslova T, Ryabov V. Cells of the Immune System in Cardiac Remodeling: Main Players in Resolution of Inflammation and Repair After Myocardial Infarction. *Front Immunol*. 2021;12:664457.
74. Paulus WJ, Tschope C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: Comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2013;62:263-271.
75. Darwish R. Regulatory mechanisms of apoptosis in regularly dividing cells. *Cell Health and Cytoskeleton*. 2010;2:59-68.
76. Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler HC, Arnon E, et al. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ. Res*. 2003;92:715-724.
77. Yang Y, Jiang G, Zhang P, Fan J. Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil Med Res*. 2015;2:12.
78. Narula J, Haider N, Arbustini E, Chandrashekar Y. Mechanisms of Disease: apoptosis in heart failure—seeing hope in death. *Nat Rev Cardiol*. 2006;3:681-688.
79. van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, De Windt LJ. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2005;67(1):21-29.
80. Wang H, Yu W, Wang Y, Wu R, Dai Y, Deng Y, et al. p53 contributes to cardiovascular diseases via mitochondria dysfunction: A new paradigm. *Free Radic Biol Med*. 2023;208:846-858.
81. Chen Y, Li S, Yang Z, Wang T, Yin F, Zhao X, et al. Value of Bax and Bcl2 expression in peripheral blood mononuclear cells for clinical prognosis of patients with chronic heart failure. *Medicine (Baltimore)*. 2024;103(3):e36943.
82. von Harsdorf R, Li PF, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation*. 1999;99:2934-2941.
83. Banerjee S, Biehl A, Gadina M, Hasni S, Schwartz DM. JAK-STAT signaling as a target for inflammatory and autoimmune diseases: Current and future prospects. *Drugs*. 2017;77(8):939.
84. Baldini C, Moriconi FR, Galimberti S, Libby P, De Caterina R. The JAK-STAT pathway: an emerging target for cardiovascular disease in rheumatoid arthritis and myeloproliferative neoplasms. *Eur Heart J*. 2021;42(42):4389-4400.
85. Villarino AV, Kanno Y, O'Shea JJ. Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nat Immunol*. 2017;18(4):374-384.
86. Kishore R, Verma SK. Roles of STATs signaling in cardiovascular diseases. *Jakstat*. 2012;1(2):118-124.
87. Podewski EK, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Morawietz H, Lichtenberg A, Wollert KC, et al. Alterations in Janus kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling in patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2003;107:798-802.
88. Jiang H, Yang J, Li T, et al. JAK/STAT3 signaling in cardiac fibrosis: a promising therapeutic target. *Front Pharmacol*. 2024;15:1336102.
89. Huo S, Shi W, Ma H, Yan D, Luo P, Guo J, et al. Alleviation of inflammation and oxidative stress in pressure overload-induced cardiac remodeling and heart failure via IL-6/STAT3 inhibition by raloxifene. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:6699054.
90. Li Q, Ye WX, Huang ZJ, Zhang Q, He YF. Effect of IL-6-mediated STAT3 signaling pathway on myocardial apoptosis in mice with dilated cardiomyopathy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(7):3042-3050.

91. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69:89-95.
92. Tijssen AJ, Pinto YM, Creemers EE. Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;303:H1085-H1095.
93. Lin DC, Diamandis EP, Januzzi JL Jr, Maisel A, Jaffe AS, Clerico A. Natriuretic peptides in heart failure. *Clin Chem.* 2014;60:1040-1046.
94. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Colvin MM, et al. 2017 ACC/AHA/HFSA focused update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on clinical practice guidelines and the Heart Failure Society of America. *Circulation.* 2017;136:e137-e161.
95. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med.* 1998;339:321-328.
96. Johns DG, Ao Z, Heidrich BJ, Hunsberger GE, Graham T, Payne L, et al. Dendroaspis natriuretic peptide binds to the natriuretic peptide clearance receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358(1):145-149.
97. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* 1981;28:89-94.
98. Currie MG, Geller DM, Cole BR, Siegel NR, Fok KF, Adams SP, et al. Purification and sequence analysis of bioactive atrial peptides (atriopeptins). *Science.* 1984;223:67-69.
99. Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha hANP). *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;118:131-139.
100. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature.* 1988;332:78-81.
101. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, et al. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *Journal of Clinical Investigation.* 1991;87:1402-1412.
102. Mukoyama M, Nakao K, Saito Y, Ogawa Y, Hosoda K, Suga S, et al. Increased human brain natriuretic peptide in congestive heart failure. *New England Journal of Medicine.* 1990;323:757-758.
103. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-Type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1990;168:863-870.
104. Rubattu S, Sciarretta S, Valenti V, Stanzione R, Volpe M. Natriuretic peptides: an update on bioactivity, potential therapeutic use, and implication in cardiovascular diseases. *American Journal of Hypertension.* 2008;21:733-741.
105. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocrine Reviews.* 2006;27:47-72.
106. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K. Atrial and brain natriuretic peptides: Hormones secreted from the heart. *Peptides.* 2018;111:18-25.
107. Nussenzveig DR, Lewicki JA, Maack T. Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *Journal of Biological Chemistry.* 1990;265:20952-20958.

108. Koh GY, Nussenzweig DR, Okolicany J, Price DA, Maack T. Dynamics of atrial natriuretic factor-guanylate cyclase receptors and receptor-ligand complexes in cultured glomerular mesangial and renomedullary interstitial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267: 11987-11994.
109. Seferovic JP, Solomon SD, Seely EW. Potential mechanisms of beneficial effect of sacubitril/valsartan on glycemic control. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*. 2020;11:2042018820970444.
110. D'Elia E, Iacovoni A, Vaduganathan M, Lorini FL, Perlini S, Senni M. Natriuretic peptide inhibition in heart failure: mechanisms and substrates beyond modulating natriuretic peptides. *European Journal of Heart Failure*. 2017;19:710-717.
111. Potter LR. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. *FEBS Journal*. 2011;278:1808-1817.
112. Bayes-Genis A, Morant-Talamante N, Lupón J. Natriuretic peptide regulation in Heart Failure. *Current Heart Failure Reports*. 2016;13(4):151-157.
113. Munagala VK, Burnett JC, Redfield MM. The natriuretic peptides in cardiovascular medicine. *Current Problems in Cardiology*. 2004;29:707-769.
114. Silver MA. The natriuretic peptide system: kidney and cardiovascular effects. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2006;15:14-21.
115. Díez J. Chronic heart failure as a state of reduced effectiveness of the natriuretic peptide system: implications for therapy. *European Journal of Heart Failure*. 2017;19:167-176.
116. Nadar SK, Shaikh MM. Biomarkers in Routine Heart Failure Clinical Care. *Card Fail Rev*. 2019;5(1):50-56.
117. Zile MR, Claggett BL, Prescott MF, McMurray JJV, Packer M, Rouleau JL, et al. Prognostic implications of changes in N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68:2425-36.
118. Myhre PL, Vaduganathan M, Claggett B, Packer M, Desai AS, Rouleau JL, et al. B-type natriuretic peptide during treatment with sacubitril/valsartan. the PARADIGM-HF trial. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73:1264-72.
119. Shrivastava A, Haase T, Zeller T, Schulte C. Biomarkers for Heart Failure Prognosis: Proteins, Genetic Scores and Non-coding RNAs. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:601364.
120. Zelenak C, Chavanon M-L, Tahirovic E, Trippel TD, Tscholl V, Stroux A, et al. Early NT-proBNP and MR-proANP associated with QoL 1 year after acutely decompensated heart failure: secondary analysis from the MOLITOR trial. *Biomark Med*. 2019;13:1493-507.
121. Masson S, Latini R, Carbonieri E, Moretti L, Rossi MG, Ciricugno S, et al. The predictive value of stable precursor fragments of vasoactive peptides in patients with chronic heart failure: data from the GISSI-heart failure (GISSI-HF) trial. *Euro J Heart Failure*. 2010;12:338-47.
122. Thygesen K, Mair J, Katus H, Plebani M, Venge P, Collinson P, et al. The Study Group of Biomarker in Cardiology of the ESC Working Group on Acute cardiac care. Recommendation of the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J*. 2010;31:2197-2206.
123. Mohammed AA, Januzzi JL, Jr. Clinical applications of highly sensitive troponin assays. *Cardiol Rev*. 2010;18:12-9.
124. Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:2173-95.
125. Sliha KS, Maisel AS, Fonarow GC. Troponin in Heart Failure. *Heart Failure Clin*. 2018;14:57-64.
126. Daubert MA, Jeremias A. The utility of troponin measurement to detect

- myocardial infarction: review of the current findings. *Vasc Health Risk Manag.* 2010;6:691-9.
127. Peacock WF 4th, De Marco T, Fonarow GC, Diercks D, Wynne J, Apple FS, et al. Cardiac troponin and outcome in acute heart failure. *N Engl J Med.* 2008;358:2117-26.
 128. Xue Y, Clopton P, Peacock WF, Maisel AS. Serial changes in high-sensitive troponin I predict outcome in patients with decompensated heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2011;13:37-42.
 129. Pascual-Figal DA, Manzano-Fernández S, Boronat M, Casas T, Garrido IP, Bonaque JC, et al. Soluble ST2, high-sensitivity troponin T- and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide: complementary role for risk stratification in acutely decompensated heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2011;13:718-25.
 130. de Boer RA, Lok DJ, Jaarsma T, van der Meer P, Voors AA, Hillege HL, et al. Predictive value of plasma galectin-3 levels in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. *Ann Med.* 2011;43:60-8.
 131. Packer M, Januzzi JL, Ferreira JP, Anker SD, Butler J, Filippatos G, et al. Concentration-dependent clinical and prognostic importance of highsensitivity cardiac troponin T in heart failure and a reduced ejection fraction and the influence of empagliflozin: the EMPEROR-Reduced trial. *Eur J Heart Fail.* 2021;23:1529-38.
 132. Tsutamoto T, Kawahara C, Nishiyama K, Yamaji M, Fujii M, Yamamoto T, et al. Prognostic role of highly sensitive cardiac troponin I in patients with systolic heart failure. *Am Heart J.* 2010;159:63-7.
 133. Berezin AE, Berezin AA. Biomarkers in Heart Failure: From Research to Clinical Practice. *Ann Lab Med.* 2023;43(3):225-236.
 134. Kazimierczyk E, Kazimierczyk R, Harasim-Symbor E, Kaminski K, Sobkowicz B, Chabowski A, et al. Persistently elevated plasma heart-type fatty acid binding protein concentration is related with poor outcome in acute decompensated heart failure patients. *Clin Chim Acta.* 2018;487:48-53.
 135. Ding Y, Wang Y, Zhang W, Jia Q, Wang X, Li Y, et al. Roles of Biomarkers in Myocardial Fibrosis. *Aging Dis.* 2020;11(5):1157-1174.
 136. Nezami Z, Holm H, Ohlsson M, Molvin J, Korduner J, Bachus E, et al. The impact of myocardial fibrosis biomarkers in a heart failure population with atrial fibrillation-The HARVEST-Malmö study. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:982871
 137. Lopez B, Gonzalez A, Ravassa S, Beaumont J, Moreno MU, San Jose G, et al. Circulating biomarkers of myocardial fibrosis: the need for a reappraisal. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65:2449-56.
 138. Bošnjak I, Selthofer-Relatić K, Včev A. Prognostic value of galectin-3 in patients with heart failure. *Dis Markers.* 2015;2015:690205.
 139. McCullough PA, Olobatoke A., Vanhecke TE. Galectin-3: a novel blood test for the evaluation and management of patients with heart failure. *Rev Cardiovasc Med.* 2011;12:200-10.
 140. Grandin EW, Jarolim P, Murphy SA, Ritterova L, Cannon CP, Braunwald E, et al. Galectin-3 and the Development of Heart failure after Acute Coronary Syndrome: Pilot Experience from PROVE IT-TIMI 22. *Clin. Chem.* 2012;58:267-73
 141. Köktürk U, Püşüroğlu H, Somuncu MU, Akgül Ö, Uygur B, Özyılmaz S, et al. Short and Long-Term Prognostic Significance of Galectin-3 in Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Angiology.* 2023;74(9):889-896.
 142. van der Velde AR, Gullestad L, Ueland T, Aukrust P, Guo Y, Adourian A, et al. Prognostic value of changes in galectin-3 levels over time in patients with heart failure data from CORONA and COACH. *Circ Heart Fail.* 2013;6(2):219-26.
 143. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, Mcclanahan TK, et al. IL-

- 33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005;23:479-90.
144. Manzano-Fernández S, Mueller T, Pascual-Figal D, Truong QA, Januzzi JL. Usefulness of soluble concentrations of interleukin family member ST2 as predictor of mortality in patients with acutely decompensated heart failure relative to left ventricular ejection fraction. *Am J Cardiol*. 2011;107(2):259-67.
145. Riccardi M, Myhre PL, Zelniker TA, Metra M, Januzzi JL, Inciardi RM. Soluble ST2 in Heart Failure: A Clinical Role beyond B-Type Natriuretic Peptide. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2023;10(11):468.
146. Kempf T, Eden M, Strelau J, Naguib M, Willenbockel C, Tongers J, et al. The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*. 2006;98:351-60.
147. Clerk A, Kemp TJ, Zoumpoulidou G, Sugden PH. Cardiac myocyte gene expression profiling during H₂O₂-induced apoptosis. *Physiol Genom*. 2007;29:118-27.
148. Frank D, Kuhn C, Brors B, Hanselmann C, Lüdde M, Katus HA, et al. Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program. *Hypertension*. 2008;51:309-18.
149. Anand IS, Kempf T, Rector TS, Tapken H, Allhoff T, Jantzen F. Serial measurement of growth-differentiation factor-15 in heart failure: relation to disease severity and prognosis in the valsartan heart failure trial. *Circulation*. 2010;122:1387-95.
150. Kempf T, Von Haehling S, Peter T, Allhoff T, Ciccoira M, Doehner W, et al. Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1054-60.
151. Bauersachs J. Heart failure drug treatment: the fantastic four. *Eur Heart J*. 2021;42(6):681-683.
152. Komajda M, Böhm M, Borer JS, Ford I, Tavazzi L, Pannaux M, Swedberg K. Incremental benefit of drug therapies for chronic heart failure with reduced ejection fraction: a network meta-analysis. *Eur J Heart Fail*. 2018;20:1315-1322.
153. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2015;373:2117-2128.
154. Wiviott SD, Raz I, Bonaca MP, Mosenzon O, Kato ET, Cahn A, et al. Dapagliflozin and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2019;380:347-357.
155. Young JB, Abraham WT, Stevenson LW, Horton DP, Elkayam U, Bourge RC. Intravenous nesiritide vs nitroglycerin for treatment of decompensated congestive heart failure: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*. 2002;287:1531-1540.
156. O'Connor CM, Starling RC, Hernandez AF, Armstrong PW, Dickstein K, Hasselblad V, et al. Effect of nesiritide in patients with acute decompensated heart failure. *New England Journal of Medicine*. 2011;365:32-43.
157. Sato N, Kajimoto K, Asai K, Mizuno M, Minami Y, Nagashima M, et al. Acute decompensated heart failure syndromes (ATTEND) registry. A prospective observational multicenter cohort study: rationale, design, and preliminary data. *American Heart Journal*. 2010;159:942-955.e1.
158. Nagai T, Iwakami N, Nakai M, Nishimura K, Sumita Y, Mizuno A, et al. Effect of intravenous carperitide versus nitrates as firstline vasodilators on in-hospital outcomes in hospitalized patients with acute heart failure: Insight from a nationwide claim-based database. *International Journal of Cardiology*. 2019;280:104-109.
159. Volpe M, Carnovali M, Mastromarino V. The natriuretic peptides system in the

- pathophysiology of heart failure: from molecular basis to treatment. *Clinical Science*. 2016;130:572-577.
160. Bevan EG, Connell JMC, Doyle J, Carmichael HA, Davies DL, Lorimer AR, et al. Candoxatril, a neutral endopeptidase inhibitor: efficacy and tolerability in essential hypertension. *Journal of Hypertension*. 1992;10:607-613.
 161. Yusuf S, Pitt B, Davis CE, Hood WB, Cohn JN. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *New England Journal of Medicine*. 1991;325:293-302.
 162. Packer M, Califf RM, Konstam MA, Krum H, McMurray JJ, Rouleau J, et al. Comparison of omapatrilat and enalapril in patients with chronic heart failure: the Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events (OVERTURE). *Circulation*. 2002;106:920-926.
 163. Dargad RR, Prajapati MR, Dargad RR, Parekh JD. Sacubitril/valsartan: a novel angiotensin receptor-neprilysin inhibitor. *Indian Heart Journal*. 2018;70:S102-S110.
 164. McMurray JJ. Neprilysin inhibition to treat heart failure: a tale of science, serendipity, and second chances. *Eur J Heart Fail*. 2015;17(3):242-7.
 165. Vardeny O, Miller R, Solomon SD. Combined neprilysin and renin-angiotensin system inhibition for the treatment of heart failure. *JACC: Heart Failure*. 2014;2:663-670.
 166. Gu J, Noe A, Chandra P, Al-Fayoumi S, Ligueros-Saylan M, Sarangapani R, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of LCZ696, a novel dual-acting angiotensin receptor-neprilysin inhibitor (ARNi). *J Clin Pharmacol*. 2010;50(4):401-414.
 167. Cada DJ, Baker DE, Leonard J. Sacubitril/Valsartan. *Hospital pharmacy*. 2015;50(11):1025-1036.
 168. McMurray JJV, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *New England Journal of Medicine*. 2014;371:993-1004.
 169. Simpson J, Jhund P, Rouleau J, Swedberg K, Zile M, Lefkowitz M, et al. Effect of sacubitril/valsartan compared with enalapril, according to etiology in PARADIGM-HF. Presented at: American College of Cardiology Scientific Sessions; 2017; Washington, USA.
 170. Desai AS, Claggett BL, Packer M, Zile MR, Rouleau JL, Swedberg K, et al. Influence of Sacubitril/Valsartan (LCZ696) on 30- Day Readmission after Heart Failure Hospitalization. *Journal of the American College of Cardiology*. 2016;68:241-248.
 171. Haddad H, Bergeron S, Ignaszewski A, Searles G, Rochdi D, Dhage P, et al. Canadian Real-World Experience of Using Sacubitril/Valsartan in Patients with Heart Failure with Reduced Ejection Fraction: Insight from the PARASAIL Study. *CJC Open*. 2020;2:344-353.
 172. Mann DL, Givertz MM, Vader JM, Starling RC, Shah P, McNulty SE, et al. Effect of Treatment With Sacubitril/Valsartan in Patients With Advanced Heart Failure and Reduced Ejection Fraction: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiology*. 2022;7:17-25.
 173. Januzzi JL Jr, Prescott MF, Butler J, Felker GM, Maisel AS, McCague K, et al. Association of Change in N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide Following Initiation of Sacubitril-Valsartan Treatment With Cardiac Structure and Function in Patients With Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *JAMA*. 2019;322(11):1085-1095.
 174. Wachter R, Senni M, Belohlavek J, Straburzynska-Migaj E, Witte KK, Kobalava Z, et al. Initiation of sacubitril/valsartan in haemodynamically stabilised heart failure patients in hospital or early after discharge: primary results of the randomised TRANSITION study. *European Journal of Heart Failure*. 2019;21:998-1007.
 175. Velazquez EJ, Morrow DA, DeVore AD, Duffy CI, Ambrosy AP, McCague K, et al. Angiotensin-Neprilysin Inhibition in Acute Decompensated Heart Failure. *New England Journal of Medicine*. 2019;380:539-548.

176. Solomon SD, Zile M, Pieske B, Voors A, Shah A, Kraigher Krainer E, et al. The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: a phase 2 double-blind randomised controlled trial. *The Lancet*. 2012;380:1387-1395. ²
177. Jhund PS, Claggett BL, Voors AA, Zile MR, Packer M, Pieske BM, et al. Elevation in High-Sensitivity Troponin T in Heart Failure and Preserved Ejection Fraction and Influence of Treatment with the Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibitor LCZ696. *Circulation: Heart Failure*. 2014;7:953-959. ¹ ²
178. Solomon SD, McMurray JJV, Anand IS, Ge J, Lam CSP, Maggioni AP, et al. Angiotensin-Neprilysin Inhibition in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *New England Journal of Medicine*. 2019;381:1609-1620. ²
179. McMurray JJV, Jackson AM, Lam CSP, Redfield MM, Anand IS, Ge J, et al. Effects of Sacubitril-Valsartan Versus Valsartan in Women Compared With Men With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction: Insights From PARAGON-HF. *Circulation*. 2020;141:335-351. ²
180. Pieske B, Wachter R, Shah SJ, Baldrige A, Szczepietek P, Ibram G, et al. PARALLAX Investigators and Committee members. Effect of Sacubitril/Valsartan vs Standard Medical Therapies on Plasma NT-proBNP Concentration and Submaximal Exercise Capacity in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction: The PARALLAX Randomized Clinical Trial. *Journal of the American Medical Association*. 2021;326:1919-1929. ¹
181. Shah SJ, Kitzman DW, Borlaug BA, van Heerebeek L, Zile MR, Kass DA, et al. Phenotype-Specific Treatment of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: A Multiorgan Roadmap. *Circulation*. 2016;134:73-90. ¹
182. Solomon SD, Vaduganathan M, L Claggett B, Packer M, Zile M, Swedberg K, et al. Sacubitril/valsartan across the spectrum of ejection fraction in heart failure. *Circulation*. 2020;141:351-361. ¹
183. Cahill TJ, Kharbanda RK. Heart failure after myocardial infarction in the era of primary percutaneous coronary intervention: Mechanisms, incidence and identification of patients at risk. *World Journal of Cardiology*. 2017;9:407-415.
184. Docherty KF, Campbell RT, Brooksbank KJM, Dreisbach JG, Forsyth P, Godeseth RL, et al. Effect of Neprilysin Inhibition on Left Ventricular Remodeling in Patients With Asymptomatic Left Ventricular Systolic Dysfunction Late After Myocardial Infarction. *Circulation*. 2021;144:199-209.
185. Zhao J, Zeng Y, Shen X. Efficacy and safety of early initiation of Sacubitril/Valsartan in patients after acute myocardial infarction: a meta-analysis. *Clinical Cardiology*. 2021;44:1354-1359. ²
186. Pfeffer MA, Claggett B, Lewis EF, Granger CB, Køber L, Maggioni AP, et al. Angiotensin Receptor-Neprilysin Inhibition in Acute Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*. 2021;385:1845-1855. ²
187. Yang P, Li X, Wang L, Wu X, Wang C, Li T, Wang H. Effects of sacubitril/valsartan on cardiac reverse remodeling and cardiac resynchronization in patients with acute myocardial infarction. *Front Cardiovasc Med*. 2023;9:1059420. ²
188. Liu H, Su Y, Shen J, Jiao Y, Li Y, Liu B, et al. Improved heart function and cardiac remodelling following sacubitril/valsartan in acute coronary syndrome with HF. *ESC Heart Fail*. 2024;11(2):937-949.
189. Chen C, Wu X, Li Y, Peng Y. Study on the application effect of bisoprolol combined with sacubitril valsartan sodium tablets in the cardiac rehabilitation of patients with acute myocardial infarction combined with left heart failure after percutaneous coronary

- intervention (PCI). *Annals of Palliative Medicine*. 2021;10:5455-5461.
190. Nikolic M, Srejavic I, Jovic JJ, Sretenovic J, Jeremic J, Cekerevac I, et al. Sacubitril/valsartan in Heart Failure and Beyond-From Molecular Mechanisms to Clinical Relevance. *Front Cardiovasc Med*. 2022;23(7):238.
191. Schamroth Pravda N, Kornowski R. Unmet Needs and Therapeutic Strategies in Cardio-Hemato-Oncology. *Acta Haematologica*. 2018;140:226-230.
192. Plana JC, Galderisi M, Barac A, Ewer MS, Ky B, ScherrerCrosbie M, et al. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2014;27:911-939.
193. Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, Aboyans V, Asteggiano R, Galderisi M, et al. 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines. The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*. 2016;37:2768-2801.
194. Yoon HJ, Kim KH, Kim JY, Park HJ, Cho JY, Hong YJ, et al. Chemotherapy-Induced Left Ventricular Dysfunction in Patients with Breast Cancer. *Journal of Breast Cancer*. 2016;19:402409.
195. Nicolas D, Kerndt CC, Patel P, Reed M. Sacubitril-Valsartan [Internet]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan– [updated 2024 Feb 29; cited 2025 Apr 7]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507904/>
196. De Vecchis R, Paccone A. A case series about the favorable effects of sacubitril/valsartan on anthracycline cardiomyopathy. *SAGE Open Medical Case Reports*. 2020;8:2050313X20952189.
197. Sheppard CE, Anwar M. The use of sacubitril/valsartan in anthracycline-induced cardiomyopathy: aminicase series. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 2019;25:1231-1234.
198. Morris K, Wagner S, Ravichandran A, Patel A, Chaudhry S, Garcia-Cortes R. Novel use of valsartan-sacubitril as treatment for trastuzumab induced cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2019;73:2188.
199. Lupi A, Ariotti S, De Pace D, Ferrari I, Bertuol S, Monti L, et al. Sacubitril/Valsartan to Treat Heart Failure in a Patient with Relapsing Hairy Cell Leukaemia: Case Report. *Clinical Medicine Insights: Cardiology*. 2021;15:11795468211010706.
200. Gregoriotti V, Fernandez TL, Costa D, Chahla EO, Daniele AJ. Use of Sacubitril/valsartan in patients with cardio toxicity and heart failure due to chemotherapy. *Cardio-oncology*. 2020;6:24.
201. Martín-García A, López-Fernández T, Mitroi C, Chaparro-Muñoz M, Moliner P, Martín-García AC, et al. Effectiveness of sacubitril-valsartan in cancer patients with heart failure. *ESC Heart Failure*. 2020;7:763-767.
202. Martín-García A, Díaz-Peláez E, Martín-García AC, SánchezGonzález J, Ibáñez B, Sánchez PL. Myocardial function and structure improvement with sacubitril/valsartan in cancer therapy-induced cardiomyopathy. *Revista Española De Cardiología*. 2020;73:268-269.
203. Rosanio S, Schwarz ER, Vitarelli A, Zarraga IGE, Kunapuli S, Ware DL, et al. Sudden death prophylaxis in heart failure. *International Journal of Cardiology*. 2007;119:291-296.
204. Grabowski M, Ozierański K, Balsam P, Dąbrowski R, Farkowski MM, Gackowski A, et al. The effect of sacubitril/valsartan on the occurrence of ventricular arrhythmia and the risk of sudden cardiac death in patients with chronic heart failure with

- reduced left ventricular ejection fraction. Expert opinion of the Heart Rhythm and Heart Failure Sections of the Polish Cardiac Society. *Kardiologia Polska*. 2019;77:987-993.
205. Claggett B, Packer M, McMurray JJ, Swedberg K, Rouleau J, Zile MR, et al. Estimating the Long-Term Treatment Benefits of Sacubitril-Valsartan. *New England Journal of Medicine*. 2015;373:2289-2290.
206. Desai AS, McMurray JJ, Packer M, Swedberg K, Rouleau JL, Chen F, et al. Effect of the angiotensin-receptor-neprilysin inhibitor LCZ696 compared with enalapril on mode of death in heart failure patients. *European Heart Journal*. 2015;36:1990-1997.
207. El-Battrawy I, Pilsinger C, Liebe V, Lang S, Kuschyk J, Zhou X, et al. Impact of Sacubitril/Valsartan on the Long-Term Incidence of Ventricular Arrhythmias in Chronic Heart Failure Patients. *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8:1582.
208. Vicent L, Juárez M, Martín I, García J, González-Saldívar H, Bruña V, et al. Ventricular Arrhythmic Storm after Initiating Sacubitril/Valsartan. *Cardiology*. 2018;139:119-123.
209. Okutucu S, Oto A. Electrical Storm after Initiating Sacubitril/Valsartan: Arrhythmic Paradox. *Cardiology*. 2019;142:2425.
210. Valentim Gonçalves A, Pereira-da-Silva T, Galrinho A, Rio P, Moura Branco L, Soares R, et al. Antiarrhythmic Effect of Sacubitril-Valsartan: Cause or Consequence of Clinical Improvement? *Journal of Clinical Medicine*. 2020;8:869.
211. Sarrias A, Bayes-Genis A. Is Sacubitril/Valsartan (also) an Antiarrhythmic Drug? *Circulation*. 2018;138:551-553.
212. Vicent L, Juárez M, Martín I, García J, González-Saldívar H, Bruña V, et al. Ventricular Arrhythmic Storm after Initiating Sacubitril/Valsartan. *Cardiology*. 2018;139:119-123.
213. Russo V, Bottino R, Rago A, Papa AA, Liccardo B, Proietti R, et al. The Effect of Sacubitril/Valsartan on Device Detected Arrhythmias and Electrical Parameters among Dilated Cardiomyopathy Patients with Reduced Ejection Fraction and Implantable Cardioverter Defibrillator. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9:1111.
214. de Diego C, González-Torres L, Núñez JM, Centurión Inda R, Martín-Langerwerf DA, Sangio AD, et al. Effects of angiotensin-neprilysin inhibition compared to angiotensin inhibition on ventricular arrhythmias in reduced ejection fraction patients under continuous remote monitoring of implantable defibrillator devices. *Heart Rhythm*. 2018;15:395-402.
215. Martens P, Nuyens D, Rivero-Ayerza M, Van Herendael H, Vercammen J, Ceyssens W, et al. Sacubitril/valsartan reduces ventricular arrhythmias in parallel with left ventricular reverse remodeling in heart failure with reduced ejection fraction. *Clinical Research in Cardiology*. 2019;108:1074-1082.
216. De Vecchis R, Paccone A, Di Maio M. Favorable Effects of Sacubitril/Valsartan on the Peak Atrial Longitudinal Strain in Patients with Chronic Heart Failure and a History of one or more Episodes of Atrial Fibrillation: a Retrospective Cohort Study. *Journal of Clinical Medicine Research*. 2020;12:100-107.
217. De Vecchis R, Paccone A, Di Maio M. Sacubitril/Valsartan Therapy for 14 Months Induces a Marked Improvement of Global Longitudinal Strain in Patients with Chronic Heart Failure: a Retrospective Cohort Study. *Cardiology Research*. 2019;10:293-302.
218. De Vecchis R, Paccone A, Di Maio M. Upstream Therapy for Atrial Fibrillation Prevention: the Role of Sacubitril/Valsartan. *Cardiology Research*. 2020;11:213-218.
219. Fala L. Entresto (Sacubitril/Valsartan): First-in-Class Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibitor FDA Approved for Patients with Heart Failure. *Am Health Drug Benefits*. 2015;8(6):330-4.

220. Gummin DD, Mowry JB, Beuhler MC, Spyker DA, Rivers LJ, Feldman R, et al. 2021 Annual Report of the National Poison Data System[®] (NPDS) from America's Poison Centers: 39th Annual Report. *Clin Toxicol (Phila)*. 2022;60(12):1381-1643.
221. Mustafa NH, Jalil J, Zainalabidin S, Saleh MSM, Asmadi AY, Kamisah Y. Molecular mechanisms of sacubitril/valsartan in cardiac remodeling. *Front Pharmacol*. 2022;13:89220.
222. von Lueder TG, Wang BH, Kompa AR, Huang L, Webb R, Jordaan P, et al. Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibitor LCZ696 Attenuates Cardiac Remodeling and Dysfunction after Myocardial Infarction by Reducing Cardiac Fibrosis and Hypertrophy. *Circulation: Heart Failure*. 2015;8:71-78.
223. Kusaka H, Sueta D, Koibuchi N, Hasegawa Y, Nakagawa T, Lin B, et al. LCZ696, Angiotensin II Receptor-Neprilysin Inhibitor, Ameliorates High-Salt-Induced Hypertension and Cardiovascular Injury more than Valsartan alone. *American Journal of Hypertension*. 2015;28:1409-1417.
224. Miyoshi T, Nakamura K, Miura D, Yoshida M, Saito Y, Akagi S, et al. Effect of LCZ696, a dual angiotensin receptor neprilysin inhibitor, on isoproterenol-induced cardiac hypertrophy, fibrosis, and hemodynamic change in rats. *Cardiology Journal*. 2019;26:575-583.
225. Wu M, Guo Y, Wu Y, Xu K, Lin L. Protective Effects of Sacubitril/Valsartan on Cardiac Fibrosis and Function in Rats With Experimental Myocardial Infarction Involves Inhibition of Collagen Synthesis by Myocardial Fibroblasts Through Down regulating TGF- β 1/Smads Pathway. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:696472.
226. Suematsu Y, Miura S, Goto M, Matsuo Y, Arimura T, Kuwano T, et al. LCZ696, an angiotensin receptor-neprilysin inhibitor, improves cardiac function with the attenuation of fibrosis in heart failure with reduced ejection fraction in streptozotocin-induced diabetic mice. *European Journal of Heart Failure*. 2016;18:386-393.
227. Ai J, Shuai Z, Tang K, Li Z, Zou L, Liu M. Sacubitril/valsartan alleviates myocardial fibrosis in diabetic cardiomyopathy rats. *Hellenic J Cardiol*. 2021;62(5):389-391.
228. Nattel S. Molecular and cellular mechanisms of atrial fibrosis in atrial fibrillation. *JACC: Clin. Electrophysiol*. 2017;3(5):425-435.
229. Boutagy NE, Feher A, Pfau D, Liu Z, Guerrera NM, Freeburg LA, et al. Dual Angiotensin Receptor-Neprilysin Inhibition with Sacubitril/Valsartan Attenuates Systolic Dysfunction in Experimental Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *JACC: CardioOncology*. 2020;2:774-787.
230. Schauer A, Adams V, Augstein A, Jannasch A, Draskowski R, Kirchhoff V, et al. Sacubitril/Valsartan Improves Diastolic Function But Not Skeletal Muscle Function in a Rat Model of HF with EF. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22:3570.
231. Ishii M, Kaikita K, Sato K, Sueta D, Fujisue K, Arima Y, et al. Cardioprotective Effects of LCZ696 (Sacubitril/Valsartan) after Experimental Acute Myocardial Infarction. *JACC: Basic to Translational Science*. 2017;2:655-668.
232. Shi YJ, Yang CG, Qiao WB, Liu YC, Liu SY, Dong GJ. Sacubitril/valsartan attenuates myocardial inflammation, hypertrophy, and fibrosis in rats with heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Pharmacol*. 2023;961:176170.
233. Kompa AR, Lu J, Weller TJ, Kelly DJ, Krum H, von Lueder TG, Wang BH. Angiotensin receptor neprilysin inhibition provides superior cardioprotection compared to angiotensin converting enzyme inhibition after experimental myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2018;258:192-198.
234. Imran M, Hassan MQ, Akhtar MS, Rahman O, Akhtar M, Najmi AK. Sacubitril and valsartan protect from experimental myocardial infarction by ameliorating oxidative damage in Wistar rats. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2018;41:62-69.

235. Croteau D, Qin F, Chambers JM, Kallick E, Luptak I, Panagia M, et al. Differential Effects of Sacubitril/Valsartan on Diastolic Function in Mice with Obesity-Related Metabolic Heart Disease. *JACC: Basic to Translational Science*. 2020;5:916-927.
236. Wu X, Luo A, Zhou Y, Ren J. N-acetylcysteine reduces oxidative stress, nuclear factor- κ B activity and cardiomyocyte apoptosis in heart failure. *Molecular Medicine Reports*. 2014;10:615-624.
237. Ge Q, Zhao L, Ren XM, Ye P, Hu ZY. LCZ696, an angiotensin receptor-neprilysin inhibitor, ameliorates diabetic cardiomyopathy by inhibiting inflammation, oxidative stress and apoptosis. *Experimental Biology and Medicine*. 2019;244:1028-1039.
238. Jeremic J, Govoruskina N, Bradic J, Milosavljevic I, Srejsovic I, Zivkovic V, et al. Sacubitril/valsartan reverses cardiac structure and function in experimental model of hypertension-induced hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*. 2023;478(12):2645-2656.
239. Shi H, Lu H, Zheng Y, Pu P, Wei L, Hu D, et al. Bioinformatics and experimental studies jointly reveal that Sacubitril Valsartan improves myocardial oxidative stress and inflammation by regulating the MAPK signaling pathway to treat chemotherapy related cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2024;690:149244.
240. Kim NH, Kang PM. Apoptosis in cardiovascular diseases: mechanism and clinical implications. *Korean Circulation Journal*. 2010;40:299-305.
241. Xia Y, Chen Z, Chen A, Fu M, Dong Z, Hu K, et al. LCZ696 improves cardiac function via alleviating Drp1-mediated mitochondrial dysfunction in mice with doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2017;108:138-148.
242. Peng S, Lu XF, Qi YD, Li J, Xu J, Yuan T, et al. LCZ696 Ameliorates Oxidative Stress and Pressure Overload-Induced Pathological Cardiac Remodeling by Regulating the Sirt3/MnSOD Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020;2020:9815039.
243. Gerich JE. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabet Med*. 2010;27:136-142.
244. Vallon V, Thomson SC. Targeting renal glucose reabsorption to treat hyperglycaemia: the pleiotropic effects of SGLT2 inhibition. *Diabetologia*. 2017;60:215-225.
245. Mather A, Pollock C. Glucose handling by the kidney. *Kidney Int Suppl*. 2011;120:S1-S6.
246. Kanai Y, Lee WS, You G, Brown D, Hediger MA. The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J Clin Invest*. 1994;93:397-404.
247. Mosley JF 2nd, Smith L, Everton E, Fellner C. Sodiumglucose linked transporter 2 (SGLT2) inhibitors in the management of type-2 diabetes: a drug class overview. *P T*. 2015;40:451-462.
248. DeFronzo RA, Norton L, Abdul-Ghani M. Renal, metabolic and cardiovascular considerations of SGLT2 inhibition. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13:11-26.
249. Ehrenkranz JR, Lewis NG, Kahn CR, Roth J. Phlorizin: a review. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005;21:31-38.
250. Tentolouris A, Vlachakis P, Tzeravini E, Eleftheriadou I, Tentolouris N. SGLT2 inhibitors: a review of their antidiabetic and cardioprotective effects. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;17:2965.
251. Blaschek W. Natural products as lead compounds for sodium glucose cotransporter (SGLT) inhibitors. *Planta Med*. 2017;83:985-993.
252. Rieg T, Vallon V. Development of SGLT1 and SGLT2 inhibitors. *Diabetologia*. 2017;61:2079-2086.
253. Cinti F, Mofa S, Impronta F, Cefalo CMA, Sun VA, Sorice GP, et al. Spotlight

on ertugliflozin and its potential in the treatment of type 2 diabetes: evidence to date. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:2905-2919.

254. Nikolic M, Zivkovic V, Jovic JJ, Sretenovic J, Davidovic G, Simovic S, et al. SGLT2 inhibitors: a focus on cardiac benefits and potential mechanisms. *Heart Failure Reviews.* 2016;27(3):935-949

255. Katsiki N, Banach M, Mikhailidis DP. Is type 2 diabetes mellitus a coronary heart disease equivalent or not? do not just enjoy the debate and forget the patient! *Arch Med Sci.* 2019;15:1357-1364.

256. Authors/Task Force Members; Rydén L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, Danchin N, et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, prediabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J.* 2013;34:3035-3087.

257. Bergmark BA, Bhatt DL, McGuire DK, Cahn A, Mosenzon O, Steg PG, et al. Metformin use and clinical outcomes among patients with diabetes mellitus with or without heart failure or kidney dysfunction: observations from the SAVOR-TIMI 53 trial. *Circulation.* 2019;140:1003-1014.

258. Maddox TM, Januzzi JL Jr, Allen LA, Breathett K, Butler J, Davis LL, et al. 2021 Update to the 2017 ACC Expert Consensus Decision Pathway for Optimization of Heart Failure Treatment: Answers to 10 Pivotal Issues About Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: A Report of the American College of Cardiology Solution Set Oversight Committee. *Journal of the American College of Cardiology.* 2021;77:772-810.

259. Lago RM, Singh PP, Nesto RW. Congestive heart failure and cardiovascular death in patients with prediabetes and type 2 diabetes given thiazolidinediones: A meta-analysis of randomised clinical trials. *Lancet.* 2007;370:1129-1136.

260. Scirica BM, Braunwald E, Raz I, Cavender MA, Morrow DA, Jarolim P, et al. Heart failure, saxagliptin, and diabetes mellitus: observations from the SAVOR-TIMI 53 randomized trial. *Circulation.* 2014;130(18):1579-88.

261. Neal B, Perkovic V, Matthews DR. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2017;377:644-657.

262. Fitchett D, Inzucchi SE, Zinman B, Wanner C, Schumacher M, Schmoor C, et al. Mediators of the improvement in heart failure outcomes with empagliflozin in the EMPA-REG OUTCOME trial. *ESC Heart Fail.* 2021;8:4517-4527.

263. American Diabetes Association. 9. Pharmacologic approaches to glycemic treatment: Standards of Medical Care in Diabetes—2020. *Diabetes Care.* 2020;43(Suppl 1):S98–110.

264. Talha KM, Anker SD, Butler J. SGLT-2 Inhibitors in Heart Failure: A Review of Current Evidence. *Int J Heart Fail.* 2023;5(2):82-90.

265. Cowart K, Carris NW. Evaluation of cardiovascular and renal outcomes with ertugliflozin: what is the VERdict from the VERTIS-CV trial? *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* 2020;1-3.

266. Kluger AY, Tecson KM, Lee AY, Lerma EV, Rangaswami J, Lepor NE, et al. Class effects of SGLT2 inhibitors on cardiorenal outcomes. *Cardiovasc Diabetol.* 2019;18(1):99

267. Zelniker TA, Wiviott SD, Raz I, Im K, Goodrich EL, Bonaca MP, et al. SGLT2 inhibitors for primary and secondary prevention of cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials. *Lancet.* 2019;393:31- 39.

268. McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, Køber L, Kosiborod MN, Martinez

- FA, et al. Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med*. 2019;381(21):1995-2008.
269. Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Pocock SJ, Carson, P, et al. Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. *N Engl J Med*. 2020;383:1413-1424.
270. Anker SD, Butler J, Filippatos G, Khan MS, Marx N, Lam CS, et al. Effect of Empagliflozin on Cardiovascular and Renal Outcomes in Patients with Heart Failure by Baseline Diabetes Status: Results from the EMPEROR-Reduced Trial. *Circulation*. 2021;143:337-349.
271. Santos-Gallego CG, Garcia-Ropero A, Mancini D, Pinney SP, Contreras JP, Fergus I, et al. Rationale and Design of the EMPA-TROPISM Trial (ATRU-4): Are the "Cardiac Benefits" of Empagliflozin Independent of its Hypoglycemic Activity? *Cardiovasc Drugs Ther*. 2019;33: 87-95.
272. Santos-Gallego CG, Vargas-Delgado AP, Requena-Ibanez JA, Garcia-Ropero A, Mancini D, Pinney S, et al. Randomized Trial of Empagliflozin in Nondiabetic Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2020;77:243-255.
273. Täger T, Atar D, Agewall S, Katus HA, Grundtvig M, Cleland JGF, et al. Comparative efficacy of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors (SGLT2i) for cardiovascular outcomes in type 2 diabetes: A systematic review and network meta-analysis of randomised controlled trials. *Heart Fail. Rev*. 2020;26:1421-1435.
274. Jiang Y, Yang P, Fu L, Sun L, Shen W, Wu Q. Comparative Cardiovascular Outcomes of SGLT2 Inhibitors in Type 2 Diabetes Mellitus: A Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Front. Endocrinol*. 2022;13:802992.
275. Usman MS, Siddiqi TJ, Anker SD, Bakris GL, Bhatt DL, Filippatos G, et al. Effect of SGLT2 Inhibitors on Cardiovascular Outcomes Across Various Patient Populations. *J Am Coll Cardiol*. 2023;81(25):2377-2387.
276. Butler J, Packer M, Filippatos G, Ferreira JP, Zeller C, Schnee J, et al. Effect of empagliflozin in patients with heart failure across the spectrum of left ventricular ejection fraction. *Eur. Heart J*. 2022;43:416-426.
277. Solomon SD, McMurray JJV, Claggett B, de Boer RA, DeMets D, Hernandez AF, et al. DELIVER Trial Committees and Investigators. Dapagliflozin in Heart Failure with Mildly Reduced or Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med*. 2022;387(12):1089-1098.
278. Bhatt DL, Szarek M, Steg PG, Cannon CP, Leiter LA, McGuire DK, et al. SOLOIST-WHF Trial Investigators. Sotagliflozin in Patients with Diabetes and Recent Worsening Heart Failure. *N Engl J Med*. 2021;384(2):117-128.
279. Abraham WT, Lindenfeld J, Ponikowski P, Agostoni P, Butler J, Desai AS, et al. Effect of empagliflozin on exercise ability and symptoms in heart failure patients with reduced and preserved ejection fraction, with and without type 2 diabetes, *European Heart Journal*. 2021;42(6):700-710.
280. von Lewinski D, Kolesnik E, Tripolt NJ, Pferschy PN, Benedikt M, Wallner M, et al. Empagliflozin in acute myocardial infarction: the EMMY trial. *European heart journal*. 2022;43(41):4421-4432.
281. Butler J, Jones WS, Udell JA, Anker SD, Petrie MC, Harrington J, et al. Empagliflozin after Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2024;390(16):1455-1466.
282. James S, Erlinge D, Storey RF, McGuire DK, de Belder M, Eriksson N, et al. Dapagliflozin in Myocardial Infarction without Diabetes or Heart Failure. *NEJM Evid*. 2024;3(2):EVIDoA2300286.
283. Cannon CP. Cardiovascular disease and modifiable cardiometabolic risk factors. *Clin Cornerstone*. 2007;8(3):11-28.
284. Shaikh A. A practical approach to hypertension management in diabetes.

Diabetes Ther. 2017;8:981-989.

285. Tikkanen I, Chilton R, Johansen OE. Potential role of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors in the treatment of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2016;25:81-85.

286. Maliha G, Townsend RR. SGLT2 inhibitors: their potential reduction in blood pressure. *J Am Soc Hypertens*. 2015;9:48-53.

287. Zaccardi F, Webb DR, Htike ZZ, Youssef D, Khunti K, Davies MJ. Efficacy and safety of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors in type 2 diabetes mellitus: systematic review and network meta-analysis. *Diabetes Obes Metab*. 2016;18:783-794.

288. Bolinder J, Ljunggren Ö, Kullberg J, Johansson L, Wilding J, Langkilde AM, et al. Effects of dapagliflozin on body weight, total fat mass, and regional adipose tissue distribution in patients with type 2 diabetes mellitus with inadequate glycemic control on metformin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:1020-1031.

289. Schork A, Saynisch J, Vosseler A, Jaghutriz BA, Heyne N, Peter A, et al. Effect of SGLT2 inhibitors on body composition, fluid status and reninangiotensin-aldosterone system in type 2 diabetes: a prospective study using bioimpedance spectroscopy. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18:46.

290. Cefalu WT, Stenlöf K, Leiter LA, Wilding JP, Blonde L, Polidori D, et al. Effects of canagliflozin on body weight and relationship to HbA1c and blood pressure changes in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2015;58:1183-1187.

291. Chilton R, Tikkanen I, Cannon CP, Crowe S, Woerle HJ, Broedl UC, et al. Effects of empagliflozin on blood pressure and markers of arterial stiffness and vascular resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2015;17:1180-1193.

292. O'Donnell M, Mente A, Yusuf S. Sodium intake and cardiovascular health. *Circ Res*. 2015;116:1046-1057.

293. Schneider MP, Raff U, Kopp C, Scheppach JB, Toncar S, Wanner C, et al. Skin sodium concentration correlates with left ventricular hypertrophy in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28:1867-1876.

294. Karg MV, Bosch A, Kannenkeril D, Striepe K, Ott C, Schneider MP, et al. SGLT-2-inhibition with dapagliflozin reduces tissue sodium content: a randomised controlled trial. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17:5.

295. Lytvyn Y, Bjornstad P, Udell JA, Lovshin JA, Cherney DZI. Sodium glucose cotransporter-2 inhibition in heart failure: potential mechanisms, clinical applications, and summary of clinical trials. *Circulation*. 2016;136:1643-1658.

296. Lopaschuk GD, Verma S. Mechanisms of cardiovascular benefits of sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors: a state-of-the-art review. *JACC Basic Transl Sci*. 2020;5:632-644.

297. Pellicori P, Kaur K, Clark AL. Fluid management in patients with chronic heart failure. *Card Fail Rev*. 2015;1:90-95.

298. Brown AJM, Gandy S, McCrimmon R, Houston JG, Struthers AD, Lang CC. A randomized controlled trial of dapagliflozin on left ventricular hypertrophy in people with type two diabetes: the DAPA-LVH trial. *Eur Heart J*. 2021;41(36):3421-3432.

299. Verma S, Mazer CD, Yan AT, Mason T, Garg V, Teoh H, et al. Effect of Empagliflozin on Left Ventricular Mass in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Artery Disease: The EMPA-HEART CardioLink-6 Randomized Clinical Trial. *Circulation*. 2019;140(21):1693-1702.

300. Connelly KA, Mazer CD, Puar P, Teoh H, Wang CH, Mason T, et al. Empagliflozin and Left Ventricular Remodeling in People Without Diabetes: Primary Results of the EMPA-HEART 2 CardioLink-7 Randomized Clinical Trial. *Circulation*. 2023;147(4):284-295.

301. Sattar N, McLaren J, Kristensen SL, Preiss D, McMurray JJ. SGLT2 Inhibition and cardiovascular events: why did EMPA-REG Outcomes surprise and what were the likely mechanisms? *Diabetologia*. 2016;59:1333-1339.
302. Lambers Heerspink HJ, de Zeeuw D, Wie L, Leslie B, List J. Dapagliflozin a glucose-regulating drug with diuretic properties in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2013;15:853-862.
303. Mazer CD, Hare GMT, Connelly PW, Gilbert RE, Shehata N, Quan A, et al. Effect of empagliflozin on Erythropoietin levels, iron stores, and red blood cell morphology in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Circulation*. 2020;141:704-707.
304. Takashima H, Yoshida Y, Nagura C, Furukawa T, Tei R, Maruyama T, et al. Renoprotective effects of canagliflozin, a sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, in type 2 diabetes patients with chronic kidney disease: A randomized open-label prospective trial. *Diab Vasc Dis Res*. 2018;15(5):469-472.
305. Maruyama T, Takashima H, Oguma H, Nakamura Y, Ohno M, Utsunomiya K, et al. Canagliflozin Improves Erythropoiesis in Diabetes Patients with Anemia of Chronic Kidney Disease. *Diabetes Technol Ther*. 2019;21(12):713-720.
306. Inzucchi SE, Zinman B, Fitchett D, Wanner C, Ferrannini E, Schumacher M, et al. How Does Empagliflozin Reduce Cardiovascular Mortality? Insights From a Mediation Analysis of the EMPA-REG OUTCOME Trial. *Diabetes Care*. 2018;41(2):356-363.
307. Secrest MH, Udell JA, Filion KB. The cardiovascular safety trials of DPP-4 inhibitors, GLP-1 agonists, and SGLT2 inhibitors. *Trends Cardiovasc Med*. 2017;27(3):194-202.
308. Scheen AJ, Paquot N. Metabolic effects of SGLT-2 inhibitors beyond increased glucosuria: a review of the clinical evidence. *Diabetes Metab*. 2014;40(6 Suppl 1):S4-S11.
309. Merovci A, Solis-Herrera C, Daniele G, Eldor R, Fiorentino TV, Tripathy D, et al. Dapagliflozin improves muscle insulin sensitivity but enhances endogenous glucose production. *J Clin Invest*. 2014;124(2):509-514.
310. Ferrannini E, Muscelli E, Frascerra S, Baldi S, Mari A, Heise T, et al. Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients. *J Clin Invest*. 2014;124(2):499-508.
311. Saponaro C, Pattou F, Bonner C. SGLT2 inhibition and glucagon secretion in humans. *Diabetes Metab*. 2018;44(5):383-385.
312. Pereira MJ, Eriksson JW. Emerging role of SGLT-2 inhibitors for the treatment of obesity. *Drugs*. 2019;79(3):219-230.
313. Lee PC, Ganguly S, Goh SY. Weight loss associated with sodium-glucose cotransporter-2 inhibition: a review of evidence and underlying mechanisms. *Obes Rev*. 2018;19(12):1630-1641.
314. Bays HE, Weinstein R, Law G, Canovatchel W. Canagliflozin: effects in overweight and obese subjects without diabetes mellitus. *Obesity (Silver Spring)*. 2014;22(4):1042-1049.
315. Scheen AJ. Beneficial effects of SGLT2 inhibitors on fatty liver in type 2 diabetes: a common comorbidity associated with severe complications. *Diabetes Metab*. 2019;45(3):213-223.
316. Hazlehurst JM, Woods C, Marjot T, Cobbold JF, Tomlinson JW. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metabolism*. 2016;65(8):1096-1108.
317. Targher G, Byrne CD, Tilg H. NAFLD and increased risk of cardiovascular disease: clinical associations, pathophysiological mechanisms and pharmacological implications. *Gut*. 2020;69(9):1691-1705.
318. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global

epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.

319. Bhole V, Choi JW, Kim SW, de Vera M, Choi H. Serum uric acid levels and the risk of type 2 diabetes: a prospective study. *Am J Med*. 2010;123(10):957-961.

320. Zhao Y, Xu L, Tian D, Xia P, Zheng H, Wang L, et al. Effects of sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors on serum uric acid level: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Obes Metab*. 2018;20(2):458-462.

321. Krishnan E. Hyperuricemia and incident heart failure. *Circ Heart Fail*. 2009;2(6):555-562.

322. Gu J, Fan YQ, Zhang HL, Zhang JF, Wang CQ. Serum uric acid is associated with incidence of heart failure with preserved ejection fraction and cardiovascular events in patients with arterial hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2018;20(3):560-567.

323. Saydah SH, Fradkin J, Cowie CC. Poor control of risk factors for vascular disease among adults with previously diagnosed diabetes. *JAMA*. 2004;291(3):335-342.

324. Hashi T, Fukui T, Nakanishi N, Yamamoto S, Tomoyasu M, Osamura A, et al. Dapagliflozin decreases small dense low-density lipoprotein-cholesterol and increases high-density lipoprotein 2-cholesterol in patients with type 2 diabetes: comparison with sitagliptin [published correction appears in *Cardiovasc Diabetol*. 2017;16(1):8

325. Storgaard H, Gluud LL, Bennett C, Grøndahl MF, Christensen MB, Knop FK, et al. Benefits and harms of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166125.

326. Filippas-Ntekouan S, Tsimihodimos V, Filippatos T, Dimitriou T, Elisaf M. SGLT-2 inhibitors: pharmacokinetics characteristics and effects on lipids. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2018;14(11):1113-1121.

327. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Management of dyslipidemia in adults with diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(suppl 1):s83-s86.

328. Nagoshi T, Yoshimura M, Rosano GM, Lopaschuk GD, Mochizuki S. Optimization of cardiac metabolism in heart failure. *Curr Pharm Des*. 2011;17:3846-3853.

329. Maejima Y. SGLT2 inhibitors play a salutary role in heart failure via modulation of the mitochondrial function. *Front Cardiovasc Med*. 2020;6:186.

330. Al Jobori H, Daniele G, Adams J, Cersosimo E, Triplitt C, DeFronzo RA, et al. Determinants of the increase in ketone concentration during SGLT2 inhibition in NGT, IFG and T2DM patients. *Diabetes Obes Metab*. 2017;19:809-813.

331. Ferrannini E, Mark M, Mayoux E. CV Protection in the EMPA-REG OUTCOME trial: a “thrifty substrate” hypothesis. *Diabetes Care*. 2016;39:1108-1114.

332. Halimi S, Vergès B. Adverse effects and safety of SGLT-2 inhibitors. *Diabetes Metab*. 2014;40(6 Suppl 1):S28-34.

333. McGill JB, Subramanian S. Safety of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors. *Am J Cardiol*. 2019;124 Suppl 1:S45-S52.

334. Hall V, Kwong J, Johnson D, Ekinici EI. Caution advised with dapagliflozin in the setting of male urinary tract outlet obstruction. *BMJ Case Rep*. 2017;2017:bcr2017219335.

335. Hahn K, Ejaz AA, Kanbay M, Lanaspa MA, Johnson RJ. Acute kidney injury from SGLT2 inhibitors: potential mechanisms. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(12):711-712.

336. Douros A, Lix LM, Fralick M, Dell'Aniello S, Shah BR, Ronksley PE, et al. Canadian Network for Observational Drug Effect Studies (CNODES) Investigators. Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors and the Risk for Diabetic Ketoacidosis : A Multicenter Cohort Study. *Ann Intern Med*. 2020;173(6):417-425.

337. Padda IS, Mahtani AU, Parmar M. Sodium-Glucose Transport Protein 2 (SGLT2) Inhibitors. [Updated 2023 Jun 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls

- Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK576405/>
338. Schaeffer SE, DesLauriers C, Spiller HA, Aleguas A, Baeza S, Ryan ML. Retrospective review of SGLT2 inhibitor exposures reported to 13 poison centers. *Clin Toxicol (Phila)*. 2018;56(3):204-208.
 339. Pittampalli S, Upadyayula S, Mekala HM, Lippmann S. Risks vs Benefits for SGLT2 Inhibitor Medications. *Federal practitioner : for the health care professionals of the VA, DoD, and PHS*. 2018;35(7):45-48.
 340. Wilson AJ, Gill EK, Abudalo RA, Edgar KS, Watson CJ, Grieve DJ. Reactive oxygen species signalling in the diabetic heart: emerging prospect for therapeutic targeting. *Heart*. 2018;104(4):293-9.
 341. Russo I, Frangogiannis NG. Diabetes-associated cardiac fibrosis: cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;90:84-93.
 342. Jiang F, Liu GS, Dusting GJ, Chan EC. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF-beta-mediated fibrotic responses. *Redox Biol*. 2014;2:267-72.
 343. Li C, Zhang J, Xue M, Li X, Han F, Liu X, et al. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart. *Cardiovascular diabetology*. 2019;18(1):15.
 344. Quagliarillo V, De Laurentiis M, Rea D, Barbieri A, Monti MG, Carbone A, et al. The SGLT-2 inhibitor empagliflozin improves myocardial strain, reduces cardiac fibrosis and pro-inflammatory cytokines in non-diabetic mice treated with doxorubicin. *Cardiovasc Diabetol*. 2021;20(1):150.
 345. Lee TM, Chang NC, Lin SZ. Dapagliflozin, a selective SGLT2 Inhibitor, attenuated cardiac fibrosis by regulating the macrophage polarization via STAT3 signaling in infarcted rat hearts. *Free Radic Biol Med*. 2017;104:298-310.
 346. Lee SG, Kim D, Lee JJ, Lee HJ, Moon RK, Lee YJ, et al. Dapagliflozin attenuates diabetes-induced diastolic dysfunction and cardiac fibrosis by regulating SGK1 signaling. *BMC medicine*. 2022;20(1):309.
 347. El-Daly M, Pulakazhi Venu VK, Saifeddine M, Mihara K, Kang S, et al. Hyperglycaemic impairment of PAR2-mediated vasodilation: Prevention by inhibition of aortic endothelial sodium-glucose-co-Transporter-2 and minimizing oxidative stress. *Vascular pharmacology*. 2018;109:56-71.
 348. Semo D, Obergassel J, Dorenkamp M, Hemling P, Strutz J, Hiden U, et al. The Sodium-Glucose Co-Transporter 2 (SGLT2) Inhibitor Empagliflozin Reverses Hyperglycemia-Induced Monocyte and Endothelial Dysfunction Primarily through Glucose Transport-Independent but Redox-Dependent Mechanisms. *J Clin Med*. 2023;12(4):1356.
 349. Pickering RJ, Rosado CJ, Sharma A, Buksh S, Tate M, de Haan JB. Recent novel approaches to limit oxidative stress and inflammation in diabetic complications. *Clin Transl Immunology*. 2018;7:e1016.
 350. Li C, Zhang J, Xue M, Li X, Han F, Liu X, et al. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18(1):15.
 351. Koizumi T, Watanabe M, Yokota T, Tsuda M, Handa H, Koya J et al. Empagliflozin suppresses mitochondrial reactive oxygen species generation and mitigates the inducibility of atrial fibrillation in diabetic rats. *Front Cardiovasc Med*. 2023;6:10.
 352. Wang J, Huang X, Liu H, Chen Y, Li P, Liu L, et al. Empagliflozin Ameliorates Diabetic Cardiomyopathy via Attenuating Oxidative Stress and Improving Mitochondrial Function. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:1122494.
 353. Malik A, Bagchi AK, Jassal DS, Singal PK. Doxorubicin-induced cardiomyopathy is mitigated by empagliflozin via the modulation of endoplasmic reticulum

stress pathways. *Mol Med Rep.* 2024;29(5):74.

354. Cai W, Chong K, Huang Y, Huang C, Yin L. Empagliflozin improves mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy by modulating ketone body metabolism and oxidative stress. *Redox biology.* 2024;69:103010.

355. Li N, Zhu QX, Li GZ, Wang T, Zhou H. Empagliflozin ameliorates diabetic cardiomyopathy probably via activating AMPK/PGC-1 α and inhibiting the RhoA/ROCK pathway. *World journal of diabetes.* 2023;14(12):1862–1876.

356. Min J, Wu L, Liu Y, Song G, Deng Q, Jin W, et al. Empagliflozin attenuates trastuzumab-induced cardiotoxicity through suppression of DNA damage and ferroptosis. *Life sciences.* 2023;312:121207.

357. Steven S, Frenis K, Oelze M, Kalinovic S, Kuntic M, Bayo Jimenez MT, et al. Vascular inflammation and oxidative stress: major triggers for cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:7092151.

358. Kusaka H, Koibuchi N, Hasegawa Y, Ogawa H, Kim Mitsuyama S. Empagliflozin lessened cardiac injury and reduced visceral adipocyte hypertrophy in prediabetic rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15:157.

359. Bonnet F, Scheen AJ. Effects of SGLT2 inhibitors on systemic and tissue low-grade inflammation: The potential contribution to diabetes complications and cardiovascular disease. *Diabetes Metab.* 2018;44(6):457-464.

360. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3328.

361. Butts B, Gary RA, Dunbar SB, Butler J. The Importance of NLRP3 Inflammasome in Heart Failure. *J Card Fail.* 2015;21(7):586-93.

362. Ye Y, Bajaj M, Yang HC, Perez-Polo JR, Birnbaum Y. SGLT-2 Inhibition with Dapagliflozin Reduces the Activation of the Nlrp3/ASC Inflammasome and Attenuates the Development of Diabetic Cardiomyopathy in Mice with Type 2 Diabetes. Further Augmentation of the Effects with Saxagliptin, a DPP4 Inhibitor. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2017;31: 119-132.

363. Byrne NJ, Matsumura N, Maayah ZH, Ferdaoussi M, Takahara S, Darwesh AM, et al. Empagliflozin Blunts Worsening Cardiac Dysfunction Associated With Reduced NLRP3 (Nucleotide-Binding Domain-Like Receptor Protein 3) Inflammasome Activation in Heart Failure. *Circ Heart Fail.* 2020;13(1):e006277.

364. Lin B, Koibuchi N, Hasegawa Y, Sueta D, Toyama K, Uekawa K, et al. Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol.* 2014;26;13:148.

365. Shi X, Verma S, Yun J, Brand-Arzamendi K, Singh KK, Liu X, Garg A, Quan A, Wen XY. Effect of empagliflozin on cardiac biomarkers in a zebrafish model of heart failure: clues to the EMPA-REG OUTCOME trial?. *Mol Cell Biochem.* 2017;433:97-102.

366. Arow M, Waldman M, Yadin D, Nudelman V, Shainberg A, Abraham NG, et al. Sodium–glucose cotransporter 2 inhibitor Dapagliflozin attenuates diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Diabetol.* 2020;19:7.

367. Lim CT, Kola B, Korbonits M. AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J Mol Endocrinol.* 2010;44(2):87-97.

368. Coughlan K, Valentine R, Ruderman N, Saha A. AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes?. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014;7:241-253

369. Zhou H, Wang S, Zhu P, Hu S, Chen Y, Ren J. Empagliflozin rescues diabetic myocardial microvascular injury via AMPK-mediated inhibition of mitochondrial fission. *Redox Biol.* 2018;15:335-346.

370. Asensio Lopez MDC, Lax A, Hernandez Vicente A, Saura Guillen E, Hernandez-

Martinez A, Fernandez Del Palacio MJ, et al. Empagliflozin improves post-infarction cardiac remodeling through GTP enzyme cyclohydrolase 1 and irrespective of diabetes status. *Sci Rep*. 2020;10:13553.

371. Lu Q, Liu J, Li X, Sun X, Zhang J, Ren D, et al. Empagliflozin attenuates ischemia and reperfusion injury through LKB1/AMPK signaling pathway. *Mol Cell Endocrinol*. 2020;501:110642.

372. Sayour AA, Korkmaz-Icöz S, Loganathan S, Ruppert M, Sayour VN, Oláh A, et al. Acute canagliflozin treatment protects against in vivo myocardial ischemia-reperfusion injury in non-diabetic male rats and enhances endothelium-dependent vasorelaxation. *J Transl Med*. 2019;17:127.

373. Tanajak P, Sa-Nguanmoo P, Sivasinprasasn S, Thummasorn S, Siri-Angkul N, Chattipakorn SC, et al. Cardioprotection of dapagliflozin and vildagliptin in rats with cardiac ischemia-reperfusion injury. *J Endocrinol*. 2018;236:69-84.

374. Trang NN, Chung CC, Lee TW, Cheng WL, Kao YH, Huang SY, et al. Empagliflozin and liraglutide differentially modulate cardiac metabolism in diabetic cardiomyopathy in rats. *Int J Mol Sci*. 2021;22:1177.

375. horro FJ, Such-Belenguer L, López-Merino V. Modelos animales de enfermedad cardiovascular [Animal models of cardiovascular disease]. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(1):69-84.

376. Pilz PM, Ward JE, Chang WT, Kiss A, Bateh E, Jha A, et al. Large and Small Animal Models of Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *Circulation research*. 2020;130(12): 1888–1905.

377. Thomas WA, Hartroft WS. Myocardial infarction in rats fed diets containing high fat, cholesterol, thiouracil, and sodium cholate. *Circulation*. 1959;19:65-72.

378. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res*. 1985;57:84-95.

379. Pan Y, Gao J, Gu R, Song W, Li H, Wang J. et al. Effect of injection of different doses of isoproterenol on the hearts of mice. *BMC Cardiovasc Disord*. 2022;22:409.

380. Silva KAS, Emter CA. Large Animal Models of Heart Failure: A Translational Bridge to Clinical Success. *JACC Basic Transl Sci*. 2020;5(8):840-856.

381. Janssen PML, Elnakish MT. Modeling heart failure in animal models for novel drug discovery and development. *Expert opinion on drug discovery*. 2019;14(4):355–363.

382. Charles CJ, Rademaker MT, Scott NJA, Richards AM. Large Animal Models of Heart Failure: Reduced vs. Preserved Ejection Fraction. *Animals : an open access journal from MDPI*. 2020;10(10):1906.

383. Reimer KA, Jennings RB. The “wavefront phenomenon” of myocardial ischemic cell death, II Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest*. 1979;40:633-644.

384. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. I. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*. 1977;56:786.

385. Dixon JA, Spinale FG. Large animal models of heart failure: a critical link in the translation of basic science to clinical practice. *Circulation. Heart failure*. 2009;2(3):262-271.

386. Erlebacher JA, Weiss JL, Weisfeldt ML, Bulkley BH. Early dilation of the infarcted segment in acute transmural myocardial infarction: role of infarct expansion in acute left ventricular enlargement. *J Am Coll Cardiol*. 1989;4:201-208.

387. Jugdutt BI, Menon V. Valsartan-induced cardioprotection involves angiotensin II type 2 receptor upregulation in dog and rat models of in vivo reperfused myocardial infarction. *J Card Fail*. 2004;10:74-82.

388. White FC, Roth DM, Bloor CM. The pig as a model for myocardial ischemia and

exercise. *Lab Anim Sci.* 1986;36:351-356.

389. Sabbah HN, Stein PD, Kono T, Gheorghiade M, Levine TB, Jafri S, et al. A canine model of chronic heart failure produced by multiple sequential coronary microembolizations. *Am J Physiol.* 1991;260(4 Pt 2):H1379-84.

390. Weaver ME, Pantely GA, Bristow JD, Ladley HD. A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovasc Res.* 1986;20:907-917.

391. Perreault CL, Shannon RP, Komamura K, Vatner SF, Morgan JP. Abnormalities in intracellular calcium regulation and contractile function in myocardium from dogs with pacing-induced heart failure. *J. Clin. Investig.* 1992;89:932-938.

392. McMahon WS, Mukherjee R, Gillette PC, Crawford FA, Spinale FG. Right and left ventricular geometry and myocyte contractile processes with dilated cardiomyopathy: myocyte growth and beta-adrenergic responsiveness. *Cardiovasc Res.* 1996;31(2):314-23.

393. Spinale FG, Tomita M, Zellner JL, Cook JC, Crawford FA, Zile MR. Collagen remodeling and changes in LV function during development and recovery from supraventricular tachycardia. *Am J Physiol Circ Physiol.* 1991;261:H308-H318.

394. Miyagi C, Miyamoto T, Kuroda T, Karimov JH, Starling RC, Fukamachi K. Large animal models of heart failure with preserved ejection fraction. *Heart failure reviews.* 2022;27(2):595-608.

395. Cops J, Haesen S, De Moor B, Mullens W, Hansen D. Current animal models for the study of congestion in heart failure: an overview. *Heart failure reviews.* 2019;24(3):387-397.

396. Whipple GH, Sheffield LT, Woodman EG, Theophilis C, Friedman S. Reversible congestive heart failure due to chronic rapid stimulation of the normal heart. *Proc N Engl Cardiovasc Soc.* 1962;20:39-40.

397. Reiter U, Reiter G, Manninger M, Adelsmayr G, Schipke J, Alogna A, et al. Early-stage heart failure with preserved ejection fraction in the pig: A cardiovascular magnetic resonance study. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* 2016;18(1):63.

398. Sorop O, Heinonen I, Van Kranenburg M, Van De Wouw J, De Beer VJ, Nguyen ITN, et al. Multiple common comorbidities produce left ventricular diastolic dysfunction associated with coronary microvascular dysfunction, oxidative stress, and myocardial stiffening. *Cardiovasc Res.* 2018;114:954-964.

399. Zbinden G, Bagdon RE. Isoproterenol-induced heart necrosis, an experimental model for the study of angina pectoris and myocardial infarct. *Rev Can Biol.* 1963;22:257-263.

400. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979;44:503-512.

401. Fletcher PJ, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. *Circ Res.* 1981;49:618-626.

402. van den Borne SW, van de Schans VA, Strzelecka AE, Vervoort-Peters HT, Lijnen PM, Cleutjens JP, et al. Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2009;84:273-282.

403. Riehle C, Bauersachs J. Small animal models of heart failure. *Cardiovascular research.* 2019;115(13):1838-1849.

404. Rockman HA, Wachhorst SP, Mao L, Ross J Jr. ANG II receptor blockade prevents ventricular hypertrophy and ANF gene expression with pressure overload in mice. *Am J Physiol.* 1994;266:H2468-H2475.

405. Patten RD, Hall-Porter MR. Small animal models of heart failure: development

- of novel therapies, past and present. *Circulation. Heart failure*. 2009;2(2):138-144.
406. Melleby AO, Romaine A, Aronsen JM, Veras I, Zhang L, Sjaastad I, et al. A novel method for high precision aortic constriction that allows for generation of specific cardiac phenotypes in mice. *Cardiovasc Res*. 2018;114:1680-1690.
407. Cantor EJ, Babick AP, Vasanji Z, Dhalla NS, Netticadan T. A comparative serial echocardiographic analysis of cardiac structure and function in rats subjected to pressure or volume overload. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38:777-786.
408. Barrick CJ, Rojas M, Schoonhoven R, Smyth SS, Threadgill DW. Cardiac response to pressure overload in 129S1/SvImJ and C57BL/6J mice: temporal- and background-dependent development of concentric left ventricular hypertrophy. *Am Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H2119-H2130.
409. Koentges C, Pepin ME, Musse C, Pfeil K, Alvarez SVV, Hoppe N, et al. Gene expression analysis to identify mechanisms underlying heart failure susceptibility in mice and humans. *Basic Res Cardiol*. 2018;113:8.
410. Toischer K, Rokita AG, Unsold B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, et al. Differential cardiac remodeling in preload versus after load. *Circulation*. 2010;122:993-1003.
411. Damiani RM, Moura DJ, Viau CM, Caceres RA, Henriques JAP, Saffi J. Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. *Arch Toxicol*. 2016;90:2063-2076.
412. Bristow MR, Sageman WS, Scott RH, Billingham ME, Bowden RE, Kernoff RS, et al. Acute and chronic cardiovascular effects of doxorubicin in the dog: the cardiovascular pharmacology of drug-induced histamine release. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1980;2:487-515.
413. Lee V, Randhawa AK, Singal PK. Adriamycin-induced myocardial dysfunction in vitro is mediated by free radicals. *Am J Physiol*. 1991;261:H989-H995.
414. Gorini S, De Angelis A, Berrino L, Malara N, Rosano G, Ferraro E. Chemotherapeutic drugs and mitochondrial dysfunction: focus on doxorubicin, trastuzumab, and sunitinib. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1.
415. Renu K, V G A, P B TP, Arunachalam S. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy - An update. *Eur J Pharmacol*. 2018;818:241-253.
416. Gomes AC, Falcão-Pires I, Pires AL, Brás-Silva C, Leite-Moreira AF. Rodent models of heart failure: an updated review. *Heart Failure Reviews*. 2012;18(2):219-249.
417. Sun D, Zhang F, Ma T, Zhang Y, Liang Z. Atorvastatin alleviates left ventricular remodeling in isoproterenol-induced chronic heart failure in rats by regulating the RhoA/Rho kinase signaling pathway. *Pharmacological reports : PR*. 2020;72(4):903-911.
418. Zhou FT, Ma K. Fasudil protects against isoproterenol-induced myocardial infarction in mice via inhibiting Rho/ROCK signaling pathway. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2020;24(10):5659-5667.
419. Zhou R, Ma P, Xiong A, Xu Y, Wang Y, Xu Q. Protective effects of low-dose rosuvastatin on isoproterenol-induced chronic heart failure in rats by regulation of DDAH-ADMA-NO pathway. *Cardiovasc Ther*. 2017;35(2).
420. Abbaszadeh S, Javidmehr A, Askari B, Janssen PML, Soraya H. Memantine, an NMDA receptor antagonist, attenuates cardiac remodeling, lipid peroxidation and neutrophil recruitment in heart failure: A cardioprotective agent?. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018;108:1237-1243.
421. Li H, Lu ZZ, Chen C, Song Y, Xiao H, Zhang YY. Echocardiographic assessment of β -adrenoceptor stimulation-induced heart failure with reduced heart rate in mice. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2014;41(1):58-66.
422. Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, Spinale FG, Francis GS, Prabhu SD, et al. Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation research*. 2012;111(1):131-150.

423. Iorio A, Pozzi A, Senni M. Addressing the Heterogeneity of Heart Failure in Future Randomized Trials. *Curr Heart Fail Rep*. 2017;14(3):197-202.
424. Greenberg MJ, Daily NJ, Wang A, Conway MK, Wakatsuki T. Genetic and Tissue Engineering Approaches to Modeling the Mechanics of Human Heart Failure for Drug Discovery. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2018;5:120.
425. Li P, Waters RE, Redfern SI, Zhang M, Mao L, Annex BH, et al. Oxidative phenotype protects myofibers from pathological insults induced by chronic heart failure in mice. *Am J Pathol*. 2007;170(2):599-608.
426. Al Thani NA, Hasan M, Yalcin HC. Use of Animal Models for Investigating Cardioprotective Roles of SGLT2 Inhibitors. *Journal of cardiovascular translational research*. 2023;16(5):975-986.
427. Park SW, Persaud SD, Ogokeh S, Meyers TA, Townsend D, Wei LN. CRABP1 protects the heart from isoproterenol-induced acute and chronic remodeling. *J Endocrinol*. 2018;236(3):151-165.
428. Fan C, Tang X, Ye M, Zhu G, Dai Y, Yao Z, et al. Qi-Li-Qiang-Xin Alleviates Isoproterenol-Induced Myocardial Injury by Inhibiting Excessive Autophagy via Activating AKT/mTOR Pathway. *Frontiers in pharmacology*. 2019;10:1329.
429. Lee TI, Chen YC, Lin YK, Chung CC, Lu YY, Kao YH, et al. Empagliflozin Attenuates Myocardial Sodium and Calcium Dysregulation and Reverses Cardiac Remodeling in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1680.
430. Davidson EP, Coppey LJ, Shevalye H, Obrosova A, Yorek MA. Vascular and Neural Complications in Type 2 Diabetic Rats: Improvement by Sacubitril/Valsartan Greater Than Valsartan Alone. *Diabetes*. 2018;67(8):1616-1626.
431. Zacchigna S, Paldino A, Falcão-Pires I, Daskalopoulos EP, Dal Ferro M, Vodret S, et al. Towards standardization of echocardiography for the evaluation of left ventricular function in adult rodents: a position paper of the ESC Working Group on Myocardial Function. *Cardiovascular research*. 2021;117(1):43-59.
432. Jakovljevic V, Milic P, Bradic J, Jeremic J, Zivkovic V, Srejsovic I, et al. Standardized Aronia melanocarpa Extract as Novel Supplement against Metabolic Syndrome: A Rat Model. *Int J Mol Sci*. 2018;20(1):6.
433. Zhang Y, Zhao X, Huang H, Li M. Network meta-analysis of sacubitril/valsartan for the treatment of essential hypertension. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*. 2023;112(7):855-867.
434. Feng M, Whitesall S, Zhang Y, Beibel M, D'Alecy L, DiPetrillo K. Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. *Am J Hypertens*. 2008;21(12):1288-91.
435. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50(6):940-50.
436. Dhein S. The Langendorff Heart. In: Dhein S, Mohr FW, Delmar M, editors. *Practical Methods in Cardiovascular Research*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2005. p. 155-172.
437. Joksimovic Jovic J, Sretenovic J, Jovic N, Rudic J, Zivkovic V, Srejsovic I, et al. Cardiovascular Properties of the Androgen-Induced PCOS Model in Rats: The Role of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:8862878.
438. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*. 1979;95:351-358.
439. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 1982;126(1):131-138.
440. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor.

Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 1985. p. 123-132.

441. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods*. 1980;38(1-2):161-170.

442. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 1984;105:121-126

443. Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International journal of health sciences*. 2018;12(3):88-93.

444. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E, editor. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. Philadelphia, PA: Grune & Stratton; 1984. p. 83-85.

445. Averill-Bates DA. The antioxidant glutathione. *Vitam Horm*. 2023;121:109-141.

446. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood. *Glutathione*. *Lab Clin Med*. 1963;61:882-888.

447. Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R, Sabzevari O. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Human & experimental toxicology*. 2003;22:205-211.

448. Bradic J, Jeremic N, Petkovic A, Jeremic J, Zivkovic V, Srejsovic I, et al. Cardioprotective effects of Galium verum L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arch. Physiol. Biochem*. 2020;126:408-415.

449. Sretenovic J, Ajdzanovic V, Zivkovic V, Srejsovic I, Corbic M, Milosevic V, et al. Nandrolone decanoate and physical activity affect quadriceps in peripubertal rats. *Acta Histochem*. 2018;120(5):429-437.

450. Ravic M, Srejsovic I, Novakovic J, Andjic M, Sretenovic J, Muric M, et al. Effect of GLP-1 Receptor Agonist on Ischemia Reperfusion Injury in Rats with Metabolic Syndrome. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2024;17(4):525.

451. Dragicin ND, Jakovljevic VL, Jeremic JN, Srejsovic IM, Andjic MM, Rankovic MR, et al. Melissa officinalis L. Supplementation Provides Cardioprotection in a Rat Model of Experimental Autoimmune Myocarditis. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:1344946.

452. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

453. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G Power 3. A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007;39:175-191.

454. Parichatikanond W, Duangrat R, Kurose H, Mangmool S. Regulation of β -Adrenergic Receptors in the Heart: A Review on Emerging Therapeutic Strategies for Heart Failure. *Cells*. 2024;13(20):1674.

455. Zhang H, Dhalla NS. The Role of Pro-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2024;25(2):1082.

456. Chang SC, Ren S, Rau CD, Wang JJ. Isoproterenol-Induced Heart Failure Mouse Model Using Osmotic Pump Implantation. *Methods Mol Biol*. 2018;1816:207-220.

457. Keihanian F, Moohebbati M, Saeidinia A, Mohajeri SA, Madaeni S. Therapeutic effects of medicinal plants on isoproterenol-induced heart failure in rats. *Biomed Pharmacother*. 2021;134:111101.

458. Cautela J, Tartiere JM, Cohen-Solal A, Bellemain-Appaix A, Theron A, Tibi T, et al. Management of low blood pressure in ambulatory heart failure with reduced ejection fraction patients. *Eur J Heart Fail*. 2020;22(8):1357-1365.

459. Ather S, Chan W, Chillar A, Aguilar D, Pritchett AM, Ramasubbu K, et al. Association of systolic blood pressure with mortality in patients with heart failure with reduced ejection fraction: a complex relationship. *Am Heart J*. 2011;161:567-573.

460. Malik AH, Aronow WS. Efficacy of Sacubitril/Valsartan in Hypertension. *Am J Ther.* 2022;29(3):e322-e333.
461. Ando S, Rahman MA, Butler GC, Senn BL, Floras JS. Comparison of candoxatril and atrial natriuretic factor in healthy men: effects on hemodynamics, sympathetic activity, heart rate variability, and endothelin. *Hypertension.* 1995;26:1160-1166.
462. Braunwald E. The path to an angiotensin receptor antagonist-neprilysin inhibitor in the treatment of heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65:1029-1041.
463. Cruz-López EO, Ye D, Stolk DG, Clahsen-van Groningen MC, van Veghel R, Garrelds IM, et al. Combining renin-angiotensin system blockade and sodium-glucose cotransporter-2 inhibition in experimental diabetes results in synergistic beneficial effects. *J Hypertens.* 2024;42(5):883-892.
464. Chen HY, Huang JY, Siao WZ, Jong GP. The association between SGLT2 inhibitors and new-onset arrhythmias: a nationwide population-based longitudinal cohort study. *Cardiovasc Diabetol.* 2020;19:73.
465. Ko SF, Sung PH, Yang CC, Chiang JY, Yip HK. Combined therapy with dapagliflozin and entresto offers an additional benefit on improving the heart function in rat after ischemia-reperfusion injury. *Biomed J.* 2023;46(3):100543.
466. Jiang J, Gao J, Zhang X, Li Y, Dang H, Liu Y, et al. Combined treatment with sacubitril/valsartan plus dapagliflozin in patients affected by heart failure with reduced ejection fraction. *Front Cardiovasc Med.* 2023;10:1097066.
467. Kim HM, Hwang IC, Choi W, Yoon YE, Cho GY. Combined effects of ARNI and SGLT2 inhibitors in diabetic patients with heart failure with reduced ejection fraction. *Scientific reports.* 2021;11(1):22342.
468. Mo X, Lu P, Yang X. Efficacy of sacubitril-valsartan and SGLT2 inhibitors in heart failure with reduced ejection fraction: A systematic review and meta-analysis. *Clinical cardiology.* 2023;46(10):1137-1145.
469. Mustapic I, Bakovic D, Susilovic-Grabovac Z, Borovac JA. Left Ventricular Systolic Function After 3 Months of SGLT2 Inhibitor Therapy in Heart Failure Patients with Reduced Ejection Fraction. *J Cardiovasc Transl Res.* 2023;16(5):987-998.
470. Goerg J, Sommerfeld M, Greiner B, Lauer D, Seckin Y, Kulikov A, et al. Low-Dose Empagliflozin Improves Systolic Heart Function after Myocardial Infarction in Rats: Regulation of MMP9, NHE1, and SERCA2a. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):5437.
471. Lipskaia L, Chemaly ER, Hadri L, Lompre AM, Hajjar RJ. Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opin Biol Ther.* 2010;10(1):26-41.
472. Hammoudi N, Jeong D, Singh R, Farhat A, Komajda M, Mayoux E, Hajjar R, Lebeche D. Empagliflozin Improves Left Ventricular Diastolic Dysfunction in a Genetic Model of Type 2 Diabetes. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2017;31(3):233-246.
473. Erdogan BR, Yesilyurt-Dirican ZE, Karaomerlioglu I, Muderrisoglu AE, Sevim K, Michel MC, et al. Sacubitril/Valsartan Combination Partially Improves Cardiac Systolic, but Not Diastolic, Function through β -AR Responsiveness in a Rat Model of Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci.* 2024;25(19):10617.
474. Zhuo XZ, Wu Y, Ni YJ, Liu JH, Gong M, Wang XH, et al. Isoproterenol instigates cardiomyocyte apoptosis and heart failure via AMPK inactivation-mediated endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis.* 2013;18(7):800-10.
475. Akhtar MS, Hassan Q, Afzal O, Altamimi A, Hassan MZ, Sharma AK, et al. Comparative Efficacy of Levosimendan, Ramipril, and Sacubitril/ Valsartan in Isoproterenol-induced Experimental Heart Failure: A Hemodynamic and Molecular Approach. *Current molecular pharmacology.* 2023;16(6):629-639.
476. Adamcova M, Baka T, Dolezelova E, Aziriova S, Krajcovicova K, Karesova I,

- 3 et al. Relations between markers of cardiac remodelling and left ventricular collagen in an isoproterenol-induced heart damage model. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2019;70(1):10.26402/jpp.2019.1.08.
- 3 477. Hagdorn QAJ, Bossers GPL, Koop AC, Piek A, Eijgenraam TR, van der Feen DE, et al. A novel method optimizing the normalization of cardiac parameters in small animal models: the importance of dimensional indexing. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2019;316(6):H1552-H1557.
478. Bertinchant JP, Robert E, Polge A, Marty-Double C, Fabbro-Peray P, Poirey S, et al. Comparison of the diagnostic value of cardiac troponin I and T determination for detecting early myocardial damage and the relationship with histological findings after isoprenaline-induced cardiac injury in rats. *Clin Chim Acta*. 2000;298:13-28
479. Herman E, Zhang J, Knapton A, Lipshultz SE, Rifai N, Sistare F. Serum cardiac troponin T as a biomarker for acute myocardial injury induced by low doses of isoproterenol in rats. *Cardiovasc Toxicol*. 2006;6:211-22
480. Zhang J, Knapton A, Lipshultz SE, Weaver JL, Herman EH. Isoproterenol-induced cardiotoxicity in sprague-dawley rats: correlation of reversible and irreversible myocardial injury with release of cardiac troponin T and roles of iNOS in myocardial injury. *Toxicol Pathol*. 2008;36(2):277-8.
481. Xing Z, Yang C, He J, Feng Y, Li X, Peng C, et al. Cardioprotective Effects of Aconite in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:1090893.
482. Li L, Ye J, Zhao Z, Hu S, Liang H, Ouyang J, et al. Shenfu injection improves isoproterenol-induced heart failure in rats by modulating co-metabolism and regulating the trimethylamine-N-oxide - inflammation axis. *Front Pharmacol*. 2024;15:1412300.
483. Zhang W, Liu J, Fu Y, Ji H, Fang Z, Zhou W, et al. Sacubitril/Valsartan Reduces Fibrosis and Alleviates High-Salt Diet Induced HFpEF in Rats. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:600953
484. Ma Y, Li W, Liu Y, Li L. Empagliflozin combined with sacubitril/valsartan in hypertensive patients with heart failure: a retrospective study of efficacy and effect on blood pressure variability and cardiac function. *Am J Transl Res*. 2024;16(7):3036-3045.
485. Zhang F, Cao X, Zhao C, Chen L, Chen X. Empagliflozin activates JAK2/STAT3 signaling and protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury under high glucose conditions. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2023;55(1):116-125.
486. Wang Z, Liu Q, Wang X, Wang P, Wang Z, Zhang F. Empagliflozin improves cardiac function in rats with chronic heart failure. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2024;397(2):1037-1044.
487. Yeh JN, Yue Y, Chu YC, Huang CR, Yang CC, Chiang JY, et al. Entresto protected the cardiomyocytes and preserved heart function in cardiorenal syndrome rat fed with high-protein diet through regulating the oxidative stress and Mfn2-mediated mitochondrial functional integrity. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2021;144:112244.
488. Münzel T, Camici GG, Maack C, Bonetti NR, Fuster V, Kovacic JC. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(2):212-229.
- 3 489. Dogan Z, Ergun DD, Durmus S, Sahin H, Senturk GE, Gelisgen R, et al. Empagliflozin and sacubitril/valsartan reverse methotrexate cardiotoxicity by repressing oxidative stress and hypoxia in heart embryonic H9c2 cardiomyocytes - the role of morphology of mitochondria observed on electron microscopy. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2023;27(9):3979-3992.

490. Li X, Wang M, Kalina JO, Preckel B, Hollmann MW, Albrecht M, et al. Empagliflozin prevents oxidative stress in human coronary artery endothelial cells via the NHE/PKC/NOX axis. *Redox Biol.* 2024;69:102979.
491. Cassano V, Armentaro G, Magurno M, Aiello V, Borrello F, Miceli S, et al. Short-term effect of sacubitril/valsartan on endothelial dysfunction and arterial stiffness in patients with chronic heart failure. *Front Pharmacol.* 2022;13:1069828.
492. Flori L, Lazzarini G, Spezzini J, Pirone A, Calderone V, Testai L, et al. The isoproterenol-induced myocardial fibrosis: A biochemical and histological investigation. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 2024;174:116534.
493. Chung CC, Lin YK, Chen YC, Kao YH, Yeh YH, Trang NN, et al. Empagliflozin suppressed cardiac fibrogenesis through sodium-hydrogen exchanger inhibition and modulation of the calcium homeostasis. *Cardiovascular diabetology.* 2023;22(1):27.
494. Zhang W, Liu J, Fu Y, Ji H, Fang Z, Zhou W, et al. Sacubitril/Valsartan Reduces Fibrosis and Alleviates High-Salt Diet-Induced HFpEF in Rats. *Frontiers in pharmacology.* 2021;11:600933.
495. Ren M, Ye X, Ouyang C, Da Q, Xue W, Chen P. JMJD2A mediates transcriptional activation of SFRP4 and regulates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in heart failure. *Pathology international.* 2024;74(4):210–221.
496. Liang Y, Liu D, Ochs T, Tang C, Chen S, Zhang, S, et al. Endogenous sulfur dioxide protects against isoproterenol-induced myocardial injury and increases myocardial antioxidant capacity in rats. *Laboratory Investigation.* 2010;91(1):12–23.
497. Li X, Lin Y, Wang S, Zhou S, Ju J, Wang X, et al. Extracellular Superoxide Dismutase Is Associated With Left Ventricular Geometry and Heart Failure in Patients With Cardiovascular Disease. *J Am Heart Assoc.* 2020;9(15):e016862.
498. Deger N, Ozmen R, Karabulut D. Thymoquinone regulates nitric oxide synthase enzymes and receptor-interacting serine-threonine kinases in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. *Chem Biol Interact.* 2022;365:110090.
499. Cotrin JC, de Souza GSM, Petito-da-Silva TI, Cardoso LEM, Souza-Mello V, Barbosa-da-Silva S. Empagliflozin Alleviates Left Ventricle Hypertrophy in High-Fat-Fed Mice by Modulating Renin Angiotensin Pathway. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2022;2022:8861911.
500. Pan Y, Liu L, Yang H, Chen W, Chen Z, Xu J. Sacubitril/Valsartan Improves Progression of Early Diabetic Nephropathy in Rats Through Inhibition of NLRP3 Inflammasome Pathway. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2022;15:2479-2488.
501. Ishibashi Y, Takahashi N, Tokumaru A, Karino K, Sugamori T, Sakane T, et al. Activation of inducible NOS in peripheral vessels and outcomes in heart failure patients. *J Card Fail.* 2008;14(9):724-31.
502. Roy R, Wilcox J, Webb AJ, O'Gallagher K. Dysfunctional and Dysregulated Nitric Oxide Synthases in Cardiovascular Disease: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Int J Mol Sci.* 2023;24(20):15200.
503. Chauhan SD, Seggara G, Vo PA, Macallister RJ, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Protection against Lipopolysaccharide-induced Endothelial Dysfunction in Resistance and Conduit Vasculature of iNOS Knockout Mice. *FASEB J.* 2003;17:773-775.
504. Koyani CN, Plastira I, Sourij H, Hallström S, Schmidt A, Rainer PP, et al. Empagliflozin protects heart from inflammation and energy depletion via AMPK activation. *Pharmacological Research.* 2020;104870.
505. Abdel-Latif GA, Elwahab AHA, Hasan RA, ElMongy NF, Ramzy MM, Louka ML, et al. A novel protective role of sacubitril/valsartan in cyclophosphamide induced lung injury in rats: impact of miRNA-150-3p on NF-κB/MAPK signaling trajectories. *Sci Rep.* 2020;10(1):13045.

506. Ghiasi M. Investigating the NF- κ B signaling pathway in heart failure: Exploring potential therapeutic approaches. *Heliyon*. 2024;10(23):e40812.
507. Sharma S, Iqbal A, Khan V, Sharma K, Najmi AK, Haque SE. Icariin ameliorates oxidative stress-induced inflammation, apoptosis, and heart failure in isoproterenol-challenged Wistar rats. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2023;26(5):517-525.
508. Liu J, Li X, Ding L, Li W, Niu X, Gao D. GRK2 participation in cardiac hypertrophy induced by isoproterenol through the regulation of Nrf2 signaling and the promotion of NLRP3 inflammasome and oxidative stress. *International immunopharmacology*. 2023;117:109957.
509. Lv C, Hu C, Zhu C, Wan X, Chen C, Ji X, et al. Empagliflozin alleviates the development of autoimmune myocarditis via inhibiting NF- κ B-dependent cardiomyocyte pyroptosis. *Biomed Pharmacother*. 2024;170:115963.
510. Mohany M, Ahmed MM, Al-Rejaie SS. The Role of NF- κ B and Bax/Bcl-2/Caspase-3 Signaling Pathways in the Protective Effects of Sacubitril/Valsartan (Entresto) against HFD/STZ-Induced Diabetic Kidney Disease. *Biomedicines*. 2022;10(11):2863.
511. Seta Y, Shan K, Bozkurt B, Oral H, Mann DL. Basic mechanisms in heart failure: The cytokine hypothesis. *J Card Fail*. 1996;2:243-249.
512. Liu M, Chen J, Huang D, Ke J, Wu W. A meta-analysis of proinflammatory cytokines in chronic heart failure. *Heart Asia*. 2014;6(1):130-6.
513. Gotzmann M, Henk P, Stervbo U, Blázquez-Navarro A, Mügge A, Babel N, et al. Empagliflozin Reduces Interleukin-6 Levels in Patients with Heart Failure. *J Clin Med*. 2023;12(13):4458.
514. Gan J, Wang Y, Deng Y, Zhang J, Wang S, Jiang X, et al. Sacubitril/valsartan ameliorates cardiac function and ventricular remodeling in CHF rats via the inhibition of the tryptophan/kynurenine metabolism and inflammation. *Sci Rep*. 2024;14(1):12377.
515. Zhou P, Tang X, Deng Y, Wu R, Yi Y, Deng H, et al. The Effect of Empagliflozin on Janus Kinase 2/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Pathway in Patients with Type 2 Cardiorenal Syndrome. *Anatol J Cardiol*. 2024;28(5):229-35.
516. Wei W, Xu G, Gao J, Wang G, Wang Y, Li C, et al. Sacubitril/Valsartan partially alleviates myocardial infarction injury by activating the FGF21 signaling pathway via PPARs. *Cardiovasc Diabetol*. 2025;24(1):89.
517. Saha S, Fang X, Green CD, Das A. mTORC1 and SGLT2 Inhibitors-A Therapeutic Perspective for Diabetic Cardiomyopathy. *Int J Mol Sci*. 2023;24(20):15078

БИБИОГРАФИЈА

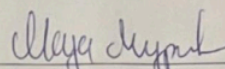
Маја Мурић, асистент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, уписала је докторске академске студије из области Експерименталне и примењене физиологије са спортском медицином на истом факултету. Своју академску каријеру започела је као сарадник настави за ужу научну област физиологија, а од краја 2021. године ради као асистент на Катедри за физиологију. Предаје физиологију на интегрисаним академским студијама фармације, интегрисаним академским студијама стоматологије, као и на основним стручним студијама на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Поред академске каријере, Маја Мурић се бави и научно-истраживачким радом, којим се активно бави од 2020. године у Центру изузетних вредности за изучавање редокс равнотеже у кардиоваскуларним и метаболичким поремећајима Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, под руководством проф. др Владимира Јаковљевића. Објавила је бројне радове у престижним међународним научним часописима. Од самог почетка свог истраживачког рада, њен примарни фокус био је на физиологији и патофизиологији кардиоваскуларног система, као и оксидативном стресу. Последњих година активно је учествовала на бројним конгресима и конференцијама на националном и међународном нивоу. Уписала је специјалистичке студије из области Спорске медицине 2021. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

*ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ*

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:
„Ефекти хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана у
експерименталном моделу срчане инсуфицијенције” истоветне.

У Крагујевцу, 10.03.2025. године,



потпис аутора
Маја Д. Мурић

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

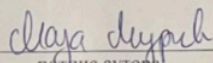
„Ефекти хроничне коадминистрације емплаглифлозина и сакубитрил/валсартана у експерименталном моделу срчане инсуфицијенције”

представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 10.03.2025. године,



попис аутора
Маја Д. Мурић

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Маја Д. Мурић,



дозвољавам



не дозвољавам

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

„Ефекти хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана у експерименталном моделу срчане инсуфицијенције”

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

Овом Изјавом такође



дозвољавам



не дозвољавам¹

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

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

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

У Крагујевцу, 10.03.2025. године,

Маја Д. Мурић

Потпис аутора
Маја Д. Мурић

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

Ефекти хроничне коадминистрације емпаглифлозина и сакубитрил/валсартана у експерименталном моделу срчане инсуфицијенције

ORIGINALITY REPORT

9%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	scidar.kg.ac.rs Internet	2191 words — 3%
2	www.imrpress.com Internet	1200 words — 2%
3	Maja Muric, Ivan Srejavic, Jovana Novakovic, Vladimir Zivkovic et al. "The Combined Empagliflozin and Sacubitril/Valsartan Therapy Attenuates Isoproterenol-Induced Heart Failure in Rats: Functional, Molecular, and Structural Insights", Cardiovascular Drugs and Therapy, 2025 Crossref	1140 words — 2%
4	Jeremić, Jovana N.. "Кардиопротективни ефекти диалил трисулфида на исхемијско-реперфузиону повреду изолованог срца пацова са метаболичким синдромом: улога оксидационог стреса", University of Kragujevac (Serbia), 2024 ProQuest	902 words — 1%
5	link.springer.com Internet	528 words — 1%
6	www.wjgnet.com Internet	391 words — 1%

EXCLUDE QUOTES	OFF	EXCLUDE SOURCES	< 1%
EXCLUDE BIBLIOGRAPHY	OFF	EXCLUDE MATCHES	< 9 WORDS