

Proiect cercetare.

Titlu: Evaluarea terapiei singulare cu Diurex pe un model murin de Insuficiență Cardiacă cu fracție de ejeție păstrată. Aspecte etice medicale.

Rezumat:

Insuficiența cardiacă (IC) constituie o problemă majoră economică, socială și medicală la nivel mondial. În ciuda progresului în terapiile medicale și intervenționale, prognosticul IC rămâne rezervat. În acest proiect ne propunem să analizăm terapia singulară cu Diurex într-un model murin de insuficiență cardiacă cu fracție de ejeție (FE) păstrată (p). Pentru analiza IC FEp am propus un model de cardiomiopatie diabetică produsă de inducerea diabetului (DZ) la șoareci prin streptozotocină (STZ). Am stabilit 1 grup sham (fără boală, fără protocol terapeutic), 1 grup martor (cu DZ) care nu va primi niciun protocol terapeutic și 1 grup de animale cu IC FEp, care va primi terapia singulară cu Diurex. Animalele vor fi evaluate atât prin ecocardiografie cât și prin histologie, după ce se vor preleva inimile la finalizarea protocolului terapeutic. Ne așteptăm ca terapia singulară cu Diurex să scadă gradul de fibroză miocardică și să scadă gradul de modificare a parametrilor ecocardiografici. Procedura medicală experimentală ce se va desfășura pe vertebrate vii se va realiza cu respectarea normelor legale în vigoare, a normelor de etică medicală.

1. Stadiul cunoașterii

Insuficiența cardiacă (IC) reprezintă o epidemie și este o problemă majoră economică, socială, dar mai ales medicală la nivel mondial. În ciuda progreselor în terapiile medicale și intervenționale, prognosticul IC rămâne slab [1-4].

Conform ultimelor recomandări ale Societății Europene de Cardiologie (ESC), IC este un sindrom clinic caracterizat prin simptome tipice (de exemplu, dispnee, edeme gambiare și fatigabilitate) care pot fi însoțite de semne (de exemplu, presiune venoasă jugulară crescută, raluri pulmonare pulmonare), cauzat de o anomalie cardiacă structurală și / sau funcțională, rezultând un debit cardiac redus și / sau presiuni intracardiace crescute în repaus sau în timpul efortului [3].

La nivel global se estimează că există aproximativ 37,7 milioane de oameni care traiesc cu insuficiența cardiacă [5], iar prevalența IC este de aproximativ 1-2% din populația totală adultă în țările în curs de dezvoltare [3]. Costurile pe care le implică IC nu sunt deloc de neglijat. Spre exemplu, dacă cheltuiala totală cu HF în 2012 în SUA era de 31 miliarde de dolari, în 2030 cheltuiala totală este pentru HF este prognozată a ajunge la aproximativ 70 miliarde de dolari [6].

IC este produsă de modificări structurale și/sau funcționale care duc la disfuncții sistolice sau diastolice, determinând contracția cardiacă inefficientă (IC cu fracție de ejeție redusă, FE_r) sau relaxare necorespunzătoare (IC cu fracție de ejeție păstrată, FE_p) [7]. Pentru evaluarea IC cu FE_p, noi propunem un model de cardiomiopatie diabetică produsă prin inducerea diabetului zaharat la șoareci, pe calea administrării de streptozotocină. Temele de cercetare în domeniul diabetului zaharat și bolilor cardiovasculare au o deosebită importanță, în special ca urmare a unor incidente în creștere ale acestor comorbidități, nu de puține ori

asociate [8]. Diabetul zaharat afectează circa 463 de milioane de persoane din întreaga lume, iar această cifră este prognozată a ajunge la aproximativ 700 milioane de persoane în 2040, din cauza urbanizării, îmbătrânirii populației, a modificărilor dietetice adverse, dar și a activității fizice reduse [9, 10]. Această boală afectează aproape toate țesuturile din corp, crescând astfel morbiditatea și mortalitatea prin disfuncționalitate considerabilă a organelor, în special a inimii. Astfel, bolile cardiovasculare sunt responsabile de aproximativ 65% din numărul deceselor legate de diabet zaharat [11, 12]. Pentru a identifica terapiile adecvate este nevoie de teste preclinice adecvate pe modele animale [12].

În acest proiect ne propunem să analizăm efectul singular al terapiei cu Diurex pe un model murin de insuficiență cardiacă cu fracție de ejecție păstrată.

2. Metodologia cercetării

Cercetarea presupune efectuarea unui studiu pe model animal, de tip analitic prospectiv, experimental, în care vor fi analizate, din punct de vedere structural și funcțional, modificările produse în cardiomiopatia diabetică. Trebuie spus că vor fi respectate toate ghidurile instituționale pentru experimente pe animale de laborator și vom obține aprobarea Comitetului de Etică al Universității de Medicină și Farmacie (UMF) din Craiova.

Biobaza din cadrul UMF Craiova, își desfășoară activitatea sub acreditarea FELASA (Federation of Laboratory Animal Science Association). Întreaga procedură experimentală va respecta reglementările în domeniu, naționale și internaționale.

Pentru analiza terapiei singulare cu Diurex la animalele cu ICFer, vom induce diabet zaharat la șoareci C57BL/6 prin injectarea intraperitoneală a unei singure doze de 150 mg/kg corp de streptozotocină (STZ).

Experimentele se vor efectua pe 24 de șoareci C57BL/6, masculi și femele, cu vârsta cuprinsă între 8 și 10 săptămâni, cu o greutate cuprinsă între 20 și 27 grame. Înainte de a efectua înregistrările ecocardiografice sau de a recolta sânge, animalele vor fi scoase din complexul de îngrijire pentru animale, unde acestea au hrană și apă ad libidum.

Animalele vor fi împărțite, aleator, în trei loturi distincte, astfel:

- Grupul **Sham** (n=8) la care se va injecta doar NaCl 0,9%, fără a se injecta streptozotocină, deci fără a se produce diabet zaharat. Scopul acestui lot va fi de a examina modificările ecocardiografice și histologice cardiace, dar și modificările biologice (greutate, glicemie etc.) în absența diabetului zaharat.
- Grupul **Control** (n=8) la care se va injecta streptozotocină 150 mg/kg greutate corporală, intraperitoneal, o singură administrare, la 8-10 săptămâni de viață. Acestui lot nu i se aplică nicio terapie. În acest caz, vor fi urmăriți parametrii biologici ai animalelor (greutate, diureză, polidipsie, polifagia), dar vor fi evaluați și parametrii structurali cardiaci (prin ecocardiografie și analiză histologică).
- Grupul **Tratat** cu doza terapeutică de **Diurex** (n=8). La acest lot de animale, după inducerea diabetului zaharat prin injectarea de STZ intraperitoneal și confirmarea prezenței diabetului prin nivel crescut al glucozei sanguine, dar și apariția poliuriei, polifagiei și polidipsiei, se va aplica protocolul terapeutic prin administrarea de Diurex (administrat în apa de baut). Terapia se va aplica timp de timp de 6 săptămâni.

➤ 3. Plan de realizare

Din punct de vedere clinic, animalele vor fi cântărite săptămânal, vor fi ținute în cuști metabolice putându-se observa cantitatea de apă ingerată, cantitatea de hrană, dar și diureza. Cântărirea animalelor se va face săptămânal. Din punct de vedere paraclinic, vom determina glicemia săptămânal. Pentru acest lucru prelevarea de sânge se va face dintr-o venă mare situată în coada animalului și vom utiliza un glucometru standard (Contour Plus One, Ascensia Diabetes care, Switzerland). Pentru efectuarea măsurătorilor structurale și funcționale cardiace noi vom utiliza un ecograf dotat cu o sondă și un soft de analiza pentru animale mici. Pentru analiza ecocardiografică, animalele vor fi anesteziate cu un cocktail de ketamina (50 mg/ml)/xilazina (7 mg/ml) ceea ce va permite un bun frame rate întrucât frecvența cardiacă va scădea în timpul analizei la aproximativ 150 bătăi/minut. Vom analiza modurile M-mode, 2D și doppler spectral. Vom evalua fracția de ejeție a VS (FEVS), fracția de scurtare (FS), diametrul end-diastolic al VS (DEDVS), undele E și (A) pentru evaluarea funcției diastolice, raportul (E/A), grosimea septului interventricular, dar și a peretelui posterior al VS (SIV și PPVS). Acestea două vor fi obținute din secțiunea parasternal ax lung. Undele E și A vor fi obținute din secțiunea apical patru camere la nivelul valvei mitrale prin doppler pulsat. În timpul evaluării ecocardiografice animalele vor fi ținute pe o plăcuță termică, încălzită la 37 grade C, echipată cu electrozi de monitorizare ECG dar și cu o sondă care se va plasa intrarectal pentru monitorizarea temperaturii centrale. Plăcuța termică este conectată la un monitor de funcții vitale (MouseMonitor, USA) cu ajutorul căruia se monitorizează pulsul animalelor, se înregistrează electrocardiograma în 6 derivații, putându-se analiza ulterior variabilitatea ritmului cardiac. Ecografia se va efectua săptămânal începând cu momentul dinaintea administrării STZ și finalizând cu momentul sacrificării animalului, astfel încât se poate efectua o analiză comparativă, în timp, a parametrilor structurali și funcționali cardiaci.

La finalul celor 6 săptămâni de aplicare a terapiei, atât animalele tratate, dar și animalele din grupurile control, respectiv sham, vor fi eutanasiate prin anestezie profundă cu un cocktail Ketamină/Xilazină, inima va fi disecată și inclusă imediat în clorura de potasiu pentru a fi oprită în diastolă. Ulterior va fi fixată în formalină 4% pentru 24 de ore. După cele 24 – 48 de ore în care inimile vor fi fixate, acestea vor fi spălate timp de 24 de ore, apoi vor fi incluse în parafină din care se vor realiza secțiuni seriate de 3-5 μm grosime, care vor fi colorate și analizate optim cu microscopul optic. Pentru a examina fibroza cardiacă, secțiunile de țesut miocardic vor fi supuse colorării tricromice Masson iar pentru evaluarea polizaharidelor vom utiliza colorația Periodic Acid Schiff (PAS). Toate datele vor exprimate ca medie și deviație standard. De menționat că vom analiza și gradul total de fibroză prin reconstrucția secțiunilor seriate scanate. Datele vor fi analizate cu softul GraphPad (Version 9.1, CA, USA). Vom folosi testul „t Student”, pentru evaluarea diferențelor statistice dintre mediile a două grupuri de date și testul varianței ANOVA pentru analiza diferențelor statistice dintre mediile a mai mult de două grupuri de date. Pentru a efectua corelații între diferitele date, vom utiliza testul de corelație Pearson. În toate cazurile în care vom avea valoarea $p < 0.05$ vom considera diferență statistică semnificativă între mediile grupurilor comparate.

Rezultatele proiectului vor fi prezentate în întâlniri naționale/internaționale și publicate în cel puțin într-o revistă de prestigiu.

4. Buget

Distribuția fondurilor se bazează pe **logistică 20%** (ținând cont că ecocardiografia nu costă nimic iar materialele utilizate în studiu dar și consumabilele pentru evaluarea histologică

nu implică sume importante) și cheltuieli de **personal 60%**. Pentru cheltuielile de personal a fost alocat un procent de **60%** deoarece este acest proiect implică numeroase proceduri experimentale de durată (o ecocardiografie durează în medie o oră și 30 min). Cheltuielile **indirecte reprezintă 20%**.

5. Conformitatea proiectului cu dispozițiile legale în materie și cu normele de etică medicală

În țara noastră, Legea nr. 305 din 2006 a ratificat Convenția europeană pentru protecția animalelor vertebrate utilizate în experimente și alte scopuri științifice (denumită în continuare Convenție), adoptată la Strasbourg la 18 martie 1986, cât și Protocolul de amendare a Convenției, adoptat la Strasbourg la 22 iunie 1998, acte semnate de România la 15 februarie 2006. Totodată, în anul 2014 Parlamentul a adoptat Legea nr. 43/2014 care stabilește cadrul legal de utilizare a animalelor în scopuri științifice.

Prezentul studiu se realizează cu respectarea dispozițiilor legale adoptate atât la nivel național cât și la nivel european în privința cercetării medicale efectuate pe animale vertebrate dar și cu respectarea normelor de etică medicală.

Studiul pe model animal, de tip analitic prospectiv pe care proiectul îl propune a se realiza pe 24 de șoareci, vertebrate vii, este o procedură experimentală științifică astfel cum aceasta este definită de art. 1 pct. 2 lit. c din Convenție: „procedură reprezintă orice folosire în scopuri experimentale sau științifice a unui animal, căruia îi poate cauza durere, suferință, disconfort sau răni de durată, inclusiv orice desfășurare a unei acțiuni intenționate sau susceptibile să aibă ca rezultat nașterea unui animal în oricare asemenea condiții, dar excluzând cele mai puțin dureroase metode acceptate în practica modernă (acestea fiind metodele "umane") de omorâre sau de marcarea a unui animal”. O astfel de procedură medicală experimentală se impune întrucât nu există o altă metodă științifică satisfăcătoare, rezonabilă și disponibilă a fi folosită care să nu necesite utilizarea animalului, având în vedere scopul prezentului studiu experimental, respectiv realizarea unei cercetări științifice ce are ca obiectiv tratamentul IC și al efectelor pe roduse de IC la animalele vertebrate, în deplină concordanță cu art. 2 lit. a și c din Convenție.

În respectarea normelor Convenției, experimentul științific va începe numai după ce animalele vor fi mai întâi pregătite pentru utilizarea lor și se va încheia când nu se vor mai efectua observații ulterioare, evitându-se pe cât posibil suferința, disconfortul sau răni de durată ale animalelor.

Celor 24 de șoareci ce vor fi utilizați în efectuarea experimentului științific, li se va asigura acomodarea la condițiile de mediu, libertate și mișcare, hrană, apă și îngrijire, potrivite pentru sănătatea și bunăstarea lor, fără restricții în ceea ce privește necesitățile fiziologice și de comportament, iar verificarea condițiilor de mediu va fi efectuată zilnic.

6. Lista de personal

Lista membrilor echipei este redată în **Tabelul 1**. Ei sunt selectați dintre cercetătorii înalt calificați din departamentele UMF Craiova și Universitatea din Craiova, toți cu un excelent parcurs științific.

LISTA DE PERSONAL

Nr. crt.	Numele și prenumele	Funcția didactică	Poziția
1	Istrătoaie Octavian	Conferențiar Universitar Doctor	Director
2	Târtea Georgică Costinel	Asistent Universitar Doctor	Membru
3	Istrătoaie Manuela Lavinia	Conferențiar Universitar Doctor	Membru
4	Oancea Carmen	Sef Lucrari universitare	Membru
5			

Referințe:

- [1].Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R; IDF Diabetes Atlas Committee. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019 Nov; 157:107843. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843. Epub 2019 Sep 10. PMID: 31518657
- [2].Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Landgraf R, Nauck M, Freckmann G, Heinemann L, Schleicher E. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2019 Dec;127(S 01): S1-S7. doi: 10.1055/a-1018-9078. Epub 2019 Dec 20. PMID: 31860923
- [3].Murtaza G, Virk HUH, Khalid M, Lavie CJ, Ventura H, Mukherjee D, Ramu V, Bhogal S, Kumar G, Shanmugasundaram M, Paul TK. Diabetic cardiomyopathy - A comprehensive updated review. *Prog Cardiovasc Dis.* 2019 Jul-Aug;62(4):315-326. doi: 10.1016/j.pcad.2019.03.003. Epub 2019 Mar 25. PMID: 30922976
- [4].Ali TM, Abo-Salem OM, El Esawy BH, El Askary A. The Potential Protective Effects of Diosmin on Streptozotocin-Induced Diabetic Cardiomyopathy in Rats. *Am J Med Sci.* 2020 Jan;359(1):32-41. doi: 10.1016/j.amjms.2019.10.005. Epub 2019 Oct 22. PMID: 31902439
- [5].Aneja A, Tang WH, Bansilal S, Garcia MJ, Farkouh ME. Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options. *Am J Med.* 2008 Sep;121(9):748-57. doi: 10.1016/j.amjmed.2008.03.046. PMID: 18724960
- [6].Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol.* 1972 Nov 8;30(6):595-602. doi: 10.1016/0002-9149(72)90595-4. PMID: 4263660
- [7].Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia.* 2014 Apr;57(4):660-71. doi: 10.1007/s00125-014-3171-6. Epub 2014 Jan 30. PMID: 24477973
- [8].Dillmann WH. Diabetic Cardiomyopathy. *Circ Res.* 2019 Apr 12;124(8):1160-1162. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.314665. PMID: 30973809
- [9].Borghetti G, von Lewinski D, Eaton DM, Sourij H, Houser SR, Wallner M. Diabetic Cardiomyopathy: Current and Future Therapies. *Beyond Glycemic Control. Front Physiol.* 2018 Oct 30;9: 1514. doi: 10.3389/fphys.2018.01514. eCollection 2018. PMID: 30425649

- [10]. Riehle C, Bauersachs J. Of mice and men: models and mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*. 2018 Nov 15;114(1):2. doi: 10.1007/s00395-018-0711-0. PMID: 30443826
- [11]. Paolillo S, Marsico F, Prastaro M, Renga F, Esposito L, De Martino F, Di Napoli P, Esposito I, Ambrosio A, Ianniruberto M, Mennella R, Paolillo R, Gargiulo P. Diabetic Cardiomyopathy: Definition, Diagnosis, and Therapeutic Implications. *Heart Fail Clin*. 2019 Jul;15(3):341-347. doi: 10.1016/j.hfc.2019.02.003. Epub 2019 Apr 5. PMID: 31079692
- [12]. Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Oct;1790(10):1149-60. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.07.026. Epub 2009 Aug 4. PMID: 19664690 15.