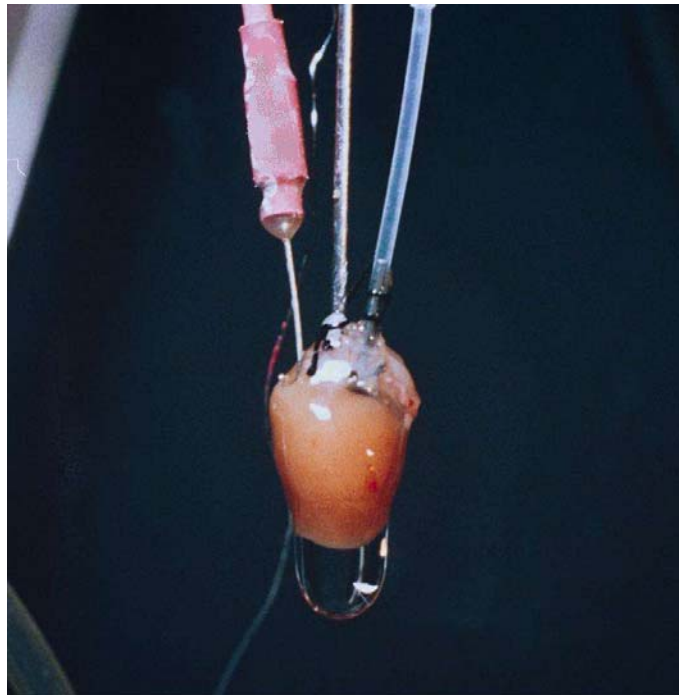


Effekt av antidiabetisk terapi på hjertets kontraktile funksjon hos mus



5. årsoppgave i stadium IV
medisinstudiet ved Universitetet i Tromsø

Av Jørgen Nissen Nygård, kull -02

Veileder: Terje S. Larsen, Prof. Med. Fys. IMB, UiTø.

Tromsø, september 2007

INNHold

| | |
|-----------------------------------|--------------|
| Resymé | s. 3 |
| Innledning | s. 4 |
| 1. Diabetes Mellitus Type 2 (DM2) | |
| 2. Diabetisk Kardiomyopati (DK) | |
| 3. PPAR agonister | |
| Metode | s. 11 |
| Resultater | s. 14 |
| Diskusjon | s. 16 |
| Tabeller og figurer | s. 19 |
| Referanser | s. 22 |

RESYMÉ:

Diabetes Mellitus type 2 (DM2) er forbundet med høy morbiditet og mortalitet spesielt på grunn av komplikasjoner med hjerte-karsykdommer. I denne oppgaven er det fokusert på en spesiell type hjertesvikt som forekommer hos diabetiske/insulin-resistente pasienter, nemlig diabetisk kardiomyopati (DK). Denne tilstanden er definert som ventrikulær dysfunksjon uten tilstedeværelse av coronar hjertesykdom.

I forskningsprosjektet jeg har deltatt i undersøkte man effekten av to terapeutiske intervensjoner (kronisk behandling med to forskjellige PPAR agonister) i diett-induserte, overvektige mus (DIO mus) med hensyn på hjertets oksidasjon av glukose og fettsyrer, samt leverens oksidasjon av fettsyrer. Vi har også undersøkt i hvilken grad disse intervensjonene påvirket hjertets kontraktilitet og post-iskemiske funksjon. Oppgavens formål er å bruke resultatene dette og tidligere eksperimentelle forsøk har vist med hensyn på effekten av PPAR-agonister på fedme/diabetisk status, energiomsetning og kontraktil funksjon i hjertet. Videre vil jeg prøve å sette funnene inn i en klinisk sammenheng.

To PPAR-agonister, Fenofibrat (FF), en selektiv PPAR α agonist, og TTA (tetradecyl-thioacetic acid) som er en uspesifikk PPAR agonist, ble brukt.

Ved begge behandlingene så man reduserte fettsyre- og triglyserid nivå i plasma, økt fettsyre-oksidasjon og økt uttrykk av PPAR α gener i lever. Hos mus behandlet med FF så man en reduksjon i hjertets FA-oksidasjon. Denne reduksjonen var derimot ikke tilstede hos TTA-behandlede mus, som også hadde hypertrofi av hjertet. Hjertene fra FF-behandlede DIO- mus hadde signifikant bedret funksjon og større toleranse for iskemi, sammenlignet med hjerter fra kontrolldyr..

Funnene indikerer en ikke udelt positiv effekt av behandling av DIO-mus med de aktuelle PPAR agonistene. Resultatene bør likevel følges opp med med nye forsøk for å undersøke om de to agonistene kan brukes i behandlingen av fedme og DM2.

INNLEDNING

Opgavens formål er å bruke resultatene fra forsøkene jeg deltok i, sette dem i sammenheng med det som er rapportert i litteraturen og videre inn i et klinisk perspektiv. Årsaken til at jeg valgte dette emnet er både sykdommens høye og stigende prevalens i seg selv, dens massive co-morbiditet, samt behov for kunnskap og medikamentelle alternativer for å møte den antatt eksplosive prevalensstigningen vi vil se i årene som kommer.

1. Diabetes Mellitus Type 2 (DM2)

De siste tiårene har det blitt større fokus på den økende forekomsten av såkalte livsstilssykdommer, deriblant Diabetes Mellitus type 2 (DM2). DM2 er et stadig økende problem i hele verden og rammer særlig i lavere sosiale klasser i det rike, urbane vesten med dårlige matvaner og manglende fysisk aktivitet. Dette kommer blant annet av at et usunt kosthold er billigere enn et sunt kosthold (1, 2). DM2 regnes å stå for over 98% av diabetestilfellene i verden og er et tiltagende problem også hos barn og ungdom. Prevalensen av type 1 diabetes, som er den typen som regnes som arvelig, øker derimot ikke.(1, 3). En studie som forutsa prevalensen av diabetes fra 2000 til 2030 konkluderte med en sannsynlig dobling av antall tilfeller i løpet av disse årene (2). Sykdommen er forbundet med høy mortalitet og co-morbiditet (1, 3).

DM2 er karakterisert av kronisk hyperlykemi, insulinresistens og en relativ insulinmangel.

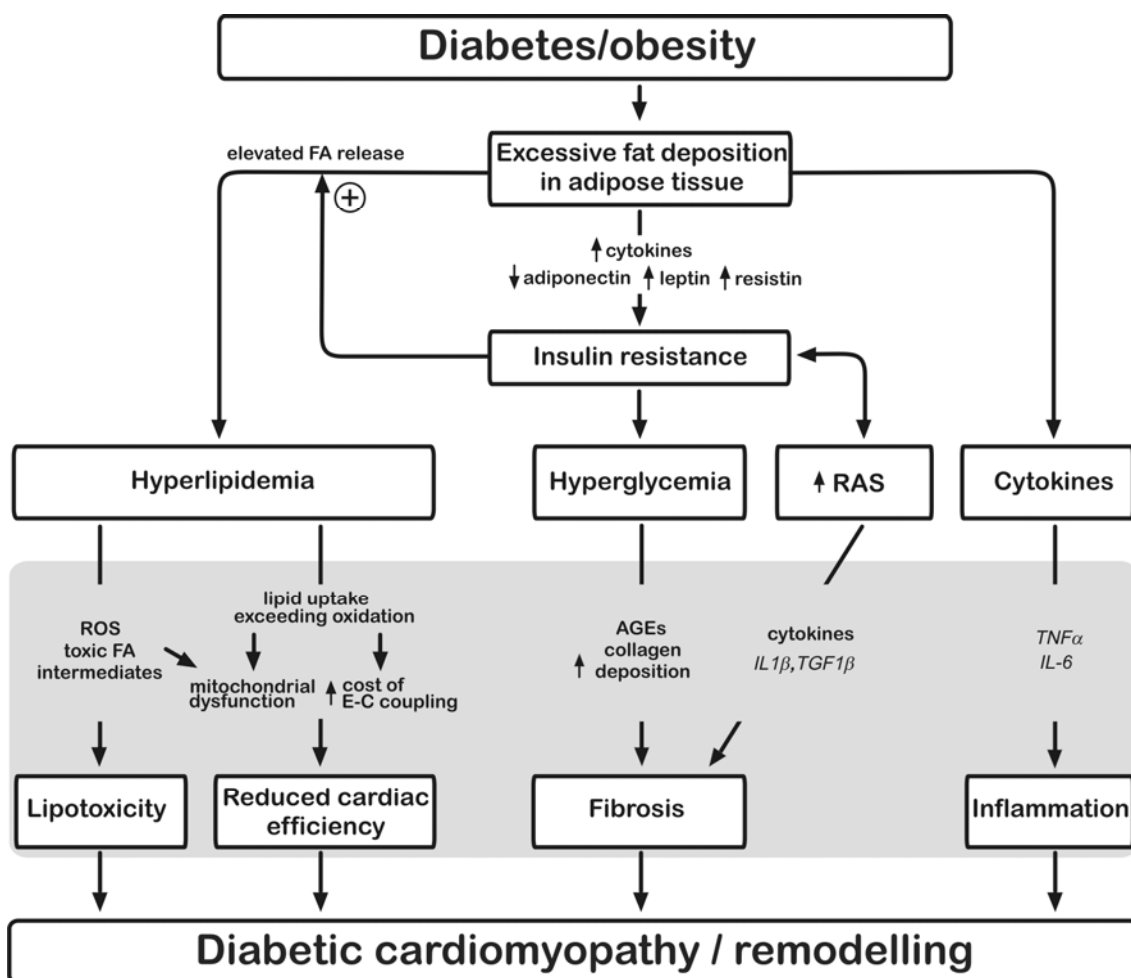
Sykdommen har mange fryktede komplikasjoner som bidrar til at fokuset nå er såpass stort på området som det er i dag. Av disse kan en nevne skade på nervesystemet, nyresvikt, hjerte-/karsykdom og øyekomplikasjoner som følge av mikro- og makro-vaskulære forandringer (1, 3, 4). En studie som kartla kostnader ved diabetesbehandling, anslo at over 1/3 av utgiftene var knyttet til co-morbiditet. Preventive tiltak eller behandling som kan begrense komplikasjonene vil altså være svært nyttig også i et samfunnsøkonomisk perspektiv (4).

Det finnes medikamentelle alternativer i behandlingen av DM2 som bidrar til å senke glukosenivået i blod og øke insulin-produksjonen og -følsomheten på ulike måter. Man vet likevel foreløpig for lite om de patofysiologiske mekanismene ved de ulike komplikasjonene som følger med DM2, og intensiv forskning på området er nødvendig for å kartlegge disse og dermed kunne finne adekvat medikamentell behandling som kan forhindre eller bremse sykdommen og begrense komplikasjonenes omfang på et tidlig stadium (5, 6).

2. Diabetisk Kardiomyopati (DK)

Hjertesykdom og svikt er dominerende som dødsårsak hos diabetikere ved to mekanismer; 1) koronar hjertesykdom som følge av økt aterosklerotisk tendens på grunn av fedme, hypertensjon, dyslipidemi og pro-trombotiske faktorer, og 2) en diabetisk kardiomyopati som er definert som nedsatt hjertefunksjon uten koronar hjertesykdom og/eller hypertensjon (6, 7, 8). Kun 2) omtales her.

DK har vist å bidra i betydelig grad til nedsatt hjertefunksjon (svikt) og redusert toleranse for iskemisk stress som man ser hos DM2 – pasienter (5, 9, 10). Det er mangelfull oversikt over de biologiske mekanismene som fører til denne tilstanden, men det foreligger teorier som beskriver en komplisert patogenese med mange komponenter (Figur 1).

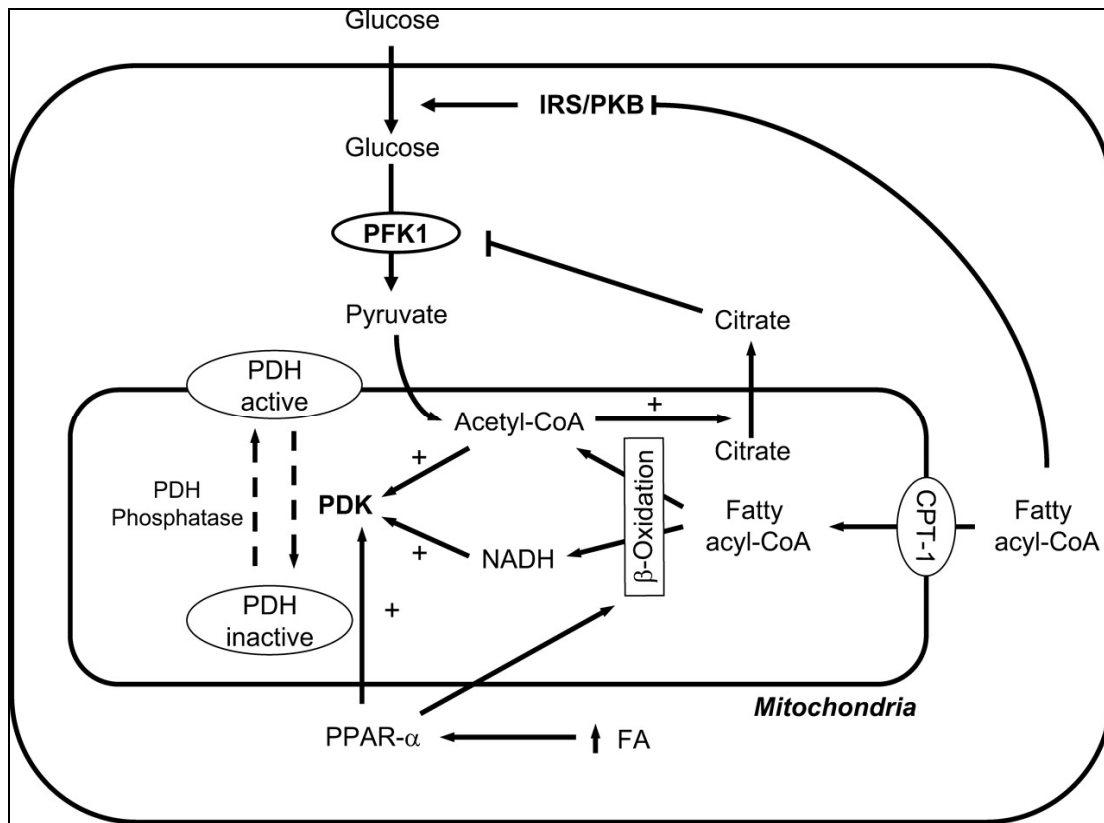


Figur 1 Oversikt over foreslåtte mekanismer for diabetisk kardiomyopati. Se tekst for beskrivelse.

Noen mekanismer som kan bidra til DK inkluderer; **a)** Som følge av hyperglykemi er det vist økt forekomst av avanserte glykosering- endeprodukter (AGE) som deaktiverer NO (Nitrogenoksid) og resulterer i nedsatt vaskulær reserve. Videre gir økt AGE en opphopning av ROS (reaktive oksygen species) i mitokondriene. Dette senker nivået av nitrogenoksyd (NO) og gir myokard-inflammasjon og nedsatt endotelfunksjon. Over tid ses kollagenavleiring og myokardial fibrose som resultat (10), **b)** Endret Ca^{2+} homeostase og/eller sensitivitet som følge av oksidativt stress (7, 11), **c)** overaktivering av renin-angiotensin systemet i diabetiske hjerter på tross av minimale forandringer i fylningstrykk, noe som fører til hypertrofi og apoptose (10). Ved Avdeling for medisinsk fysiologi, Institutt for medisinsk biologi (IMB) ved Universitetet i Tromsø, har man fokusert spesielt på hvordan endringene i hjertets energimetabolisme, som følge av det høye tilbudet av fettstoffer i plasma i diabetes, kan føre til DK (9, 12, 13). Deltakelse i dette forskningsprosjektet er grunnlaget for oppgaven min.

Endret hjertemetabolisme

Karbohydratforbruket i er sterkt redusert i hjertemuskulaturen hos overvektige og de som utvikler/har utviklet DM2 (9, 10, 12). I tillegg til nedsatt insulin-følsomhet forklares dette ved det økte tilbudet av fettsyrer, som har en hemmende effekt på en del nøkkelenzymer i reaksjonsveiene som står for nedbrytingen av glukose. Dette forholdet beskrives som Randle's fettsyre-glukose syklus (14) (Figur 2). Fettsyrer er dessuten naturlige ligander for noen spesielle reseptorer i cellekjernen som omtales som peroksisom proliferator-aktivererte reseptorer (PPAR). Disse reseptorene er å betrakte som transkripsjonsfaktorer som regulerer ekspresjonen av en rekke gener i lipid- og karbohydratmetabolismen (se nedenfor). I hjertet fins det uttrykt PPAR α som aktiverer enzymer involvert i fettforbrenningen. Disse reseptorene fungerer som en "lipostat" som tilpasser oksidasjonen til tilbudet av fettsyrer. Fettsyrene utgjør ved fedme/DM2 hovedkilden til energiproduksjonen i myocytene.



Figur 2. Randle's syklus. Fettsyrer bremser glukoseomsetningen på flere nivåer.

Energiutbyttet ved forbrenning av fett er lavere enn ved karbohydratforbrenning, fordi P:O forholdet, det vil si antall ATP molekyler som produseres for hvert oksygenatom som forbrukes, er 2.58 og 2.33 (15) for oksidasjon av henholdsvis karbohydrat og fett. Dette betyr at det koster mer oksygen å produsere en bestemt mengde ATP når hjertet forbrenner fett sammenlignet med karbohydrat. Rent teoretisk kan det brukes opptil 12% mer oksygen ved fettforbrenning, men måling av oksygenforbruket i hjerter fra hund (*in situ*) og mus (*ex vivo*) viser at oksygenforbruket øker enda mer (30-40%) når energiproduksjonen skjer primært fra fettforbrenning (13, 16, 17, 18). Dette skyldes trolig at et høyt tilbud av fettsyrer setter i gang energi-sløsende reaksjoner (futile cycles) i myocytene, og/eller frikopler energi (ATP)-produksjonen fra den mitokondrielle respirasjonen via aktivering av såkalte "uncoupling" proteiner (UCP). Det er også sterke holdepunkter for at opprettholdelse av kalsiumhomeostasen koster mer energi/oksygen i hjertemuskel fra type 2 diabetiske (db/db) mus enn fra normale mus (12) (Figur 2). Alle disse forhold gjør at diabetiske hjerter har et høyt oksygenforbruk og at de dermed arbeider ineffektivt. Dette kan i sin tur være en faktor i seg selv som kan bidra til DK og dessuten gjøre hjertemuskelen mer utsatt i forbindelse med lav oksygentilgang (hypoksi/iskemi).

Forskning blant annet fra Universitetet i Tromsø (IMB) viser at endret metabolisme er assosiert med kontraktile dysfunksjon og utvikling av en konsentrisk hypertrofi (12,14, 19). I samarbeid med forskere i Calgary (Canada) har Tromsøgruppen også vist at overekspresjon av den insulin-avhengige glukosetransportøren hGLUT4 hos db/db mus, et transportmolekyl som vanligvis har redusert uttrykk ved diabetes, førte til normalisering av både metabolisme og kontraktile funksjon i hjertet (12).

I tillegg til nedsatt effektivitet ved FA som substrat vil en overskridelse av FA-oksideringskapasiteten føre til opphopning av triglyserider (TG) og ceramid i myocyttene. Hjertemuskelcellen adapteres initialt til denne tilstanden ved å øke avhengigheten av fettsyrer som energisubstrat, men over tid skjer det en mal-adaptasjon (lipotoksisitet) som kan resultere i myocyt-apoptose og ventrikulær dysfunksjonen (10, 14, 20, 21, 22).

3) PPAR (Peroksisomal proliferator-aktiverte reseptorer):

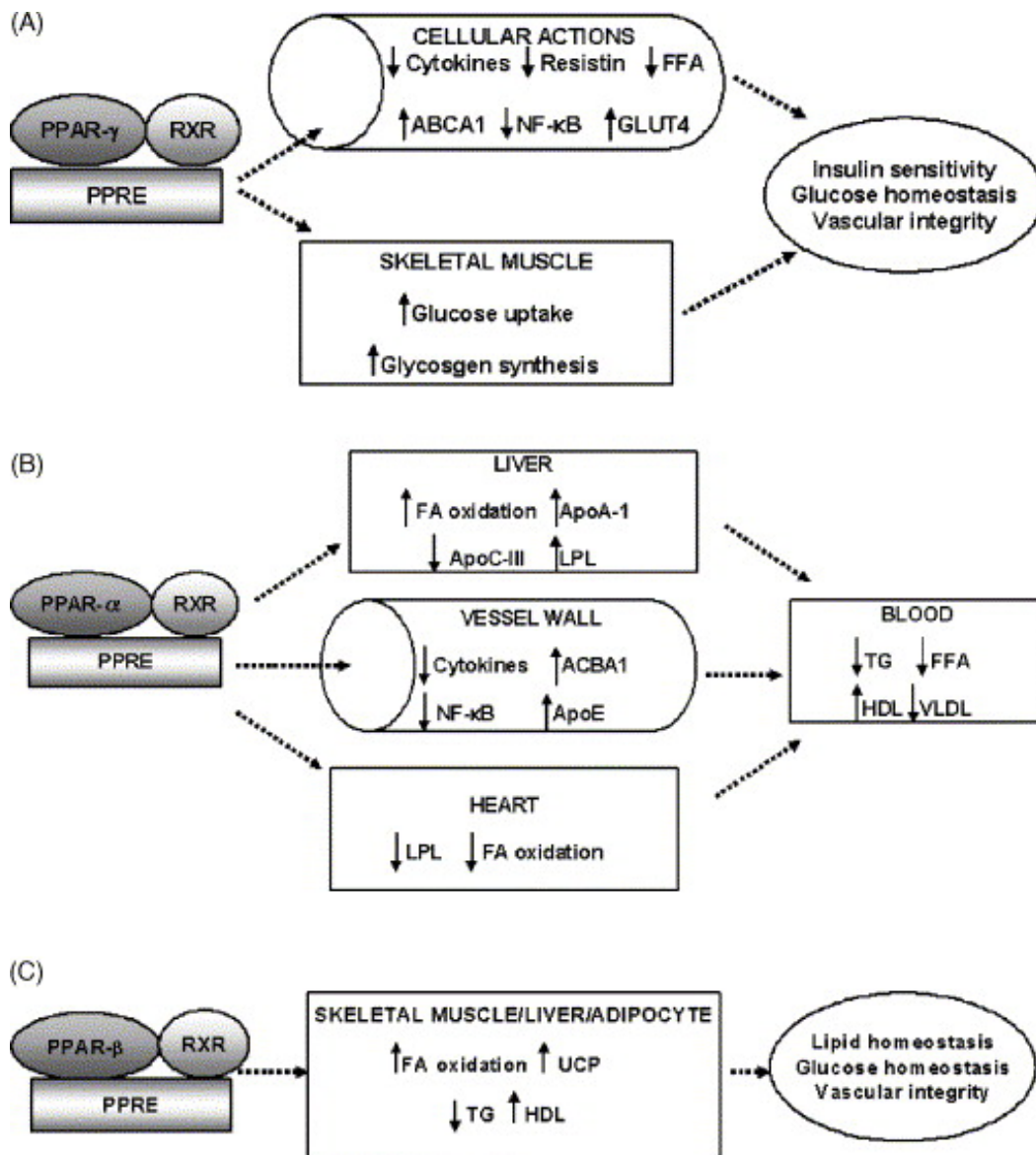
Ble oppdaget på 1990-tallet og tilhører den såkalte nukleære reseptor-superfamilien som omfatter glukokortikoide, mineralkortikoide, kjønnsormon, vitamin D, thyroidea hormon og retininsyre – reseptorer. Reseptorene er både reseptor og transkripsjonsfaktor i ett og samme molekyl og man kan derfor betegne det som en cellulær signalvei. Når liganden binder reseptoren, blir hormonreseptor-komplekset aktivert og endrer konformasjon før det går til cellekjernen der det binder spesifikke DNA-sekvenser og induserer transkripsjonen (23, 24). PPAR har en viktig rolle i gentranskripsjons-reguleringen av lipid-forbruk og lagring i flere organer, deriblant hjerte, lever og fettvev (9, 24) (Figur 3). Det er så langt funnet tre hovedtyper; alfa (α), beta (β)/delta (δ) og gamma (γ). Forøvrig er reseptorene involvert i regulering av diverse typer tumorer, inflammasjon, aterosklerose og ved infertilitet (16, 23).

PPAR α fins hovedsaklig i lever, hjertemuskelceller og brune fettceller. Reseptorens naturlige ligand er fettsyrer (FA) (9,18, 23). Aktivering av PPAR α med farmakologiske preparater som klofibrat eller fenofibrat (sistnevnte ble brukt i forsøkene) gir økt opptak av FA og økt FA-oksidasjon i lever via en oppregulering av transportproteiner og enzymer (23) (Figur 3).

Man har vist at insulinresistente mus med en genetisk PPAR α mangel (PPAR α -/-) ikke utviklet kardiomyopati, mens derimot overekspresjon av PPAR α i normale mus fører til en diabetisk

fenotype, noe som taler for at reseptoren spiller en viktig rolle i patogenesen for utvikling av DK (25). Fibrater, som er agonister for denne reseptoren, har vært i bruk ved hypertriglyceridemi og hyperlipidemi i over 30 år. Virkningsmåten har derimot ikke vært kjent før de siste 15 årene. Preparatene markedsføres ikke i Norge (26).

PPAR β/δ stimulerer også forekomsten av proteiner som deltar i FA-oksidasjon på liknende måte som PPAR α , men fortsatt er funksjonen til disse reseptorene forholdsvis lite kjent (16).



Figur 3. Metabolske effekter av PPARs i forskjellige organer. (A) PPAR γ utøver sin anti-diabetiske og anti-aterosklerotiske effekt i adipocytter og skjelettmuskulatur. (B) PPAR α har multiple effekter i lever, hjerte og karvegg ved regulering av korresponderende gener. (C) PPAR β/δ er uttrykt i hele kroppen og har effekt på gener involvert i glukose,- og lipidmetabolisme .

PPAR γ er lite uttrykt i hjerteceller, men i større grad i mange andre organer (primært fettvev) og synes å være viktig i differensieringen av fettceller fra fibroblaster. Uten at mekanismene er fullstendig klarlagt, gir aktivering av PPAR γ økt insulinfølsomhet i vevene. Polymorfe forandringer og mutasjoner i genet som koder for denne reseptoren har vist seg å kunne bidra til den varierende insulinfølsomheten og økende tendensen til fedme som man ser i befolkningen (27).

Aktivering av PPAR γ gir en reduksjon i FA-nivået i blodet og bidrar på den måten til mindre tilgjengelig FA for hjertemetabolisme. Samtidig vil mengden FA i plasma som ligand for PPAR α senkes og en får således mindre uttrykk av FA-oksiderende enzymer i myocytene (16).

I fedme/diabetes vil nedsatt FA-tilbud som følge av PPAR γ aktivering øke karbohydratorbruket, senke glukoseproduksjonen i lever og derved bedre insulinfølsomheten (27) (Figur 3).

Det er i løpet av de siste årene kommet PPAR γ ligander (tiazolidindion – preparater) på det farmasøytiske markedet (rosiglitazon og pioglitazon i Norge) som antidiabetisk behandling (3).

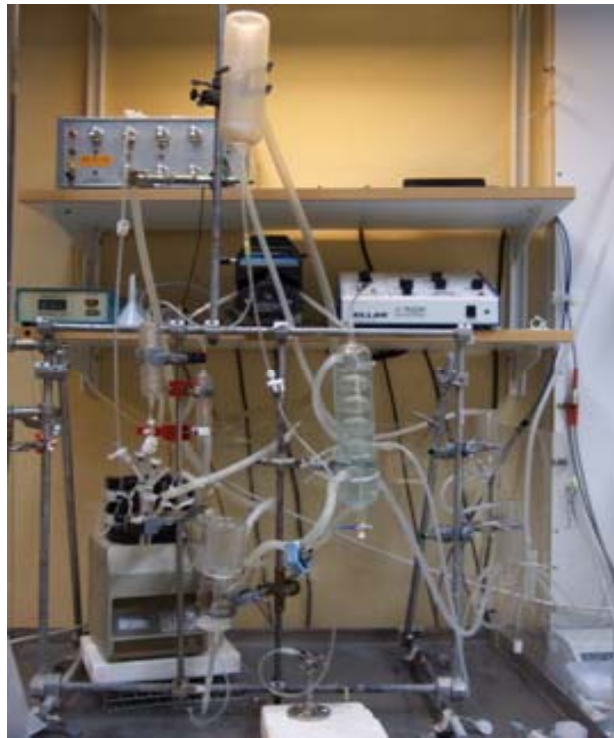
Metode

De eksperimentelle forsøkene jeg deltok i var utført ved Avdeling for medisinsk fysiologi, Institutt for medisinsk biologi. Det ble innkjøpt 60 mus som var 7-8 uker gamle ved forsøkets start. Musene ble inndelt i fire grupper á 15 mus; Kontroll-gruppen fikk standard fôr hele perioden. De andre tre gruppene fikk sukrose-anriket fôr som gir overvekt (DIO-mus). Etter 10 uker fikk disse tre gruppene enten tilsatt Fenofibrat (FF), TTA eller ingen tilsetning i dietten de påfølgende 11-12 ukene.

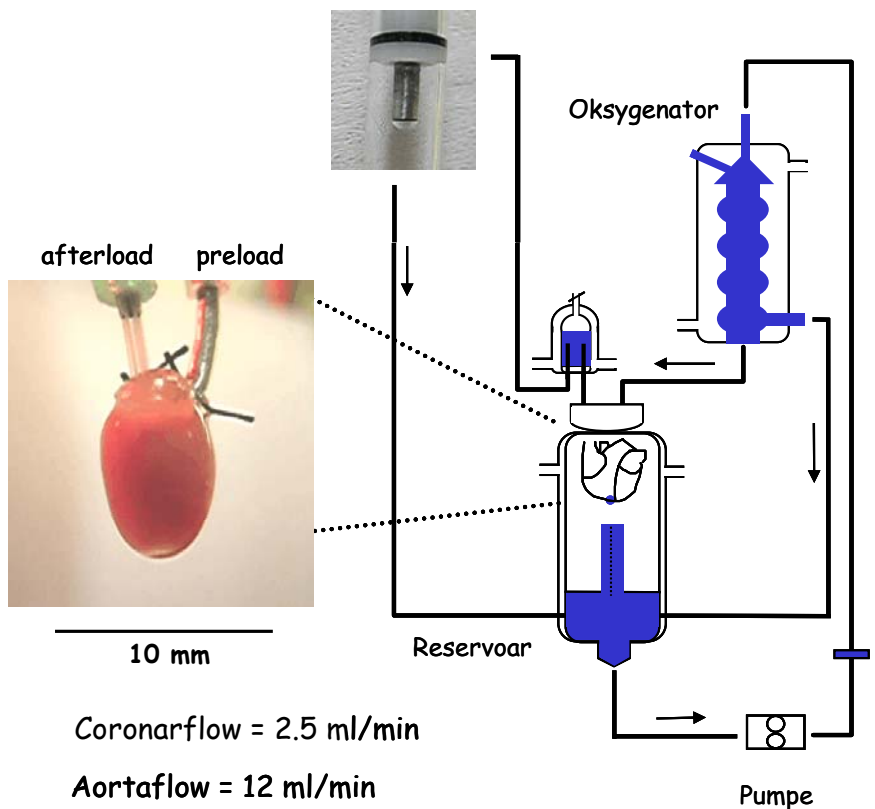
Isolerte, ex- vivo perfunderte arbeidende musehjerter:

Musehjertene ble dissikert fra brysthulen rett etter injeksjon av anestesi-middel. Det ble tatt blodprøver rett etter eksisjon av hjertet fra brysthulen og leveren ble klipt ut og veid. Biopsier fra leveren ble raskt frosset ned i flytende nitrogen for senere analyser.

Hjertet ble så hengt opp og aorta raskt kannulert for å skylle blod ut av koronarkarene. I tillegg ble venstre atrium kannulert. Deretter ble atriakanylen knyttet til preload-reservoaret mens aortakanylen ble knyttet til afterload-kolonnen i perfusjonsriggen (Figur 4). Hjertet ble så perfundert i arbeidende modus med en Krebs – Henseleit bikarbonat (KHB) buffer tilsatt 0.2 mM palmitat (bundet til 3% albumin) og 11 mM glukose som substrat som beskrevet tidligere (19, 28, 29, 30, 31). Under forsøkene ble alle hjertene pacet elektrisk med en frekvens på 8 Hz for å kunne sammenligne kontraktil funksjon mellom de ulike gruppene. Preload var 7.5 mmHg og afterload var satt til 55 mmHg (trykket fra afterload-kolonnen).



Perfusion conditions:
 preload: 12.5 mmHg
 afterload: 65 mmHg



Figur 4. Bilde (øverst) og skjematisk figur av Langendorff- perfusjonsrigg.

Måling av hjertets oksidasjon av fett og glukose

For å kunne måle metabolismen av glukose og fett var bufferen tilsatt spormengder av radioaktivt merket glukose ([U- ^{14}C]-glukose) og fettsyrer ([9,10- ^3H]-palmitat). I forbrenningen av disse substratene produseres det henholdsvis $^{14}\text{CO}_2$ og $^3\text{H}_2\text{O}$, og det ble tatt prøver fra bufferen til faste tidspunkter underveis i forsøket for å bestemme mengden (dpm) av $^{14}\text{CO}_2$ og $^3\text{H}_2\text{O}$. På grunnlag av produksjonen av disse radioaktive nedbrytningsproduktene (dpm) og den spesifikke aktiviteten av radioaktiv glukose og palmitat (dpm/ μmol) beregnet vi så oksidasjonshastigheten av glukose og fettsyrer i hjertet (29, 30).

Måling av hjertefunksjonen og iskemisk toleranse

Slike målinger ble utført som beskrevet tidligere (9,17, 28). Kort oppsummert ble ventrikkelfunksjonen (VF) målt før og etter iskemi; et mikromanometer som ble ført inn i venstre ventrikkel (VV) via atriokanylen registrerte trykket som ble generert i VV. Den iskemiske episoden bestod av en 40 minutters periode med svært lav koronarflow, det vil si at koronarflow ble redusert til mindre enn 5% av normalverdien. Deretter ble hjertene reperfundert i 40 minutter og tilsvarende trykkmålinger som før iskemi ble gjennomført (9).

Det ble også målt ekspresjon (mRNA nivå) av fem PPAR α regulerte enzymer i biopsier fra lever og hjerte som hemmer glukoseoksidasjon og stimulerer fettoksidasjon: PDK4 (Pyruvat dehydrogenase kinase 4), CPT-I/CPT-II (Carnitin Palmitoyltransferase I/II) ACO (Acyl- CoA oksidase) og UCP2 (Uncoupling protein 2) (9).

Resultater

Mus som fikk sukrose-anriket fôr hadde etter 21-22 uker økt vekt og mer hvitt og brunt fettvev enn kontrollgruppen. De hadde også høyere konsentrasjoner av glukose og triglyserider (TG) i plasma (Tabell 1A+B).

Både FF og TTA behandlede mus fikk redusert plasmakonsentrasjon av TG, FA og glukose. Man så også en reduksjon i fettvev, og spesielt hos TTA behandlede mus var kroppsvekten betydelig redusert.

Hos FF behandlede mus var vekten noe høyere (dog ikke statistisk signifikant) enn for ubehandlede DIO-mus, noe som kan forklares med en betydelig økt levervekt. For TTA-behandlede mus var hjertets størrelse og vekt økt, mens leveren bare var lett forstørret.

Leveroksidasjon.

Både FF og TTA behandlede mus fikk en signifikant økning i hepatisk palmityl-CoA- oksidasjon. Man så også økt aktivitet av CPT- II og ACO i lever.

Hjertemetabolisme.

Substrat-oksidasjon ble målt i *ex vivo* hjerter, og som vist tidligere hos db/db mus fant vi økt FA oksidasjon og en resiprok redusert glukoseoksidasjon i hjerter hos DIO-mus.

I hjerter behandlet med FF så man en reduksjon i FA-oksidasjonen sammenlignet med den ubehandlede gruppen, samtidig som glukose-oksidasjonen var signifikant økt. I hjerter fra mus behandlet med TTA så vi imidlertid ingen reduksjon i FA-oksidasjonen.

Hjertefunksjon og iskemisk toleranse

Hjerter fra ubehandlede DIO-mus viste mekanisk dysfunksjon i form av redusert cardiac output (CO) og redusert trykkutvikling i forhold til kontrollgruppen. FF-behandling ga ikke liknende dysfunksjon (Tabell 2).

I kontrollgruppen (musene som fikk vanlig fôr) var det 5 av 7 hjerter som klarte å pumpe mot den satte afterload etter iskemi-episoden. Blant de ubehandlede DIO-musene var det bare 2 av 7, mens alle hjertene i FF-gruppen klarte dette. Disse hjertene viste en signifikant bedre iskemisk toleranse, det vil si økt trykkutvikling og CO (Tabell 2).

Hjerter fra TTA – behandlede mus klarte ikke å utøve tilstrekkelig kontraksjonsarbeid etter iskemi, og resultatene fra disse hjertene ble ikke benyttet.

Genuttrykks–analysen viste en oppregulering av alle fem PPAR α målgener i lever for både FF og TTA behandlede DIO-mus, mens uttrykket av disse genene var uendret i hjertet (ikke vist i tabell).

Diskusjon

DIO-mus viste en overvektig fenotype inkludert en moderat økning i plasmanivå av lipider, glukose og nedsatt glukoregulering. Behandling av DIO-mus med FF eller TTA ga et lavere plasmanivå av FA, TG og glukose samt redusert forekomst av fettvev hos som tidligere vist i db/db mus. (9, 12, 17, 29).

Tidligere eksperimentelle forsøk med db/db mus har vist at kardial dysfunksjon har sammenheng med endret metabolisme (10, 12). Dette forsøket viste også svekket kontraksjonskraft i hjerter fra DIO- mus.

TTA- behandling ga økt oksidasjon av FA i lever, og i tillegg en uventet økning av FA-oksidasjon i hjertet. De fleste hjertene fra TTA-behandlede mus klarte ikke å gjenoppta funksjon etter iskemi. Disse hjertene hadde også en betydelig grad av hypertrofi. Årsaken til denne hypertrofi-utviklingen er ikke kjent, men tolkes som at TTA utøver en direkte effekt på hjertet som motvirker den indirekte effekten av redusert FA- nivå i plasma (9).

Det er tidligere påvist at ekspresjonen av PPAR α , såvel FA-oksidasjonen, øker i i isolerte myocytter i nærvær av FA (som er naturlige ligander for disse reseptorene). Således skulle en tro at man ved behandling med syntetiske PPAR α agonister ville få lignende effekt. Imidlertid viser dette forsøket og tidligere forsøk på db/db mus at dette ikke er tilfelle (9, 19, 29).

FF-behandling reverserte det endrete metabolismemønsteret i DIO-mus, det vil si at den høye forbrenningen av FA ble redusert, samtidig som glukoseoksidasjonen økte. Denne reverseringen gir mer netto energi i forhold til O₂-forbruket i tillegg til redusert nivå av sirkulerende FA som i sin tur betyr mindre substrat for lipid-indusert myocyttskade og hypertrofi (16, 17, 18). Fallet i nivået av sirkulerende lipider (FA og TG) skyldes sannsynligvis den økte hepatiske FA-oksidasjon som vil drenerer lipider fra plasma. Den økte FA-oksidasjonen samsvarer også med økt hepatisk aktivitet av enzymene ACO og CPT II (Tabell 3) og dessuten økt uttrykk av fem målgenene for PPAR α .

FF-behandling forhindret kardiell dysfunksjon og ga i tillegg bedre iskemisk toleranse. Til sammenlikning har tidligere forsøk vist at diabetiske mus (db/db) som ble behandlet med en annen PPAR α agonist (K-111) ikke fikk bedret kontraktilitet, verken før eller etter iskemi (19). En forklaring på dette er at de iskemiske periodene i disse forsøkene var helt uten coronar flow (såkalt no-flow iskemi) i motsetning til det aktuelle forsøket, der det man hadde en viss koronarflow i den iskemiske perioden.. I tillegg ser man en mer moderat endring av metabolismen i hjerter hos DIO-

mus i forhold til diabetiske db/db mus (9). Dette kan indikere at behandling med preparater brukt i dette forsøket (først og fremst FF) vil kunne reversere den endrede substratmetabolismen, men ikke gi utslag i hjertefunksjon hos personer med fullt utviklet DM2. Derimot vil det kanskje kunne være preparater som kan brukes i tidlige stadier av en utvikling mot diabetes (fedme) og derved kunne bremse, eller i beste fall forhindre utvikling mot en mer fulminant tilstand (5). Tendensen til bedret iskemisk toleranse når coronar flow er redusert, vil også kunne være av betydning i langt utviklet sykdom og coronarsykdom/hjertesvikt. Om hjertefunksjon hos DIO- mus vil være bedret etter iskemi-episoder uten flow som i det nevnte forsøket (19) gjenstår å se.

Fibrater, deriblant FF, har i rundt 30 år hatt en plass i medikamentell terapi for kombinert hyperlipidemi (hyperkolesterolemi og hypertriglyseridemi) og er godkjent på markedet i svært mange land, men forløpig ikke markedsført i Norge. Tidligere studier har vist en reduksjon i risiko på 34 % for kardiovaskulær død etter behandling med fibrater hos pasienter med kombinert hyperlipidemi (26).

Disse resultatene, i sammenheng med resultatene fra forsøk gjort ved Avdeling for medisinsk fysiologi, Institutt for medisinsk biologi, UiTø, tilsier at DM2 – pasienter kan ha nytte av slike medikamenter for å reversere den endrede metabolismen og redusere risiko for både utvikling av DK, kardiovaskulære hendelser og dødsfall som følge av dette. En risiko ved bruk av fibrater er at de interagerer med statiner, kolesterolsenkende midler som er hyppig brukt ved hyperkolesterolemi for å forebygge kardiovaskulær sykdom, og kan gi bivirkning i form av toksisk myopati (26).

Det er vist at den tidligste endringen ved fedme og utvikling mot DM2 er økt FA metabolisme og høyere plasmanivåer av fettsyrer (12). Man kan i så måte se for seg at man for å unngå tidlig endring av substratforbruk også må intervensere på et tidlig tidspunkt for optimal effekt av PPAR agonist-preparater (5). Likevel er endringene moderate og DM2 såvel som DK er vanskelig å diagnostisere på et tidlig tidspunkt i forløpet (1, 3, 5, 10). I tillegg til nye medikamentelle alternativer kan det se ut som det i framtiden derfor også må fokuseres på diagnostikk og eventuelle nye metoder/kriterier for å kunne igangsette medikamentell terapi tidligst mulig.

I tidlige stadier, og ved diagnosetidspunktet for DM2 vil fokus tradisjonelt sett ligge på kostholdsendring og mosjon (1,3). Dette er effektiv egenbehandling som dessverre ikke alltid lar seg gjennomføre i tilfredsstillende grad for mange pasienter. Ifølge retningslinjene til Norsk

handlingsprogram for diabetes skal medikamentell intervensjon finne sted når man ikke oppnår glykemisk kontroll ved konservative metoder (3).

Det foreløpige foretrukne preparatet i DM2 behandling er metformin. Det senker glukosenivået samtidig som det øker insulinproduksjonen. Ulike kombinasjoner med andre typer medikamenter prøves ved ufullstendig glykemisk kontroll. Ved lav toleranse eller dårlig kontroll med perorale antidiabetika legger man til insulin-injeksjon (3).

PPAR- γ angonister som rosiglitazon kalles gjerne insulin-sensitisers. Det fins i Norge både som monopreparat og i kombinasjon med metformin. Indikasjonen er ufullstendig kontroll med førstevalgspreparater både før og etter eventuell oppstart med insulin (3). Én grunn for at PPAR γ agonistene ikke brukes som 1. valgspreparat er at det er rapportert bivirkninger i form av væskeretensjon og anemi. Man har også sett hjertesvikt som direkte komplikasjon, mest ved administrasjon i kombinasjon med insulin (27). I tillegg er preparatene nye og man har mindre erfaringer på langtidseffekter (2).

Hvorvidt den økte levervekten man så i dette forsøket, særlig ved FF behandling (tentativ mekanisme; økt opptak av FA i lever) er uttrykk for en eventuell skadevirkning på leveren synes ikke tilstrekkelig klarlagt. Det er sannsynlig at man med videre studier også på større dyremodeller vil kunne få verdifull kunnskap om virkning og eventuelle bivirkninger som er lettere overførbare til menneskelig fysiologi.

Tendensen til hypertrofi ved TTA – behandling er uheldig og vil forverre en tilstand med DK som ledd i en hjertesvikt. TTA har altså, på tross av forslag om at den er en selektiv PPAR α agonist, andre egenskaper enn FF. Dette er et funn som indikerer at TTA ikke har gunstig effekt for hjertefunksjonen på tross av at den normaliserer nivåene av TG, FA og glukose i plasma.

Som konklusjon vil hovedstrategien i diabeteskontroll, som er kostholds,- og livsstilsendring, fortsatt være avgjørende for kontroll av kronisk hyperglykemi og insulinresistens i DM2. PPAR α agonister viser seg å ha gunstig effekt på DIO-mus ved å øke lever-oksidasjonen, og derved senke nivået av glukose, TG og FA i plasma. FF ga endret hjertemetabolisme i favør av glukoseoksidasjon som var assosiert med bedret hjertefunksjon både pre- og post-iskemisk. Tentativt må slik medikamentell intervensjon skje på et tidlig stadium i utvikling av DM2 og DK for å ha best kardioprotektiv effekt. Med framtidsrettet forskning på PPAR agonister kan man komme nærmere nye behandlingsalternativer som potensielt kan bidra til å senke co-morbiditeten og mortaliteten hos den raskt økende gruppen DM2-pasienter.

Tabell 1. Kropps,- lever,- og fettvevvekt (panel A), plasma nivå av glukose, frie fettsyrer (FA) og triacylglycerol (TG) (panel B) i kontroll og diettindusert overvektige (DIO)- mus med og uten fenofibrat (FF) eller TTA.

| A | Kontroll (n=15) | DIO (n=15) | DIO + FF (n=15) | DIO + TTA (n=14) |
|---------------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------|
| Kroppsvekt (g) | 42.5±1.0 | 45.9±1.3 # | 49.6±2.1 | 41.7±0.5 * |
| Kroppsvektøkning (%) | 6.39±1.53 | 16.80±3.85 # | 14.03±2.36 | 1.61±1.85 * |
| Hjertevekt (tørrvekt, mg) | 43.2±1.0 | 46.0±1.6 | 49.5±1.4 | 54.7±1.1 * |
| Hjertevekt / kroppsvekt | 1.02±0.03 | 0.96±0.02 # | 1.03±0.02 | 1.30±0.02 * |
| Levervekt (g) | 1.75±0.06 | 1.79±0.11 | 4.38±0.20 * | 2.51±0.05 * |
| HFV / kroppsvekt (%) | 0.41±0.08 | 1.19±0.18 # | 0.65±0.09 * | 0.49±0.03 * |
| BFV / kroppsvekt (%) | 0.28±0.03 | 0.51±0.07 # | 0.31±0.05 * | 0.25±0.01 * |
| B | Kontroll | DIO | DIO + FF | DIO + TTA |
| Glukose (mM) | 10.3±0.5 (15) | 14.6±0.6 # (14) | 12.6±0.3 * (14) | 12.0±0.5 * (14) |
| TG (mM) | 1.26±0.10 (14) | 1.56±0.11 # (14) | 1.15±0.08 * (11) | 0.93±0.08 * (14) |
| FA (mM) | 0.92±0.11 (10) | 0.72±0.09 (10) | 0.49±0.07 * (8) | 0.32±0.045 * (7) |
| Insulin (ng/ml) NB | 0.78±0.09 (6) | 1.01±0.08 (7) | 1.21±0.24 (6) | 0.84±0.08 (5) |

Økning i kroppsvekt ble målt over den 11-12 ukers behandlingsperioden. Verdiene er gjennomsnitt for gruppen, og tallene i parentes angir antall dyr i hver gruppe. HFV, perirenalt hvitt fettvev; BFV, brunt fettvev. # p< 0.017 vs. kontroll. * p< 0.017 vs. DIO.

Tabell 2. Hjertefunksjon før og etter 40 min. lav-flow iskemi i kontroll og DIO mus med og uten fenofibrat (FF).

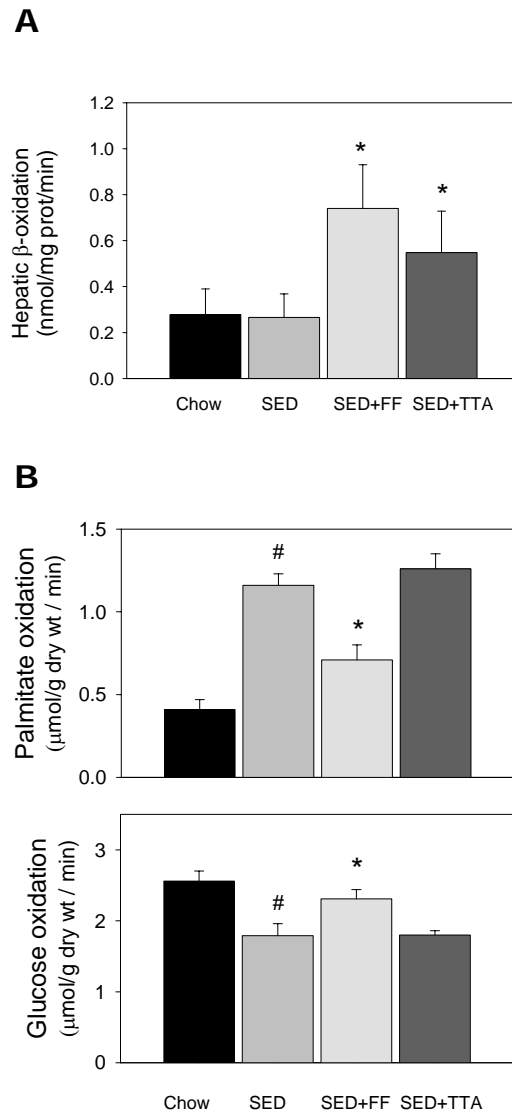
| | Kontroll (n=8) | DIO (n=8) | DIO+FF (n=7) |
|---------------------------------|-------------------|--------------|-----------------|
| Pre-iskemisk funksjon: | | | |
| VVT (mmHg) | 83.8±1.6 | 79.5±1.6 | 84.2±1.9 |
| dP/dt _{max} (mmHg/sek) | 4739±126 | 4761±174 | 5166±171 |
| dP/dt _{min} (mmHg/sek) | -4058±94 | -3812±61 | -4298±198 * |
| CO (µL/min/mg tørrvekt) | 302±7 | 267±9 # | 290±7 |
| CF (µL/min/mg tørrvekt) | 88±2 | 89±2 | 80±4 * |
| HK (mJ/min/mg tørrvekt) | 3.37±0.10 | 2.84±0.13 # | 3.25±0.12 * |
| Post-iskemisk funksjon: | | | |
| VVT (mmHg) | 59.8±6.3 | 49.1±7.7 | 72.7±4.3 * |
| dP/dt _{max} (mmHg/sek) | 3283±407 | 2831±500 | 4393±332 * |
| dP/dt _{min} (mmHg/sek) | -2744±386 | 2205±387 | -3625±255 * |
| CO (µL/min/mg tørrvekt) | 157±35 | 101±24 | 209±22 * |
| CF (µL/min/mg tørrvekt) | 68±7 | 64±7 | 75±9 |
| HK (mJ/min/mg tørrvekt) | 1.45±0.41 | 0.80±0.28 | 2.09±0.30 * |

Alle hjerter ble pacet på 8 Hz. Et mikromanometer ble ført inn i venstre ventrikkel, og målte venstre venstre ventrikkel generert trykk (VVT) og tidsderivatene av trykkforandringene (dP/dt_{max} og dP/dt_{min}) ble beregnet. Coronar flow (CF), ble målt ved prøver tatt til bestemte tidspunkter og aorta flow (AF) via en dråpeteller. Cardiac output (CO) ble beregnet som summen av AF and CF.

Hjertekontraktiliteten (HK) ble kalkulert fra CO and VVT (HK=CO*VVT). # p< 0.025 vs. kontroll;

* p< 0.025 vs. DIO.

Figur 5. Viser grafisk framstilling av resultatene i tabell 1B. A viser hepatisk betaoksidasjon, B viser Palmitat oksidasjon (øverst) og glukoseoksidasjon i isolerte perfunderte hjerter fra kontroll (Chow), DIO mus (SED), FF behandlede (SED+FF) og TTA behandlede (SED + TTA)



REFERANSER

1. Grendstad, Møinichen, Vaaler. Diabeteshåndboken, 2.utg. 19-52 Universitetsforlaget. (1999)
2. Wild, Roglic, Green et.al. Global prevalence of diabetes. *Diabetes Care* 27; 5: 1047-1053 (2004)
3. Claudi, Midthjell, Cooper, Daae, Furuseth, Hanssen. NSAM, Norsk handlingsprogram for diabetes. (www.nsamdiabetes.no)
4. Simpson, Corabian, Jacobs, Johnson. The cost of major comorbidity in people with diabetes mellitus. *CMAJ*, 168;13 (2003)
5. Rodrigues, Cam, McNeill. Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. *Molec. And Cell. Bioch.* Volume 180; 1: 53-57 (1998)
6. Jagasia D, McNulty PH. Diabetes Mellitus and heart failure. *Congestive Heart Failure* 9;3 133-139 (2003)
7. Severson, D.L. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy – cardiac efficiency in hearts from diabetic mice. Review. (2001)
8. Cosson S, Kevorkian JP. Left ventricular diastolic dysfunction; an early sign of diabetic cardiomyopathy? *Diabetes and Metabolism* 29; 5: 455-466 (2003)
9. Aasum, Khalid, How, Larsen et. al. Modulation of cardiac and hepatic metabolism via PPAR agonists in diet-induced obese mice – impact on ischemic tolerance. (Upublisert, 2007)
10. Hayat A, Patel, B, Khattar, RS, Malik RA. Diabetic cardiomyopathy. Mechanisms, diagnosis and treatment. *Clinical Science*, 107: 539 – 557. (2004)
11. Choi, Zhong, Hoit et.al. Defective intracellular Ca^{2+} signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1398-H1408 (2002)
12. Belke, Larsen, Gibbs, Severson. Altered metabolism cause cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E1104-E1113 (2000)
13. Severson, D.L, Carley A.N. Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts. *BBA Acta* 1734: 112-126 (2005)
14. Lopaschuk G, Stanley W, Recchia F. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol. Rev.* 85: 1093 -1129 (2005)

15. How, Aasum, Severson, Larsen et. al. Influence of substrate supply on cardiac efficiency, as measured by pressure-volume analysis in ex vivo mouse hearts. *Am J Ph. Heart Circ Physiol* 288: H2979-H2985 (2005)
16. Mjøs, O. Effect of the free fatty acids on myocardial function and oxygen consumption in intact dogs. *J clin Invest* 50: 1386-1389 (1971)
17. Aasum, Cooper, Severson et.al. Effect of BM 17.0744, a PPAR α ligand, on metabolism of perfused hearts from control and diabetic mice. *Can J Physiol Pharmacol.* 83; 2:183-190 (2005)
18. Kota BP, Huang T, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological research* 51, 85-94 (2005)
19. Van der Lee, K. Fatty acid-mediated gene expression in the cardiac muscle. *Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.* 25-74 (2001)
20. Finck BN, Han X, Courtois M, Nerbonne JM et.al. A critical role for PPAR-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: Modulation by dietary fat content. *PNAS*, 100; 3: 1226-1231 (2003)
21. Hexeberg, Retterstøl. Hypertriglyceridemi – diagnostikk, risiko og behandling. *Tidsskriftet*, 124: 2746-9 (2004)
22. McCulloch DK. Thiazolidinediones in the treatment of Diabetes Mellitus. (<http://patients.uptodate.com/topic.asp?file=diabetes/12781>) (2006)
23. Deeb, SS, Fajas, L, Nemoto, M, et al. A Prol12Ala substitution in PPAR gamma 2 is associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet.* 20: 284-287.(1998).
24. Aasum E, Belke D, Severson DL et. al. Cardiac function and metabolism in Type 2 diabetic mice after treatment with BM 17.0744, a novel PPAR - α activator. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H949-957 (2002)
25. Lopaschuk GD, Barr RL. Measurements of cardiovascular function. *CRC Press Inc.* Ch. 1-3. (1997)
26. Larsen TS, Dani R, Giles RW, Severson DL. The isolated working mouse heart; methodological considerations. *Pflügers Arch* 437: 979 – 985. (1999)
27. Taegtmeyer H, Golfman L, Sharma S et.al. Linking gene expression to function: metabolic flexibility in the normal and diseased heart. *Ann N Y Acad Sci* 1015: 202-213 (2004)

28. Taegtmeyer H, McNulty P, Young ME Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I: general concepts. *Circulation*. 105;14: 1727-33. Review. (2002)
29. Young ME, McNulty P, Taegtmeyer H. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part II: potential mechanisms. *Circulation* 105;15: 1861-70 (2002)
30. Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N. and Newsholme, E.A. The glucose-fatty acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, 785–789 (1963)
31. Opie, Lionel H. *Heart physiology*. 4. Ed. Lippincott Williams and Wilkins. 324-336. (2004)