

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Vojtěch Krátký

Možnosti farmakologického ovlivnění renální dysfunkce u experimentálního modelu srdečního selhání

Pharmacological possibilities for amending renal dysfunction in experimental model of heart failure

Disertační práce

Školitel: MUDr. Zuzana Charvátová, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 30.05.2021

Vojtěch Krátký

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat své školitelce MUDr. Zuzaně Charvátové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné rady během celého studia a sepsování této práce. Poděkování patří také všem kolegům z Centra experimentální medicíny IKEM a zejména pak MVDr. L. Kopkanovi, Ph.D. a prof. MUDr. L. Červenkovi, CSc. za cenné rady a podporu při práci na vlastních experimentech. Zároveň bych chtěl poděkovat své rodině za podporu a trpělivost v průběhu celého studia.

Možnosti farmakologického ovlivnění renální dysfunkce u experimentálního modelu srdečního selhání

Abstrakt

Mechanismy vzniku a možnosti farmakologického ovlivnění renální dysfunkce u pacientů s chronickým srdečním selháním nejsou dosud dostatečně prozkoumány. Cílem práce proto bylo porovnat vliv ACE inhibitoru (ACEi), blokátoru AT₁ receptoru (ARB) a kombinovaného AT₁ blokátoru a inhibitoru neprilysinu (ARNi) na renální hemodynamické a exkreční funkce na experimentálním modelu srdečního selhání navozeném pomocí aortokavální píštěle (AKP) v kombinaci s hypertenzí nebo preexistujícím poškozením ledvin. U normotenzních i hypertenzních potkanů se srdečním selháním 20 týdnů po založení AKP předešla léčba ARB, na rozdíl od léčby ACEi, renální hypoperfuzi a zabránila tak hypoxii v ledvině měřené pomocí aktivity laktát dehydrogenázy. Zároveň vykazovali AKP potkani léčení ARB nižší tvorbu ROS, zlepšenou dostupnost NO v ledvině a normální aktivitu SNS oproti potkanům léčených ACEi. Neschopnost ACEi zlepšit ledvinnou hypoperfuzi u potkanů s AKP byla nejspíše důsledkem nedostatečně utlumeného intrarenálního RAS spolu se zvýšenou aktivitou SNS při vyčerpané kapacitě kompenzatorních mechanismů, a to zejména NO. Kombinovaná léčba ARNi vedla, na rozdíl od léčby samotným ARB nebo ACEi, u potkanů se srdečním selháním po založení AKP a s progresivní renální dysfunkcí k signifikantně nižší úmrtnosti oproti neléčeným potkanům, a to zřejmě díky zlepšenému vylučování sodíku ledvinami. Podávání ARNi by proto mohla být nadějná léčebná strategie u pacientů s chronickým srdečním selháním a pokročilou renální dysfunkcí.

Klíčová slova

ACE inhibitor, aorto-kavální píštěl, blokátor AT₁ receptoru, kardiorenální syndrom, kombinovaný AT₁ blokátor a inhibitor neprilysinu, renální dysfunkce, srdeční selhání

Pharmacological possibilities for amending renal dysfunction in experimental model of heart failure

Abstract

Mechanisms underlying the development of renal dysfunction and pharmacological possibilities for its amending in patients with chronic heart failure are still incompletely understood. The aim of the study was thus to compare the effect of treatment with an ACE inhibitor (ACEi), AT₁ receptor blocker (ARB) or combined angiotensin receptor-neprilysin inhibitor (ARNi) on renal hemodynamic and excretory functions in experimental models of heart failure induced by placing an aorto-caval fistula (ACF) in combination with hypertension or preexisting renal disease. In normotensive and especially in hypertensive rats with high-output heart failure 20 weeks after ACF placement, ARB administration, dissimilarly to an ACEi treatment, was shown to prevent renal hypoperfusion and hypoxia. In addition, heart failure rats treated with ARB exhibited lower ROS generation, improved renal NO bioavailability, and normal renal SNS activity. The failure of ACEi to ameliorate renal hypoperfusion in rats with heart failure may be a consequence of insufficiently suppressed intrarenal RAS along with enhanced renal SNS activity in the face of depleted compensatory mechanisms, namely NO. Combined ARNi treatment in rats with induced heart failure superimposed on progressive renal dysfunction significantly improved survival compared to untreated rats, in contrast to ACEi administration or ARB treatment alone. Additionally, survival improvement was in ARNi-treated rats accompanied by a marked increase in natriuresis. Therefore, ARNi administration might be an effective treatment strategy for patients with chronic heart failure and advanced renal dysfunction.

Keywords

ACE inhibitor, aortocaval fistula, AT₁ receptor blocker, cardiorenal syndrome, combined angiotensin receptor-neprilysin inhibitor, heart failure, renal dysfunction

Seznam zkratek

ACE	angiotenzin konvertující enzym
ACE 2	angiotenzin konvertující enzym 2
ACEi	inhibitor angiotenzin konvertujícího enzymu
ADH	antidiuretický hormon
AKP	aorto-kavální píštěl
ANG 1-7	angiotenzin 1-7
ANG II	angiotenzin II
ANG I	angiotenzin I
ANP	atriální natriuretický peptid
ARB	blokátor AT ₁ receptoru pro angiotenzin II
ARNi	kombinovaný AT ₁ blokátor a inhibitor neprilysinu
AT ₁	receptor typu 1 pro angiotenzin II
AT ₂	receptor typu 2 pro angiotenzin II
BNP	komorový natriuretický peptid
CNS	centrální nervový systém
dP/dt max	maximální rychlost vzestupu tlaku
dP/dt min	maximální rychlost poklesu tlaku
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ENaC	amilorid-senzitivní sodíkový kanál
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
FENa	frakční exkrece sodíku
FGF 23	fibroblastový růstový faktor 23
FHH	Fawn-hooded hypertenzní potkan
FHL	Fawn-hooded normotenzní potkan
GFR	glomerulární filtrace
GSI	glomerulosklerotický index
HanSD	Hannover Sprague-Dawley
CHSS	chronické srdeční selhání
LDH	laktát dehydrogenáza
LKPSd	rozměr přední stěny levé komory v diastole
LKZSd	rozměr zadní stěny levé komory v diastole
NA	noradrenalin

NEP	neprilysin
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
NOx	nitráty/nitrity
NT-proBNP	N-terminální část prohormonu komorového natriuretického peptidu
NYHA	New York Heart Association
PKL	průtok krve ledvinou
RAS	renin-angiotenzinový systém
ROS	reaktivní formy kyslíku
SNS	sympatický nervový systém
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TGR	hypertenzní Ren-2 transgenní potkan

Obsah

Obsah	9
1. Úvod	11
1.1. Chronické srdeční selhání.....	11
1.1.1. Dělení chronického srdečního selhání.....	12
1.1.2. Zvířecí modely chronického srdečního selhání	12
1.1.2.1. Aorto - kavální píštěl	12
1.1.2.2. Ostatní modely CHSS.....	13
1.2. Renální dysfunkce u chronického srdečního selhání.....	14
1.3. Patofyziologické mechanismy vedoucí k renální dysfunkci u CHSS	14
1.3.1. Hemodynamické faktory	15
1.3.2. Renin - angiotenzinový systém	17
1.3.2.1. Aktivace RAS při chronickém srdečním selhání.....	19
1.3.2.2. Vliv nadměrné aktivace RAS na renální funkce	20
1.3.3. Sympatický nervový systém.....	20
1.3.3.1. Vliv aktivovaného SNS na renální funkce	21
1.3.4. Endotelinový systém	22
1.3.5. Antidiuretický hormon	22
1.3.6. Natriuretické peptidy	23
1.3.7. Oxid dusnatý.....	24
1.3.8. Dopad renální dysfunkce na progresi CHSS	25
1.4. Terapie chronického srdečního selhání	26
2. Hypotéza a cíle práce.....	28
3. Metodika.....	29
3.1. Model srdečního selhání.....	29
3.2. Protokol č. 1.....	29
3.2.1. Echokardiografie	30

3.2.2.	Renální hemodynamické studie.....	31
3.2.3.	Biochemická měření.....	32
3.3.	Protokol č. 2.....	34
3.3.1.	Echokardiografie	35
3.3.2.	Tlakově – objemové křivky.....	35
3.3.3.	Biochemická měření a histologická analýza	36
3.4.	Statistická analýza	36
4.	Výsledky.....	38
4.1.	Protokol č. 1.....	38
4.2.	Protokol č. 2.....	48
5.	Diskuze.....	57
5.1.	Léčba blokátorem AT ₁ receptoru na rozdíl od ACEi zlepšuje ledvinnou hypoperfuzi u potkanů s AKP.....	57
5.2.	Sakubitril/valsartan zlepšuje přežití potkanů s kardiorenálním syndromem oproti samotnému valsartanu i trandolaprilu díky vyššímu vylučování sodíku ledvinami.....	64
6.	Závěry práce	68
7.	Souhrn.....	69
8.	Summary.....	70
	Seznam použité literatury	71

1. Úvod

1.1. Chronické srdeční selhání

Chronické srdeční selhání (CHSS) je závažné onemocnění, jehož incidence a prevalence celosvětově narůstá a dosahuje tak pandemických rozměrů. Je odhadováno, že v rozvinutých zemích touto chorobou trpí 2-3 % populace a roční incidence dosahuje 0,1-0,2 % (Roger 2013; Ziaeian & Fonarow 2016). Do roku 2030 se má prevalence CHSS zvýšit o 46 % a vytvořit tak enormní zátěž pro zdravotnické systémy (Savarese & Lund 2017). Důvodů, proč k tomuto nárůstu dochází, je několik. Jednak se v posledních desetiletích rapidně zlepšila terapie akutních srdečních příhod, díky čemuž pacienti sice přežijí, avšak často mají snížené srdeční funkce a jsou tak ohroženi rozvojem CHSS. Za druhé se díky pokroku v medicíně neustále zvyšuje průměrná délka dožití, což způsobuje narůst nemocných s CHSS, u kterých prevalence roste s přibývajícím věkem. Více jak polovina nemocných s CHSS je starších 75 let a prevalence ve věkové skupině nad 80 let přesahuje 10 % (Ziaeian & Fonarow 2016). Mortalita CHSS zůstává vysoká i přes pokroky v jeho léčbě. Pět let po diagnóze se dožije pouze polovina pacientů, deseti let pak pouhých 10 % nemocných (Roger 2013). Chronické srdeční selhání není samostatnou chorobou, ale důsledek stavů, které k němu vedou. Nejdůležitějšími příčinami CHSS jsou ischemická choroba srdeční, systémová arteriální hypertenze, diabetes mellitus, kardiomyopatie, vady chlopenního aparátu a plicní choroby způsobující plicní hypertenzi (Ziaeian & Fonarow 2016).

Patofyziologicky je CHSS syndrom, při kterém srdce není schopné produkovat dostatečný srdeční výdej potřebný k uspokojení metabolických potřeb těla bez toho, aniž by se zvýšily plicní tlaky v komorách (Tan *et al.* 2010). Zvýšené plicní tlaky při levostranném chronickém srdečním selhání vedou k dilataci levé síně a následně i k postkapilární formě plicní hypertenze, projevům dušnosti, které jsou, zejména v počátečních fázích onemocnění, pouze námahové, případně až k plicnímu edému. Nedostatečný srdeční výdej pak způsobuje únavu, celkovou slabost a nevykonnost jako důsledek celkové hypoperfuze těla na základě periferní vazokonstrikce. Pro selhávání pravostranných srdečních oddílů jsou pak typické zejména příznaky a známky plynoucí ze zvýšeného měštnání krve před pravou komorou. Mezi tyto příznaky patří periferní otoky závislé na hydrostatickém tlaku, dyspeptické potíže v souvislosti se stagnací krve v gastrointestinálním traktu, zvýšená náplň krčních žil, ascites, hepatomegalie a případně i známky hepatální insuficience projevující se zvýšenými jaterními testy a poruchou

syntetické funkce jater (např. prodloužené koagulační testy). Spíše v pokročilých fázích CHSS se objevuje tachykardie, hypotenze, rozsáhlé periferní otoky až anasarka, kachexie, somnolence, případně amentní stavy či jiné změny chování (Inamdar & Inamdar 2016). Při CHSS se pak často rozvíjí renální dysfunkce, jak bude rozebráno dále.

1.1.1. Dělení chronického srdečního selhání

CHSS je možné dělit na základě ejekční frakce levé komory změřené nejčastěji pomocí echokardiografie, případně pomocí jiných metod zahrnujících mimo jiné magnetickou rezonanci srdce, výpočetní tomografii srdce nebo katetrizační ventrikulografii. Pokud je hodnota ejekční frakce levé komory $\geq 50\%$ hovoříme o srdečním selhání se zachovalou ejekční frakcí, při ejekční frakci v pásmu mezi $40 - 49\%$ o srdečním selhání s ejekční frakcí ve středním pásmu a při ejekční frakci $< 40\%$ o srdečním selhání se sníženou ejekční frakcí (Branca *et al.* 2020). Toto dělení je zejména důležité s ohledem na léčbu, jak bude diskutováno v samostatné kapitole. Existují i další dělení CHSS, která jsou důležitá zejména z klinického pohledu, jako je například dělení podle New York Heart Association (NYHA) klasifikace, které se odvíjí od tíže symptomů spojených s CHSS (César *et al.* 2019).

1.1.2. Zvířecí modely chronického srdečního selhání

Za účelem studia patofyziologických mechanismů uplatňujících se při rozvoji chronického srdečního selhání bylo vytvořeno mnoho zvířecích modelů CHSS. Toto velké spektrum modelů odráží fakt, že CHSS není uniformní choroba a má mnoho příčin. Mechanizmy, které vedou ke vzniku srdečního selhání, se částečně liší u objemového a tlakového přetížení srdce, a proto ani nemůže existovat ideální zvířecí model CHSS. Na druhou stranu je možné vidět některé společné principy, které se uplatňují u všech forem CHSS.

1.1.2.1. Aorto - kavální píštěl

Objemové přetížení srdce navozené vytvořením zkratu mezi abdominální aortou a dolní dutou žilou je preklinický model věrně napodobující lidské CHSS. Ačkoliv je to model CHSS s vysokým srdečním výdejem, jeho dlouhodobá kardiální a renální manifestace vykazuje rysy typické pro pacienty trpící nízkovýdejovým CHSS. Ty zahrnují zadržování sodíku v těle, bilaterální kardiální hypertrofii a zvýšenou aktivitu jak vazokonstrikčních/natriumretenčních systémů tak i kompenzatorních

vazodilatačních/natriuretických systémů (Abassi *et al.* 2011). Zařazení tohoto modelu srdečního selhání s ohledem na ejekční frakci levé komory však doposud není jasně definováno. Podle časového odstupu od vytvoření aorto-kavální píštěle (AKP) můžeme rozlišit kompenzovanou a dekompenzovanou fázi CHSS, přičemž dekompenzace (a tudíž i úmrtí zvířat) začíná 20 týdnů od operace (Melenovsky *et al.* 2011). Při dekompenzaci zvířete je možné sledovat piloerекci, letargii, cyanózu, ascites a dušnost (Melenovsky *et al.* 2012). To umožňuje studovat patofyziologické změny v jednotlivých fázích CHSS. Ačkoliv byl tento model zprvu používán pouze u psů (Hilton *et al.* 1955), dnes jsou v experimentech nejčastěji využíváni laboratorní potkani. Pomocí mikrochirurgických technik je možné vytvořit AKP i u myší, díky čemuž lze snadno studovat dopad různých genetických manipulací na vývoj CHSS (Karram *et al.* 2005).

Ačkoliv objemové přetížení srdce z důvodu existence AKP zcela jistě nepředstavuje častou příčinu srdečního selhání srdce u lidí, jako vzácná jednotka je vznik AKP u lidí popisován. Nejčastější vznik AKP u lidí je spontánní/primární, a to u pacientů s preexistujícím aneurysmatem abdominální aorty. Obdobně jako u potkanů, vede u lidí AKP k přetížení srdce až, zejména pravostrannému, selhání srdce prezentující se kongescí v žilním systému s renální a jaterní insuficiencí (Patelis *et al.* 2018).

Mnohem častější je umělé založení zkratu mezi artérií a vénou u lidí směřujících k nebo podstupujících hemodialýzu. I když u těchto pacientů je posloupnost dějů opačná, tedy nejprve vzniká renální selhání, v důsledku čehož vzniká srdeční nedostatečnost, faktem zůstává, že nadměrný průtok krve skrze hyperfunkční arteriovenózní fistuli přispívá k srdeční dysfunkci u hemodialyzovaných pacientů (Malik 2018).

1.1.2.2. Ostatní modely CHSS

Další zvířecí modely srdečního selhání zahrnují zejména podvaz levé koronární arterie srdce napodobující nejčastější příčinu CHSS – infarkt myokardu, tlakové přetížení srdce pomocí podvazu vzestupné nebo sestupné části aorty nebo specifické vyřazení některého z genů vedoucí k hypertrofické nebo dilatační kardiomyopatii (Patten & Hall-Porter 2009). CHSS může být navozeno toxickým poškozením srdce, tachykardií navozenou farmakologicky nebo katetrizačně, případně geneticky podmíněnou hypertenzí. Tento neúplný výčet dokumentuje rozmanitost modelů CHSS, avšak zdaleka ne všechny splňují kritéria dané Americkou kardiologickou společností pro preklinický výzkum CHSS. K plnému porozumění patofyziologie progresu CHSS je třeba ji studovat na

experimentálních modelech zcela rozvinutého srdečního selhání, nikoliv pouze srdeční dysfunkce (Houser *et al.* 2012).

1.2. Renální dysfunkce u chronického srdečního selhání

Chronické srdeční selhání je porucha nejen čistě hemodynamického charakteru (nízký srdeční výdej vzhledem k metabolickým potřebám těla; zvýšené plicní tlaky v srdci a z toho plynoucí vyšší hydrostatické tlaky ve venózním řečišti), ale je spojeno i s aktivací celé řady neurohumorálních systémů. Tato fyziologická kompenzace má za úkol nahradit ztrátu čerpacího výkonu srdce. Avšak dlouhodobá nadměrná aktivace těchto mechanismů vede nejen k poškození samotného srdečního svalu, ale i k orgánové dysfunkci a dochází tak k progresi CHSS (Kemp & Conte 2012). Ledviny jsou díky svému úzkému vztahu s kardiovaskulárním systémem při CHSS ke zhoršení svých funkcí zvláště náchylné. Patofyziologicky bychom tento stav označili jako renální dysfunkci u CHSS, zatímco klinicky se spíše popisuje jako kardiorenální syndrom druhého typu (tj. primární chronické poškození srdce vedoucí k sekundární poruše v podobě chronické renální insuficience (Di Lullo *et al.* 2017).

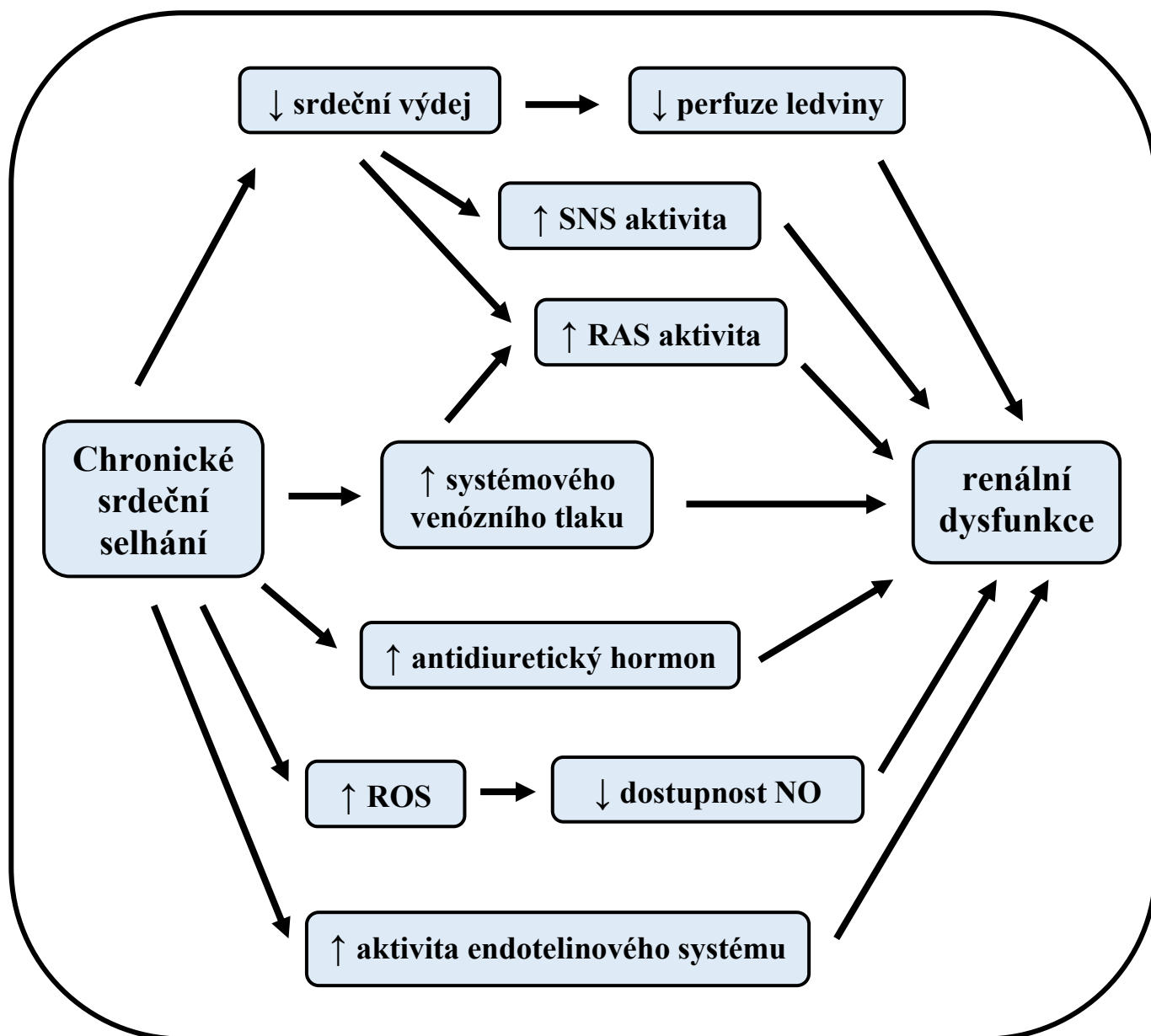
Renální dysfunkce u CHSS výrazně přispívá k progresi srdečního selhání, jelikož ledviny pak nejsou schopny adekvátně regulovat objem a složení extracelulární tekutiny v závislosti na potřebách těla, což nepřiměřeně zvyšuje zátěž na již selhávající srdce. Pacienti s CHSS, u kterých se vyvine renální dysfunkce, proto mají výrazně zkrácenou dobu přežití. Predikce doby přežití podle renálních funkcí pacienta je citlivější než hodnocení jeho ejekční frakce srdce nebo hodnocení stupně dušnosti podle NYHA klasifikace (Hillege *et al.* 2000). Až 45 % - 63 % pacientů s CHSS má některou z forem chronické renální insuficience (Cruz & Bagshaw 2010).

1.3. Patofyziologické mechanismy vedoucí k renální dysfunkci u CHSS

Chronické srdeční selhání vede ke změnám v systémové hemodynamice a k aktivaci renin-angiotenzinového, sympatického a endotelinového systému a ke zvýšenému vyplavování antidiuretického hormonu. Narušuje také funkci důležitých kontraregulačních systémů, zejména natriuretických peptidů a oxidu dusnatého, jež mají za úkol vyvažovat zvýšenou aktivitu RAS a SNS a dalších systémů aktivovaných v rámci CHSS. Na obr. 1 je zjednodušené schéma znázorňující renální dysfunkci u CHSS a systémy do ní zapojené.

Obr. 1

Schéma vztahu CHSS a renální dysfunkce



1.3.1. Hemodynamické faktory

Podle typu CHSS jsou v různé míře závažnosti vyjádřeny dvě hlavní poruchy systémové hemodynamiky. První je snížený srdeční výdej, což je důsledek nedostatečné přečerpávací kapacity srdce, vzhledem k metabolickým potřebám organismu. Jelikož je systémový tlak dán součinem srdečního výdeje a celkové periferní rezistence, k udržení dostatečného systémového arteriálního tlaku, a tudíž i dostatečné perfuze tkání, tělo aktivuje několik obranných mechanismů (RAS, SNS, ADH, endotelinový systém) zvyšujících celkovou periferní rezistenci. Jak již bylo zmíněno, nadměrná aktivace těchto

mechanizmů vede v dlouhodobém horizontu k remodelaci tkání a orgánové dysfunkci (Damman & Testani 2015).

Průtok krve ledvinou (PKL) má však, na rozdíl od většiny ostatních orgánů v těle, nejen funkci nutritivní, ale záleží na něm i exkreční funkce ledviny. Proto je autoregulován v rozmezí 70 – 170 mmHg středního arteriálního tlaku pomocí tubuloglomerulární zpětné vazby a myogenního mechanismu (Carlström *et al.* 2015). Při CHSS dochází k neúměrnému snížení PKL, než by odpovídalo srdečnímu výdeji. To je výsledek aktivace tubuloglomerulární zpětné vazby a aktivace renin-angiotenzinového systému, jak bude popsáno v příslušné kapitole. Důsledkem je zachování nebo jen mírné snížení glomerulární filtrace (GFR) za cenu výrazného snížení průtoku krve ledvinou a naopak zvýšení filtrační frakce. Pokud dojde k dalšímu poklesu PKL, paralelně s ním klesá i GFR, protože autoregulační kapacita ledviny je již vyčerpána (Ljungman *et al.* 1990). Při farmakologické inhibici RAS u pacientů s CHSS však dochází k paralelnímu snížení PKL a GFR již od začátku (Smilde *et al.* 2009). Bez dostatečně vysoké glomerulární filtrace pak dochází k zadržování sloučenin, jejichž vylučování je primárně závislé na GFR, což jsou zejména zplodiny metabolismu dusíku (urea, kreatinin a další).

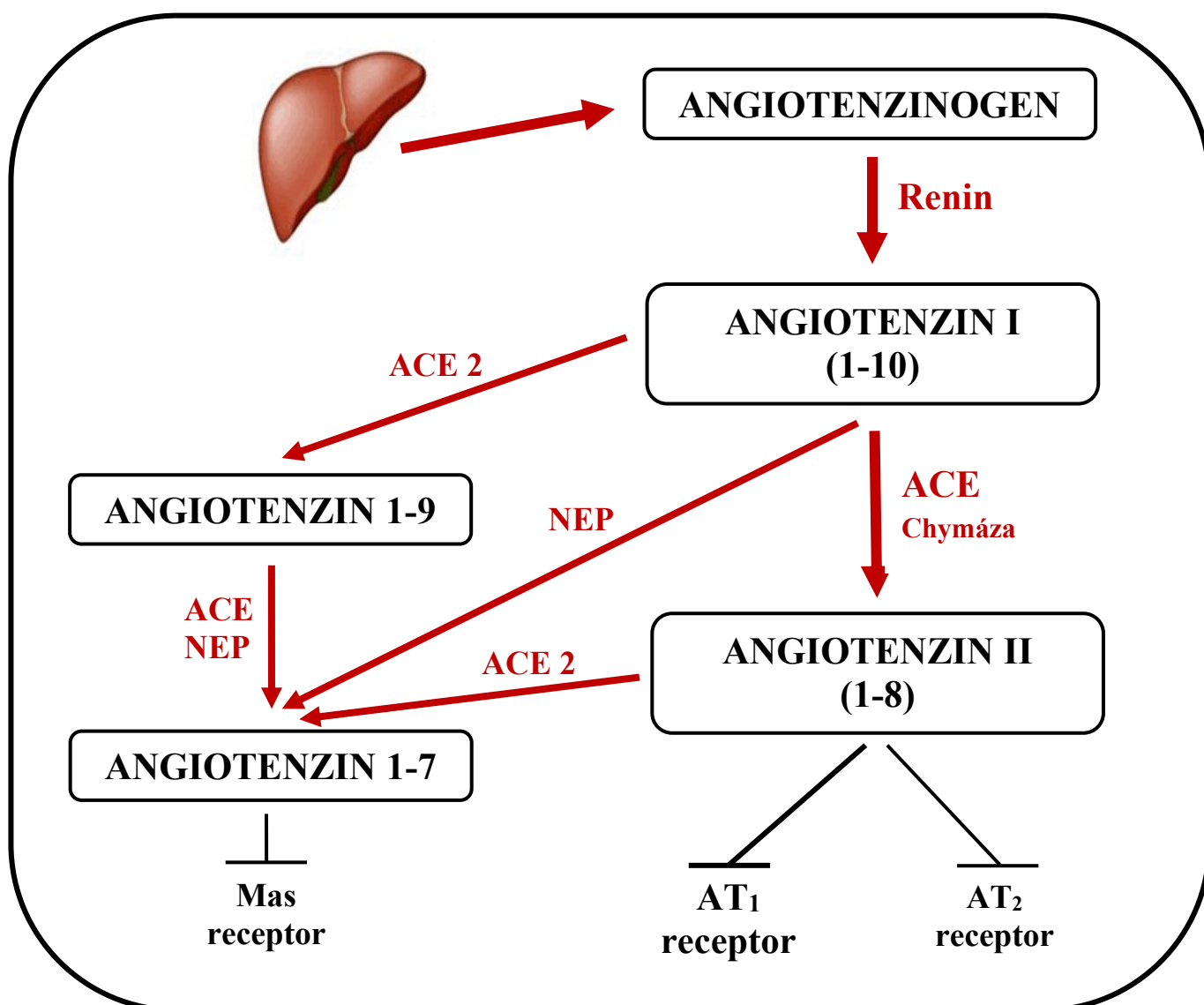
Druhým hemodynamickým faktorem, kterému se v posledních letech začíná přikládat větší váha, je stagnace krve ve venózním řečišti (Takahama & Kitakaze 2017). Zvýšení plicních tlaků v pravostranných srdečních oddílech vede k nárůstu tlaku ve vénách a dochází k ledvinné kongesci. Ve studiích u pacientů s CHSS bylo jasně prokázáno, že existuje korelace mezi zvýšením centrálního venózního tlaku nebo ledvinou kongescí a snížením GFR a to nezávisle na průtoku krve ledvinou (Damman *et al.* 2007; Mullens *et al.* 2009). To platí nejen pro CHSS, jelikož bylo zjištěno, že zvýšení centrálního venózního tlaku je spojeno se snížením GFR a zkrácením doby přežití nemocného v širokém spektru kardiálních onemocnění (Damman *et al.* 2009). Důsledkem ledvinné kongesce může být lokální hypoxie, prozánětlivá odpověď, zvýšený oxidativní stres, endoteliální dysfunkce, aktivace RAS a zvýšený intraluminální tlak, který snižuje transglomerulární filtrační tlak, a tudíž může přispívat ke snížení GFR (Afsar *et al.* 2016). Nakolik se však jednotlivé mechanismy uplatňují na vzniku renální dysfunkce při ledvinné kongesci je nejisté, experimentálních dat není prozatím dostatečné množství.

Ačkoliv se zdá, že zvýšení tlaku v ledvinném žilním řečišti hraje důležitou úlohu při vzniku renální dysfunkce u CHSS, je spíše pravděpodobné, že se na zhoršení ledvinných funkcí podílí menší měrou než snížení PKL (Damman & Testani 2015).

1.3.2. Renin - angiotenzinový systém

Renin-angiotenzinový systém (RAS) je zodpovědný za udržování stálosti vnitřního prostředí organismu. Jeho hlavní úloha spočívá zejména v regulování celkového objemu extracelulární tekutiny, tlaku krve a složení elektrolytů. Nadměrná aktivace RAS je jedním z nejdůležitějších faktorů v progresi chronického srdečního selhání. Na obr. 2 je uvedeno zjednodušené schéma RAS.

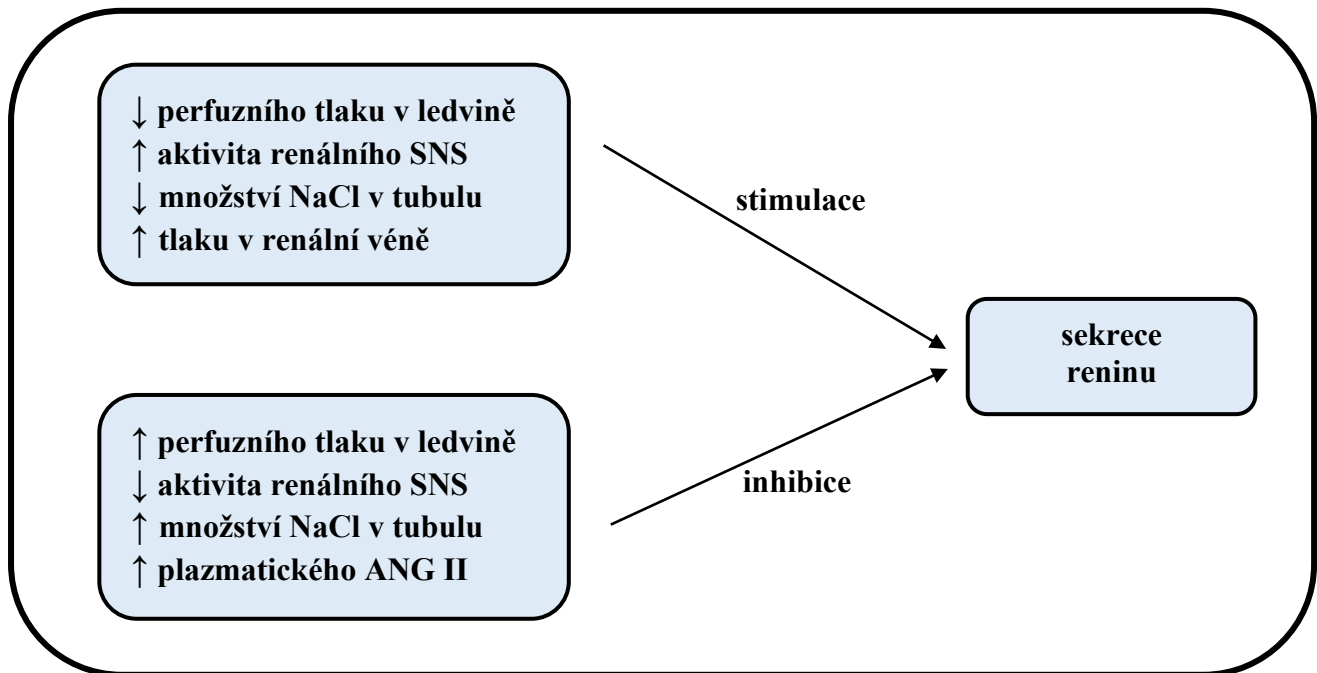
Obr. 2 Schéma renin-angiotenzinového systému



Klasická cesta renin-angiotenzinového systému je aktivována produkcí reninu juxtaglomerulárními buňkami v aferentní arteriole ledviny. Regulace vyplavování reninu z buněk je komplexní a je určujícím faktorem celé aktivity RAS (Persson 2003). Snížené množství sodíku a chloridů v distálním tubulu zvyšuje sekreci reninu. Tento

mechanismus je součástí tubuloglomerulární zpětné vazby, která zajišťuje autoregulaci průtoku krve ledvinou. Zvýšená aktivita renálního sympatického nervového systému (SNS) zvyšuje intenzitu vyplavování reninu pomocí stimulace β -adrenergických receptorů přítomných na buňkách juxtaglomerulárního aparátu. Renin secernující buňky fungují také jako baroreceptory. Snížení perfuzního tlaku v aferentní arteriole zvyšuje množství vyloučeného reninu. Konečný produkt klasické RAS kaskády angiotenzin II (ANG II) pak také sekreci reninu inhibuje negativní zpětnou vazbou. Zvýšení tlaku v renální vėně má za následek vyšší vyplavování reninu do cirkulace a aktivaci intrarenálního RAS (Kishimoto *et al.* 1973; Kopp *et al.* 1984). Obrázek 3 znázorňuje vliv jednotlivých faktorů na vyplavování reninu.

Obr. 3 Vliv faktorů na sekreci reninu



Renin je proteáza štěpící volně cirkulující angiotenzinogen, který se tvoří v játrech, na angiotenzin I. Angiotenzin konvertující enzym (ACE) pak dále štěpí angiotenzin I na hlavní produkt klasické RAS kaskády – angiotenzin II. Existují i alternativní cesty vedoucí k tvorbě ANG II pomocí jiných peptidáz či proteáz jako jsou chymáza, chymotrypsin nebo katepsin G (Hall 2003). Tyto enzymy jsou zodpovědné za tzv. „ACE escape“ fenomén, neboli neúčinnost inhibitorů angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEi) u některých pacientů s CHSS (Lee *et al.* 2001; Zablocki & Sadoshima 2010). ANG II se v lidském organismu primárně váže na receptory typu 1 (AT_1). Prostřednictvím AT_1 receptorů způsobuje ANG II vazokonstrikci v odporových cévách krevního řečiště, stimuluje

uvolňování aldosteronu z kůry nadledvin a zároveň katecholaminů z dřeně nadledvin a ze zakončení sympatických nervů, v centrálním nervovém systému (CNS) navozuje pocit žízně a zvyšuje sekreci vazopresinu z neurohypofýzy. Dále pak způsobuje pozitivní inotropní a chronotropní účinek na srdeční kardiomyocyty a v neposlední řadě zvyšuje reabsorpci sodíku v ledvinných tubulech a ve střevě (Ma *et al.* 2010). ANG II zprostředkovaně působí jako prozánětlivý cytokin, růstový faktor a navozuje fibrózu cílových tkání, zejména srdce a ledvin (Rüster & Wolf 2011).

AT₁ receptory jsou přítomny prakticky ve všech tkáních v těle, naproti tomu receptory typu 2 (AT₂) pro ANG II se ve větší míře vyskytují pouze ve fetálních tkáních a krátce po narození exprese AT₂ receptorů prudce klesá (Li *et al.* 2012). V dospělosti nalezneme AT₂ receptory v ledvinách, srdci, mozku, nadledvinách, vaječnicích a uteru. ANG II navozená stimulace AT₂ receptoru způsobuje vazodilataci, natriurézu, protizánětlivé a antifibrotické účinky a zlepšuje endoteliální funkci (Matavelli & Siragy 2015). Důležitost AT₂ receptoru v antagonizování účinků AT₁ receptoru při onemocněních se zvýšenými hladinami ANG II (např. srdeční selhání, hypertenze) však zůstává předmětem kontroverzí (Lemarié & Schiffrin 2009).

Vedle klasického ramena RAS kaskády, jehož hlavní efektor je ANG II, existuje i alternativní rameno RAS, jehož hlavním efektoem je angiotenzin 1-7 (ANG 1-7). Ten vzniká přeměnou z ANG II pomocí angiotenzin konvertujícího enzymu 2 (ACE2). ANG 1-7 také může vznikat z ANG I přes meziproduct angiotenzin 1-9 působením ACE, ACE2 a neprilysinu – viz obr. 2 (Zhuo *et al.* 2013). Častěji však dochází za pomoci proteázy neprilysinu (NEP) k přímému enzymatickému štěpení ANG I na ANG 1-7 (Domenig *et al.* 2016). ANG 1-7 má vazodilatační, organoprotektivní, protizánětlivé, diuretické a natriuretické účinky a do jisté míry tak vyvažuje negativní působení ANG II (Santos *et al.* 2017). Tyto účinky jsou zprostředkovány vazbou na jeho specifický receptor Mas, přesto však interakce ANG 1-7 s AT₁ receptorem není vyloučena (Gaidarov *et al.* 2018).

1.3.2.1. Aktivace RAS při chronickém srdečním selhání

Při chronickém srdečním selhání dochází k aktivaci RAS při snížení systémového arteriálního tlaku, na což reagují buňky macula densa vyplavením reninu do cirkulace. Snížení systémového arteriálního tlaku také vede k aktivaci SNS, který prostřednictvím renálních nervů přímo stimuluje renin-secernující buňky. Tato aktivace renálního SNS mimo jiné také vede ke snížení průtoku krve ledvinami, což bez zapojení kompenzačních mechanismů vyvolá pokles GFR. Díky tomu se dostává menší množství primární moče a

tedy i chloridů a sodíku do distálního tubulu, a to zvláště při vystupňované zpětné resorpci vody a iontů aktivované CHSS. To aktivuje buňky macula densa, které následně stimulují RAS. Jelikož ANG II preferenčně působí na eferentní arteriolu v glomerulu, dochází ke zvýšení GFR, a tudíž se zvyšuje i množství vody a sodíku profiltrované do tubulu. Tato zpětná vazba je jedním z opatření nefronu proti přílišným výkyvům GFR. (Sparks *et al.* 2014) Stimulem RAS je také aktivace mechanoreceptorů při zvýšení tlaku v renální véně (Kopp *et al.* 1984).

1.3.2.2. Vliv nadměrné aktivace RAS na renální funkce

Hlavním mediátorem aktivovaného RAS při CHSS na renální funkce je ANG II. Ten účinkem na AT₁ receptory zprostředkovává vazokonstrikci v odporových cévách ledviny, a to zejména eferentní arterioly (Myers *et al.* 1975). Je však třeba zdůraznit, že data dokumentující podíl konstrikce aferentní a eferentní arterioly navozené ANG II se liší (Carmines *et al.* 1987). Následkem je sice udržení GFR, ale za cenu snížení průtoku krve ledvinou. AT₁ receptor je exprimován v proximálním tubulu, v tlusté části vzestupného raménka Henleovy kličky a v korových i dřevných sběracích kanálcích, kde ovlivňuje funkci řady transportérů zahrnující sodíko-vodíkový výměník, sodíko-fosfátový kotransport a další (Paxton *et al.* 1993; Sparks *et al.* 2014). Důležitým důsledkem je zadržování sodíku a vody ledvinou, což je navíc potencováno zvýšenou hladinou aldosteronu. ANG II stimuluje uvolňování aldosteronu z kůry nadledvin a ten svým působením na amilorid-senzitivní sodíkový kanál (ENaC) zvyšuje resorpci sodíku z tubulu. Nadto se aldosteron podílí na zánětlivých a fibrotických pochodech v ledvině (Briet & Schiffrin 2010). Ve dřeni ledviny se navíc ANG II zapojuje do koncentrace moče zprostředkované vazopresinem a přispívá tak k zadržování vody v těle (Sparks *et al.* 2014). ANG II přes AT₁ receptor v ledvině způsobuje zánětlivou reakci, patologickou přestavbu ledvinné tkáně a tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), a je tudíž důležitým faktorem v progresi renální dysfunkce (Sachse & Wolf 2007).

1.3.3. Sympatický nervový systém

Chronické srdeční selhání je spojeno s aktivací SNS a vzniká při něm nerovnováha mezi parasympatickou (vagovou) a sympatickou nervovou aktivitou. Tato abnormální aktivace SNS vede ve svém důsledku k dalšímu zhoršování CHSS (Kishi 2012).

Organismus reaguje na zhoršení kardiálních funkcí aktivací SNS několika reflexními mechanismy. Hlavní aferentní dráhy těchto reflexů začínají v baroreceptorech obou karotid

a oblouku aorty (SNS inhibice), kardiopulmonálních baroreceptorech (aktivují rozličné reflexy včetně Bezold-Jarischova reflexu; SNS inhibice), kardiovaskulárních nízkoprahových polymodálních receptorech (SNS aktivace) a periferních chemoreceptorech (SNS aktivace). Hyperaktivita SNS při CHSS je úzce spjata s dysregulací těchto reflexů. Srdeční selhání vede k signifikantnímu potlačení inhibičních reflexů SNS, jako jsou ty mající začátek v karotických baroreceptorech, a naopak ke zvýšení působení reflexů aktivujících SNS, například reflexů spojených s periferními chemoreceptory (Floras & Ponikowski 2015; Zhang & Anderson 2014). Navíc je SNS aktivován volně cirkulujícím a mozkovým ANG II, čímž se vytváří pozitivní zpětná vazba. Naopak zvýšené hladiny natriuretických peptidů aktivitu SNS tlumí (Watson *et al.* 2006).

Aktivovaný SNS při CHSS působí na periferní orgány a tkáně skrze noradrenalin sekretující neurony ganglion stellatum inervující sinusový a atrioventrikulární uzel a myokard komor, čímž dochází ke zvýšení srdeční frekvence, ke zrychlenému převodu vzruchu v srdci a zvýšení kontraktility komor. Aktivace SNS vede v periferním řečišti převážně k arteriální vazokonstrikci, což zvyšuje systémovou vaskulární rezistenci, a k venokonstrikci, čímž se razantně snižuje kapacitance cév vedoucí ke zvýšení srdečního preloadu. Po stimulaci nadledviny sympatikem dochází k vyplavení adrenalinu a noradrenalinu (NA) do cirkulace, kde účinkují v závislosti na typu přítomného receptoru. Nadměrná aktivace SNS sice v počátečních fázích CHSS napomáhá zvýšit ztracený srdeční výkon, v dlouhodobém horizontu však vede ke zvýšení zátěže kladené na srdce, patologické přestavbě srdce a myokard se stává více náchylný k arytmiím (G. & N. 2014; Triposkiadis *et al.* 2009).

1.3.3.1. Vliv aktivovaného SNS na renální funkce

Zvýšená SNS aktivita při CHSS vede v ledvině k vazokonstrikci zejména aferentní arterioly, ačkoli i eferentní arteriola je inervována sympatickými nervovými vlákny (Luff *et al.* 1992). Následkem je snížení průtoku krve ledvinou a GFR. Navíc je aktivita SNS důležitým modulátorem tubuloglomerulární zpětné vazby (Burnstock & Loesch 2017). Jak již bylo zmíněno, juxtaglomerulární buňky reagují na sympatickou stimulaci vyplavením reninu do cirkulace, čímž se aktivuje RAS. Důležitou úlohu hraje také epitel proximálního a distálního tubulu i sběracích kanálků, který zvýšeně vstřebává sodík a vodu v reakci na zvýšenou aktivitu SNS (Burnstock & Loesch 2017; Ramchandra & Barrett 2015).

Zvýšený tlak v renální vėně nebo snížení průtoku krve ledvinou při CHSS ovlivňuje aktivitu ledvinných mechano - a chemoreceptorů. Ty prostřednictvím renálních aferentních

sympatických nervů tvoří celou řadu reno-renálních interakcí, které pravděpodobně vedou k dalšímu vystupňování výše zmíněného dopadu SNS na renální funkce. Nakolik a jak se podílí tyto interakce na aktivitě renálního SNS je však nejisté, neboť studií zabývajících se touto problematikou je nedostatečné množství (Booth *et al.* 2015).

Důležitost renálního SNS v progresi CHSS dokumentuje fakt, že zvýšená aktivita renálního SNS měřená pomocí přetékání noradrenalinu (NA spillover) v ledvině je spojená se zvýšenou mortalitou pacientů trpících CHSS a to nezávisle na celkové SNS aktivitě, GFR nebo ejekční frakci levé komory (Rundqvist *et al.* 2005).

1.3.4. Endotelinový systém

Endoteliny jsou polypeptidy, které v těle produkují hlavně buňky endotelu cév konstitutivně nebo na základě různých patofyziologických stimulů jako je hypoxie, shear stress, zvýšené množství volných radikálů, růstových faktorů, prozánětlivých cytokinů a dalších. Endoteliny převážně navozují velmi potentní vazokonstrikci cév, i když podle typu receptoru, na který se vážou, mohou mít i vazodilatační účinky (Davenport *et al.* 2016). Zvýšené hladiny endotelinů jsou pozorovány u celé řady kardiovaskulárních onemocnění včetně CHSS.

Experimentální studie prokázaly negativní vliv endotelinů na průběh CHSS. V srdci navozují konstrikci koronárních cév, zvyšují riziko komorových arytmií a podporují patologickou přestavbu myokardu. V ledvinách působí vazokonstrikci aferentní i eferentní arterioly a snižují tak průtok krve ledvinou, GFR a zvyšují renální vaskulární rezistenci (Rehsia & Dhalla 2010). Vliv endotelinů na vylučování sodíku je komplexní, ale pravděpodobně snižují v tubulech zpětné vstřebávání sodíku (Kohan *et al.* 2011). Ačkoliv se endoteliny zapojují do patofyziologie progresu CHSS, klinické studie s antagonisty endotelinových receptorů jsou zatím spíše neúspěšné (Bonsu *et al.* 2016).

1.3.5. Antidiuretický hormon

Antidiuretický hormon (ADH) je neurohormon, který se vyplavuje z neurohypofýzy v závislosti na osmolaritě plazmy. Druhým důležitým stimulem pro sekreci ADH, který se zvláště uplatňuje při CHSS, je snížení systémového tlaku snímané aortálními a karotickými baroreceptory a aktivovaný RAS (Wasilewski *et al.* 2016). Zvýšené hladiny ADH nezávisle na ostatních faktorech predikují mortalitu u pacientů s CHSS (Lanfear *et al.* 2013).

ADH vyvolává zadržování bezsolutové vody v těle, skrze účinek na sběrací kanálky v dřeni ledviny, a arteriální vazokonstrikci, podle typu receptoru, na který se váže. Při zvýšených hladinách ADH u CHSS tudíž narůstá zátěž na srdce přes zvýšení preloadu (zadržování vody) a afterloadu (vazokonstrikce). Navíc ADH přímým účinkem na srdce vyvolává hypertrofii, dilataci a fibrózu myokardu (Vinod *et al.* 2017; Wasilewski *et al.* 2016). V ledvinách ovlivňuje ADH průtok krve dřeni ledviny (Nakanishi *et al.* 1995) a v podmínkách experimentálně navozeného CHSS spolu s dalšími faktory zhoršuje renální funkce (Riegger & Liebau 1982).

1.3.6. Natriuretické peptidy

Natriuretické peptidy jsou v organismu reprezentovány hlavně dvěma zástupci – atriálním natriuretickým peptidem (ANP) a komorovým natriuretickým peptidem (BNP). Mechanismus vzniku a účinku obou hormonů je obdobný. Oba vznikají jako pre-pro-hormony v síních, respektive komorách srdce a po dvojnásobném odštěpení konců těchto polypeptidů je do cirkulace vyplaven aktivní ANP nebo BNP. Aktivní formy natriuretických peptidů jsou v srdci produkovány na základě zvýšeného napětí ve stěně myokardu, nebo aktivací receptorů pro endotelin, angiotenzin II a vazopresin (Lee & Daniels 2016). Za fyziologických podmínek jsou hladiny natriuretických peptidů v těle velice nízké, díky čemuž je BNP nebo jeho N-terminální fragment (NT-proBNP) úspěšně využíván při diagnostice CHSS (Ibrahim & Januzzi 2017). ANP a BNP jsou v těle degradovány proteázou neprilysinem, nebo jsou internalizovány svými receptory a následně katabolizovány.

Hlavním místem působení natriuretických peptidů jsou ledviny, kde zvyšují diurézu a natriurézu. ANP a BNP potlačují aktivitu ENaC kanálu a Na/K ATPázy ve sběracím kanálku, čímž dochází ke snížení zpětné resorpce sodíku, a s tím i vody, ledvinou. Natriuretické peptidy také zvyšují diurézu tím, že blokují receptory pro vazopresin ve sběracím kanálku a inhibují sekreci reninu z juxtaglomerulárních buněk nefronu. V aferentní arteriole ledviny natriuretické peptidy způsobují vazodilataci, naproti tomu na eferentní arteriolu nemají žádný vliv, nebo spíše navozují vazokonstrikci. V konečném důsledku však jednoznačně vedou ke zvýšení GFR. Systémově natriuretické peptidy snižují krevní tlak, způsobují hypovolémii a snižují aktivitu SNS. Na srdce mají antifibrotické a antihypertrofické účinky (Wong *et al.* 2017).

Zjednodušeně by se dalo říci, že zatímco dlouhodobá nadměrná aktivace RAS, SNS a dalších systémů u pacientů s CHSS je pro organismus škodlivá, tak zvýšené množství

natriuretických peptidů je naopak protektivní vůči změnám navozeným CHSS (Volpe *et al.* 2016). Přesto však tento balanční mechanismus selhává. Důvodem je jednak vyčerpání schopnosti tvořit natriuretické peptidy v dostatečném množství pro vyvážení aktivace RAS, SNS a dalších systémů. Za druhé je to rezistence vůči natriuretickým peptidům. Zejména dysfunkční ledvina u pacientů s CHSS je neschopna adekvátně reagovat na vzestup hladin natriuretických peptidů zvýšením diurézy a natriurézy (Chen 2007).

1.3.7. Oxid dusnatý

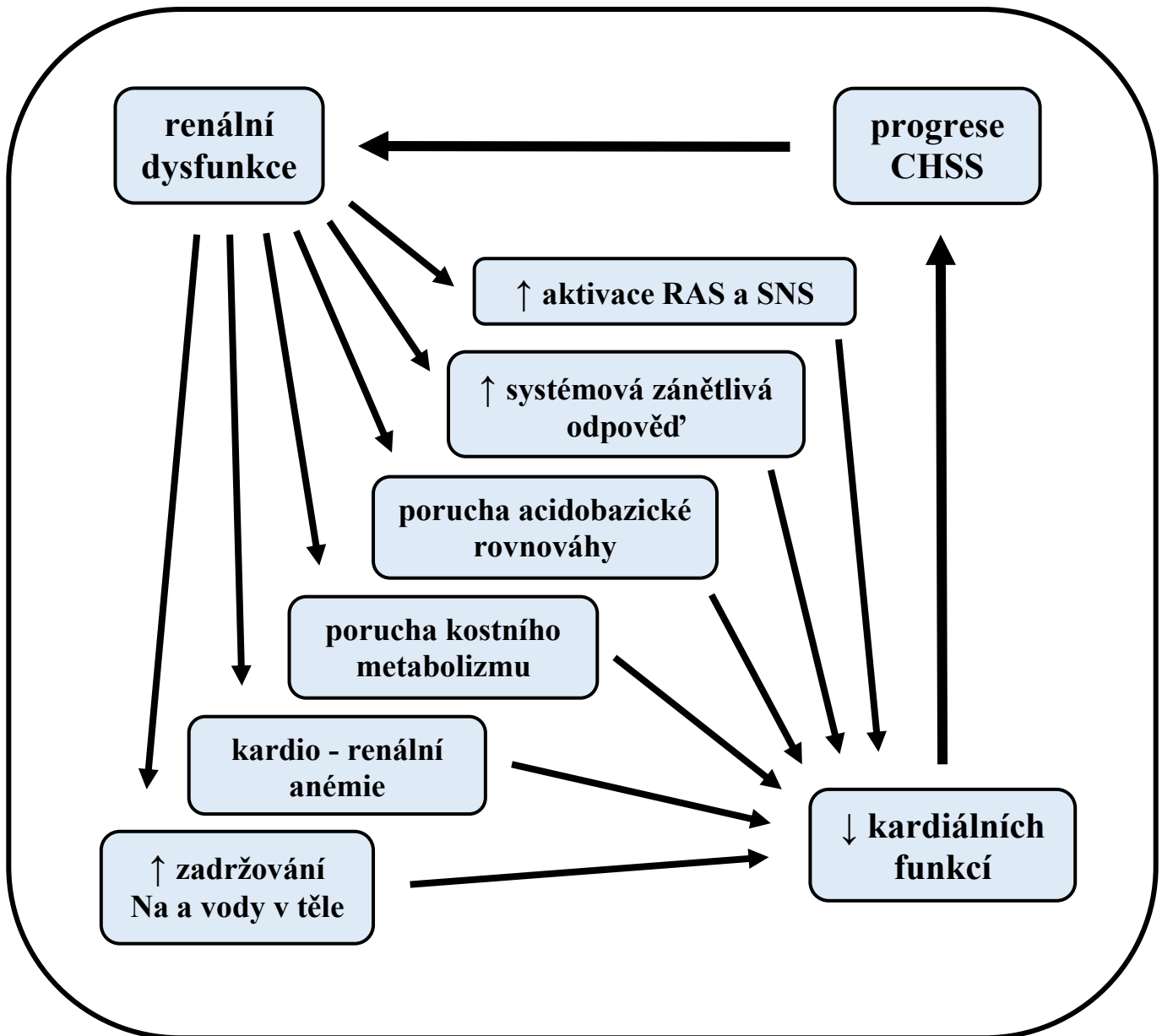
Oxid dusnatý (NO) je rozpustný plyn s krátkým poločasem rozpadu (do 30 sekund), který hraje důležitou úlohu v organismu při regulaci celé řady biologických procesů. Existuje několik izoform enzymů - NO syntáz (NOS) - tvořících NO z aminokyseliny L-argininu. Většina NO produkovaného v endotelu cév je tvořeno konstitutivní NOS, avšak na základě různých imunologických stimulů se může NO generovat pomocí indukibilní NOS. Ve stěně cév krevního řečiště působí NO jako důležitý regulátor tonu, díky své schopnosti navodit vazodilataci navzdory působení silných vazokonstriktorů, jakým je například ANG II (Tousoulis *et al.* 2012). Dysfunkční endotel s poškozenou schopností vytvářet nebo uvolňovat NO, který je neschopný adekvátně balancovat účinky ostatních systémů (RAS, SNS a dalších), je hnacím motorem progresu kardiovaskulárních onemocnění včetně CHSS (Umar & van der Laarse 2009). Zvýšené množství ROS je, alespoň z části, zodpovědné za sníženou dostupnost NO a s tím spojenou endoteliální dysfunkci, jež doprovází CHSS (Daiber *et al.* 2015). Oxidativní stres svým působením na buněčné i orgánové úrovni poškozuje jak samotný myokard (snižuje srdeční kontraktilitu, stimuluje patologickou přestavbu srdce) tak i ostatní orgány (Tsutsui *et al.* 2011).

V ledvinách NO způsobuje vazodilataci aferentní a eferentní arterioly, uplatňuje se při zvyšování průtoku krve ledvinou, reguluje perfuzi renální dřeně, a významným způsobem tak ovlivňuje glomerulární hemodynamiku. Navíc NO moduluje tubuloglomerulární zpětnou vazbu a inhibuje renální sympatickou aktivitu. V tubulech ledviny NO ovlivňuje množství výměníků a přenašečů, důsledkem čehož vede celkově ke zvýšení natriurézy a diurézy. Z důvodu nedostatečné dostupnosti NO při CHSS dochází k nerovnováze mezi NO a ostatními systémy, což vede k snížení prokrvení ledviny a zadržování vody a sodíku v těle (Lee 2008; Marti *et al.* 2012).

1.3.8. Dopad renální dysfunkce na progresi CHSS

Obr. 4 shrnuje nejdůležitější důsledky postižení renálních funkcí u CHSS na srdce a celkovou homeostázu organismu.

Obr. 4 Mechanizmy dopadu renální dysfunkce na CHSS



Dysfunkční ledviny představují pro organismus enormní zátěž, jelikož nejsou schopny správně regulovat homeostázu vnitřního prostředí. Důsledkem je zhoršení výkonu srdce a progresse CHSS. To vede k dalšímu poškození ledvin a vzniká tím bludný kruh, který je obtížně léčitelný (Scabbia & Scabbia 2015).

Jedním z důležitých aspektů progresse CHSS je progresivní zadržování sodíku a vody ledvinami způsobené zvýšenou aktivitou natriumretenčních systémů (RAS, SNS a dalších)

a zároveň nedostatečnou odpovědí dysfunkčních ledvin na aktivované natriuretické systémy (natriuretické peptidy, NO). Zvyšuje se tím venózní návrat do srdce, které je nuceno přečerpávat větší objemy krve, což v dlouhodobém horizontu srdeční sval poškozuje. Dysfunkční ledviny dále zvyšují aktivitu systémů (RAS a SNS), již do patofyziologie CHSS zapojených, které srdce svým dlouhodobým přímým účinkem na něj poškozují (Shah & Greaves 2010). U pacientů s CHSS a zhoršenými renálními funkcemi se může objevit kardio-renální anémie, která výrazně navyšuje mortalitu pacientů a jejíž patogenetický mechanismus není zatím plně objasněn (Attanasio *et al.* 2012). Je však nepochybně úzce provázána s deficitem železa v těle, a proto je suplementace železem jako možná terapie CHSS intenzivně studována (Petra *et al.* 2019). Podobně se může vyskytnout porucha kostního metabolismu se zvýšenou hladinou parathormonu a fibroblastového růstového faktoru 23 (FGF 23) a sníženou hladinou vitamínu D, která zapříčiňuje zhoršení CHSS aktivací fibrotických pochodů v srdci, zhoršením endoteliální funkce a ztvrdnutím a kalcifikací cév (Schefold *et al.* 2016). Nadměrná stimulace systémů aktivovaných při CHSS může spolu s dysfunkčním substrátem v ledvině vyvolat poruchy acidobazické rovnováhy a další poruchy iontového hospodaření se závažnými důsledky jak pro srdce, tak pro celý organizmus (Urso *et al.* 2015). Systémový zánět vystupuje nejen jako jedna z příčin CHSS, ale může být i důsledkem rozvinutého CHSS, čímž se rozvíjí jeden z bludných kruhů CHSS (Van Linthout & Tschöpe 2017), přičemž poškozené ledviny slouží jako důležitý zdroj prozánětlivých cytokinů v těle (Colombo *et al.* 2012).

1.4. Terapie chronického srdečního selhání

Terapie CHSS v současné době zahrnuje dietní a režimová opatření, farmakologickou terapii, chirurgickou terapii a speciální přístrojovou léčbu. Farmakologická léčba s jasně prokázanou účinností na zlepšení mortality u pacientů se srdečním selháním se sníženou ejekční frakcí zahrnuje zejména ACE inhibitory nebo sartany (blokátory AT₁ receptoru) a beta-blokátory. Ačkoliv se obdobné skupiny léků používají i u pacientů se srdečním selháním se zachovalou ejekční frakcí nebo s ejekční frakcí ve středním pásmu, u těchto pacientů prozatím žádný ze zkoumaných léků nepřinesl mortalitní benefit (Coats *et al.* 2016).

Vzhledem k významnému zapojení RAS do patofyziologie CHSS není překvapivé, že inhibice RAS kaskády je jedním ze základních kamenů léčby CHSS. K tomu se používají ACEi, nebo blokátory AT₁ receptoru pro ANG II (ARB). Ačkoliv se obě skupiny léků považují za ekvivalentně účinné v léčbě CHSS, blokují RAS na různých úrovních jeho

kaskády a lze tudíž pozorovat rozdíly v biologickém dopadu obou skupin látek (Januzzi & Ibrahim 2017). Přímé srovnání obou farmakologických přístupů s ohledem na renální hemodynamiku zatím nebylo provedeno.

Nedávno zavedeným lékem CHSS do klinické praxe je kombinace AT₁ blokátoru a inhibitoru neprilysinu (ARNi). Neprilysin je peptidáza, která štěpí mimo jiné natriuretické peptidy a, podobně jako ACE, bradykinin. Inhibice neprilysinu tak zvyšuje koncentrace protektivních molekul v organismu. Kombinovaná léčba pomocí ARNi se ukázala být více účinná v léčbě CHSS s redukovanou ejekční frakcí než samotná inhibice RAS inhibitorem ACE (Kario 2018). U pacientů s CHSS se zachovalou ejekční frakcí se však tento příznivý efekt nepotvrdil (Solomon *et al.* 2019).

Při léčbě CHSS se také využívají betablokátory, omezující nadměrně aktivovaný SNS, blokátory receptorů pro aldosteron, diuretika, digoxin (pozitivně inotropní účinky na srdce a zároveň zpomalující srdeční frekvenci skrze stimulaci vagální aktivity), ivabradin (bradykardizující účinky na sinoatriální uzel) a další látky. Ty jsou využívány zejména v kombinované léčbě s inhibicí RAS, s cílem tlumit více systémů, které významně ovlivňují patofyziologii CHSS, a zvýšit tak účinnost léčby.

2. Hypotéza a cíle práce

CHSS navozené pomocí aorto-kavální píštěle se klinicky blíží nejvíce srdečnímu selhání s ejekční frakcí ve středním pásmu, jednotce s prozatím nedostatečně definovaným léčebným přístupem. Předpokládáme, že u potkanů s AKP budou jednotlivé farmakologické přístupy inhibice RAS vykazovat rozdíly v ovlivnění renální dysfunkce. Práce má zejména zodpovědět tyto otázky:

1. Porovnat vliv ACE inhibitorů a AT₁ blokátorů na renální hemodynamické a exkreční funkce u potkanů s AKP a ověřit, jestli dokážou předcházet rozvoji renální dysfunkce u tohoto modelu CHSS.
2. Zjistit, zda a jaký efekt bude mít inhibice neprilysinu, obsažená v ARNi, na renální funkce proti samotnému ARB, respektive i proti ACEi.

3. Metodika

Všichni potkani použiti při pokusech pocházeli z Centra experimentální medicíny Institutu klinické a experimentální medicíny, což je zařízení akreditované Ministerstvem zemědělství ČR. Potkani byli chováni za standardních podmínek při 12hodinovém cyklu světlo/tma a měli volný přístup k vodě a standardnímu krmivu.

3.1. Model srdečního selhání

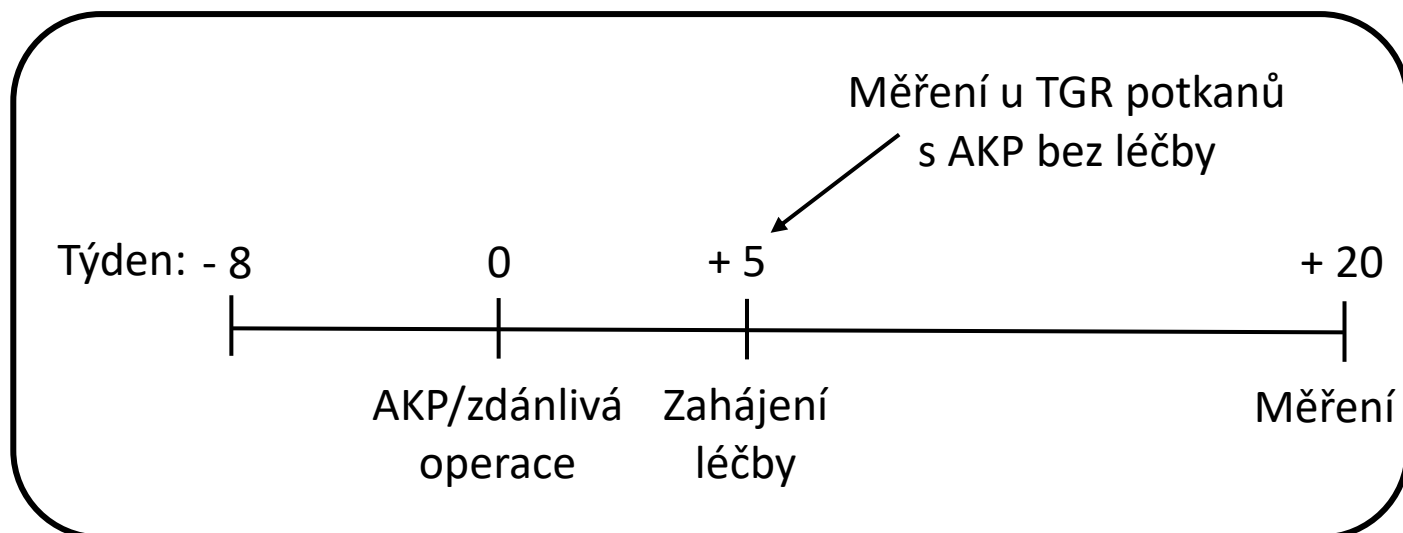
Nejprve byli potkani uvedeni do celkové anestezie pomocí intraperitoneální injekce směsi ketaminu v dávce 150 mg/kg váhy potkana (Calypsol, Gedeon Richter, Maďarsko) a midazolamu v dávce 15 mg/kg váhy potkana (Dormicum, Roche, Francie). Za aseptických podmínek byla poté potkanům otevřena břišní dutina a vizualizovány velké cévy odpreparováním od okolních tkání. Ty byly následně zaklipovány pomocí chirurgické svorky. Použitím jehly o velikosti 18 G (1,2 mm v průměru) byla nejprve v úrovni bifurkace punktována abdominální aorta. Distálně od odstupu renálních arterií pak bylo jehlou proniknuto skrze stěnu aorty do dolní duté žíly. Jehla byla vyjmuta a otvor v aortě byl zalepen tkáňovým lepidlem (Histoacryl, B.Braun AG, Germany). Úspěšné založení aorto-kavální píštěle bylo potvrzeno pulzací světle červené krve v dolní duté žíle. Dutina břišní byla po vrstvách zašita vstřebatelnou nití. Ke kompenzaci perioperačních ztrát bylo do dutiny břišní aplikováno 5 ml fyziologického roztoku. Při známkách bolesti u zvířete po operaci byl použit butarphanol 2 mg/kg až 2x denně (Torbugesic, Pfizer, USA) jako pooperační analgezie. U zdánlivé operace byl postup operace identický s výše uvedeným postupem, avšak nepoužila se jehla k vytvoření vlastní aorto-kavální píštěle.

3.2. Protokol č. 1

V této části byli použiti normotenzní potkani kmene Hannover Sprague-Dawley (HanSD) a dále pro zvýraznění patofyziologických procesů v souvislosti s CHSS také hypertenzní heterozygotní Ren-2 transgenní potkani (TGR). Tito potkani mají navíc v genomu myší reninový gen, což vede ke zvýšené expresi reninu a ve svém důsledku k angiotenzin II-dependentní hypertenzi (Langheinrich *et al.* 1996). HanSD a TGR potkanům byla v 8. týdnu života založena AKP nebo jim byla provedena zdánlivá operace. Následně byli potkani 5 týdnů ponecháni bez léčby, aby se mohlo plně rozvinout CHSS. Poté byly potkani buď i nadále ponecháni bez léčby dalších 15 týdnů, nebo začala léčba ACE inhibitorem trandolapilem (Gopten, Mylan, USA) v dávce 6 mg/l rozpuštěným ve

vodě podávané potkanům k pití, nebo byl do vody rozpuštěn blokátor AT₁ receptoru losartan v dávce 200 mg/l (Lozap, Zentiva, ČR). Jelikož u TGR potkanů vedlo založení AKP k vysoké mortalitě okolo 5 týdnu po operaci, byli tito potkani studováni již 5 týdnů po založení AKP. Obr. 5 znázorňuje experimentální protokol 1.

Obr. 5 Experimentální protokol č.1



Experimentální skupiny byly rozděleny následovně:

1. HanSD potkani zdánlivě operováni - změření 20 týdnů po operaci
2. HanSD potkani s AKP bez léčby - změření 20 týdnů po operaci
3. HanSD potkani s AKP léčení ACE inhibítorem - změření 20 týdnů po operaci
4. HanSD potkani s AKP léčení blokátorem AT₁ receptoru - změření 20 týdnů po operaci
5. TGR potkani zdánlivě operováni - změření 20 týdnů po operaci
6. TGR potkani s AKP bez léčby - změření 5 týdnů po operaci
7. TGR potkani s AKP léčení ACE inhibítorem - změření 20 týdnů po operaci
8. TGR potkani s AKP léčení blokátorem AT₁ receptoru - změření 20 týdnů po operaci

3.2.1. Echokardiografie

Po 20 týdnech od operace byli potkani uvedeni do celkové anestezie pomocí 2 % isofluranu (Abbott Lab, SRN) a byly jim změřeny echokardiografické parametry pomocí GE Medical Vivid 7 Dimension System, které byly dále analyzovány s využitím Echo PAC softwaru. Srdeční frekvence byla udržována pomocí hloubky inhalační anestezie na konstantní úrovni kolem 350 úderů za minutu u všech zvířat. Změřené parametry

zahrnovaly rozměr levé komory v diastole a systole a tloušťku přední a zadní stěny levé komory (měřeno v M-modu). Z těchto parametrů byly následně odvozeny end-systolické a end-diastolické objemy levé komory pomocí Teichholzovy rovnice (Riha *et al.* 2012). Poté byla stanovena ejekční frakce z objemů levé komory pomocí obvyklého výpočtu (end-diastolický objem – end-systolický objem / end-diastolický objem *100 %).

3.2.2. Renální hemodynamické studie

Po provedení echokardiografických měření s odstupem minimálně jednoho dne byli potkani opět uvedeni do celkové anestezie pomocí intraperitoneální injekce thiopentalu (VUAB Pharma a.s., ČR) v dávce 80 mg/ kg váhy potkana a podle potřeby udržování v dostatečné úrovni anestezie dalšími bolusy thiopentalu intravenózně. Tělesná teplota byla udržována s využitím vyhřívaného chirurgického stolku. Po odpreparování trachey byla provedena tracheostomie k prevenci obstrukce horních dýchacích cest během manipulace se zvířetem. K zajištění intravenózního přístupu byla zakanylována pravá jugulární žíla. Invazivní měření krevního tlaku bylo zajištěno pomocí kanylace levé femorální arterie. Následně byla otevřena dutina břišní a levá ledvina byla opatrně odpreparována od okolní tkáně a fixována na místě pomocí plastové vaničky. Levý ureter byl zakanylován ke sběru moče. Po odpreparování levé renální arterie byla na cévu nasazena ultrazvuková sonda (Transonic Systems, Altron Medical Electronic GmbH, SRN) umožňující kontinuální měření průtoku krve ledvinou. Po dokončení operace byl potkanům podán 0,5 ml bolus fyziologického roztoku obsahujícího 2 % sérový albumin (Sigma Chemical Co., Praha, ČR) a 5 % sinistrin (Inutest, Fresenius Kabi Austria GmbH, Rakousko) s navazující kontinuální infuzí stejného roztoku rychlostí 20 μ l/min. K zotavení z chirurgického stresu byli potkani ponecháni 45 minut bez měření, a poté následovaly tři 30minutové periody, ve kterých byl potkanům měřen tlak krve, průtok krve ledvinou a byla jim sbírána moč. Na konci každé z těchto period byl odebrán zvířatům vzorek krve. Po dokončení této části experimentu byly potkanům následně podány bolusy vazoaktivních substancí v náhodném pořadí. Mezi jednotlivými bolusy byl odstup minimálně pěti minut k zajištění normalizace průtoku krve ledvinou. Odpovědi na intravenózně podaný bolus angiotenzinu II v dávce 20 ng a 40 ng, noradrenalinu v dávce 100 ng a 200 ng a acetylcholinu v dávce 50 ng a 200 ng byly zaznamenávány jako procentuální rozdíl mezi bazálním průtokem krve ledvinou a maximální nebo minimální hodnotou dosaženou po podání dané látky. Po podání všech dávek bolusů byla zvířata ponechána 5 minut na zotavení a následně jim byla zakanylována levá renální žíla pomocí katétru měřícím tlak krve s vysokou frekvencí a

sensitivitou (Millar Instruments, Houston, USA) a bylo tak možné přesně změřit tlak krve v levé renální žíle. Po skončení celého experimentu byly potkani utraceni pomocí předávkování anestetikem (intravenózní bolus thiopentalu). Poté byly zváženy následující orgány: celé srdce a po oddělení levá i pravá komora, plíce, obě ledviny a játra. Dále byla změřena délka levé tibie. Váhy jednotlivých orgánů pak byly vztaženy na délku tibie.

3.2.3. Biochemická měření

K získání vzorků využitelných k biochemickému měření (tj. vzorků potkanů nezatížených chirurgickým stresem) bylo připraveno dalších osm skupin potkanů podle stejného protokolu uvedeného výše. Tito potkani byli den před koncem experimentu umístěni na 24 hodin do metabolických klecí, kde jim byla sbírána moč, která byla dále analyzována. Poté byla zvířata dekapitována a odebrány vzorky plazmy a ledvin, které byly rychle zmrazeny tekutým dusíkem a následně umístěny do mrazáku s teplotou -80 °C, kde byly ponechány do konečné analýzy.

Plazmatické koncentrace angiotenzinu I a angiotenzinu II a renální koncentrace angiotenzinu I, angiotenzinu II a angiotenzinu 1-7 byly změřeny z námi dodaných vzorků plazmy a ledvin společností Attoquant Diagnostics GmbH (Víděň, Rakousko) za použití kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, která vykazuje vyšší sensitivitu a specifitu než běžně používaná ELISA metoda (Poglitsch *et al.* 2016).

Plazmatické koncentrace noradrenalinu byly změřeny z rozmražených vzorků plazmy s využitím ELISA metody podle návodu od výrobce (E4360-100, BioVision, CA, USA).

Aktivita renální laktát dehydrogenázy byla stanovena ze vzorků ledvin s použitím kolorimetrické eseje podle návodu od výrobce (#MAK066, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Koncentrace 8-isoprostanu v moči byla změřena pomocí ELISA metody podle návodu od výrobce (516,361; Cayman chemical, USA). Změřené koncentrace 8-isoprostanu v moči byly následně vynásobeny objemem moči za 24 hodin u daného zvířete.

Močové koncentrace nitrátů a nitritů byly změřeny s využitím kolorimetrické eseje podle návodu od výrobce (780,001; Cayman Chemical, Ann Arbor, USA). Koncentrace kreatininu v moči byla stanovena s využitím soupravy Liquick Cor-CREATININE (PZ Cormay S.A., Polsko), která je založena na modifikované Jaffeho metodě bez deproteinizace. Močové koncentrace nitrátů/nitritů (NOx) pak byly vztaženy na koncentraci kreatininu v moči.

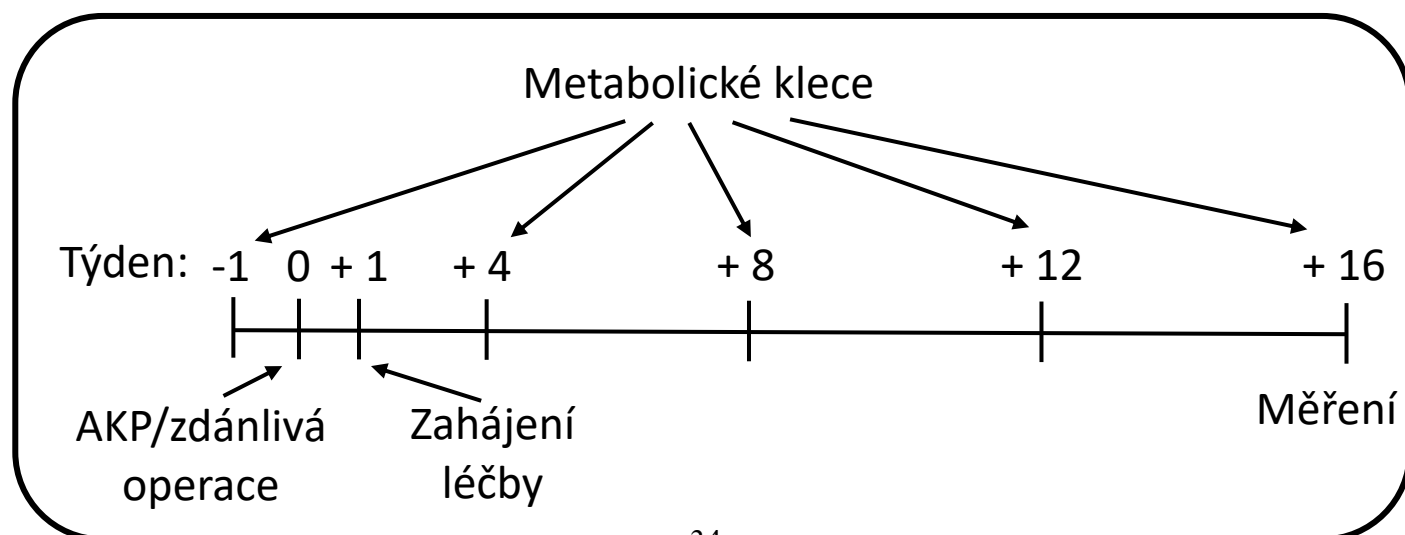
Úroveň oxidativního stresu v ledvině byla změřena pomocí reaktivních substancí thiobarbiturové kyseliny (TBARS – Thiobarbituric acid reactive substances). Nejprve byly homogenáty vzorků ledvin smíchány s 20% roztokem kyseliny trichloroctové v poměru jedna ku jedné. Následně bylo přimícháno čtyřnásobné množství roztoku o složení 37 mmol/l kyseliny thiobarbiturové, 500 mmol/l hydroxidu sodného a 15 % kyseliny octové a vzorek byl zahříván po dobu 70 minut na 100 °C. Následně byl vzorek po vychladnutí smíchán s 1-butanol/pyridinem v poměru 14:1 a byla změřena absorbance při 535 nm pomocí spektrofotometru (Synergy H1, BioTek, USA). Všechny vzorky byly vyhodnoceny v duplikátech a průměr z obou měření pak byl použit k výpočtu ekvivalentních koncentrací malondialdehydu s využitím kalibrační křivky z tetrabutylamonné soli malondialdehydu (#63287, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Tyto koncentrace malondialdehydu pak byly vztaženy na koncentrace proteinu ve vzorku získané pomocí Bradfordovy analýzy (Bradford 1976).

Exprese endoteliální syntázy oxidu dusnatého (eNOS) byla stanovena pomocí SDS-PAGE elektroforézy a následné western blot analýzy. Zmrazené vzorky ledvin byly nejprve rozmělněny v tekutém dusíku. Následně byly vzorky homogenizovány v SB20 lyzačním pufru obsahujícím 20 % dodecylsírán sodný, roztok kyseliny ethylendiamintetraoctové (10 mmol/l) a 100 mmol/l trisaminomethanu s pH upraveném na 6,8. Následně byl přidán Laemmliho pufr (S3401, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a vzorek byl po dobu pěti minut vařen. Po naplnění jamek stejným množstvím vzorku byla provedena SDS-PAGE elektroforéza na 10 % bisakrylamid gelu při konstantním napětí 120 V (Mini-Protean TetraCell, Bio-Rad). Následně byly oddělené proteiny přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (velikost pórů 0,2 μ m, Advantec, Tokyo, Japonsko) a zafixovány na 4 hodiny pomocí 5 % odtučněného mléka obsahujícím sůl trisaminomethanu s 0,1 % Tween 20 (P9416, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Poté byla membrána inkubována přes noc s primárními protilátkami proti NOS3 (sc-653, Santa Cruz Biotechnology Inc, USA) a proti β -aktinu (A5441, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Po promytí byla membrána inkubována po dobu 1 hodiny se sekundární protilátkou označenou křenovou peroxidázou (#7074/#7076, Cell Signaling Technology, Danvers, USA). K vizualizaci proteinů byla použita chemiluminiscenční metoda a množství stanoveno denzitometricky pomocí softwaru Carestream Molecular Imaging Software (verze 5.0, Carestream Health, New Haven, USA). Poté byl v daném vzorku spočítán poměr exprese eNOS a β -aktinu a výsledky byly vyjádřeny jako procentní změna oproti průměru kontrolní skupiny (HanSD zdánlivě operovaní potkani).

3.3. Protokol č. 2

Ke zvýraznění patofyziologických procesů při kardiorenálním syndromu byli v této části použiti inbrední hypertenzní potkani kmene Fawn-hooded (FHH), kteří se kromě již zmíněné hypertenze vyznačují progresivní proteinurií a glomeruloskerózou, přecházející až do konečného selhání ledvin (Doleželová *et al.* 2016; Simons *et al.* 1993a, 1993b). Jako kontrolní skupina byli použiti potkani na podobném genetickém základě, kteří jsou ovšem normotenzní a nedochází u nich k poškození renálních funkcí, tzv. Fawn-hooded low pressure (FHL) potkani. FHH a kontrolním FHL potkanům byla v 6 měsících života založena AKP nebo jim byla provedena zdánlivá operace. Následně byli potkani 1 týden ponecháni bez léčby. Poté byli FHH potkani s AKP buď i nadále ponecháni bez léčby dalších 15 týdnů, nebo začala léčba ACE inhibitorem trandolapilem (Gopten, Mylan, USA) v dávce 6 mg/l rozpuštěného ve vodě podávané k pití potkanům, nebo byl do krmiva přimíchán rozdrčený blokátor AT₁ receptoru valsartan v dávce 16 mg/den (Valsacor, KRKA, Novo Mesto, Slovinsko), nebo byl do krmiva přimíchán rozdrčený kombinovaný inhibitor neprylisinu a blokátor AT₁ receptoru sakubitril/valsartan v dávce 9,7/10,3 mg/den (Entresto, Novartis, Norimberk, Německo). Díky lepší biologické dostupnosti valsartanu obsaženém v přípravku Entresto je dávka 10,3 mg ekvivalentní dávce 16 mg v přípravku Valsacor. Uvedené dávky valsartanu v předběžných experimentech dostatečně blokovaly AT₁ receptor po podání angiotenzinu II (více jak 80 % u všech potkanů) a zvýšení denní dávky valsartanu již nevedlo ke zvýšení účinku léku. Týden před založením AKP byly potkani umístěni na 24 hodin do metabolických klecí a byla jim sbírána moč. Dále byla měření v metabolických klecích provedena ve 4., 8., 12. a 16. týdnu po založení AKP nebo zdánlivé operaci. Obr. 6 znázorňuje experimentální protokol 2.

Obr. 6 Experimentální protokol č.2



Experimentální skupiny byly rozděleny následovně:

1. FHL potkani zdánlivě operováni bez léčby
2. FHH potkani zdánlivě operováni bez léčby
3. FHH potkani s AKP bez léčby
4. FHH potkani s AKP léčení trandolapilem
5. FHH potkani s AKP léčení valsartanem
6. FHH potkani s AKP léčení sakubitril/valsartanem

3.3.1. Echokardiografie

Po 16 týdnech od operace byli potkani uvedeni do celkové anestezie pomocí 2 % isofluranu (Abbott Lab, SRN) a echokardiografické parametry jim byly změřeny pomocí GE Medical Vivid 7 Dimension System podle stejného postupu uvedeném v oddílu 3.2.1

3.3.2. Tlakově – objemové křivky

Po provedení echokardiografického vyšetření byli potkani uvedeni do celkové anestezie pomocí intraperitoneální injekce směsi ketaminu v dávce 150 mg/kg váhy potkana (Calypsol, Gedeon Richter, Maďarsko) a midazolamu v dávce 15 mg/ kg váhy potkana (Dormicum, Roche, Francie) a umístění na vyhřívaný chirurgický stolek. Následně jim byla zakanylována levá jugulární žíla k zajištění vstupu pro podávání anestezie a relaxace. Poté byla vypreparována trachea, provedena tracheostomie a následně intravenózním bolusem podána svalová relaxace pomocí 1 mg/0,5 ml pankuronium-bromidu (Pavulon, N.V. ORGANON, Oss, Nizozemsko) a zahájena uměla plicní ventilace ventilátorem pro malá laboratorní zvířata (Ugo Basile, Varese, Itálie). Ventilace byla udržována směsí 80 % kyslíku ve vdechovaném vzduchu, který byl zvlhčován. Plicní ventilace byla nastavena následovně: dechový objem = $6,2 \times \text{váha potkana v kg}^{1,01}$; dechová frekvence = $53,5 \times \text{váha potkana v kg}^{-0,26}$. Poté byla pravá karotická arterie kanylována tlakově-objemovým katetrem SPR-869 (Millar Instruments Inc., Houston, USA) připojenému k systému MPVS Ultra (Millar Instruments Inc., Houston, USA). Naměřené parametry byly zpracovány pomocí programu Labchart 8 (ADInstruments, Dunedin, Nový Zéland). Po změření bazálního tlaku krve v aortálním oblouku, byl katetr umístěn do levé srdeční komory. Poté byl potkan ponechán 20 minut na zotavení z chirurgického stresu. U každého potkana bylo naměřeno nejméně pět 10sekundových křivek při vypnuté ventilaci s odstupem alespoň jedné minuty. Následně byly provedeny přechodné okluze dolní duté žíly, slaná kalibrace a potkan byl předávkován bolusem

anestetika. Poté byla provedena kalibrace pomocí kyvet. Tento postup je detailně popsán v publikaci od Pacher a kol. (Pacher *et al.* 2008). Na konci experimentu byly zváženy ledviny, játra, plíce, celé srdce a odděleně levá a pravá komora a dále byla změřena délka levé tibie.

3.3.3. Biochemická měření a histologická analýza

Z odebraných vzorků moči a krve byly stanoveny hladiny elektrolytů s využitím plamenného fotometru (BWB XP, BWB Technologies Ltd., Newbury Spojené království). Dále byla stanovena koncentrace kreatininu v krvi a moči s využitím soupravy Liquick Cor-CREATININE (PZ Cormay S.A., Polsko), která je založena na modifikované Jaffeho metodě bez deproteinizace. Poté byla vypočtena clearance kreatininu podle standardního vzorce. Albumin v moči byl stanoven pomocí ELISA metody podle návodu od výrobce (ERA3201-1, Assaypro LLC, St Charles, USA) a následně byla stanovena hodnota albuminurie za 24 hodin vynásobením množství vyprodukované moči.

Odebraná ledvina byla umístěna do fixační tekutiny (10% roztok formaldehydu) a následně byla zpracována na histologickou analýzu. Vzorek ledviny byl zalit do parafínu a barven PAS (periodic-acid-Schiff) metodou. V každém vzorku bylo hodnoceno celkem 100 glomerulů podle následující stupnice: stupeň 0 - glomeruly beze změn, stupeň 1 - segmentální sklerotizace do 25% plochy glomerulu, stupeň 2 - 25-50%, stupeň 3 - 50-75% a stupeň 4 - segmentální sklerotizace 75-100% plochy glomerulu. Následně byl vypočítán glomerulosklerotický index (GSI) podle vzorce popsaného dříve (Saito *et al.* 1987): $GSI = [(1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)] / (n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4)$, kde n_x je počet glomerulů s daným stupněm poškození. Poté byl objektivem s 20násobným zvětšením hodnocen index tubulointersticiálního poškození nejméně ve 30 náhodně vybraných a nepřekrývajících se zorných polích v oblasti kůry. Tubulointersticiální poškození bylo definováno jako zánětlivý infiltrát, dilatace a/nebo atrofie tubulů nebo intersticiální fibrotizace a bylo hodnoceno semikvantitativně podle následující škály (Nakano *et al.* 2008): 0 - žádný abnormální nález, 1 - mírné (< 25% kůry), 2 - střední (25 - 50% kůry), 3 - těžké (> 50% kůry).

3.4. Statistická analýza

Všechny hodnoty v této studii jsou vyjádřeny pomocí průměrů se standardní odchylkou, pokud není výslovně uvedeno jinak. Ke statistickému zpracování změřených dat byl použit GraphPad Prism 8 software (GraphPad software, San Diego, USA). Použité

statistické metody zahrnovaly analýzu rozptylu jednoduchého třídění (one-way ANOVA) a analýzu rozptylu dvojného třídění (two-way ANOVA) s následným post hoc Bonferroniho testem. Přežívací křivky byly srovnány pomocí Gehanova-Breslowova-Wilcoxonova testu. Jako statisticky signifikantní byly označeny výsledky přesahující 95 % hladinu pravděpodobnosti (tj. hodnota P menší než 0,05).

4. Výsledky

4.1. Protokol č. 1

Tabulka 1 shrnuje váhy potkanů a jednotlivých orgánů u TGR a HanSD potkanů 20 týdnů po založení AKP/zdánlivé operaci. Jak je vidět z vah srdečních oddílů, u HanSD i

Tab. 1 Hmotnost potkanů a váhy jednotlivých orgánů u kontrolních potkanů, potkanů s AKP bez léčby, AKP potkanů léčených ACE inhibítorem (ACEi) a AKP potkanů léčených AT₁ blokátorem (AT₁B) 20 týdnů po zdánlivé/AKP operaci.

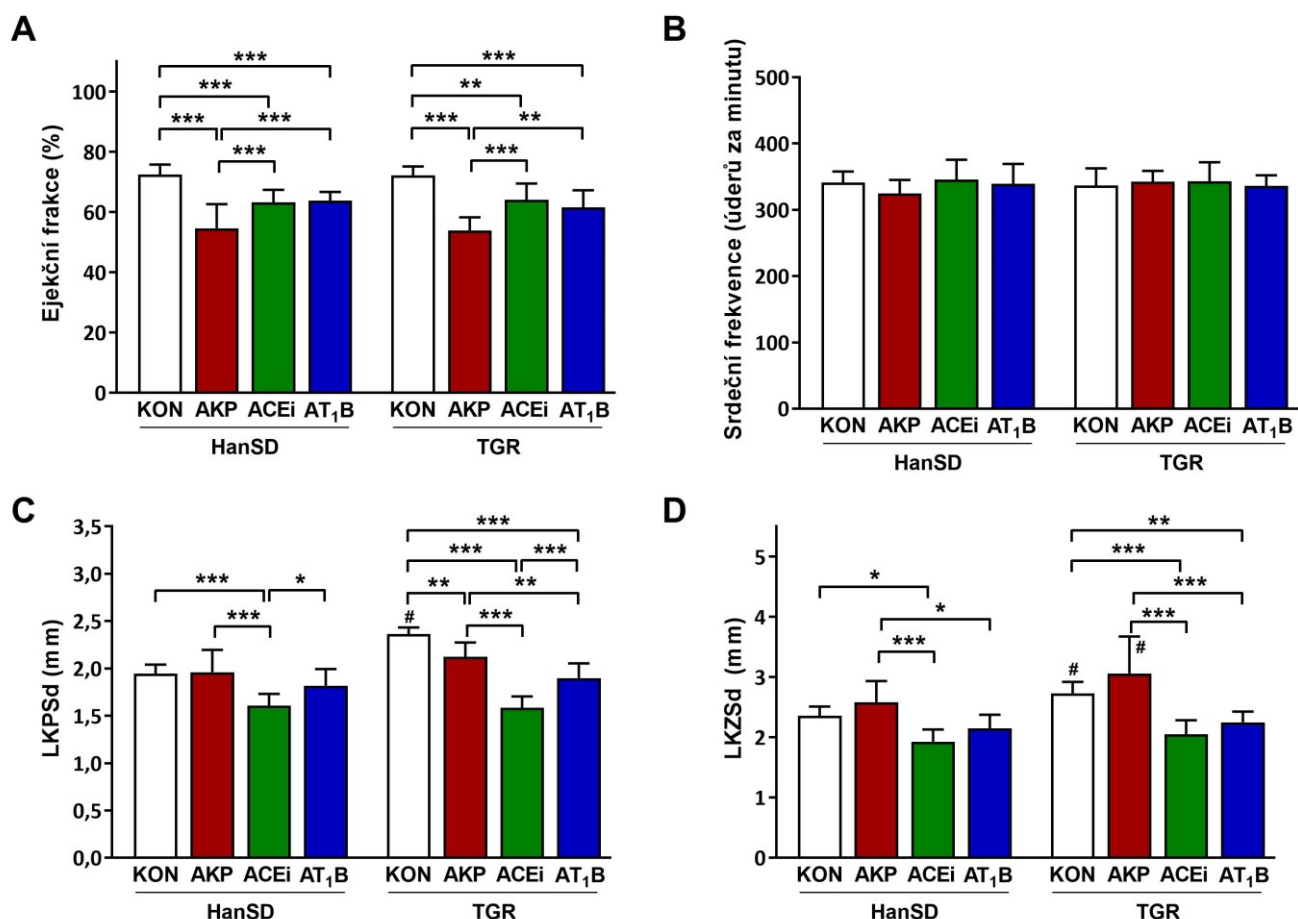
HanSD potkani				
Skupina	Kontrolní	AKP	AKP + ACEi	AKP + AT ₁ B
Váha potkana (g)	543 ± 37	548 ± 45	537 ± 31	575 ± 56
Váha srdce (mg)	1543 ± 115	2782 ± 481 *	2306 ± 196 ** [#]	2514 ± 256 *
Váha levé komory (mg)	1108 ± 78	1760 ± 232 *	1527 ± 114 ** [#]	1660 ± 147 *
Váha pravé komory (mg)	309 ± 31	625 ± 126 *	522 ± 54 ** [#]	572 ± 76 *
Váha plic (mg)	1987 ± 126	2578 ± 623 *	2216 ± 216 [#]	2278 ± 172 [#]
Váha jater (mg)	16,8 ± 2,0	18,3 ± 7,2	17,1 ± 2,5	16,8 ± 2,1
Váha ledvin (mg)	1933 ± 188	1801 ± 229	1918 ± 233	1887 ± 170
TGR potkani				
Skupina	Kontrolní	AKP	AKP + ACEi	AKP + AT ₁ B
Váha potkana (g)	652 ± 46 [¥]	483 ± 46 *	606 ± 53 ^{#¥}	643 ± 38 ^{#¥}
Váha srdce (mg)	1950 ± 131 [¥]	2468 ± 337 ** [¥]	2149 ± 257 ^{#¥}	2202 ± 272 ^{#¥}
Váha levé komory (mg)	1482 ± 85 [¥]	1687 ± 159 *	1418 ± 157 ^{#¥}	1481 ± 178 ^{#¥}
Váha pravé komory (mg)	315 ± 30	490 ± 106 *	519 ± 124 *	492 ± 75 *
Váha plic (mg)	2057 ± 182	2558 ± 638 *	2333 ± 235 [#]	2331 ± 171 [#]
Váha jater (mg)	20,0 ± 1,3	17,1 ± 3,5	17,8 ± 2,7	19,1 ± 2,3
Váha ledvin (mg)	2143 ± 76	1740 ± 164	1863 ± 227	1984 ± 153

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka. V každé skupině bylo n = 10.

* $P < 0,05$ versus kontrolní skupina stejného kmene # $P < 0,05$ versus AKP skupina stejného kmene [¥] $P < 0,05$ versus stejná skupina HanSD potkanů

TGR potkanů po založení AKP dochází ke značné hypertrofii srdce. Zatímco podání ACEi zabránilo hypertrofii srdce u HanSD i TGR potkanů, léčba AT₁ blokátorem významně snížila váhu srdce pouze u TGR potkanů. U potkanů s AKP bez léčby byla významně vyšší váha plic, což naznačuje stagnaci žilní krve z důvodu srdeční nedostatečnosti. Oba léčebné přístupy pak významně snížily váhu plic ve srovnání s neléčenými potkany s AKP.

Obr. 7 Ejekční frakce levého srdce (A), srdeční frekvence (B), rozměr přední stěny levé komory v diastole (LKPSd) (C) a rozměr zadní stěny levé komory v diastole (LKZSd) (D) u kontrolních potkanů (KON), potkanů s AKP bez léčby (AKP), AKP potkanů léčených ACE inhibítorem (ACEi) a AKP potkanů léčených AT₁ blokátorem (AT₁B) 20 týdnů po zdánlivé/AKP operaci.



Hodnoty jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka. V každé skupině bylo n = 10.

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ # $P < 0,05$ versus stejná skupina HanSD potkanů

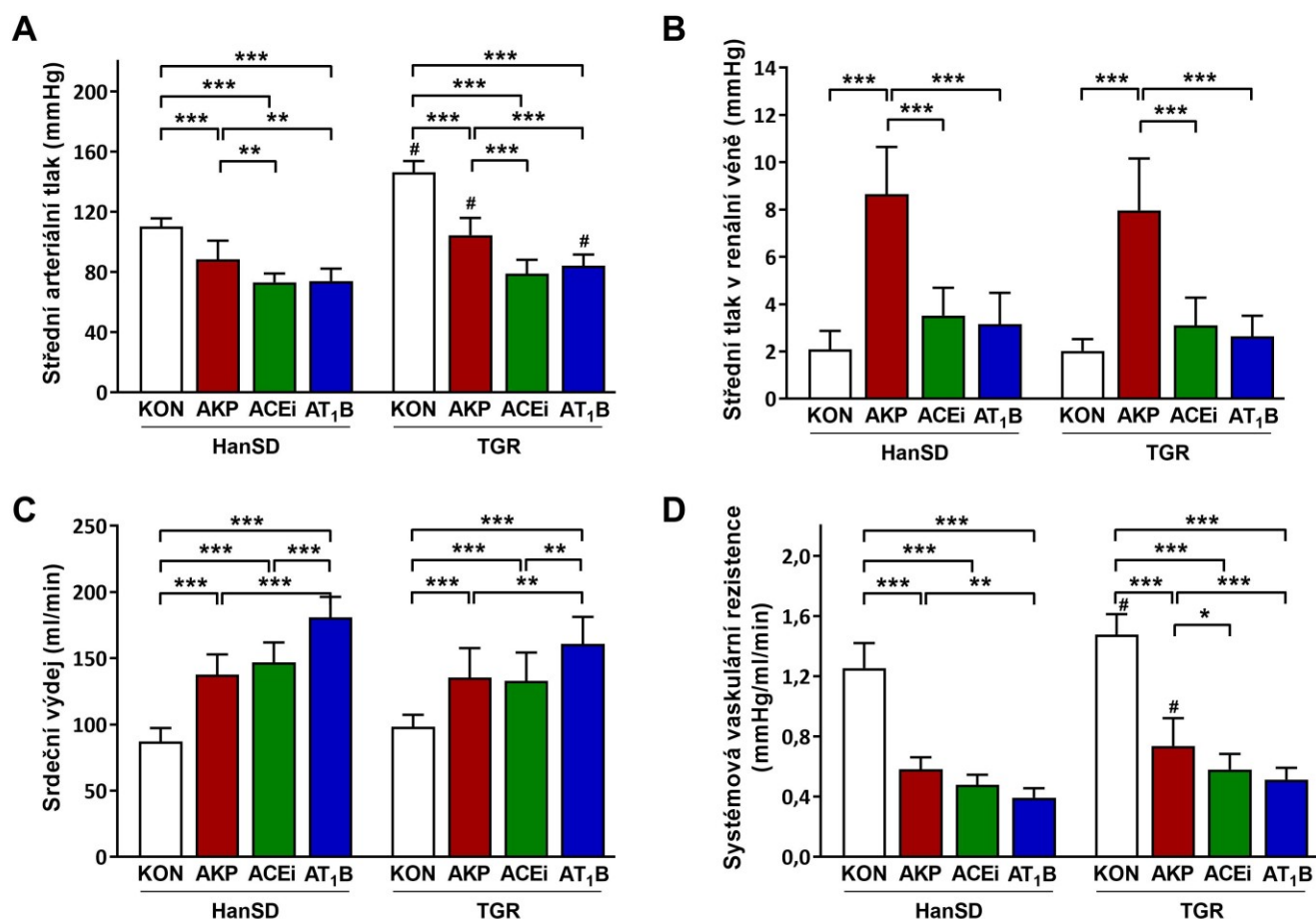
Obrázek 7 shrnuje echokardiografické srdeční parametry. Založení AKP u obou kmenů potkanů vedlo k významnému snížení ejekční frakce levé komory ve srovnání s

kontrolními skupinami (HanSD: $54,6 \pm 8,1\%$ vs. $72,5 \pm 3,4\%$, $P < 0,001$; TGR: $53,9 \pm 5,2\%$ vs. $72,1 \pm 3,8\%$, $P < 0,001$). Léčba ACEi nebo blokátorem AT₁ receptoru u HanSD potkanů s AKP signifikantně zlepšila ejekční frakci levé komory ($63,3 \pm 4,1\%$ a $63,8 \pm 2,9\%$, obě $P < 0,001$), stejně tomu bylo u TGR potkanů ($64,1 \pm 6,1\%$ a $61,5 \pm 5,8\%$, obě $P < 0,01$) jak je znázorněno na obrázku 7 A. I přes rozdíly v ejekční frakci se srdeční frekvence u všech skupin signifikantně nelišila (Obr. 7 B). Rozměry přední stěny levé komory v diastole (LKPSd) a zadní stěny levé komory v diastole (LKZSd) nebyly u HanSD potkanů ovlivněny založením AKP (Obr. 7 C a D), na rozdíl od TGR potkanů, kde jsme pozorovali signifikantně menší LKPSd 5 týdnů založení AKP (obr. 1 C), avšak LKZSd u nich nebyl založením AKP ovlivněn. Spolu s pozorovaným značným nárůstem hmotnosti srdce u potkanů s AKP (Tab. 1) tyto výsledky ukazují, že po založení AKP dochází k rozsáhlé excentrické srdeční hypertrofii. Obě léčby významně snížily LKPSd i LKZSd, avšak mnohem více byl efekt vyjádřen u potkanů léčených ACE inhibitorem, jak je patrné z obrázku 7 C.

Na obrázku 8 jsou shrnuty systémové hemodynamické parametry. Střední arteriální tlak byl signifikantně vyšší u kontrolních TGR potkanů v porovnání s kontrolními HanSD potkany (110 ± 5 mmHg vs. 146 ± 8 mmHg, $P < 0,001$). U HanSD i TGR potkanů vedlo založení AKP k signifikantnímu snížení středního arteriálního tlaku (88 ± 12 mmHg a 104 ± 11 mmHg, obě $P < 0,001$). 20týdenní léčba ACEi a AT₁ blokátorem vedla k dalšímu, u obou léčebných přístupů obdobnému, snížení středního arteriálního tlaku (Obr. 8A). V porovnání s kontrolními potkany měla zvířata s AKP signifikantně vyšší střední tlak v renální vlně ($2,1 \pm 0,8$ mmHg vs. $8,7 \pm 2,0$ mmHg u HanSD potkanů, $2,0 \pm 0,5$ mmHg vs. $8,0 \pm 2,2$ mmHg u TGR potkanů, obě $P < 0,001$). Jak je ovšem patrné z obrázku 8B, potkani s AKP léčení ACEi nebo AT₁ blokátorem měli oproti neléčeným potkanům výrazně nižší venózní tlaky, s hodnotami obdobnými kontrolní skupině. Oproti kontrolním skupinám byl srdeční výdej významně vyšší u všech skupin s AKP. Potkani s AKP léčení AT₁ blokátorem měli oproti ostatním skupinám další signifikantní nárůst v srdečním výdeji (Obr. 8 C). Paralelně se zvyšujícím se srdečním výdejem klesala systémová vaskulární rezistence, jak je patrné na obrázku 8 D.

Parametry renální hemodynamiky jsou shrnuty na obrázku 9. Průtok krve ledvinou byl signifikantně snížený u neléčených HanSD potkanů v porovnání s kontrolní skupinou ($8,9 \pm 1,0$ ml/min vs. $4,7 \pm 1,6$ ml/min, $P < 0,001$). Léčba pomocí ACEi signifikantně neovlivnila PKL ($5,6 \pm 1,1$ ml/min), oproti tomu léčba AT₁ blokátorem, vedla k signifikantnímu zlepšení PKL ($9,0 \pm 1,5$ ml/min), jak je patrné z obrázku 9 A. U TGR

Obr. 8 Střední arteriální tlak (A), střední tlak v renální vėně (B), srdeční výdej (C) a systémová vaskulární rezistence (D) u kontrolních potkanů (KON), potkanů s AKP bez léčby (AKP), AKP potkanů léčených ACE inhibítorem (ACEi) a AKP potkanů léčených AT₁ blokátorem (AT₁B) 20 týdnů po zdánlivé/AKP operaci.

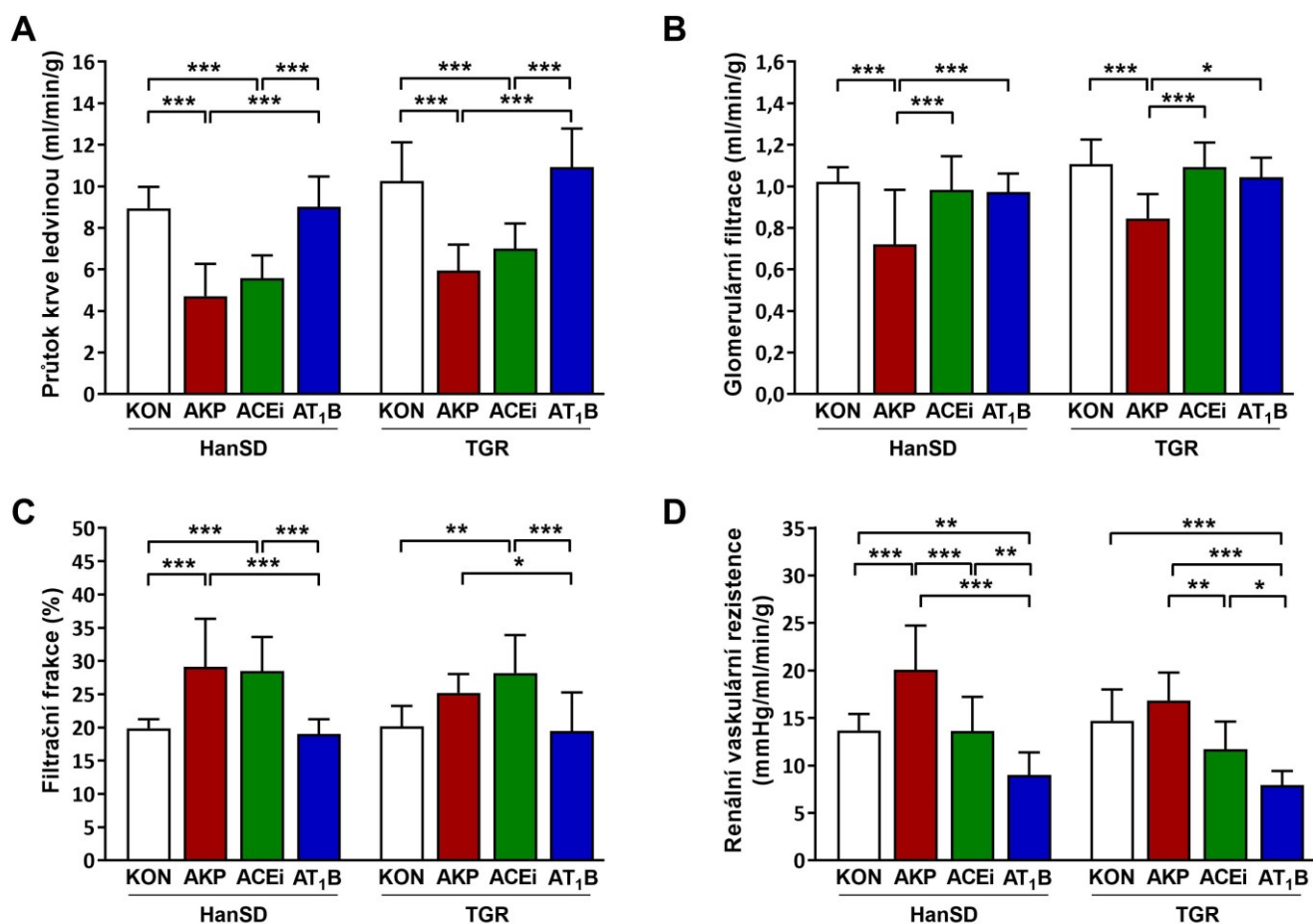


Hodnoty jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka. V každé skupině bylo n = 10.

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ # $P < 0,05$ versus stejná skupina HanSD potkanů

potkanů jsme pozorovali obdobné změny. Glomerulární filtrace byla signifikantně nižší pouze u neléčených potkanů s AKP, zatímco u léčených skupin byla filtrace obdobná jako u kontrolních skupin (Obr. 9 B). Filtrační frakce byla signifikantně vyšší u potkanů s AKP, a to jak u neléčených, tak i léčených ACEi, v porovnání s kontrolní skupinou. Oproti tomu léčba blokátorem AT₁ receptoru u potkanů s AKP normalizovala filtrační frakci (Obr. 9 C). Renální vaskulární rezistence byla signifikantně vyšší u neléčených potkanů s AKP oproti kontrolní skupině, naproti tomu léčba ACE inhibítorem renální vaskulární rezistenci normalizovala u obou kmenů potkanů. U potkanů léčených AT₁ blokátorem byla renální vaskulární rezistence signifikantně nižší než u všech ostatních skupin, včetně potkanů léčených ACEi, jak je patrné z obrázku 9 D.

Obr. 9 Průtok krve ledvinou (A), glomerulární filtrace (B), filtrační frakce (C) a renální vaskulární rezistence (D) u kontrolních potkanů (KON), potkanů s AKP bez léčby (AKP), AKP potkanů léčených ACE inhibítorem (ACEi) a AKP potkanů léčených AT₁ blokátorem (AT₁B) 20 týdnů po zdánlivé/AKP operaci.

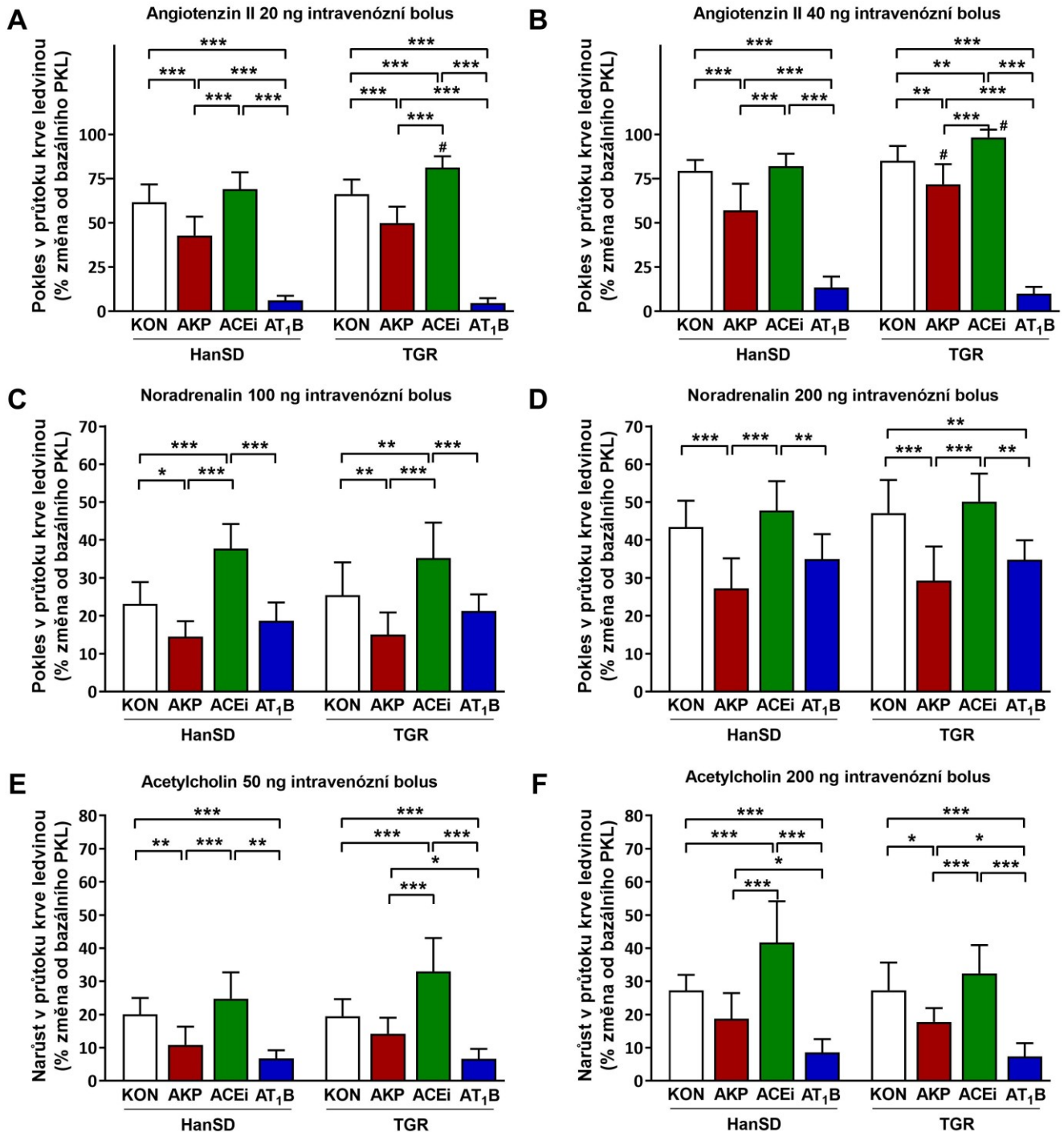


Hodnoty jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka. V každé skupině bylo n = 10.

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ # $P < 0,05$ versus stejná skupina HanSD potkanů

Na obrázku 10 jsou shrnuty odpovědi renálních cév na intravenózně aplikované bolusy angiotenzinu II, noradrenalinu a acetylcholinu. Podání 20 ng i 40 ng angiotenzinu II intravenózně vyvolalo signifikantně menší pokles PKL u neléčených AKP potkanů než u kontrolních potkanů. U AKP potkanů léčených ACEi jsme pozorovali signifikantně vyšší odpovědi na bolusy angiotenzinu II než u neléčených AKP potkanů. U TGR potkanů s AKP léčených ACEi byla vaskulární reakce na angiotenzin II signifikantně vyšší i oproti kontrolní skupině. U potkanů léčených AT₁ blokátorem byly odpovědi na angiotenzin II očekávaně výrazně utlumené (Obr. 10 A a B). Podání 100 ng a 200 ng noradrenalinu vyvolalo u neléčených potkanů s AKP signifikantně menší pokles PKL v porovnání

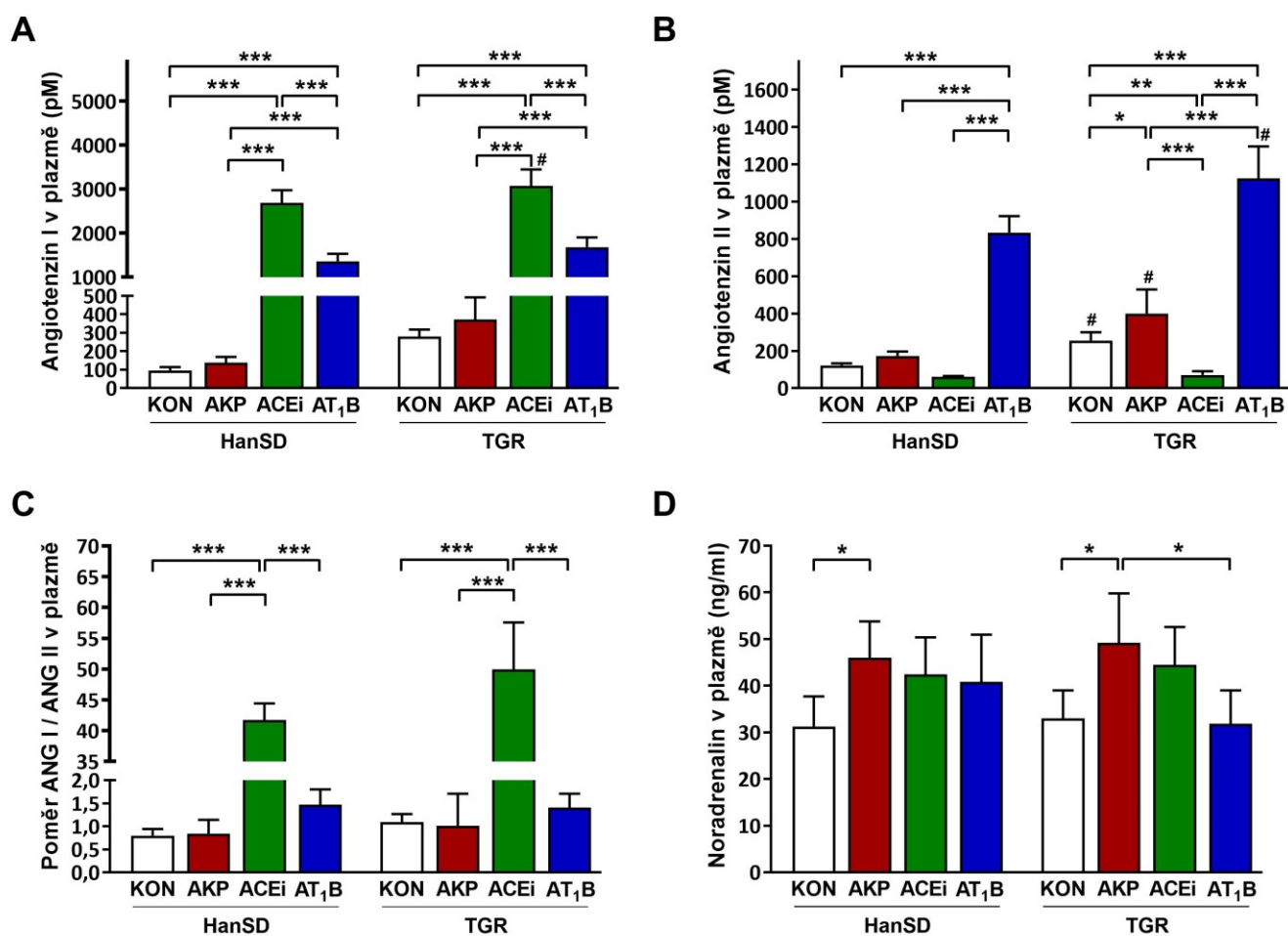
Obr. 10 Maximální změna v průtoku krve ledvinou vyvolaná intravenózním bolusem 20 ng angiotenzinu II (A), 40 ng angiotenzinu II (B), 100 ng noradrenalinu (C) 200 ng noradrenalinu (D) 50 ng acetylcholinu (E) a 200 ng acetylcholinu (F) u kontrolních potkanů (KON), potkanů s AKP bez léčby (AKP), AKP potkanů léčených ACE inhibítorem (ACEi) a AKP potkanů léčených AT₁ blokátorem (AT₁B) 20 týdnů po zdánlivé/AKP operaci.



* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ # $P < 0,05$ versus stejná skupina HanSD potkanů

s kontrolními potkany. Naopak potkani s AKP na léčbě ACEi reagovali na podání noradrenalinu signifikantně větším snížením PKL, na rozdíl od potkanů léčených AT₁ blokátorem, kteří vykazovali obdobnou citlivost renálních cév po podání noradrenalinu jako kontrolní potkani (Obr. 10 C a D). U neléčených AKP potkanů jsme pozorovali

Obr. 11 Plazmatické koncentrace angiotenzinu I (A), angiotenzinu II (B), poměr angiotenzinu I vůči angiotenzinu II v plazmě (C) a koncentrace noradrenalinu v plazmě (D) u kontrolních potkanů (KON), potkanů s AKP bez léčby (AKP), AKP potkanů léčených ACE inhibítorem (ACEi) a AKP potkanů léčených AT₁ blokátorem (AT₁B) 20 týdnů po zdánlivé/AKP operaci.



Hodnoty jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka. V každé skupině bylo n = 5-6.

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ # $P < 0,05$ versus stejná skupina HanSD potkanů

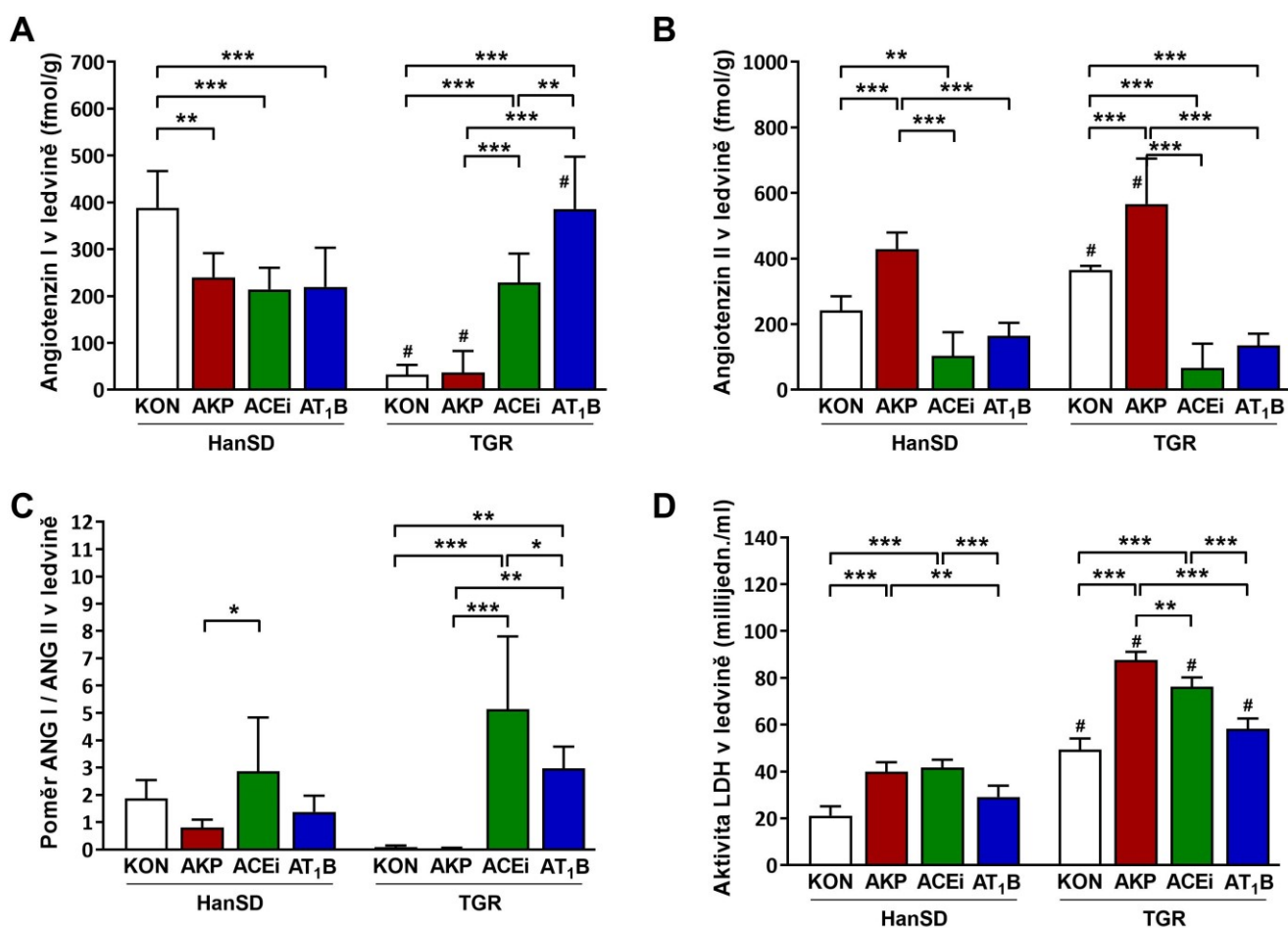
signifikantně menší vzestupy PKL po intravenózním podání acetylcholinu. Léčba ACEi u AKP zvýšila citlivost na acetylcholin, zatímco potkani léčení blokátorem AT₁ receptoru měli signifikantně snížené odpovědi v PKL (Obr. 10 E a F).

Plazmatické hladiny angiotenzinů a noradrenalinu jsou prezentovány na obrázku 11. Ačkoliv se plazmatické hladiny angiotenzinu I (ANG I) významně nelišily mezi kontrolními potkany a potkany s AKP bez léčby, měli potkani léčení ACEi i AT₁ blokátorem významně zvýšené hladiny ANG I v plazmě (Obr. 11 A). Kontrolní TGR potkani měli ve srovnání s HanSD potkany očekávaně významně vyšší plazmatické koncentrace ANG II. Pouze TGR potkani s AKP bez léčby měli významně vyšší hladiny plazmatického ANG II oproti kontrolním potkanům. Obdobně léčba ACEi významně snížila plazmatickou koncentraci ANG II pouze u TGR potkanů, jelikož u HanSD potkanů snížení nebylo statisticky významné. U obou kmenů potkanů však vedlo podávání AT₁ blokátoru k výraznému zvýšení plazmatického ANG II, jak je patrné z obrázku 11 B. Ačkoliv u HanSD potkanů byly změny v plazmatickém ANG II stejné jako u TGR potkanů, nedosáhly statistické významnosti zejména díky extrémní koncentracím u potkanů léčených AT₁ blokátorem. Jak je vidět na obrázku 11C, léčba pomocí ACE inhibitoru dostatečně blokovala přeměnu ANG I na ANG II, jelikož poměr ANG I/II byl u těchto potkanů řádově vyšší. Ve srovnání s kontrolními potkany měli neléčení potkani obou kmenů s AKP významně vyšší hladiny noradrenalinu v plazmě. A pouze u TGR potkanů vedla léčba k významnému snížení plazmatických hladin noradrenalinu (Obr. 11D).

Na obrázku 12 jsou shrnuty renální koncentrace angiotenzinu II a aktivita laktát dehydrogenázy (LDH) v ledvině. Neléčení AKP potkani kmene HanSD měli ve srovnání s kontrolními potkany významně nižší renální koncentrace ANG I a ani jeden z léčebných přístupů dále ANG I v ledvině neovlivnil. U TGR potkanů měli jak kontrolní potkani, tak neléčení potkani s AKP, významně snížené ledvinné hladiny ANG I. Po obou léčbách pak došlo k významnému zvýšení koncentrace ANG I v ledvině (Obr. 12 A). Kontrolní TGR potkani měli ve srovnání s HanSD potkany významně vyšší koncentraci ANG II v ledvině. U obou kmenů měli neléčení potkani s AKP ve srovnání s kontrolními významně vyšší renální koncentrace ANG II. HanSD i TGR potkani měli při léčbě ACEi nebo AT₁ blokátorem významně nižší koncentrace ANG II v ledvině, jak je vidět na obrázku 12 B. U neléčených potkanů s AKP jsme pozorovali ve srovnání s kontrolními potkany významně vyšší poměr renálního ANG I vůči ANG II (Obr. 12 C). Avšak při srovnání s plazmatickým poměrem ANG I/II (Obr. 11 C) je vidět, že míra zablokování přeměny ANG I na ANG II byla v ledvině výrazně nižší (poměr ANG I/ANG II v ledvině cca 3-5x vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou) než v plazmě (poměr ANG I/ANG II v plazmě cca 40-50x vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou). Aktivita renální LDH byla

signifikantně zvýšena u neléčených AKP potkanů ve srovnání s kontrolami. Pouze u TGR potkanů jsme pozorovali mírné, avšak statisticky významné, snížení renální aktivity LDH při léčbě ACE inhibítorem. Naopak u léčby AT₁ blokátorem bylo snížení renální LDH aktivity signifikantní u HanSD i TGR potkanů (Obr. 12 D).

Obr. 12 Renální koncentrace angiotenzinu I (A), angiotenzinu II (B), poměr angiotenzinu I vůči angiotenzinu II v ledvině (C) a aktivity renální laktát dehydrogenázy (D) u kontrolních potkanů (KON), potkanů s AKP bez léčby (AKP), AKP potkanů léčených ACE inhibítorem (ACEi) a AKP potkanů léčených AT₁ blokátorem (AT₁B) 20 týdnů po zdánlivé/AKP operaci.



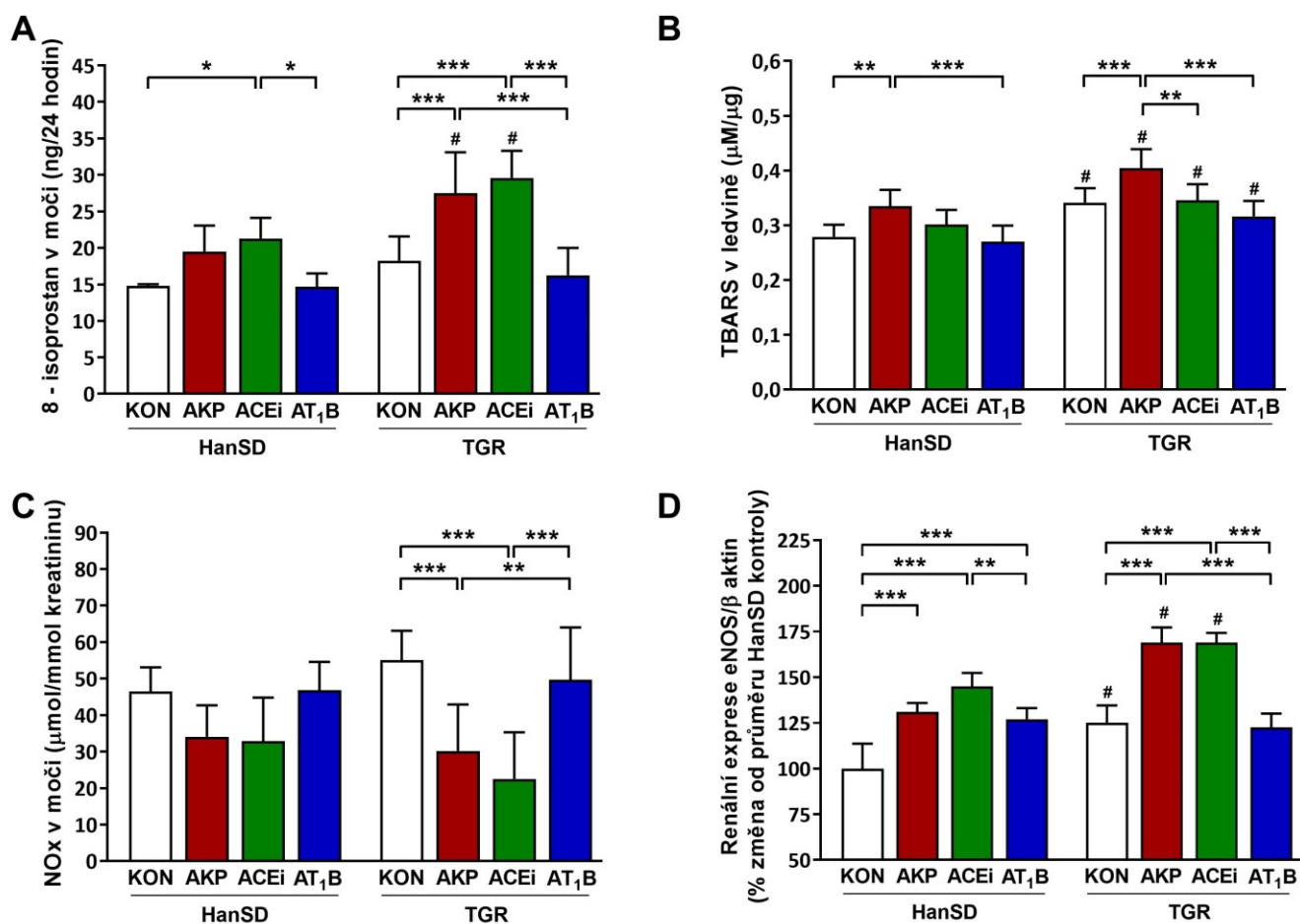
Hodnoty jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka. V každé skupině bylo n = 4-6.

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ # $P < 0,05$ versus stejná skupina HanSD potkanů

Na obrázku 13 A a B jsou prezentována množství 8-isoprostanu v moči a renální TBARS jako markery oxidativního stresu v ledvině. U neléčených AKP potkanů jsme pozorovali zvýšené parametry oxidativního stresu. Zatímco léčba pomocí ACEi signifikantně neovlivnila úroveň oxidativního stresu v ledvině, podávání AT₁ blokátoru vedlo k významnému snížení oxidativního stresu. U HanSD potkanů byl pouze trend

močových NOx k nižším hodnotám u neléčených AKP potkanů. U TGR potkanů byly močové koncentrace NOx signifikantně nižší u neléčených a ACEi léčených potkanů s AKP v porovnání s kontrolami. Léčba AT₁ blokátorem pak významně zlepšila produkci

Obr. 13 8-isoprostany v moči (A), renální TBARS (B), koncentrace nitrátů/nitritů v moči (C) a renální exprese eNOS (D) u kontrolních potkanů (KON), potkanů s AKP bez léčby (AKP), AKP potkanů léčených ACE inhibítorem (ACEi) a AKP potkanů léčených AT₁ blokátorem (AT₁B) 20 týdnů po zdánlivé/AKP operaci.



Hodnoty jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka. V každé skupině bylo n = 6-9.

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ # $P < 0,05$ versus stejná skupina HanSD potkanů

močových NOx, jak je patrné z obrázku 13 C. Expres eNOS byla signifikantně vyšší u neléčených potkanů s AKP oproti kontrolním potkanům. Podávání ACEi nemělo vliv na úroveň exprese eNOS. Naopak léčba pomocí AT₁ blokátoru signifikantně snížila expresi eNOS u TGR potkanů.

4.2. Protokol č. 2

Tabulka 2 shrnuje váhy potkanů a jednotlivých orgánů u FHL a FHH potkanů 16 týdnů po založení AKP/zdánlivé operaci. Kontrolní hypertenzní FHH potkani měli oproti

Tab. 2 Hmotnost potkanů a váhy jednotlivých orgánů vztažené na délku tibie u kontrolních FHL potkanů, kontrolních FHH potkanů, FHH potkanů s AKP bez léčby, FHH potkanů s AKP léčených ACE inhibítorem (ACEi), FHH potkanů s AKP léčených AT₁ blokátorem (AT₁B) a FHH potkanů s AKP léčených kombinovaným AT₁B a inhibítorem neprilysinu (ARNi) 16 týdnů po zdánlivé/AKP operaci.

Skupina	FHL kontroly	FHH kontroly	FHH+AKP
Váha potkana (g/mm tibie)	87,5 ± 2,5	96,3 ± 5,5 *	97,1 ± 5,0 *
Délka tibie (mm)	4,03 ± 0,03	4,29 ± 0,04 *	4,30 ± 0,06 *
Váha srdce (mg/mm tibie)	249 ± 13	307 ± 27 *	511 ± 32 **
Váha levé komory (mg/mm tibie)	176 ± 9	224 ± 23 *	319 ± 29 **
Váha pravé komory (mg/mm tibie)	48,3 ± 3,4	56,4 ± 6,8	107,7 ± 11,7 **
Váha plic (mg/mm tibie)	323 ± 26	345 ± 19	494 ± 60 **
Váha jater (mg/mm tibie)	2761 ± 175	3729 ± 275 *	4526 ± 513 **
Váha ledvin (mg/mm tibie)	274 ± 14	319 ± 28 *	294 ± 38

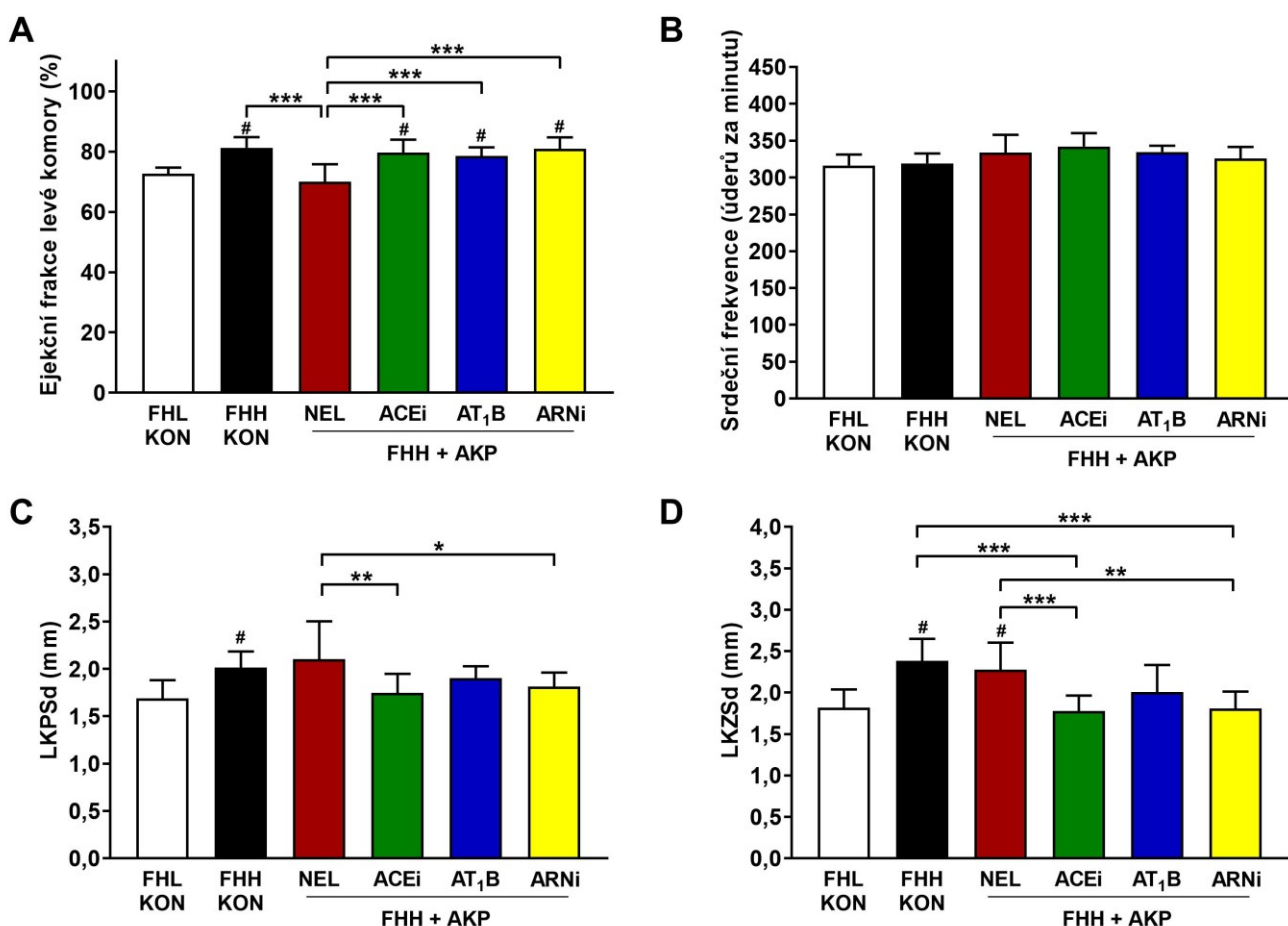
Skupina	FHH+AKP+ACEi	FHH+AKP+AT ₁ B	FHH+AKP+ARNi
Váha potkana (g/mm tibie)	90,1 ± 5,4	103,3 ± 5,7 *	100,1 ± 4,4 *
Délka tibie (mm)	4,25 ± 0,06 *	4,34 ± 0,07 *	4,30 ± 0,06 *
Váha srdce (mg/mm tibie)	376 ± 39 **¥	413 ± 42 **¥	387 ± 26 **¥
Váha levé komory (mg/mm tibie)	247 ± 26 **¥	271 ± 24 **¥	258 ± 20 **¥
Váha pravé komory (mg/mm tibie)	81,6 ± 8,7 **¥	91,3 ± 9,9 **¥	85,4 ± 6,2 **¥
Váha plic (mg/mm tibie)	366 ± 19 ¥	398 ± 27 **¥	393 ± 21 **¥
Váha jater (mg/mm tibie)	3126 ± 310 ¥	3741 ± 258 * ¥	3708 ± 329 * ¥
Váha ledvin (mg/mm tibie)	278 ± 26	293 ± 17	292 ± 22

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka. V každé skupině bylo n = 10.

* $P < 0,05$ versus FHL kontroly # $P < 0,05$ versus FHH kontroly ¥ $P < 0,05$ versus neléčení FHH potkani s AKP

kontrolním normotenzním FHL potkanům signifikantně vyšší hmotnost celého srdce i levé komory. Založení AKP u FHH potkanů vedlo k signifikantní hypertrofii celého srdce i obou srdečních oddílů. Všechny léčebné přístupy navodily signifikantní zmírnění srdeční hypertrofie. U neléčených FHH potkanů s AKP jsme pozorovali signifikantně vyšší hmotnost plic oproti kontrolním potkanům, což naznačuje značnou žilní kongesci z důvodu levostranné srdeční nedostatečnosti u této skupiny. Opět všechny léčebné přístupy signifikantně zmírnily žilní kongesci, a tedy váhu plic, oproti neléčeným FHH potkanům

Obr. 14 Ejekční frakce levé komory (A), srdeční frekvence (B), rozměr přední stěny levé komory v diastole (LKPSd) (C) a rozměr zadní stěny levé komory v diastole (LKZSd) (D) u kontrolních FHL potkanů (FHL KON), kontrolních FHH potkanů (FHH KON), FHH potkanů s AKP bez léčby (NEL), FHH potkanů s AKP léčených ACE inhibítorem (ACEi), FHH potkanů s AKP léčených AT₁B a FHH potkanů s AKP léčených kombinovaným AT₁B a inhibítorem neprilysinu (ARNi) 16 týdnů po zdánlivé/AKP operaci.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka. V každé skupině bylo n = 9-12.

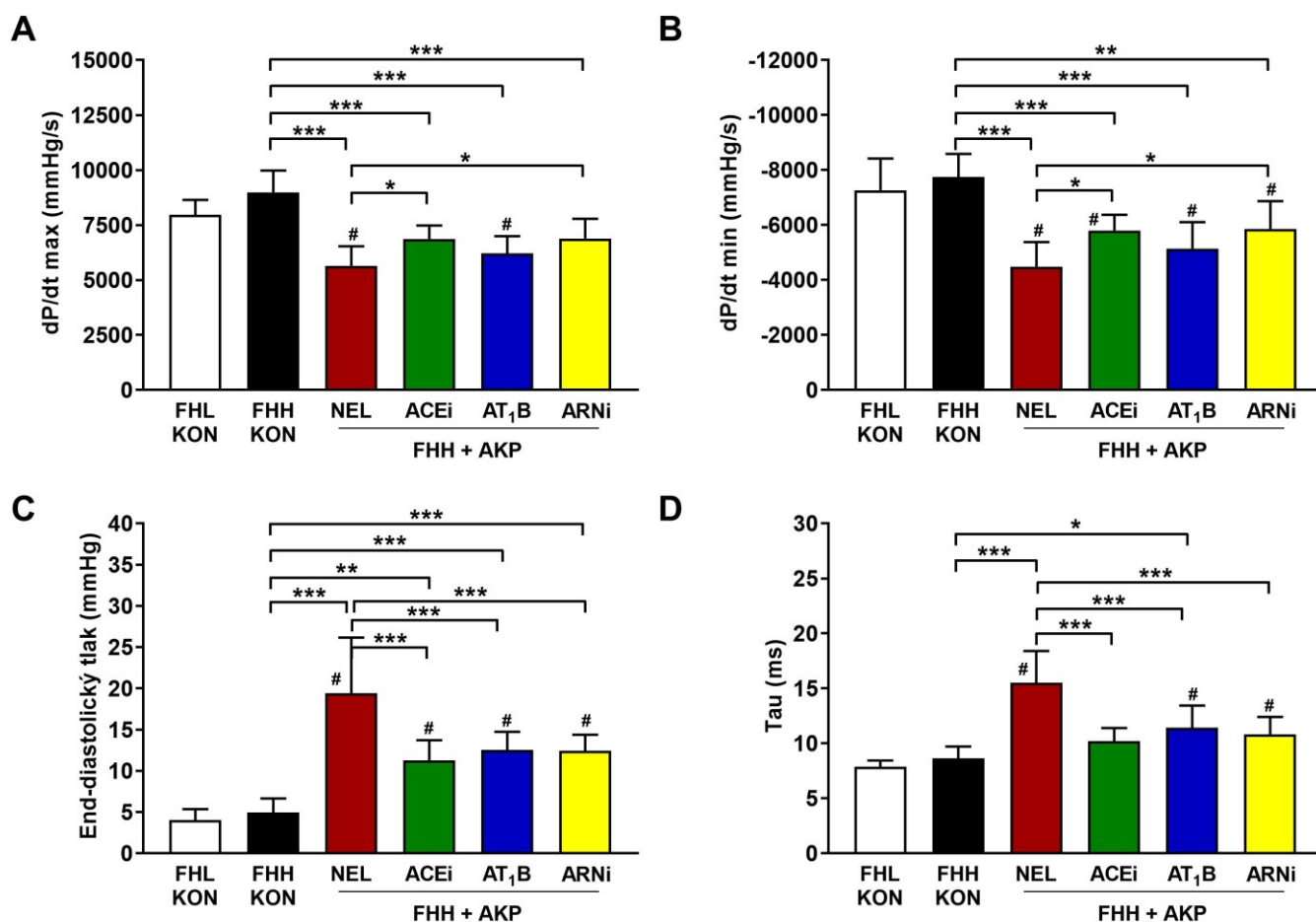
[#] $P < 0,05$ versus FHL kontroly * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

s AKP. Obdobně měli neléčení FHH potkani s AKP signifikantně těžší játra oproti kontrolním potkanům, nejspíše jako projev stagnace krve před pravým srdcem z důvodu jeho selhávání. I váha jater byla signifikantně nižší u všech léčebných protokolů ve srovnání s neléčenými FHH potkany s AKP.

Echokardiografické parametry jsou shrnuty na obrázku 14. V porovnání s kontrolami měli neléčení FHH potkani s AKP signifikantně sníženou ejekční frakci levé komory ($81,2 \pm 3,6 \%$ vs. $70,0 \pm 5,8 \%$, $P < 0,001$). Všechny léčebné protokoly signifikantně zlepšily ejekční frakci v porovnání s neléčenými FHH potkany s AKP (ACEi: $79,6 \pm 4,3 \%$; AT₁B: $78,5 \pm 2,9 \%$; ARNi: $80,9 \pm 3,8 \%$; všechny $P < 0,001$), jak je znázorněno na obrázku 14 A. Srdeční frekvence se u žádné skupiny signifikantně nelišila (Obr. 14 B). Oproti kontrolním FHL potkanům měli kontrolní FHH potkani signifikantně vyšší rozměry LKPSd i LKZSd, což spolu se signifikantním nárůstem váhy srdce značí hypertrofickou přestavbu srdce jako odpověď na tlakové přetížení. FHH potkani s AKP však neměli oproti kontrolním FHH potkanům větší rozměry LKPSd ani LKZSd. U těchto potkanů ale došlo k výraznému nárůstu váhy srdce, což opět ukazuje na výraznou excentrickou hypertrofii srdce u FHH potkanů po založení AKP, obdobně jako tomu bylo u HanSD a TGR potkanů. Oproti neléčeným FHH potkanům s AKP měli pouze potkani s AKP léčeni ACEi nebo ARNi signifikantně nižší rozměr LKPSd a LKZSd, zatímco u potkanů léčených AT₁ blokátorem se rozměry signifikantně nelišily (Obr. 14 C a D).

Na obrázku 15 jsou prezentovány parametry získané z tlakově-objemových křivek levé komory. Maximální rychlost vzestupu tlaku (dP/dt max) v levé komoře jako ukazatel srdeční kontraktility byl u všech skupin s AKP signifikantně snížený oproti kontrolním FHH potkanům. V porovnání s neléčenými FHH potkany s AKP měli potkani na léčbě ACEi i ARNi signifikantně zvýšené hodnoty dP/dt max (Obr. 15 A). Ukazatel srdeční relaxace, maximální rychlost poklesu tlaku (dP/dt min), byl signifikantně menší u všech skupin FHH potkanů s AKP oproti kontrolám. Potkani na léčbě ACEi a ARNi měli ve srovnání s neléčenými FHH potkany s AKP signifikantně vyšší hodnoty dP/dt min, jak je znázorněno na obrázku 15 B. Pozorovali jsme značné zvýšení end-diastolického tlaku v levé komoře u neléčených AKP potkanů oproti kontrolním FHH potkanům ($4,9 \pm 1,6$ mmHg vs. $19,4 \pm 6,7$ mmHg, $P < 0,001$). Všechny léčebné protokoly signifikantně snížily tlak v levé komoře na konci diastoly (ACEi: $11,2 \pm 2,4$ mmHg; AT₁B: $12,5 \pm 2,1$ mmHg; ARNi: $12,4 \pm 1,9$ mmHg; všechny $P < 0,001$), jak je znázorněno na obrázku 15 C. Časová

Obr. 15 Maximální rychlost vzestupu tlaku v levé komoře (dP/dt max) (A), maximální rychlost poklesu tlaku v levé komoře (dP/dt min) (B), end-diastolický tlak v levé komoře (C) a časová konstanta relaxace Tau (D) u kontrolních FHL potkanů (FHL KON), kontrolních FHH potkanů (FHH KON), FHH potkanů s AKP bez léčby (NEL), FHH potkanů s AKP léčených ACE inhibítorem (ACEi), FHH potkanů s AKP léčených AT₁ blokátorem (AT₁B) a FHH potkanů s AKP léčených kombinovaným AT₁B a inhibítorem neprilysinu (ARNi) 16 týdnů po zdánlivé/AKP operaci.



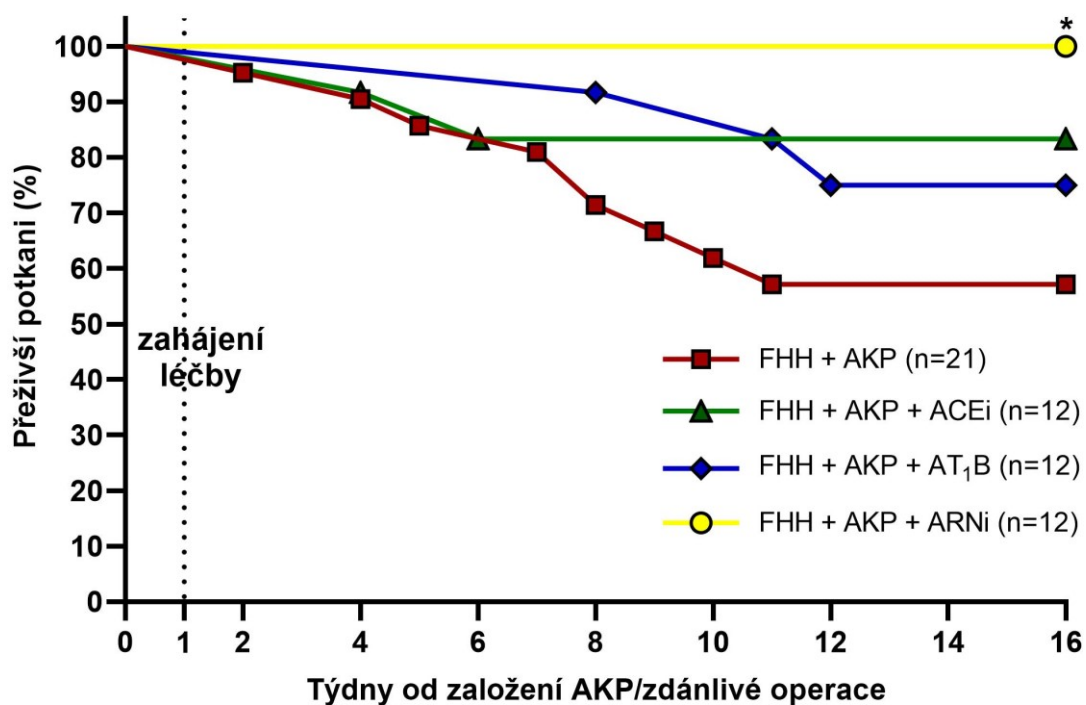
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka. V každé skupině bylo n = 9-12.

$P < 0,05$ versus FHL kontroly * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

konstanta relaxace Tau byla signifikantně vyšší u neléčených FHH potkanů s AKP oproti kontrolním potkanům. Potkani na všech léčebných protokolech měli opět obdobně signifikantně zlepšené Tau oproti neléčeným FHH potkanům s AKP.

Procento přeživších potkanů sledovaných do 16. týdne po AKP/zdánlivé operaci je znázorněno na obrázku 16. Na konci experimentu měli kontrolní FHH i FHL potkani stoprocentní přežití (n=10 u obou skupin). V 16. týdnu po operaci žilo pouze 57 % neléčených FHH potkanů s AKP (vstupní n=21). Léčba ACEi zlepšila přežívání na 83 % (vstupní n=12), zatímco léčba pomocí AT₁ blokátoru zlepšila přežívání na 75 % (vstupní

Obr. 16 Procento přeživších FHH potkanů s AKP bez léčby, FHH potkanů s AKP léčených ACE inhibítorem (ACEi), FHH potkanů s AKP léčených AT₁ blokátorem (AT₁B) a FHH potkanů s AKP léčených kombinovaným AT₁B a inhibítorem neprilysinu (ARNi) ve sledování do 16 týdne po zdánlivé/AKP operaci (u kontrolních FHL a FHH potkanů bylo přeživších 100 % v 16. týdnu – nevyznačeno v grafu pro přehlednost).

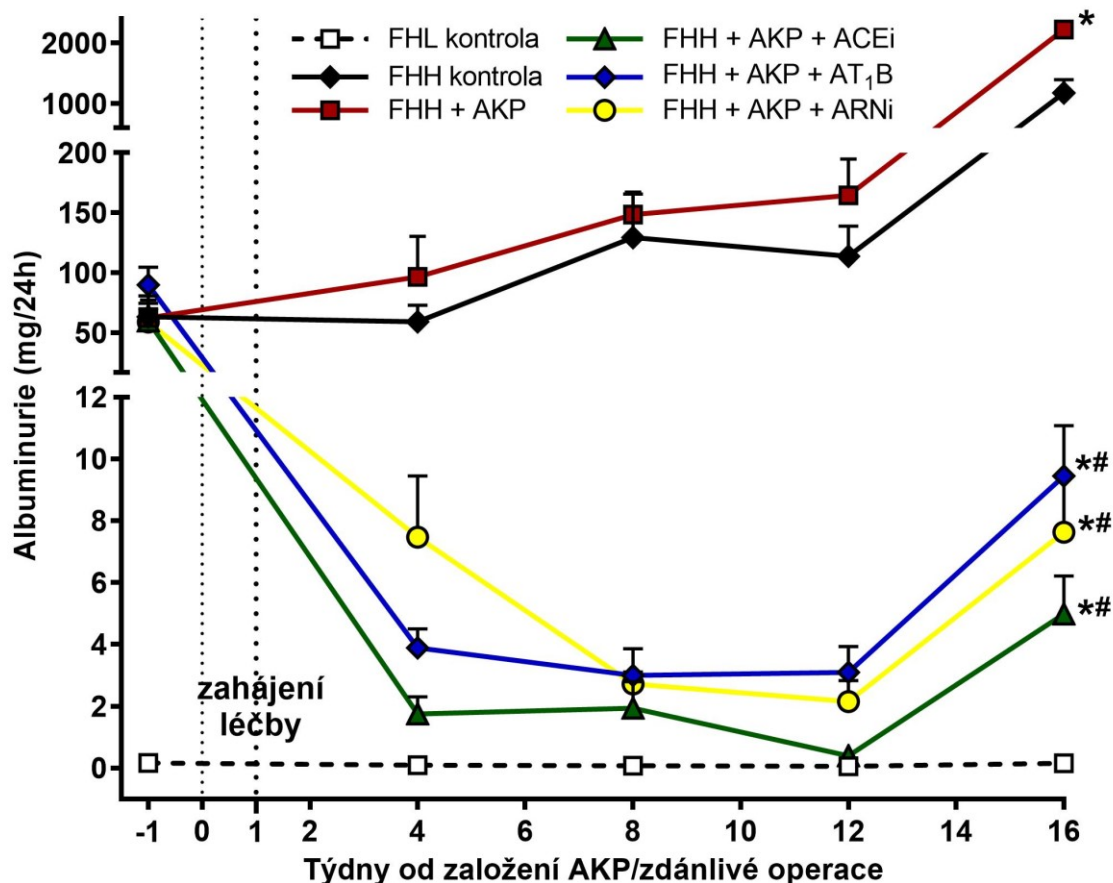


* $P < 0,05$ versus FHH + AKP bez léčby

n=12), pozorované změny však nedosáhly statistické signifikance. Pouze FHH potkani s AKP na léčbě ARNi měli signifikantně zlepšené přežívání na 100 % (vstupní n=12).

Na obrázku 17 je znázorněna albuminurie za 24 hodin měřená v týdnech -1, 4, 8, 12 a 16 po zdánlivé/AKP operaci. Kontrolní FHL potkani měli prakticky neměnné minimální albuminurie po celou dobu sledování. Oproti tomu kontrolní FHH potkani měli postupně signifikantně zhoršující se albuminurie (1 týden před operací: 63 ± 42 mg/24 h; v týdnu 16 po AKP/zdánlivé operaci: 1177 ± 662 mg/24 h, $P < 0,001$). Neléčení FHH potkani s AKP měli obdobně postupně signifikantně zhoršující se albuminurie (v týdnu -1: 62 ± 36 mg/24 h; v týdnu 16: 2222 ± 340 mg/24 h, $P < 0,001$). V týdnu 16 po zdánlivé/AKP operaci měli neléčení potkani s AKP signifikantně větší albuminurii oproti kontrolním FHH potkanům. Všechny léčebné protokoly vedly k signifikantnímu poklesu albuminurie oproti FHH potkanům s AKP v 16. týdnu po operaci (ACEi: $4,9 \pm 3,8$ mg/24 h; AT₁ blokátor: $9,4 \pm 4,9$ mg/24 h, ARNi: $7,6 \pm 5,7$ mg/24 h, všechny $P < 0,001$). Mezi jednotlivými léčbami nebyl pozorován statisticky významný rozdíl.

Obr. 17 Albuminurie za 24 hodin u kontrolních FHL a FHH potkanů, FHH potkanů s AKP bez léčby, FHH potkanů s AKP léčených ACE inhibítorem (ACEi), FHH potkanů s AKP léčených AT₁ blokátorem (AT₁B) a FHH potkanů s AKP léčených kombinovaným AT₁B a inhibítorem neprilysinu (ARNi) ve sledování do 16 týdne po zdánlivé/AKP operaci.

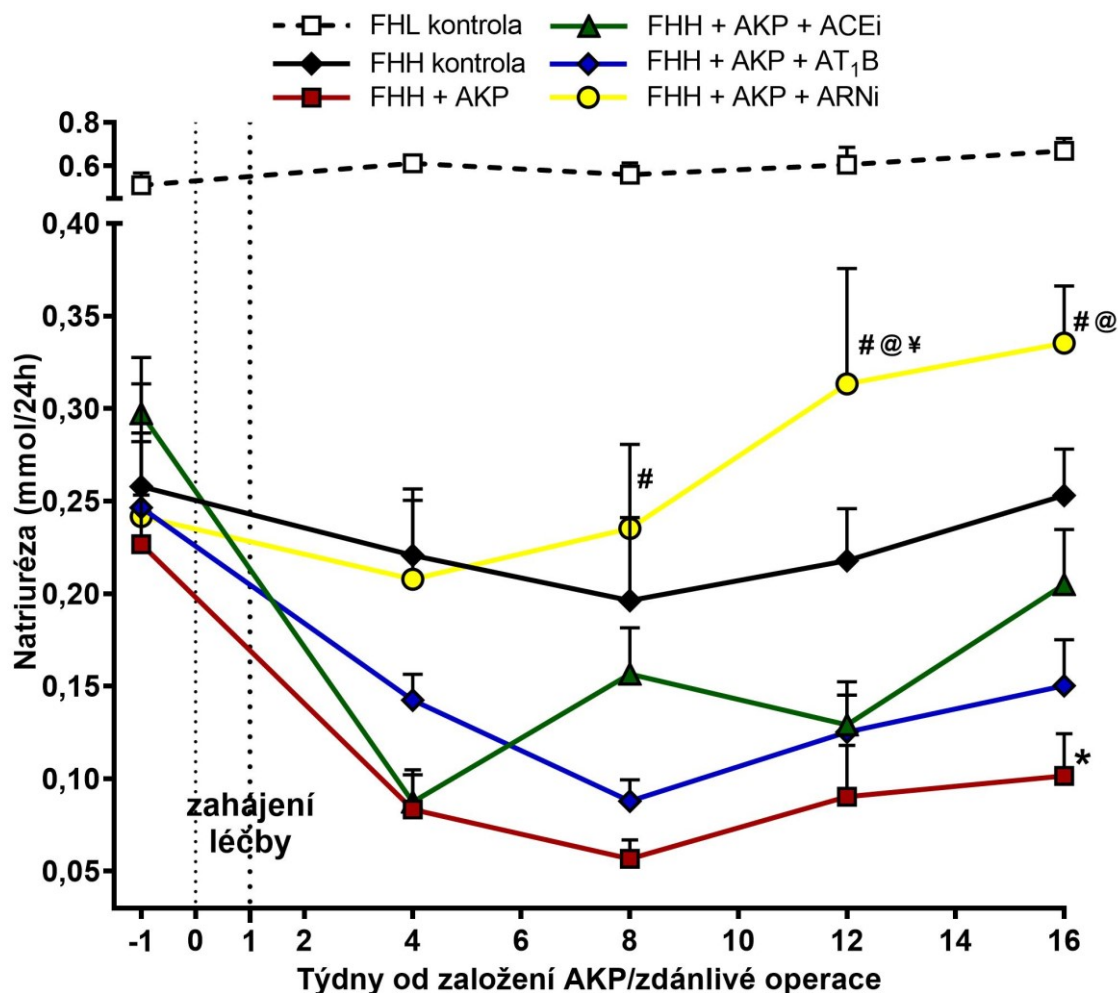


Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka průměru

* $P < 0,05$ versus FHH kontroly # $P < 0,05$ versus FHH + AKP bez léčby

Na obrázku 18 je znázorněna natriuréza za 24 hodin měřená v týdnech -1, 4, 8, 12 a 16 po zdánlivé/AKP operaci. Oproti kontrolním FHL potkanům měly všechny skupiny s FHH potkany signifikantně nižší natriurézu. Neléčení FHH potkani s AKP měli oproti kontrolním FHH potkanům signifikantně nižší vylučování sodíku za 24 hodin v 16. týdnu po operaci ($0,253 \pm 0,075$ mmol/24 h vs. $0,101 \pm 0,065$ mmol/24 h, $P < 0,05$). FHH potkani s AKP na léčbě ARNi měli signifikantně vyšší natriurézu oproti neléčeným FHH potkanům s AKP v 8., 12. a 16. týdnu po založení AKP (v 16. týdnu $0,335 \pm 0,088$ mmol/24 h, $P < 0,001$). Zároveň měli potkani léčení ARNi signifikantně vyšší natriurézu než potkani léčení AT₁ blokátorem v 12. a 16. týdnu a než potkani léčení ACE inhibítorem v 12. týdnu po operaci.

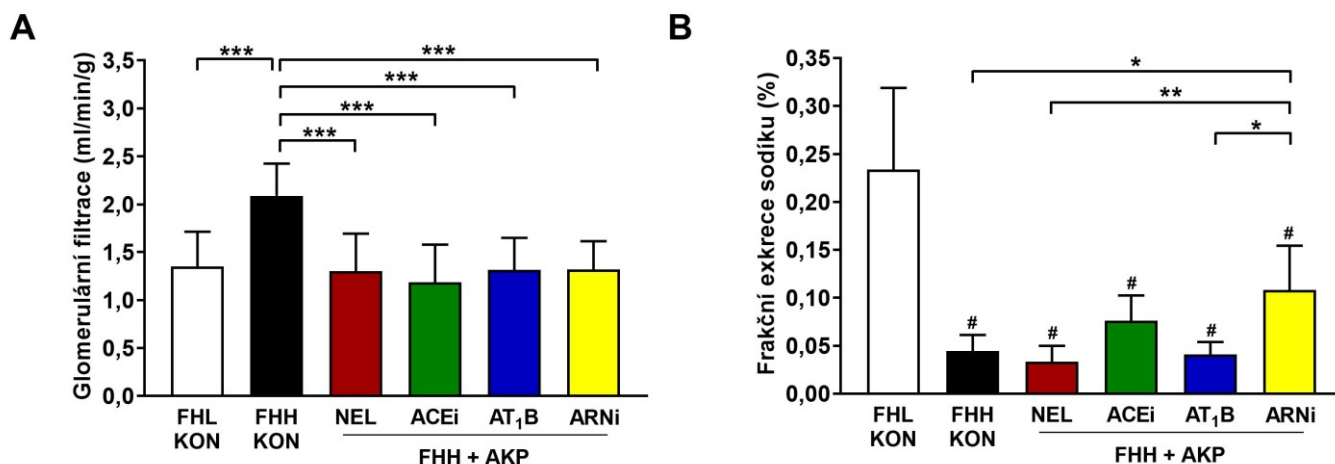
Obr. 18 Natriuréza za 24 hodin u kontrolních FHL a FHH potkanů, FHH potkanů s AKP bez léčby, FHH potkanů s AKP léčených ACE inhibítorem (ACEi), FHH potkanů s AKP léčených AT₁ blokátorem (AT₁B) a FHH potkanů s AKP léčených kombinovaným AT₁B a inhibítorem neprilysinu (ARNi) ve sledování do 16 týdnů po zdánlivé/AKP operaci.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka průměru. # $P < 0,05$ versus FHH + AKP bez léčby; ¥ $P < 0,05$ versus FHH potkani s AKP léčení ACEi; @ $P < 0,05$ versus FHH potkani s AKP léčení AT₁B

Glomerulární filtrace měřená pomocí clearance endogenního kreatininu je prezentována na obrázku 19 A. Kontrolní hypertenzní FHH potkani měli oproti kontrolním FHL potkanům signifikantně vyšší GFR. Založení AKP u FHH potkanů vedlo k signifikantnímu snížení GFR, na obdobné hodnoty jako měli kontrolní FHL potkani. Ani jeden z léčebných přístupů dále hodnotu GFR u FHH potkanů s AKP neovlivnil. Frakční exkrece sodíku (FENa) u zvířat 16 týdnů po operaci je shrnuta na obrázku 19 B. Oproti kontrolním FHL potkanům měli kontrolní FHH potkani signifikantně menší FENa. FHH

Obr. 19 Glomerulární filtrace (A) a frakční exkrece sodíku (B) u kontrolních FHL potkanů (FHL KON), kontrolních FHH potkanů (FHH KON), FHH potkanů s AKP bez léčby (NEL), FHH potkanů s AKP léčených ACE inhibítorem (ACEi), FHH potkanů s AKP léčených AT₁ blokátorem (AT₁B) a FHH potkanů s AKP léčených kombinovaným AT₁B a inhibítorem neprilysinu (ARNi) 16 týdnů po zdánlivé/AKP operaci.



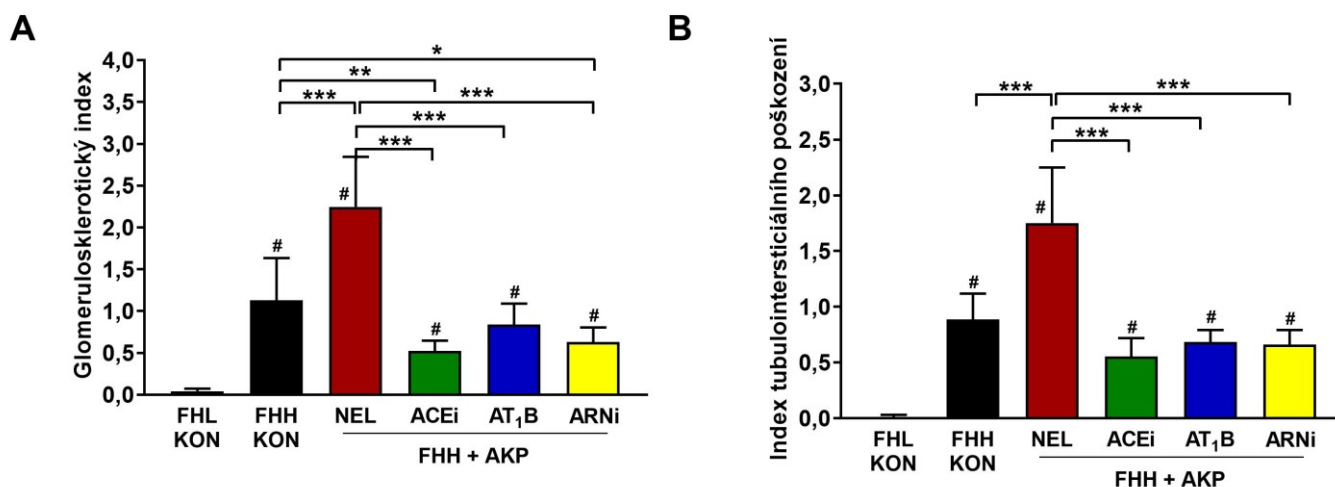
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka. V každé skupině bylo n = 9-12.

$P < 0,05$ versus FHL kontroly * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

potkani s AKP bez léčby měli nevýznamně nižší FENa oproti kontrolním FHH potkanům.

Léčba pomocí ARNi jako jediná vedla u FHH potkanů s AKP k signifikantnímu zvýšení

Obr. 20 Glomerulosklerotický index (A) a index tubulointerstiálního poškození (B) u kontrolních FHL potkanů (FHL KON), kontrolních FHH potkanů (FHH KON), FHH potkanů s AKP bez léčby (NEL), FHH potkanů s AKP léčených ACE inhibítorem (ACEi), FHH potkanů s AKP léčených AT₁ blokátorem (AT₁B) a FHH potkanů s AKP léčených kombinovaným AT₁B a inhibítorem neprilysinu (ARNi) 16 týdnů po zdánlivé/AKP operaci.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka. V každé skupině bylo n = 9-12.

$P < 0,05$ versus FHL kontroly * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

frakční exkrece sodíku v porovnání s kontrolními FHH potkany, neléčenými FHH potkany s AKP i FHH AKP potkany na léčbě samotným AT₁ blokátorem.

Glomerulosklerotické indexy a indexy tubulointersticiálního poškození jsou prezentovány na obrázku 20. V porovnání s kontrolními FHL potkany vykazovali kontrolní FHH potkani signifikantně větší sklerózu glomerulů a poškození intersticia. FHH potkani s AKP pak měli oproti kontrolním FHH potkanům významně vyšší GSI i index tubulointersticiálního poškození. Všechny léčebné protokoly v obdobné míře chránily před rozvinutím glomerulosklerózy i tubulointersticiálního poškození u FHH potkanů s AKP.

5. Diskuze

V rámci studia možností ovlivnění renální dysfunkce u modelu srdečního selhání navozeném pomocí AKP jsme využili ke zvýraznění patofyziologických procesů dva kmeny potkanů. Jednak to byli TGR potkani s ANG II-dependentní hypertenzí a za druhé to byli FHH potkani vyznačující se hypertenzí a progresivním zhoršováním renálních funkcí. Prvním cílem práce bylo porovnat vliv ACE inhibitoru a AT₁ blokátoru na ledvinné funkce u HanSD a TGR potkanů s AKP. V druhé části pak byl srovnáván kombinovaný blokátor AT₁ receptoru a inhibitor neprilysinu oproti samotnému AT₁ blokátoru a ACE inhibitoru u FHH potkanů s AKP.

5.1. Léčba blokátorem AT₁ receptoru na rozdíl od ACEi zlepšuje ledvinnou hypoperfuzi u potkanů s AKP

U normotenzních HanSD i hypertenzních TGR potkanů jsme pozorovali po založení AKP a následném objemovém přetížení srdce po dobu 20 týdnů pokles v ejekční frakci levé komory (průměrná hodnota neléčených HanSD potkanů byla 55 %, u TGR potkanů pak 54 %). Z hlediska ejekční frakce levé komory bychom proto mohli model srdečního selhání při AKP zařadit na hranici mezi srdečním selháním se zachovalou ejekční frakcí a s ejekční frakcí ve středním pásmu. U neléčených potkanů obou kmenů s AKP jsme pozorovali významné snížení průtoku krve ledvinou i GFR, což je ve shodě s předchozími pracemi (Abassi *et al.* 1997, 2011). Zatímco u potkanů léčených 15 týdnů ACE inhibitorem trandolaprilem došlo k signifikantnímu zlepšení ejekční frakce, na průtok krve ledvinou neměla léčba vliv. Naproti tomu podávání AT₁ blokátoru losartanu vedlo k signifikantnímu zlepšení jak srdečních funkcí, tak renální hemodynamiky, jak je patrné z obrázku 9. Již dříve bylo popsáno zapojení AT₁ receptoru do regulace průtoku krve ledvinou u srdečního selhání při AKP. Bylo prokázáno, že u tohoto modelu srdečního selhání hraje RAS důležitou úlohu ve snížení PKL a že je možné snížení PKL zvrátit zablokováním AT₁ receptoru (Abassi *et al.* 1997; Sergey *et al.* 1998). Na druhé straně studie, v nichž byl použit ACE inhibitor k potlačení nadměrně aktivovaného RAS, neprokázaly vliv na zlepšení PKL (Kala *et al.* 2018; Oka *et al.* 1993b). V souladu s našimi pozorováními jsou výsledky, které jasně ukazují, že pouze přímé intravenózní podávání losartanu, narozdíl od ACE inhibitoru captoprilu, vede v akutních podmínkách ke zvýšení průtoku krve ledvinou u potkanů s AKP (Duggan & Tabrizchi 2016). V kontrastu s námi pozorovanou neschopností ACE inhibitoru při podávání po dobu 15 týdnů ovlivnit PKL, je

však studie, kde 5týdenní léčba ACE inhibítorem vedla u potkanů s AKP ke zlepšení PKL (Červenka *et al.* 2015). Zdá se proto, že s progredujícím srdečním selháním klesá schopnost ACE inhibítora efektivně blokovat RAS.

Průtok krve ledvinami za fyziologických podmínek dosahuje zhruba 20 % z celkového srdečního výdeje. I přes takto vysoké zásobení ledvin krví, mohou naměřené tlaky O₂ klesat až k 5 mmHg ve dřeni ledvin a v kůře ledvin až k 50 mmHg, a to zejména kvůli vysoké spotřebě kyslíku v ledvinách spojené s vysokou transportní aktivitou v průběhu nefronu. Proto je renální parenchym, a to zejména dřeň ledvin, vysoce náchylný k hypoxii (Haase 2013; Liu *et al.* 2017). V naší práci jsme prokázali, že potkani s AKP bez léčby stejně jako léčení ACE inhibítorem mají významnou renální hypoperfuzi. U neléčených potkanů s AKP byla navíc redukce PKL doprovázená snížením glomerulární filtrace, zatímco u potkanů léčených ACEi zůstala GFR nezměněná. Následkem nepoměru mezi vysokou spotřebou kyslíku v tubulech upravujících normální objemy primární moči a sníženým přísunem O₂ při výrazné redukci průtoku krve ledvinou vzniká u těchto potkanů hypoxie v ledvině. K potvrzení naší hypotézy jsme změřili aktivitu LDH v ledvině jako marker renální hypoxie, která byla vskutku signifikantně vyšší u neléčených potkanů s AKP stejně jako u těch léčených ACE inhibítorem (Obr. 12 D). To je zejména důležité, protože chronická hypoxie vede k tubulointersticiálnímu poškození a podílí se na postupném úbytku renálních funkcí v průběhu času (Haase 2013; Liu *et al.* 2017; Norman & Fine 2006). Jelikož u AKP potkanů léčených AT₁ blokátorem nedochází k renální hypoperfuzi a tím i k hypoxii, je možné lépe zabránit ztrátě ledvinných funkcí. I když jsme v této části práce přímo nevyhodnocovali histologii ledvin, bylo dříve prokázáno, že založení AKP u potkanů predisponuje k poškození zevní zóny dřene ledvin (Goldfarb *et al.* 2001).

Jak normotenzní HanSD potkani, tak hypertenzní TGR potkani s geneticky zvýšenou aktivitou RAS měli po založení AKP signifikantně zvýšené hladiny ANG II v ledvině. Po zablokování AT₁ receptoru jsme pozorovali výrazné snížení množství ANG II v ledvině, což naznačuje, že větší část ANG II se do ledviny dostává díky AT₁ receptorem zprostředkované internalizaci ANG II. Na druhou stranu nezanedbatelné množství ANG II je v ledvině produkováno lokálně, což zdůrazňuje důležitost intrarenálního RAS (Navar 2014). V naší práci jsme dále pozorovali, že AKP potkani léčení ACE inhibítorem měli podobné hladiny ANG II v ledvině jako potkani na léčbě AT₁ blokátorem. To naznačuje, že u potkanů s AKP může docházet k tzv. „ACE escape“ fenoménu (Ma *et al.* 2010). Nedostatečně inhibovaný intrarenální RAS u potkanů s AKP na léčbě ACE inhibítorem by

pak vysvětloval neschopnost ACE inhibitoru signifikantně zlepšit průtok krve ledvinou u těchto potkanů. K posouzení úrovně blokády přeměny ANG I na ANG II při ACE inhibici jsme použili poměr ANG I/ANG II v plazmě a ledvině. Jak je patrné z obrázků 11 C a 12 C, ACE inhibitor výrazně méně (přibližně 10x) ovlivnil poměr ANG I/ANG II v ledvině než v plazmě. Takže zatímco v plazmě byla přeměna ANG I na ANG II dostatečně inhibována, v ledvině zůstala schopnost produkce ANG II alespoň částečně zachována. Další faktor, který se mohl podílet na renální hypoperfuzi kromě zvýšené aktivity intrarenálního RAS u AKP potkanů léčených ACE inhibitorem, byla zvýšená odpověď renálních cév na ANG II (Obr. 10 A a B).

Angiotenzin 1-7 jako hlavní efektor alternativního ramena RAS kaskády je také zapojený do regulace renálních funkcí a mimo své organoprotektivní a další vlastnosti navozuje vazodilataci v cévách ledvin a tedy zvyšuje průtok krve ledvinou (Becari *et al.* 2011; Santos *et al.* 2017). V naší práci jsme naměřili vysoké plazmatické koncentrace ANG II u potkanů s AKP léčených AT₁ blokátorem. Bylo by tedy logické předpokládat, že u těchto potkanů bude docházet ke zvýšené přeměně vysokých koncentrací ANG II skrze ACE2 na angiotenzin 1-7 a ten pak navodí námi pozorované zvýšení průtoku krve ledvinou. Tuto hypotézu podporuje fakt, že dříve byly dokumentovány zvýšené exprese ACE2 v ledvinách potkanů s AKP (Cohen-Segev *et al.* 2014). V naší studii jsme však u žádné ze skupin neměřili renální koncentrace angiotenzinu 1-7 vyšší, než je detekční limit vysoce senzitivní metody kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Nezdá se proto, že by námi pozorovaný vzestup průtoku krve ledvinou u AKP potkanů léčených AT₁ blokátorem byl angiotenzin 1-7 dependentní, případně angiotenzin 1-7 hraje pouze malou úlohu ve vzestupu PKL u těchto potkanů.

U potkanů s AKP většinou dochází ke zhoršení GFR, tak jak bylo pozorováno námi (Obr. 9 B) a i dokumentováno v dřívějších pracích (Abassi *et al.* 2011). Mechanismus snížení GFR u potkanů s AKP však zatím není přesně objasněn a nabízí se několik možností. Za prvé, obdobně jako je tomu v případě poklesu PKL, musíme zvážit vliv nadměrné aktivity RAS na GFR u potkanů s AKP. ANG II jako nejdůležitější peptid RAS kaskády má schopnost kontrahovat jak aferentní, tak eferentní arterioli v ledvinách skrze AT₁ receptor. Avšak aferentní arteriola je za fyziologických podmínek uchráněna před ANG II navozenou vazokonstrikcí díky kontraregulačním mechanismům, a to zejména díky NO systému. Neschopnost NO systému kompenzovat vazokonstrikci navozenou excesivní aktivací RAS u potkanů s AKP byla již dříve popsána (Abassi *et al.* 1997, 1998). Je proto důvodné se domnívat, že u potkanů s AKP dochází díky ANG II k vazokonstrikci

na aferentní i eferentní arteriole glomerulů ledvin, což vede k poklesu PKL, asociovanému s nárůstem renální vaskulární rezistence a s poklesem GFR. Další možný mechanismus poklesu GFR u potkanů s AKP by mohl být vzestup tlaku v renální vėně. Vysoký tlak v renálních vėnách u zvířat s AKP byl již dříve popsán jak v akutních, tak v chronických podmínkách (Hilton *et al.* 1955; Wu *et al.* 2016). Dřívější práce ukázala, že při zvýšení tlaku v renální vėně dochází k poklesu GFR a to při zachování průtoku krve ledvinou (Fiksen-Olsen *et al.* 1992). Autoři v ní argumentují, že jakmile dojde k elevaci tlaku v renální vėně, následné zvýšení tlaku v intersticiu ledvin komprimuje renální tubuly což vede ke zvýšení tlaku v renálních tubulech a následnému poklesu GFR při snížení rozdílu hydrostatických tlaků na glomerulární membráně. Navíc při elevaci tlaku v renální vėně dochází ke zvýšené produkci reninu v ledvině a tudíž i k aktivaci intrarenálního RAS (Kishimoto *et al.* 1973). Nejspíše tedy dochází k poklesu GFR kombinací výše uvedených mechanismů u potkanů s AKP, jelikož u neléčených HanSD i TGR potkanů s AKP jsme pozorovali zvýšení tlaku v renální vėně, zvýšení koncentrací ANG II v ledvině a pokles v GFR. Pokud jsme inhibovali RAS u těchto potkanů, ať už ACE inhibítorem nebo AT₁ blokátorem, došlo u nich k výraznému poklesu tlaku v renální vėně a zlepšení GFR.

Výrazně snížená dostupnost NO v ledvině i přes zvýšené exprese renální eNOS byla v dřívějších pracích uváděna jako důvod pro snížení PKL u potkanů s AKP (Abassi *et al.* 1997, 1998). Navíc byl tento proces závislý na ANG II působením přes AT₁ receptor, jelikož po zablokování AT₁ receptoru došlo u potkanů s AKP ke zlepšení PKL. V naší práci jsme potvrdili, že potkani s AKP mají zvýšené exprese eNOS v ledvině, a to zejména potkani bez léčby a potkani léčení ACE inhibítorem (Obr. 13 D). V našem experimentu byla také potvrzena nižší dostupnost NO, jelikož neléčení AKP potkani a potkani s AKP na léčbě ACEi měli nižší vylučování NO_x do moči. Naopak u potkanů s AKP léčených AT₁ blokátorem došlo k výraznému zlepšení dostupnosti NO (Obr. 13 C). To jasně prokazuje, že dostupnost NO v ledvině se významně podílí na regulaci renální hemodynamiky u potkanů s AKP. Neschopnost tvořit dostatečné množství NO u potkanů s AKP pak vede ke kompenzatorní nadměrné expresi eNOS. Navíc jsme pozorovali, že acetylcholin, na endotelu závislý vazodilatátor, vyvolal menší vzestupy PKL u neléčených potkanů s AKP než u kontrolních potkanů. Naopak v kontrastu s tím měli AKP potkani na léčbě ACEi po podání acetylcholinu vyšší odpovědi v průtoku PKL (Obr. 10 E a F). To značí, že endotel renálních cív je plně schopný vazodilatace u AKP potkanů na léčbě ACEi. Navzdory tomu ale u těchto potkanů nedochází ke vzestupu PKL. Snížená produkce NO může mít celou řadu příčin včetně tvorby ANG II a ROS v ledvině. Oba tyto mechanismy mohou hrát roli

ve snížené produkci NO u potkanů s AKP. Jednak, jak bylo diskutováno výše, renální koncentrace ANG II byly zvýšené u neléčených potkanů s AKP a léčba ACE inhibitorem nedostatečně zablokovala intrarenální produkci ANG II, a tudíž i jeho působení v ledvině. Za druhé jsme pozorovali, že neléčení potkani s AKP a potkani léčení ACE inhibitorem měli zvýšené množství produktů oxidativního stresu v ledvině, jak je vidět na obrázku 13 A a B. Zvýšený oxidativní stres v ledvině pak vede k renální vazokonstrikci, zvýšené reaktivitě na ANG II, bioinaktivaci NO a k zvýšené aktivitě SNS v ledvině (Araujo & Wilcox 2014; Carlström *et al.* 2015).

V regulaci renální hemodynamiky hraje důležitou úlohu také sympatický nervový systém. Zvýšená aktivita renálního SNS vede jednak k arteriolární vazokonstrikci a za druhé k produkci reninu a tím ke zvýšení aktivity RAS. Ve shodě s předchozími pozorováními jsme naměřili signifikantně vyšší plazmatické koncentrace noradrenalinu u neléčených potkanů s AKP (Abassi *et al.* 2011). Navíc jsme pozorovali u AKP potkanů léčených ACE inhibitorem významně zvýšenou reaktivitu renálních cév na intravenózní bolusy noradrenalinu. V porovnání s tím jsme viděli u potkanů léčených AT₁ blokátorem sníženou aktivitu renálního SNS. Neschopnost dostatečné vazodilatace u AKP potkanů vykazujících renální hypoperfuzi tak může být i výsledkem vzájemného propojení RAS a SNS. Tato hypotéza je navíc podpořena faktem, že inhibice renálního SNS pomocí denervace ledvin vede ke zlepšení nadměrné aktivace RAS u zvířecího modelu srdečního selhání (Sharp *et al.* 2018). U TGR potkanů s AKP vedla renální denervace navíc ke zlepšenému přežívání, avšak vzestup PKL u těchto potkanů pozorován nebyl (Honetschlagerová *et al.* 2021a).

Na základě našich výsledků a s ohledem na výše zmíněné se domníváme, že u potkanů s AKP dochází ke zlepšení renální hemodynamiky díky následujícím faktorům, respektive interakcemi mezi nimi. Za prvé zvýšené hladiny renálního ANG II u neléčených AKP potkanů vedou k vazokonstrikci v ledvinách, zvýšené produkci ROS a snížené tvorbě NO. Obdobně je tomu u potkanů s AKP léčených ACE inhibitorem, kde nedostatečně utlumená tvorba ANG II v kombinaci se zvýšenou citlivostí renálních cév na ANG II nebyla schopna zlepšit renální hemodynamiku. A zdá se, že pouze zablokováním AT₁ receptoru je možné efektivně utlumit intrarenální RAS a potlačit tak tyto negativní důsledky působení ANG II na renální hemodynamiku. Za druhé, hypoxie v ledvině dále stimuluje produkci ROS (Honda *et al.* 2019), což vede k bioinaktivaci NO a další vazokonstrikci v ledvině. A za třetí, zvýšená aktivita SNS, obzvláště u AKP potkanů léčených ACE inhibitorem, podporuje aktivaci RAS a podílí se na renální vazokonstrikci.

V souhrnu se dá říct, že blokáda AT₁ receptoru je účinnější než inhibice ACE ve zlepšení renální hemodynamiky u potkanů s AKP, zejména za podmínek zvýšené RAS aktivity u TGR potkanů.

Na základě našich dat z vah srdcí a tloušťky stěn srdce získaných echokardiografií u potkanů s AKP, se na druhou stranu zdá, že AT₁ blokátory nezlepšují excentrickou srdeční hypertrofii tak efektivně jako ACE inhibitory. Což je v kontrastu s tím, že AT₁ blokátory naopak zlepšovaly renální hypoperfuzi u potkanů s AKP na rozdíl od ACE inhibitorů. Klinické studie na pacientech se srdečním selháním, které porovnávaly účinek ACE inhibitorů a AT₁ blokátorů, neukázaly signifikantní rozdíl v mortalitě pacientů léčených oběma skupinami léků. V některých studiích se ukazovaly ACE inhibitory jako účinnější ve zlepšení kardiálních funkcí, zatímco v jiných AT₁ blokátory více snižovaly u pacientů s CHSS počet hospitalizací pro dekompenzaci srdečního selhání (Dell'Italia 2011; Dézsi 2014; Tai *et al.* 2017). Na základě námi prezentovaných výsledků jsme toho názoru, že zatímco AT₁ blokátory jsou účinnější ve zlepšení renální dysfunkce u srdečního selhání, tak ACE inhibitory dokáží lépe předcházet srdeční hypertrofii plynoucí z AKP. Tyto závěry však vyžadují další studie, které by jasně objasnily rozdílné protektivní mechanismy obou skupin léků. Vysvětlovalo by to však fakt, že jsme nepozorovali rozdílnou úmrtnost u potkanů s AKP léčených ACE inhibitorem nebo AT₁ blokátorem. Naše výsledky by také mohly znovuotevřít otázku potenciálního benefitu z kombinované léčby pomocí ACE inhibitoru a AT₁ blokátoru u pacientů se srdečním selháním. Na druhou stranu je třeba zmínit, že velká klinická studie, která hodnotila kombinovanou léčbu ACE inhibitorem spolu s AT₁ blokátorem u pacientů s vysokým rizikem pro srdeční příhody prokázala signifikantně vyšší četnost nežádoucích účinků včetně hypotenze, synkopy, renální dysfunkce a hyperkalémie u kombinované léčby než u monoterapie kterýmkoli z preparátů. (Yusuf *et al.* 2008). Obdobně ukázala metaanalýza čtyř studií na pacientech s levostrannou srdeční nedostatečností zvýšené procento nežádoucích účinků u pacientů na kombinované léčbě ACE inhibitorem a AT₁ blokátorem (Phillips *et al.* 2007). I když některé dřívější studie ukázaly nižší úmrtnost a lepší výsledky u pacientů se srdečním selháním na kombinované léčbě než u monoterapie (Dimopoulos *et al.* 2004), v současné klinické praxi není kombinovaná léčba pomocí ACE inhibitoru a AT₁ blokátoru doporučována (Holdiness *et al.* 2011). Nicméně vzhledem k heterogenitě pacientů se srdečním selháním se zachovalou ejekční frakcí jsme toho názoru, že určitá podskupina pacientů, u nichž dominuje zejména objemové přetížení (tj. například pacienti s chlopenními vadami, arteriovenózními fistulemi, těžkými anémiemi), by mohla

profitovat z kombinované léčby ACE inhibítorem a AT₁ blokátorem. K ověření této hypotézy budou ale potřeba další studie.

TGR potkani jsou spolehlivý model ANG II dependentní hypertenze, díky konstantní expresi vloženého myšího Ren-2 genu (Langheinrich *et al.* 1996). V porovnání s HanSD potkany u nich docházelo po založení AKP pozoruhodně dříve k dekompenzaci srdečního selhání, což vedlo nakonec i k dřívější smrti. Navíc byly změny pozorované u HanSD potkanů s AKP jako například zvýšená tvorba ROS, zvýšená aktivita renální LDH, snížená produkce NO v ledvině, v mnohem větší míře vyjádřeny u TGR potkanů s AKP. To podporuje náš závěr, že změny pozorované u modelu srdečního selhání založeném na AKP jsou alespoň částečně ANG II dependentní (Abassi *et al.* 1997). Na druhou stranu všichni spontánně hypertenzní potkani, představující na ANG II nezávislý model hypertenze, vykazovali již 2 týdny po založení AKP známky dekompenzace srdečního selhání, zatímco kontrolní normotenzní Wistar potkani tyto známky prakticky nevykazovali (Oka *et al.* 1993a). Je tedy možné, že vysoký tlak samotný, nehlédě na jeho příčinu, zhoršuje průběh srdečního selhání. Zajímavé je také naše zjištění, že u kontrolních a neléčených AKP TGR potkanů došlo k významnému snížení koncentrace ANG I v ledvině. Dohromady s vysokými hladinami renálního ANG II u těchto potkanů to může znamenat, že zde dochází k potlačení intrarenálního RAS díky negativní zpětné vazbě z aktivovaného systémového RAS. Druhou možností je, že zde dochází ke stimulaci intrarenálního RAS a zejména ke stimulaci renální ACE aktivity díky aktivitě komponent systémového RAS tak, jak již bylo popsáno u jiných chorobných stavů (Navar 2014). K zodpovězení této otázky by však byly potřeba další experimenty.

Limitací této části práce je skutečnost, že experimenty na potkanech byly prováděny v celkové anestezii, která může ovlivnit renální hemodynamiku. Možným řešením v budoucnu by tak byly dlouhodobé experimenty na bdělých potkanech za použití radiotelemetrických sond měřících tlak krve a průtok krve ledvinou. Další limitací naší práce je fakt, že jsme neměřili parametry pravé komory srdce. Vliv pravostranné srdeční nedostatečnosti na renální funkce byl již dříve popsán (Bansal *et al.* 2018). Budoucí studie by se tudíž měly zaměřit u tohoto modelu srdečního selhání na definování vlivu pravostranné srdeční nedostatečnosti na rozvoj renální dysfunkce.

5.2. Sakubitril/valsartan zlepšuje přežití potkanů s kardiorenálním syndromem oproti samotnému valsartanu i trandolaprilu díky vyššímu vylučování sodíku ledvinami

U hypertenzních FHH potkanů došlo po založení AKP obdobně jako u TGR potkanů k výraznému vzestupu mortality. Léčba ACE inhibítorem nebo samotným AT₁ blokátorem zlepšila přežití potkanů v obdobné míře, což potvrzuje naši domněnku, že ačkoliv nejspíše existují rozdíly v mechanismu protektivního účinku obou skupin léků, výsledný efekt na mortalitu je srovnatelný. Naše výsledky však zejména jasně ukazují, že pouze kombinovaná léčba pomocí ARNi signifikantně zlepšuje přežívání u FHH potkanů s AKP (Obr. 16). Dřívější práce ukázaly protektivní vliv ARNi na kardiální funkce u celé řady experimentálních modelů srdečního selhání včetně infarktu myokardu (Chang *et al.* 2019; Kompa *et al.* 2018; Masanobu *et al.* 2017; Suematsu *et al.* 2016; Trivedi *et al.* 2021), uremické kardiomyopatie (Suematsu *et al.* 2018), vysokoslané diety u Dahl sůlsenzitivních potkanů (Zhang *et al.* 2021) a insuficience aortální chlopně (Maslov *et al.* 2019). Při kombinovaném postižení ledvin jako je tomu u FHH potkanů a objemovém přetížení srdce pomocí AKP však experimentální data o účinnosti ARNi dosud chyběla. U pacientů se srdečním selháním s redukovanou ejekční frakcí byla kombinovaná léčba ARNi více účinná než samotná inhibice RAS inhibítorem ACE (Kario 2018). U pacientů s CHSS se zachovalou ejekční frakcí se však tento příznivý efekt nepotvrdil (Solomon *et al.* 2019). Avšak sekundární analýzou u podskupiny pacientů s CHSS se zachovalou ejekční frakcí a chronickou renální insuficiencí s GFR < 60 ml/min/1,73 m² se ukázal signifikantní protektivní efekt ARNi oproti samotnému AT₁ blokátoru valsartanu (Causland *et al.* 2020), což dobře koreluje s našimi výsledky.

Spolu se sníženou mortalitou jsme u FHH potkanů s AKP na léčbě ARNi pozorovali signifikantní zlepšení vylučování sodíku ledvinami, jak je patrné z obrázku 18. Předchozí studie ukázaly, že u potkanů s AKP dochází k zadržování sodíku a tudíž i vody ledvinami i přes násobně vyšší koncentrace cirkulujících natriuretických peptidů (Abassi *et al.* 1991). Glomeruly zvířat s AKP totiž vykazují výrazně utlumenou natriuretickou reakci na natriuretické peptidy (Hoffman *et al.* 1988; Norling *et al.* 1996; Reiser *et al.* 1992). Snížená reaktivita na natriuretické peptidy je u potkanů s AKP způsobena zejména nadměrnou aktivitou RAS, jelikož jeho inhibice ať už ACE inhibítorem nebo AT₁ blokátorem vede ke zlepšení schopnosti ledvin vylučovat sodík po podání ANP nebo po volumexpanzi (Abassi *et al.* 1990; Reiser *et al.* 1992). Vylučování sodíku u zvířat s experimentálním srdečním selháním také zvyšuje inhibice neprilysinu (Chen *et al.* 1999).

Kombinovaná léčba ACE inhibitorem a inhibitorem neprilysinu avšak nevedla k dalšímu zlepšení vylučování sodíku ledvinami u potkanů s AKP, nejspíše díky pozorovanému velkému snížení systémového tlaku krve a tudíž snížení tlakové natriurézy u kombinace těchto látek (Kirk & Wilkins 1996). Naopak v našem experimentu vedla kombinovaná léčba pomocí ARNi k výraznému zlepšení natriurézy u FHH potkanů s AKP, přičemž systémový tlak se u těchto potkanů signifikantně nelišil od potkanů léčených samotným AT₁ blokátorem nebo ACE inhibitorem. Schopnost ARNi navodit signifikantně vyšší natriurézu v porovnání s monoterapií AT₁ blokátorem byla popsána na experimentálních modelech ANG II dependentní i na ANG II nezávislé hypertenzi (Kusaka *et al.* 2015; Wegner *et al.* 1996).

Naše data u kontrolních FHH potkanů ukazují progresivní albuminurii, která je dána zejména glomerulární hyperfiltrací, spolu s glomerulosklerózou a poškozením tubulointersticia, což je v souladu s předchozími pracemi (Doleželová *et al.* 2016; Simons *et al.* 1993a, 1993b). Po založení AKP u těchto potkanů pak došlo k dalšímu významnému navýšení albuminurie, která dosáhla dvojnásobku hodnot pozorovaných u kontrolních FHH potkanů v 16. týdnu po operaci. V kontrastu s tím však došlo k „normalizaci“ GFR u AKP FHH potkanů na srovnatelnou úroveň pozorovanou u kontrolních normotenzních FHL potkanů, jak je patrné z obrázku 19. To by odpovídalo hypotéze, že glomerulární hyperfiltrace je u FHH potkanů dána kombinací vysokého systémového tlaku a poškozené autoregulace PKL, dané zejména dysfunkčním endotelem neschopným intrarenální produkce vazodilatačních faktorů jako je NO (Doleželová *et al.* 2016). Poklesem systémového tlaku u FHH potkanů po založení AKP díky přidání nízkoodporového řečiště vedoucí k poklesu systémové vaskulární rezistence, což je jev pozorovaný i v jiných modelech hypertenze (Červenka *et al.* 2015; Oka *et al.* 1993a), došlo k normalizaci glomerulární filtrace. Nicméně jak je vidět z našich dat, poškození ledvin u FHH potkanů s AKP dále progredovalo oproti kontrolním FHH potkanům. Všechny léčebné protokoly do podobné míry signifikantně zlepšily jak histologické parametry poškození ledvin, tak výrazně snížily albuminurii, a to až 200x v porovnání s neléčenými AKP FHH potkany (Obr. 17), přičemž GFR se ani u jedné ze skupin signifikantně nelišila. To je obzvláště důležitý poznatek, jelikož u FHH potkanů s AKP léčených ARNi by se dalo předpokládat, že zvýšené hladiny natriuretických peptidů při inhibici neprilysinu povedou k nárůstu GFR, což je jejich známý účinek (Volpe 2014), a následnému zvýšení albuminurie a glomeruloskleróze. Naše data ohledně ARNi jsou navíc v souladu s výsledky na modelu

chronického onemocnění ledvin navozeném pomocí 5/6 nefrektomie, kde byl prokázán vyšší renoprotektivní efekt ARNi oproti samotnému AT₁ blokátoru (Ushijima *et al.* 2017).

FHH potkani s AKP vykazovali oproti kontrolním FHH potkanům signifikantně zhoršené parametry systolické funkce levé srdeční komory (pokles ejekční frakce, dP/dt max) spolu s významným poškozením diastolické funkce levého srdce (narůst dP/dt min, Tau, end-diastolického tlaku). U FHH potkanů s AKP terapie ACE inhibitorem i ARNi do obdobné míry signifikantně zlepšila všechny měřené parametry systolické i diastolické srdeční funkce, na rozdíl od monoterapie AT₁ blokátorem, která signifikantně zlepšila pouze ejekční frakci, end-diastolický tlak a Tau. Naše výsledky jsou ve shodě s pozorováními na analogickém modelu srdečního selhání při objemovém přetížení srdce díky uměle navozené aortální insuficienci, kde kombinovaná léčba ARNi na rozdíl od terapie samotným AT₁ blokátorem signifikantně zlepšila všechny parametry systolické i diastolické srdeční funkce (Maslov *et al.* 2018). Pokud však byla léčba započata ihned po navození srdečního selhání u tohoto modelu, efekt ARNi na zlepšení relaxace levé srdeční komory se vytratil (Maslov *et al.* 2019). Signifikantně lepší kardioprotekce ARNi oproti léčbě samotným AT₁ blokátorem valsartanem byla potvrzena i na dalších modelech srdečního selhání (Trivedi *et al.* 2021; Zhang *et al.* 2021). Ačkoliv se v naší práci v srdečních funkcích FHH potkani s AKP léčení ACE inhibitorem a ARNi signifikantně nelišili, jak je vidět z obrázků 14 a 15, tak na modelu srdečního selhání na podkladě srdečního infarktu bylo ARNi signifikantně účinnější než ACE inhibice v prevenci srdeční remodelace a dysfunkce (Kompa *et al.* 2018). Tato diskrepance může být jednak dána rozdílem v užitém modelu srdečního selhání, za druhé i použitím jiného ACE inhibitoru, které se mezi sebou můžou lišit v účinnosti (Sun *et al.* 2016), protože použité dávky ARNi se v naší práci a práci publikované Kompem a spolupracovníky významně nelišily. V souhrnu se dá však konstatovat, že zatímco byl vliv všech léčebných přístupů na kardiální funkce u FHH potkanů s AKP obdobný, léčba ARNi jako jediná zřetelně zlepšila renální exkretční funkce.

Experimentální model kombinovaného poškození funkce srdce a ledvin, jako je tomu u FHH potkanů po založení AKP, dobře napodobuje klinickou situaci kardiorenálního syndromu u pacientů se srdečním selháním se zachovalou ejekční frakcí levé komory nebo s ejekční frakcí ve středním pásmu. Na modelu FHH potkana s AKP, avšak s rozdílem založení pístěle ve 12. týdnu života potkana (na rozdíl od 24. týdne v naší práci), byly dříve popsány renoprotektivní vlastnosti solubilní epoxid hydrolázy (Vacková *et al.* 2019). Naproti tomu snaha o zvrácení progresu průběhu srdečního selhání pomocí denervace

ledvin se u tohoto modelu ukázala jako neúčinná (Honetschlagerová *et al.* 2021b), ačkoliv dřívější studie jasně prokázaly protektivní vliv renální denervace na průběh srdečního selhání při experimentálně navozeném srdečním infarktu (Polhemus *et al.* 2017; Sharp *et al.* 2018). Díky heterogenitě příčin vzniku srdečního selhání v klinické praxi je proto při hledání nových terapeutických postupů potřeba pracovat s výhodami a limitacemi jednotlivých experimentálních modelů srdečního selhání a ověřit jejich účinnost na více modelech (Riehle & Bauersachs 2019).

Limitem této části práce je za první skutečnost, že nebyly provedeny experimenty detailně studující renální hemodynamiku včetně měření PKL, které by objasnilo vliv ARNi na kombinované poškození funkce ledvin a srdce. Za druhé, stejně jako u předchozí části, nebyly změřeny parametry funkce pravé komory, která pravděpodobně také hraje důležitou úlohu při progresi srdečního selhání u tohoto modelu. Dále je také možné, že delší doba sledování u léčených skupin by umožnila vidět další organoprotektivní efekt ARNi oproti ACE inhibitoru, tak jak byl pozorován v jiných studiích (Kompa *et al.* 2018).

6. Závěry práce

Výsledky této práce porovnávají vliv různých farmakologických přístupů na ovlivnění renálních funkcí u preklinického modelu CHSS navozeného pomocí aortokavální píštěle. Prezentované výsledky jsou zejména unikátní použitím tohoto modelu CHSS, který se klinicky blíží nejvíce srdečnímu selhání s ejekční frakcí ve středním pásmu, jednotce s dosud nedostatečně definovanými patofyziologickými mechanismy a z toho vyplývající absencí specifické farmakologické léčby. Dále jsou tyto výsledky jedinečné v délce rozvoje CHSS u potkanů a v dlouhém podávání farmak potkanům, což dobře odpovídá klinickému stavu. Doktorand v rámci svého Ph.D. studia prováděl veškeré části pokusů, od plánování se stanovením cílů práce, přes provádění a vyhodnocení všech *in vivo* pokusů, dále se podílel na laboratorním zpracování získaných vzorků a následné analýze, a konečně prováděl zhodnocení i statistické zpracování výsledků práce.

U normotenzních HanSD a zejména hypertenzních TGR potkanů s navozeným srdečním selháním pomocí AKP zlepšila léčba AT₁ blokátorem průtok krve ledvinou, na rozdíl od léčby ACE inhibítorem. GFR přitom byla u obou léčebných přístupů zachována. Díky zlepšení renální hypoperfuze vykazovali potkani léčení AT₁ blokátorem ústup hypoxie v ledvině. Zároveň vykazovali AKP potkani léčení AT₁ blokátorem nižší tvorbu ROS, zlepšenou dostupnost NO v ledvině a normální aktivitu SNS oproti potkanům léčených ACE inhibítorem. Zároveň však výsledky naznačují, že AT₁ blokátory nezlepšují excentrickou srdeční hypertrofii tak efektivně jako ACE inhibitory, jelikož některé parametry vah srdcí a tloušťky stěn srdce získaných echokardiografií u potkanů s AKP byly významně zlepšeny u potkanů léčených ACE inhibítorem, oproti potkanům léčených AT₁ blokátorem.

Hypertenzní FHH potkani s AKP s kombinovanou dysfunkcí srdce a ledvin vykazovali obdobné zlepšení kardiálních funkcí ve všech léčebných protokolech. Potkani s AKP měli při kombinované léčbě ARNi, na rozdíl od léčby samotným AT₁ blokátorem nebo ACE inhibítorem, signifikantně nižší úmrtnost oproti neléčeným potkanům. Obdobně byly u všech léčebných přístupů zlepšeny albuminurie a histologické parametry poškození ledvin. Pouze FHH potkani s AKP léčení ARNi vykazovali signifikantně vyšší vylučování sodíku ledvinami oproti neléčeným potkanům.

7. Souhrn

U HanSD i hypertenzních TGR potkanů s AKP jsme pozorovali jasné rozdíly v ovlivnění renálních funkcí různými přístupy blokady RAS. Léčba AT₁ blokátorem, na rozdíl od léčby ACE inhibítorem, zlepšila renální hypoperfuzi a zabránila tak hypoxii v ledvině. Prokázali jsme, že neschopnost ACE inhibítora zlepšit ledvinnou hypoperfuzi u potkanů s AKP je nejspíše důsledek nedostatečně utlumeného intrarenálního RAS spolu se zvýšenou aktivitou SNS při vyčerpané kapacitě kompenzatorních mechanismů, a to zejména NO.

Zároveň jsme prezentovali u hypertenzních FHH potkanů s AKP, představující experimentální formu kardiorenálního syndromu, že pouze kombinovaná léčba ARNi, v porovnání s léčbou samotným AT₁ blokátorem nebo ACE inhibítorem, signifikantně zlepšuje přežívání potkanů, a to zřejmě díky zlepšenému vylučování sodíku ledvinami.

Na základě prezentovaných dat lze souhrnně říci, že u modelu srdečního selhání na podkladě objemového přetížení při AKP léčba AT₁ blokátorem účinněji vede ke zlepšení renální hemodynamiky než léčba ACE inhibítorem. Zároveň jsme ukázali na experimentálním modelu kombinované dysfunkce srdce a ledvin, že kombinovaná terapie ARNi lépe předchází úmrtí než monoterapie AT₁ blokátorem nebo ACE inhibítorem a mohla by tak být účinnou léčebnou strategií pro pacienty s kardiorenálním syndromem.

8. Summary

We showed that there are important differences in impact of different RAS-inhibiting drugs on renal functions in normotensive HanSD as well as hypertensive TGR rats with high-output heart failure. An AT₁ receptor blocker administration, dissimilarly to an ACE inhibitor treatment, was shown to prevent renal hypoperfusion and hypoxia. The failure of ACE inhibition to ameliorate renal hypoperfusion in rats with heart failure may be a consequence of insufficiently suppressed intrarenal RAS along with enhanced renal SNS activity in the face of depleted compensatory mechanisms, namely NO.

Furthermore, our results show that in hypertensive FHH rats with aorto-caval fistula, an experimental model of a cardiorenal syndrome, only rats treated with ARNi displayed significantly improved survival compared to untreated rats, in contrast to an ACE inhibitor administration or treatment with AT₁ receptor blocker alone. Additionally, survival improvement was in ARNi-treated rats probably caused by a marked increase in natriuresis.

Based on the presented results, we conclude that an AT₁ receptor blocker treatment improves renal hemodynamics in an experimental model of high-output heart failure induced by placement of an aorto-caval fistula, unlike treatment with an ACE inhibitor. Moreover, we showed in an experimental model of combined heart and kidney dysfunction that ARNi administration leads to improved survival, unlike monotherapy with an AT₁ receptor blocker or an ACE inhibitor. Therefore, ARNi-based treatment could be an effective treatment in patients with cardiorenal syndrome.

Seznam použité literatury

- 1) **Abassi, Z.**, Burnett, J. C., Grushka, E., Hoffman, A., Haramati, A., & Winaver, J. (1991). Atrial natriuretic peptide and renal cGMP in rats with experimental heart failure. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 261(4), R858–R864.
- 2) **Abassi, Z.**, Goltsman, I., Karram, T., Winaver, J., & Hoffman, A. (2011). Aortocaval fistula in rat: a unique model of volume-overload congestive heart failure and cardiac hypertrophy. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 729497.
- 3) **Abassi, Z.**, Gurbanov, K., Rubinstein, I., Better, O. S., Hoffman, A., & Winaver, J. (1998). Regulation of intrarenal blood flow in experimental heart failure: role of endothelin and nitric oxide. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 274(4), F766–F774.
- 4) **Abassi, Z.**, Haramati, A., Hoffman, A., Burnett, J. C., & Winaver, J. (1990). Effect of converting-enzyme inhibition on renal response to ANF in rats with experimental heart failure. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 259(1), R84–R89.
- 5) **Abassi, Z.**, Konstantin, G., E., M. S., ... Joseph, W. (1997). Impaired Nitric Oxide–Mediated Renal Vasodilation in Rats With Experimental Heart Failure. *Circulation*, 96(10), 3655–3664.
- 6) **Afsar, B.**, Ortiz, A., Covic, A., Solak, Y., Goldsmith, D., & Kanbay, M. (2016). Focus on renal congestion in heart failure. *Clinical Kidney Journal*, 9(1), 39–47.
- 7) **Araujo, M.**, & Wilcox, C. S. (2014). Oxidative stress in hypertension: role of the kidney. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(1), 74–101.
- 8) **Attanasio, P.**, Ronco, C., Anker, S. D., Cicoira, M., & von Haehling, S. (2012). Role of Iron Deficiency and Anemia in Cardio-Renal Syndromes. *Seminars in Nephrology*, 32(1), 57–62.
- 9) **Bansal, S.**, Prasad, A., & Linas, S. (2018). Right Heart Failure—Unrecognized Cause of Cardiorenal Syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29(7), 1795 LP – 1798.
- 10) **Becari, C.**, Oliveira, E. B., & Salgado, M. C. O. (2011). Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system . *Brazilian Journal of*

Medical and Biological Research , scielo , pp. 914–919.

- 11) **Bonsu**, K. O., Owusu, I. K., Buabeng, K. O., Reidpath, D. D., & Kadirvelu, A. (2016). Review of novel therapeutic targets for improving heart failure treatment based on experimental and clinical studies. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 12, 887–906.
- 12) **Booth**, L. C., May, C. N., & Yao, S. T. (2015). The role of the renal afferent and efferent nerve fibers in heart failure. *Frontiers in Physiology*, 6, 270.
- 13) **Bradford**, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254.
- 14) **Branca**, L., Sbolli, M., Metra, M., & Fudim, M. (2020). Heart failure with mid-range ejection fraction: pro and cons of the new classification of Heart Failure by European Society of Cardiology guidelines. *ESC Heart Failure*, 7(2), 381–399.
- 15) **Briet**, M., & Schiffrin, E. L. (2010). Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nature Reviews Nephrology*, 6, 261.
- 16) **Burnstock**, G., & Loesch, A. (2017). Sympathetic innervation of the kidney in health and disease: Emphasis on the role of purinergic cotransmission. *Autonomic Neuroscience*, 204, 4–16.
- 17) **Carlström**, M., Wilcox, C. S., & Arendshorst, W. J. (2015). Renal autoregulation in health and disease. *Physiological Reviews*, 95(2), 405–511.
- 18) **Carmines**, P., D Perry, M., B Hazelrig, J., & Navar, L. (1987). *Effects of preglomerular and postglomerular vascular resistance alterations on filtration fraction. Kidney international. Supplement*, Vol. 20.
- 19) **Causland**, R. M. F., P., L. M., Brian, C., ... D., S. S. (2020). Angiotensin-Nepriylsin Inhibition and Renal Outcomes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation*, 142(13), 1236–1245.
- 20) **Červenka**, L., Melenovský, V., Husková, Z., Škaroupková, P., Nishiyama, A., & Sadowski, J. (2015). Inhibition of soluble epoxide hydrolase counteracts the development of renal dysfunction and progression of congestive heart failure in Ren-2 transgenic hypertensive rats with aorto-caval fistula. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 42(7), 795–807.
- 21) **César**, C., R., D. N., Hillary, M., ... Tariq, A. (2019). Clinical Implications of the New York Heart Association Classification. *Journal of the American Heart Association*, 8(23), e014240.

- 22) **Chang, P.-C., Lin, S.-F., Chu, Y., ... Chou, C.-C.** (2019). LCZ696 Therapy Reduces Ventricular Tachyarrhythmia Inducibility in a Myocardial Infarction-Induced Heart Failure Rat Model. *Cardiovascular Therapeutics*, 2019, 6032631.
- 23) **Chen, H. H.** (2007). Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 49(10), 1089 LP – 1091.
- 24) **Chen, H. H., A., S. J., L., C. W., ... C., B. J.** (1999). Renal Response to Acute Neutral Endopeptidase Inhibition in Mild and Severe Experimental Heart Failure. *Circulation*, 100(24), 2443–2448.
- 25) **Coats, A. J. S., Pieske, B., Linde, C., ... Ponikowski, P.** (2016). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*, 37(27), 2129–2200.
- 26) **Cohen-Segev, R., Francis, B., Abu-Saleh, N., ... Abassi, Z.** (2014). Cardiac and renal distribution of ACE and ACE-2 in rats with heart failure. *Acta Histochemica*, 116(8), 1342–1349.
- 27) **Colombo, P. C., Ganda, A., Lin, J., ... Cotter, G.** (2012). Inflammatory activation: cardiac, renal, and cardio-renal interactions in patients with the cardiorenal syndrome. *Heart Failure Reviews*, 17(2), 177–190.
- 28) **Cruz, D. N., & Bagshaw, S. M.** (2010). Heart-kidney interaction: epidemiology of cardiorenal syndromes. *International Journal of Nephrology*, 2011, 351291.
- 29) **Daiber, A., Gori, T., Münzel, T., Keaney Jr, J. F., & Maack, C.** (2015). Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. *European Heart Journal*, 36(38), 2555–2564.
- 30) **Damman, K., Navis, G., Smilde, T. D. J., ... Hillege, H. L.** (2007). Decreased cardiac output, venous congestion and the association with renal impairment in patients with cardiac dysfunction. *European Journal of Heart Failure*, 9(9), 872–878.
- 31) **Damman, K., & Testani, J. M.** (2015). The kidney in heart failure: an update. *European Heart Journal*, 36(23), 1437–1444.
- 32) **Damman, K., van Deursen, V. M., Navis, G., Voors, A. A., van Veldhuisen, D. J., & Hillege, H. L.** (2009). Increased Central Venous Pressure Is Associated With Impaired Renal Function and Mortality in a Broad Spectrum of Patients With

- Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(7), 582–588.
- 33) **Davenport**, A. P., Hyndman, K. A., Dhaun, N., ... Maguire, J. J. (2016). Endothelin. *Pharmacological Reviews*, 68(2), 357 LP – 418.
- 34) **Dell'Italia**, L. J. (2011). Translational Success Stories: Angiotensin Receptor 1 Antagonists in Heart Failure. *Circulation Research*, 109(4), 437–452.
- 35) **Dézi**, C. A. (2014). Differences in the clinical effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and Angiotensin receptor blockers: a critical review of the evidence. *American Journal of Cardiovascular Drugs : Drugs, Devices, and Other Interventions*, 14(3), 167–173.
- 36) **Di Lullo**, L., Bellasi, A., Barbera, V., ... Ronco, C. (2017). Pathophysiology of the cardio-renal syndromes types 1-5: An uptodate. *Indian Heart Journal*, 69(2), 255–265.
- 37) **Dimopoulos**, K., Salukhe, T. V, Coats, A. J. S., Mayet, J., Piepoli, M., & Francis, D. P. (2004). Meta-analyses of mortality and morbidity effects of an angiotensin receptor blocker in patients with chronic heart failure already receiving an ACE inhibitor (alone or with a β -blocker). *International Journal of Cardiology*, 93(2), 105–111.
- 38) **Doleželová**, Š., Jíchová, Š., Huskova, Z., ... Kopkan, L. (2016). Progression of hypertension and kidney disease in aging fawn-hooded rats is mediated by enhanced influence of renin–angiotensin system and suppression of nitric oxide system and epoxyeicosanoids. *Clinical and Experimental Hypertension*, 38, 644–651.
- 39) **Domenig**, O., Manzel, A., Grobe, N., ... Poglitsch, M. (2016). Nephilysin is a Mediator of Alternative Renin-Angiotensin-System Activation in the Murine and Human Kidney. *Scientific Reports*, 6, 33678.
- 40) **Duggan**, D. J., & Tabrizchi, R. (2016). Angiotensin II control of regional haemodynamics in rats with aortocaval fistula. *Experimental Physiology*, 101(9), 1192–1205.
- 41) **Fiksen-Olsen**, M. J., Strick, D. M., Hawley, H., & Romero, J. C. (1992). Renal effects of angiotensin II inhibition during increases in renal venous pressure. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 19(2 Suppl), II137-41.
- 42) **Floras**, J. S., & Ponikowski, P. (2015). The sympathetic/parasympathetic imbalance in heart failure with reduced ejection fraction. *European Heart Journal*,

- 36(30), 1974–1982.
- 43) **G., F. V., & N., C. J.** (2014). The Autonomic Nervous System and Heart Failure. *Circulation Research*, 114(11), 1815–1826.
 - 44) **Gaidarov, I., Adams, J., Frazer, J., ... Unett, D. J.** (2018). Angiotensin (1–7) does not interact directly with MAS1, but can potently antagonize signaling from the AT1 receptor. *Cellular Signalling*, 50, 9–24.
 - 45) **Goldfarb, M., Abassi, Z., Rosen, S., Shina, A., Brezis, M., & Heyman, S. N.** (2001). Compensated heart failure predisposes to outer medullary tubular injury: Studies in rats. *Kidney International*, 60(2), 607–613.
 - 46) **Haase, V. H.** (2013). Mechanisms of Hypoxia Responses in Renal Tissue. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(4), 537 LP – 541.
 - 47) **Hall, J. E.** (2003). Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Molecular Biotechnology*, 24(1), 27–39.
 - 48) **Hillege, H., Girbes, A., J. de Kam, P., ... J. van Veldhuisen, D.** (2000). *Renal Function, Neurohormonal Activation, and Survival in Patients With Chronic Heart Failure*. *Circulation*, Vol. 102. doi:10.1161/01.CIR.102.2.203
 - 49) **Hilton, J. G., Kanter, D. M., Hays, D. R., ... Wegria, R.** (1955). The effect of acute arteriovenous fistula on renal functions. *The Journal of Clinical Investigation*, 34(5), 732–736.
 - 50) **Hoffman, A., Burnett, J. C., Haramati, A., & Winaver, J.** (1988). Effects of atrial natriuretic factor in rats with experimental high-output heart failure. *Kidney International*, 33(3), 656–661.
 - 51) **Holdiness, A., Monahan, K., Minor, D., & de Shazo, R. D.** (2011). Renin Angiotensin Aldosterone System Blockade: Little to No Rationale for ACE Inhibitor and ARB Combinations. *The American Journal of Medicine*, 124(1), 15–19.
 - 52) **Honda, T., Hirakawa, Y., & Nangaku, M.** (2019). The role of oxidative stress and hypoxia in renal disease. *Kidney Research and Clinical Practice*, 38(4), 414–426.
 - 53) **Honetschlagerová, Z., Gawrys, O., Jíchová, Š., ... Červenka, L.** (2021a). Renal Sympathetic Denervation Attenuates Congestive Heart Failure in Angiotensin II-Dependent Hypertension: Studies with Ren-2 Transgenic Hypertensive Rats with Aortocaval Fistula. *Kidney and Blood Pressure Research*, 46(1), 95–113.
 - 54) **Honetschlagerová, Z., Škaroupková, P., Kikerlová, S., ... Čertíková Chábová, V.** (2021b). Effects of renal sympathetic denervation on the course of congestive heart

- failure combined with chronic kidney disease: Insight from studies with fawn-hooded hypertensive rats with volume overload induced using aorto-caval fistula. *Clinical and Experimental Hypertension*, 1–14.
- 55) **Houser**, S. R., Margulies, K. B., Murphy, A. M., ... Koch, W. J. (2012). Animal Models of Heart Failure. *Circulation Research*, 111(1), 131–150.
- 56) **Ibrahim**, N. E., & Januzzi, J. L. (2017). Beyond Natriuretic Peptides for Diagnosis and Management of Heart Failure. *Clinical Chemistry*, 63(1), 211 LP – 222.
- 57) **Inamdar**, A. A., & Inamdar, A. C. (2016). Heart Failure: Diagnosis, Management and Utilization. *Journal of Clinical Medicine*, 5(7), 62.
- 58) **Januzzi**, J. L., & Ibrahim, N. E. (2017). Renin-Angiotensin System Blockade in Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 69(7), 820 LP – 822.
- 59) **Kala**, P., Sedláková, L., Škaroupková, P., ... Červenka, L. (2018). Effect of angiotensin-converting enzyme blockade, alone or combined with blockade of soluble epoxide hydrolase, on the course of congestive heart failure and occurrence of renal dysfunction in Ren-2 transgenic hypertensive rats with aorto-caval fistula. *Physiological Research*, 67(3), 401–415.
- 60) **Kario**, K. (2018). The Sacubitril/Valsartan, a First-in-Class, Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibitor (ARNI): Potential Uses in Hypertension, Heart Failure, and Beyond. *Current Cardiology Reports*, 20(1), 5.
- 61) **Karram**, T., Hoffman, A., Bishara, B., ... Abassi, Z. (2005). Induction of Cardiac Hypertrophy by a Controlled Reproducible Sutureless Aortocaval Shunt in the Mouse. *Journal of Investigative Surgery*, 18(6), 325–334.
- 62) **Kemp**, C. D., & Conte, J. V. (2012). The pathophysiology of heart failure. *Cardiovascular Pathology*, 21(5), 365–371.
- 63) **Kirk**, J. E., & Wilkins, M. R. (1996). Renal effects of concurrent E-24.11 and ACE inhibition in the aorto-venocaval fistula rat. *British Journal of Pharmacology*, 119(5), 943–948.
- 64) **Kishi**, T. (2012). Heart failure as an autonomic nervous system dysfunction. *Journal of Cardiology*, 59(2), 117–122.
- 65) **Kishimoto**, T., Maekawa, M., Abe, Y., & Yamamoto, K. (1973). Intrarenal distribution of blood flow and renin release during renal venous pressure elevation. *Kidney International*, 4(4), 259–266.
- 66) **Kohan**, D. E., Inscho, E. W., Wesson, D., & Pollock, D. M. (2011). Physiology of endothelin and the kidney. *Comprehensive Physiology*, 1(2), 883–919.

- 67) **Kompa**, A. R., Lu, J., Weller, T. J., ... Wang, B. H. (2018). Angiotensin receptor neprilysin inhibition provides superior cardioprotection compared to angiotensin converting enzyme inhibition after experimental myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*, 258, 192–198.
- 68) **Kopp**, U. C., Olson, L. A., & DiBona, G. F. (1984). Renorenal reflex responses to mechano- and chemoreceptor stimulation in the dog and rat. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 246(1), F67–F77.
- 69) **Kusaka**, H., Sueta, D., Koibuchi, N., ... Kim-Mitsuyama, S. (2015). LCZ696, Angiotensin II Receptor-Neprilysin Inhibitor, Ameliorates High-Salt-Induced Hypertension and Cardiovascular Injury More Than Valsartan Alone. *American Journal of Hypertension*, 28(12), 1409–1417.
- 70) **Lanfear**, D. E., Sabbah, H. N., Goldsmith, S. R., ... investigators, E. trial. (2013). Association of arginine vasopressin levels with outcomes and the effect of V2 blockade in patients hospitalized for heart failure with reduced ejection fraction: insights from the EVEREST trial. *Circulation. Heart Failure*, 6(1), 47–52.
- 71) **Langheinrich**, M., Ae Lee, M., Böhm, M., Pinto, Y. M., Ganten, D., & Paul, M. (1996). The Hypertensive Ren-2 Transgenic Rat TGR (mREN2) 27 in Hypertension Research Characteristics and Functional Aspects. *American Journal of Hypertension*, 9(5), 506–512.
- 72) **Lee**, A. F. C., MacFadyen, R. J., & Struthers, A. D. (2001). Neurohormonal reactivation in heart failure patients on chronic ACE inhibitor therapy: a longitudinal study. *European Journal of Heart Failure*, 1(4), 401–406.
- 73) **Lee**, J. (2008). Nitric oxide in the kidney : its physiological role and pathophysiological implications. *Electrolyte & Blood Pressure : E & BP*, 6(1), 27–34.
- 74) **Lee**, N. S., & Daniels, L. B. (2016). Current Understanding of the Compensatory Actions of Cardiac Natriuretic Peptides in Cardiac Failure: A Clinical Perspective. *Cardiac Failure Review*, 2(1), 14–19.
- 75) **Lemarié**, C. A., & Schiffrin, E. L. (2009). The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 11(1), 19–31.
- 76) **Li**, Y., Li, X.-H., & Yuan, H. (2012). Angiotensin II type-2 receptor-specific effects on the cardiovascular system. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, 2(1), 56–62.
- 77) **Liu**, Z. Z., Bullen, A., Li, Y., & Singh, P. (2017). Renal Oxygenation in the

- Pathophysiology of Chronic Kidney Disease . *Frontiers in Physiology* , p. 385.
- 78) **Ljungman, S.**, Laragh, J. H., & Cody, R. J. (1990). Role of the Kidney in Congestive Heart Failure. *Drugs*, 39(4), 10–21.
- 79) **Luff, S. E.**, Hengstberger, S. G., McLachlan, E. M., & Anderson, W. P. (1992). Distribution of sympathetic neuroeffector junctions in the juxtaglomerular region of the rabbit kidney. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 40(3), 239–253.
- 80) **Ma, T. K. W.**, Kam, K. K. H., Yan, B. P., & Lam, Y.-Y. (2010). Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *British Journal of Pharmacology*, 160(6), 1273–1292.
- 81) **Malik, J.** (2018). Heart disease in chronic kidney disease – review of the mechanisms and the role of dialysis access. *The Journal of Vascular Access*, 19(1), 3–11.
- 82) **Marti, C. N.**, Gheorghide, M., Kalogeropoulos, A. P., Georgiopoulou, V. V., Quyyumi, A. A., & Butler, J. (2012). Endothelial Dysfunction, Arterial Stiffness, and Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 60(16), 1455 LP – 1469.
- 83) **Masanobu, I.**, Koichi, K., Koji, S., ... Kenichi, T. (2017). Cardioprotective Effects of LCZ696 (Sacubitril/Valsartan) After Experimental Acute Myocardial Infarction. *JACC: Basic to Translational Science*, 2(6), 655–668.
- 84) **Maslov, M. Y.**, Foianini, S., Mayer, D., Orlov, M. V., & Lovich, M. A. (2018). Synergy between sacubitril and valsartan leads to hemodynamic, antifibrotic, and exercise tolerance benefits in rats with preexisting heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 316(2), H289–H297.
- 85) **Maslov, M. Y.**, Foianini, S., Mayer, D., Orlov, M. V., & Lovich, M. A. (2019). Interaction Between Sacubitril and Valsartan in Preventing Heart Failure Induced by Aortic Valve Insufficiency in Rats. *Journal of Cardiac Failure*, 25(11), 921–931.
- 86) **Matavelli, L. C.**, & Siragy, H. M. (2015). AT2 receptor activities and pathophysiological implications. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 65(3), 226–232.
- 87) **Melenovsky, V.**, Benes, J., Skaroupkova, P., ... Cervenka, L. (2011). Metabolic characterization of volume overload heart failure due to aorto-caval fistula in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 354(1), 83–96.
- 88) **Melenovsky, V.**, Skaroupkova, P., Benes, J., Torresova, V., Kopkan, L., &

- Cervenka, L. (2012). The Course of Heart Failure Development and Mortality in Rats with Volume Overload due to Aorto-Caval Fistula. *Kidney and Blood Pressure Research*, 35(3), 167–173.
- 89) **Mullens**, W., Abrahams, Z., Francis, G. S., ... Tang, W. H. W. (2009). Importance of venous congestion for worsening of renal function in advanced decompensated heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(7), 589–596.
- 90) **Myers**, B., M Deen, W., & M Brenner, B. (1975). *Effects of norepinephrine and angiotensin II on the determinants of glomerular ultrafiltration and proximal tubule fluid reabsorption in the rat. Circulation research*, Vol. 37.
doi:10.1161/01.RES.37.1.101
- 91) **Nakanishi**, K., Mattson, D. L., Gross, V., Roman, R. J., & Cowley, A. W. (1995). Control of renal medullary blood flow by vasopressin V1 and V2 receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 269(1), R193–R200.
- 92) **Nakano**, Y., Hirano, T., Uehara, K., ... Yamada, Y. (2008). New rat model induced by anti-glomerular basement membrane antibody shows severe glomerular adhesion in early stage and quickly progresses to end-stage renal failure. *Pathology International*, 58(6), 361–370.
- 93) **Navar**, L. G. (2014). Intrarenal renin-angiotensin system in regulation of glomerular function. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 23(1), 38–45.
- 94) **Norling**, L. L., Thornhill, B. A., & Chevalier, R. L. (1996). Abnormal glomerular response to atrial natriuretic peptide in rats with aortocaval fistulas. *Journal of the American Society of Nephrology*, 7(7), 1038 LP – 1044.
- 95) **Norman**, J., & Fine, L. (2006). Intrarenal oxygenation in chronic renal failure. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 33, 989–996.
- 96) **Oka**, T., Nishimura, H., Ueyama, M., Kubota, J., & Kawamura, K. (1993a). Haemodynamic and Neurohumoral Changes in Spontaneously Hypertensive Rats with Aortocaval Fistulae. *Clinical Science*, 84(5), 531–535.
- 97) **Oka**, T., Nishimura, H., Ueyama, M., Kubota, J., & Kawamura, K. (1993b). Lisinopril reduces cardiac hypertrophy and mortality in rats with aortocaval fistula. *European Journal of Pharmacology*, 234(1), 55–60.
- 98) **Pacher**, P., Nagayama, T., Mukhopadhyay, P., Bátkai, S., & Kass, D. A. (2008). Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter

- technique in mice and rats. *Nature Protocols*, 3(9), 1422–1434.
- 99) **Patelis**, N., Giagkos, G.-C., Maltezos, K., & Klonaris, C. (2018). Aortocaval fistula: an unusual complication of ruptured abdominal aortic aneurysm. *BMJ Case Reports*, 2018, bcr-2018-224998.
- 100) **Patten**, R. D., & Hall-Porter, M. R. (2009). Small animal models of heart failure development of novel therapies, past and present. *Circulation: Heart Failure*. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.839761
- 101) **Paxton**, W. G., Runge, M., Horaist, C., Cohen, C., Alexander, R. W., & Bernstein, K. E. (1993). Immunohistochemical localization of rat angiotensin II AT1 receptor. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 264(6), F989–F995.
- 102) **Persson**, P. B. (2003). Renin: origin, secretion and synthesis. *The Journal of Physiology*, 552(Pt 3), 667–671.
- 103) **Petrak**, J., Havlenova, T., Krijt, M., ... Melenovsky, V. (2019). Myocardial iron homeostasis and hepcidin expression in a rat model of heart failure at different levels of dietary iron intake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1863(4), 703–713.
- 104) **Phillips**, C. O., Kashani, A., Ko, D. K., Francis, G., & Krumholz, H. M. (2007). Adverse Effects of Combination Angiotensin II Receptor Blockers Plus Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors for Left Ventricular Dysfunction: A Quantitative Review of Data From Randomized Clinical Trials. *Archives of Internal Medicine*, 167(18), 1930–1936.
- 105) **Poglitsch**, M., Sturrock, E. D., & Danser, A. H. J. (2016). Letter to the editor: Angiotensin quantification by mass spectrometry. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 310(3), H452–H453.
- 106) **Polhemus**, D. J., Trivedi, R. K., Gao, J., ... Lefer, D. J. (2017). Renal Sympathetic Denervation Protects the Failing Heart Via Inhibition of Nephrylysin Activity in the Kidney. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(17), 2139–2153.
- 107) **Ramchandra**, R., & Barrett, C. J. (2015). Regulation of the renal sympathetic nerves in heart failure. *Frontiers in Physiology*, 6, 238.
- 108) **Rehsia**, N. S., & Dhalla, N. S. (2010). Potential of endothelin-1 and vasopressin antagonists for the treatment of congestive heart failure. *Heart Failure Reviews*, 15(1), 85–101.
- 109) **Reiser**, I. W., Chou, S.-Y., & Porush, J. G. (1992). Failure of atrial natriuretic peptide to induce natriuresis in aortocaval fistula dogs. *Kidney International*, 42(4),

- 867–874.
- 110) **Riegger**, A. J. G., & Liebau, G. (1982). The Renin-Angiotensin-Aldosterone System, Antidiuretic Hormone and Sympathetic Nerve Activity in an Experimental Model of Congestive Heart Failure in the Dog. *Clinical Science*, 62(5), 465 LP – 469.
 - 111) **Riehle**, C., & Bauersachs, J. (2019). Small animal models of heart failure. *Cardiovascular Research*, 115(13), 1838–1849.
 - 112) **Riha**, H., Papousek, F., Neckar, J., Pirk, J., & Ostadal, B. (2012). *Effects of Isoflurane Concentration on Basic Echocardiographic Parameters of the Left Ventricle in Rats. Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, Vol. 61.
 - 113) **Roger**, V. L. (2013). Epidemiology of heart failure. *Circulation Research*, 113(6), 646–659.
 - 114) **Rundqvist**, B., Lambert, G., Eisenhofer, G., Petersson, M., & Friberg, P. (2005). Long-term outcome in relation to renal sympathetic activity in patients with chronic heart failure. *European Heart Journal*, 26(9), 906–913.
 - 115) **Rüster**, C., & Wolf, G. (2011). Angiotensin II as a Morphogenic Cytokine Stimulating Renal Fibrogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(7), 1189 LP – 1199.
 - 116) **Sachse**, A., & Wolf, G. (2007). Angiotensin II–Induced Reactive Oxygen Species and the Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(9), 2439 LP – 2446.
 - 117) **Saito**, T., Sumithran, E., Glasgow, E. F., & Atkins, R. C. (1987). The enhancement of aminonucleoside nephrosis by the co-administration of protamine. *Kidney International*, 32(5), 691–699.
 - 118) **Santos**, R. A. S., Sampaio, W. O., Alzamora, A. C., ... Campagnole-Santos, M. J. (2017). The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7). *Physiological Reviews*, 98(1), 505–553.
 - 119) **Savarese**, G., & Lund, L. H. (2017). Global Public Health Burden of Heart Failure. *Cardiac Failure Review*, 3(1), 7–11.
 - 120) **Scabbia**, E. V, & Scabbia, L. (2015). The Cardio-renal Syndrome (CRS). *IJC Metabolic & Endocrine*, 9, 1–4.
 - 121) **Schefold**, J., Filippatos, G., Hasenfuß, G., D. Anker, S., & von Haehling, S. (2016). *Heart failure and kidney dysfunction: epidemiology, mechanisms and management*.

- Nature Reviews Nephrology*, Vol. 12. doi:10.1038/nrneph.2016.113
- 122) **Sergey, B., Konstantin, G., Zaid, A., ... Joseph, W. (1998).** Effects of Eprosartan on Renal Function and Cardiac Hypertrophy in Rats With Experimental Heart Failure. *Hypertension*, 32(4), 746–752.
- 123) **Shah, B., & Greaves, K. (2010).** *The Cardiorenal Syndrome: A Review. International journal of nephrology*, Vol. 2011. doi:10.4061/2011/920195
- 124) **Sharp, T. E., Polhemus, D. J., Li, Z., ... Goodchild, T. T. (2018).** Renal Denervation Prevents Heart Failure Progression Via Inhibition of the Renin-Angiotensin System. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(21), 2609 LP – 2621.
- 125) **Simons, J. L., Provoost, A. P., Anderson, S., ... Brenner, B. M. (1993a).** Pathogenesis of glomerular injury in the fawn-hooded rat: early glomerular capillary hypertension predicts glomerular sclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 3(11), 1775 LP – 1782.
- 126) **Simons, J. L., Provoost, A. P., De Keijzer, M. H., Anderson, S., Rennke, H. G., & Brenner, B. M. (1993b).** Pathogenesis of glomerular injury in the fawn-hooded rat: effect of unilateral nephrectomy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 4(6), 1362 LP – 1370.
- 127) **Smilde, T. D. J., Damman, K., van der Harst, P., ... Hillege, H. L. (2009).** Differential associations between renal function and “modifiable” risk factors in patients with chronic heart failure. *Clinical Research in Cardiology*, 98(2), 121–129.
- 128) **Solomon, S. D., McMurray, J. J. V, Anand, I. S., ... Lefkowitz, M. P. (2019).** Angiotensin–Neprilysin Inhibition in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *New England Journal of Medicine*, 381(17), 1609–1620.
- 129) **Sparks, M. A., Crowley, S. D., Gurley, S. B., Mirotsoy, M., & Coffman, T. M. (2014).** Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Comprehensive Physiology*, 4(3), 1201–1228.
- 130) **Suematsu, Y., Jing, W., Nunes, A., ... Moradi, H. (2018).** LCZ696 (Sacubitril/Valsartan), an Angiotensin-Receptor Neprilysin Inhibitor, Attenuates Cardiac Hypertrophy, Fibrosis, and Vasculopathy in a Rat Model of Chronic Kidney Disease. *Journal of Cardiac Failure*, 24(4), 266–275.
- 131) **Suematsu, Y., Miura, S., Goto, M., ... Saku, K. (2016).** 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*, 18(4), 386–393.
- 132) **Sun, W.**, Zhang, H., Guo, J., ... Zhang, L. (2016). Comparison of the Efficacy and Safety of Different ACE Inhibitors in Patients With Chronic Heart Failure: A PRISMA-Compliant Network Meta-Analysis. *Medicine*, 95(6), e2554–e2554.
- 133) **Tai, C.**, Gan, T., Zou, L., ... Xu, D. (2017). Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers on cardiovascular events in patients with heart failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Cardiovascular Disorders*, 17(1), 257.
- 134) **Takahama, H.**, & Kitakaze, M. (2017). Pathophysiology of cardiorenal syndrome in patients with heart failure: potential therapeutic targets. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 313(4), H715–H721.
- 135) **Tan, L.-B.**, Williams, S. G., Tan, D. K. H., & Cohen-Solal, A. (2010). So many definitions of heart failure: are they all universally valid? A critical appraisal. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 8(2), 217–228.
- 136) **Tousoulis, D.**, Kampoli, A.-M., & Stefanadis, C. T. N. P. and C. (2012). The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Current Vascular Pharmacology*, pp. 4–18.
- 137) **Triposkiadis, F.**, Karayannis, G., Giamouzis, G., Skoularigis, J., Louridas, G., & Butler, J. (2009). The Sympathetic Nervous System in Heart Failure: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Implications. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(19), 1747–1762.
- 138) **Trivedi, R. K.**, Polhemus, D. J., Zhen, L., ... J., L. D. (2021). Combined Angiotensin Receptor–Nepriylsin Inhibitors Improve Cardiac and Vascular Function Via Increased NO Bioavailability in Heart Failure. *Journal of the American Heart Association*, 7(5), e008268.
- 139) **Tsutsui, H.**, Kinugawa, S., & Matsushima, S. (2011). Oxidative stress and heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 301(6), H2181–H2190.
- 140) **Umar, S.**, & van der Laarse, A. (2009). Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 333(1), 191.
- 141) **Urso, C.**, Brucculeri, S., & Caimi, G. (2015). Acid-base and electrolyte abnormalities in heart failure: pathophysiology and implications. *Heart Failure*

- Reviews*, 20(4), 493–503.
- 142) **Ushijima, K.**, Ando, H., Arakawa, Y., ... Fujimura, A. (2017). Prevention against renal damage in rats with subtotal nephrectomy by sacubitril/valsartan (LCZ696), a dual-acting angiotensin receptor-neprilysin inhibitor. *Pharmacology Research & Perspectives*, 5(4), e00336.
- 143) **Vacková, Š.**, Kopkan, L., Kikerlová, S., ... Červenka, L. (2019). Pharmacological Blockade of Soluble Epoxide Hydrolase Attenuates the Progression of Congestive Heart Failure Combined With Chronic Kidney Disease: Insights From Studies With Fawn-Hooded Hypertensive Rats. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 18.
- 144) **Van Linthout, S.**, & Tschöpe, C. (2017). Inflammation - Cause or Consequence of Heart Failure or Both? *Current Heart Failure Reports*, 14(4), 251–265.
- 145) **Vinod, P.**, Krishnappa, V., Chauvin, A. M., Khare, A., & Raina, R. (2017). Cardiorenal Syndrome: Role of Arginine Vasopressin and Vaptans in Heart Failure. *Cardiology Research*, 8(3), 87–95.
- 146) **Volpe, M.** (2014). Natriuretic peptides and cardio-renal disease. *International Journal of Cardiology*, 176(3), 630–639.
- 147) **Volpe, M.**, Carnovali, M., & Mastromarino, V. (2016). The natriuretic peptides system in the pathophysiology of heart failure: from molecular basis to treatment. *Clinical Science*, 130(2), 57 LP – 77.
- 148) **Wasilewski, M. A.**, Myers, V. D., Recchia, F. A., Feldman, A. M., & Tilley, D. G. (2016). Arginine vasopressin receptor signaling and functional outcomes in heart failure. *Cellular Signalling*, 28(3), 224–233.
- 149) **Watson, A. M. D.**, Hood, S. G., & May, C. N. (2006). Mechanisms of sympathetic activation in heart failure. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33(12), 1269–1274.
- 150) **Wegner, M.**, Ganten, D., & Stasch, J.-P. (1996). Neutral Endopeptidase Inhibition Potentiates the Effects of Natriuretic Peptides in Renin Transgenic Rats. *Hypertension Research*, 19(4), 229–238.
- 151) **Wong, P. C. Y.**, Guo, J., & Zhang, A. (2017). The renal and cardiovascular effects of natriuretic peptides. *Advances in Physiology Education*, 41(2), 179–185.
- 152) **Wu, J.**, Cheng, Z., Zhang, M., Zhu, P., & Gu, Y. (2016). Impact of aortocaval shunt flow on cardiac and renal function in unilateral nephrectomized rats. *Scientific Reports*, 6, 27493.
- 153) **Yusuf, S.**, Teo, K., Pogue, J., ... Anderson, C. (2008). Telmisartan, Ramipril, or

- Both in Patients at High Risk for Vascular Events. *New England Journal of Medicine*, 358(15), 1547–1559.
- 154) **Zablocki**, D., & Sadoshima, J. (2010). The one-two punch: knocking out angiotensin II in the heart. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 1028–1031.
- 155) **Zhang**, D. Y., & Anderson, A. S. (2014). The Sympathetic Nervous System and Heart Failure. *Cardiology Clinics*, 32(1), 33–45.
- 156) **Zhang**, W., Liu, J., Fu, Y., ... Dong, Y. (2021). Sacubitril/Valsartan Reduces Fibrosis and Alleviates High-Salt Diet-Induced HFpEF in Rats . *Frontiers in Pharmacology* , p. 2282.
- 157) **Zhuo**, J., Ferrao, F., Zheng, Y., & Li, X. (2013). New Frontiers in the Intrarenal Renin-Angiotensin System: A Critical Review of Classical and New Paradigms . *Frontiers in Endocrinology* , p. 166.
- 158) **Ziaeeian**, B., & Fonarow, G. C. (2016). Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nature Reviews. Cardiology*, 13(6), 368–378.