

Ранні маркери гострої доксорубіциніндукованої кардіотоксичності та механізми її розвитку

М.В. Денисова, Н.А. Струтинська, Ю.П. Коркач, Л.А. Мись, О.М. Магомедов, Р.Б. Струтинський, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: mayadenisova81@gmail.com

Аритмії та застійна серцева недостатність, що становлять найбільший ризик при виникненні токсичної кардіоміопатії, є клінічно лімітуючою побічною дією доксорубіцину – основного високоактивного протипухлинного засобу. Важкість ранньої діагностики кардіоміопатії та своєчасне виявлення серцевої дисфункції, пов'язаної з хіміотерапією, залишається суттєвою проблемою медицини. Метою нашої роботи було виявлення ранніх ознак розвитку гострої доксорубіциніндукованої кардіотоксичності у дорослих щурів, оцінюючи зміни електрокардіограми (ЕКГ) та біохімічні маркери пошкодження міокарда. Гостру кардіотоксичність моделювали короткостроковим введенням внутрішньоочередово доксорубіцину у загальній дозі 15 мг/кг. На 5-ту добу експерименту було досліджено візуальні флуктуації форм хвиль ЕКГ, тривалість та амплітуду основних зубців і інтервалів, а також частоту серцевих скорочень у контрольній та дослідній групі щурів для визначення ранніх ЕКГ-ознак кардіотоксичності. Найбільш значущою зміною ЕКГ було збільшення вдвічі тривалості інтервалу QT та значна елевация сегмента ST у щурів дослідної групи. В експериментах на ізольованих кільцях аорти нами було показано доксорубіциніндуковані порушення механізмів як розслаблення, так і скорочення судин. Ендотелійзалежна релаксація судинних препаратів тварин після введення доксорубіцину на дію ацетилхоліну (0,1 мкмоль/л) була меншою на 47%, ніж у контрольній групі. Скорочення судинних кілець щурів на діюнорадреналіну (10 мкмоль/л) були меншими на 59% порівняно з контрольними щурами. Після введення доксорубіцину на тлі серцево-судинних порушень розвивався оксидативний стрес. Так, у мітохондріях серця дослідних щурів вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів, а саме дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду збільшився у 4 та 2,5 рази відповідно. При цьому в ізольованих мітохондріях серця збільшувалася у 3,7 рази активність індукцйбельної NO-синтази із одночасним значним пригніченням у 4,8 рази конститутивної NO-синтази. У плазмі крові виявлено підвищення вмісту гострофазових біохімічних показників, що є маркерами пошкодження, а саме аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази та серцевої фракції креатинфосфокінази у 2,2, 1,4 та 1,5 рази відповідно. Отже, результатом гострої кардіотоксичної дії доксорубіцину є зміни систоло-діастолічної функції лівого шлуночка та його провідності, автоматизму і скоротливості, а також порушення розслаблення та скорочення препаратів аорти на тлі посилення оксидативного стресу та збільшення вмісту біохімічних маркерів пошкодження міокарда, що супроводжувалося зменшенням конститутивного синтезу NO.

Ключові слова: доксорубіцин; електрокардіограма; судинні реакції; оксидативний стрес; NO-синтази; маркери пошкодження міокарда.

ВСТУП

Доксорубіцин (або адріаміцин) вперше було виділено з колоній *Streptomyces peucetius caesius* у 1967 р. Із тих пір були ідентифіковані та вивчені сигнальні шляхи, що призводять до розвитку раку, і розроблені різноманітні

терапевтичні агенти, спрямовані на них [1]. Але, незважаючи на те, що такі препарати зазвичай мають менше побічних ефектів, резистентність пухлин до них розвивається швидко [2]. Тому доксорубіцин – основний клінічний протираковий засіб, який найбільш

широко призначається [3]. Слід зазначити, що цей препарат негативно впливає на нейрони, нирки, слизові оболонки тощо, але найбільш лімітуючою побічною дією є токсичний вплив на серцево-судинну систему. Серцева дисфункція, спричинена хіміотерапією, залишається основною проблемою, яка ускладнюється важкістю раннього виявлення перших ознак кардіотоксичності [4].

Побічні ефекти доксорубіцину з боку серцево-судинної системи часто проявляються у вигляді зміни електрокардіограми (ЕКГ). ЕКГ є одним із основних способів дослідження серця і діагностики захворювань серцево-судинної системи через його ефективність та неінвазивність, який також застосовують для оцінки серцевої токсичності в експериментальній кардіології [5]. Патологічні ознаки, пов'язані зі захворюваннями або впливом токсичних речовин, виявляються на ЕКГ гризунів і людей однаковими. Такі зміни, як збільшення зубця Р, подовження інтервалу PQ, подовження QRS, відхилення осі QRS, патологічний зубець Q або елевація сегмента ST, зміни зубця Т, якщо їх порівнювати з супутніми оцінками гістології, мають високу прогностичну цінність для багатьох форм серцево-судинних захворювань у щурів. Кардіальна токсичність, спричинена дією доксорубіцину, має широкий клінічний спектр і проявляється ранніми та пізніми ефектами. Саме ранні ефекти можна виявити на ЕКГ: елевацію сегмента ST, зміни амплітуди зубців та тривалості комплексу QRS, подовження інтервалів PQ та QT, аритмії та зміну частоти серцевих скорочень (ЧСС) [5].

Основною метою хіміотерапії раку є не лише загибель пухлинних клітин через пригнічення клітинної проліферації, а й токсичне ураження функціонуючого судинного ендотелію, оскільки такі клітини потребують його для росту та проліферації [6]. Показано, що доксорубіцин *in vitro* індукує підвищення проникності ендотелію та важку ендотеліальну дисфункцію, збільшення артеріальної жорсткості, а також порушення

регуляції судинного тону, ангиогенезу та репарації судин [7].

Відомо, що для забезпечення ендотелію залежного розслаблення судин вкрай важливим фактором є біодоступність периферичного вазодилатора – оксиду азоту (NO), котрий являє собою сигнальну молекулу у серцево-судинній системі. Так, під дією кальційзалежної конститутивної NO-синтази відбувається метаболізм L-аргініну, що є основним шляхом синтезу NO в судинах. У гладеньких м'язах NO активує гуанілатциклазу з подальшим утворення циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ) і активації цГМФ-залежної протеїнкінази, яка стимулює відтік внутрішньоклітинного Ca^{2+} та їх розслаблення [8]. Отже, однією з причин порушення ендотелію залежного розслаблення судин є недостатня біодоступність NO, що може виникати як на тлі підвищеного оксидативно-нітрозативного стресу, так і внаслідок порушення утворення інших сполук, зокрема, ендогенного сірководню [9].

У попередньому нашому дослідженні [10] було продемонстровано доксорубіцино-посередкований розвиток мітохондріальної дисфункції у серці щурів через зменшення продукції ендогенного сірководню на тлі значного посилення окисного метаболізму і, як наслідок, підвищену чутливість до Ca^{2+} -залежної втрати функції, що пояснюється підвищеною активністю мітохондріальної пори (МП). Було показано, що в основі доксорубіцинової моделі кардіоміопатії лежить ураження кардіоміоцитів причиною якого є тривала деполяризація внутрішньої мітохондріальної мембрани та вивільнення у цитозоль апоптогенних факторів. Отже, доксорубіцин через «перепрограмування» метаболізму та зміну регуляції мітохондріального біогенезу призводить до зменшення енергетичних резервів серця, оскільки пошкоджені мітохондрії втрачають здатність синтезувати АТФ. Цей процес супроводжується накопиченням активних форм кисню та азоту, продуктів перекисного

окиснення ліпідів та порушення синтезу таких сигнальних молекул, як сірководень та оксид азоту, і може лежати в основі розвитку патології серцево-судинної системи, що має вирішальне значення при індукції кардіоміопатії.

Метою нашої роботи було виявлення ранніх ознак розвитку гострої доксорубіцин-індукованої кардіотоксичності у дорослих щурів, оцінюючи зміни ЕКГ, активність синтаз оксид азоту, показники окисного метаболізму, а також біохімічні маркери пошкодження міокарда.

МЕТОДИКА

Експерименти виконані на щурах-самцях лінії Вістер масою 250–350 г, віком 6 міс. Тварини знаходилися у віварії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де їх утримували на стандартному харчовому раціоні. Всі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Міжнародних принципів Європейської конвенції (Страсбург, 1986). У дослідженні використовували доксорубіцин «Ебеве» 50 мг/25 мл («Фарма Гесюмюб», Австрія).

Тварин рандомізовано розподілили на дві групи. Щурам контрольної групи внутрішньоочеревинно вводили фізіологічний розчин (5 мл/кг); тваринам дослідної групи – загальну кумулятивну дозу доксорубіцину (15 мг/кг) протягом 2 днів із виведенням тварин з експерименту на 5-ту добу.

Електрокардіографічне дослідження. Перед ЕКГ-дослідженням щурам ($n = 20$) вводили уретан (150 мг/100 г маси внутрішньоочеревинно). Цей седативний препарат був обраний з огляду його найменшого впливу на показники ЕКГ порівняно з іншими анестетиками [11]. Глибину наркозу оцінювали клінічно за педальним рефлексом. Тварину вкладали на операційний стіл, розміщуючи фронтально у вентральному положенні, фіксуєючи кінцівки та голову. Під шкіру кінцівок вводили голчасті електроди. ЕКГ реєструва-

ли на швидкості плівки 50 мм/с, калібровка 1 мВ – 10 мм. Електричні потенціали з поверхні тіла гризунів записували за допомогою портативного 12-канального ЕКГ-апарата HEARTSCREEN 80G-L1 Innomed Medical (Україна). Стандартна система включає біполярні відведення I, II, III та додаткові уніполярні відведення aVL, aVR, aVF, що фіксують різницю потенціалів у фронтальній площині. Біполярна система розміщує відведення на правій верхній (червоний електрод), лівій верхній кінцівці (жовтий електрод) та лівій нижній кінцівці (зелений електрод), права нижня – заземлення (чорний електрод). Після завершення реєстрації ЕКГ тварин виводили із експерименту.

За II стандартним відведенням визначали зміни ЧСС, тривалість проміжку RR, інтервалів PR, QT, тривалість та амплітуду зубців комплексу QRS, зміни сегмента ST. Використовували значення QTc, яке коригували за ЧСС і вираховували за формулою Sagie (Framingham): $QTc = QT + (0,154(1-RR)) \cdot 1000$. У нормі на ЕКГ щура відсутній зубець Q, інтервал ST короткий та зливається з асиметричним зубцем T. У нашому дослідженні ізоелектричну точку визначали як середнє значення 5 найнижчих відповідних ділянок, що виникають перед зубцем R. Зубець Q приймали за ділянку, в якій ізоелектрична лінія перехоплює екстраполяцію підйому зубця R. За кінець зубця S приймали точку, в якій напруга збільшувалася від мінімуму (пік зубця S) до перехрещення з ізолінією. За верхівку зубця T вважали хвилю після зубця S, в якій середнє значення 5 найближчих комплексів є максимальним.

Реєстрація скорочення-розслаблення препаратів аорти. Досліди проводили на ізольованих, перфузованих при 37°C нормальним розчином Кребса, кільцевих смужках грудної аорти щурів. Ізольовані судинні кільця мали діаметр 2 мм, ширину 1,5 мм. Усі тестування здійснювали в ізометричному режимі при початковій заданій напруженості,

при якій вони генерували максимальну силу у відповідь на інфузію норадреналіну (10 мкмоль/л). Температуру розчину в експериментальній камері (37°C з точністю до $\pm 0,5^\circ\text{C}$) підтримували за допомогою автоматичного термостата KISS 208B «Huber». Робочий розчин насичували киснем за допомогою карбогену (газова суміш 95% O_2 і 5% CO_2). Перед вимірюванням препарати, закріплені в експериментальній камері, витримували протягом 60 хв у нормальному розчині Krebsa такого складу (ммоль/л): NaCl – 120,4; KCl – 5,9; NaHCO_3 – 15,5; NaH_2PO_4 – 1,2; MgCl_2 – 1,2; CaCl_2 – 2,5; глюкоза – 11,5. Дослідження ефектів скорочення-розслаблення препаратів аорти проводили, застосовуючи норадреналін та ацетилхолін.

Визначення маркерів оксидативного стресу та активності NO-синтаз. Дієнові кон'югати (ДК) виявляли вилученням ліпідів із зразків органічним розчинником (гептан/ізопропанол 1:1) та вимірюванням оптичної густини при $\lambda = 232$ нм. Вміст ДК обчислювали за допомогою молярного коефіцієнта поглинання $21000 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Метод визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА) базувався на його реакції з 2)-тіобарбітуровою кислотою та утворенні триметинового комплексу з максимумом поглинання при $\lambda = 532$ нм [12]. Вміст МДА обраховували за допомогою молярного коефіцієнта поглинання $15600 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Активність конститутивної NOS (cNOS) та індукцйбельної NOS (iNOS) виявляли за здатністю NOS використовувати L-аргінін як субстрат при виробництві L-цитруліну [13]. Концентрацію утвореного L-цитруліну реєстрували спектрофотометрично при $\lambda = 465$ нм. Активність cNOS вираховували як різницю між значеннями сумарної активності NOS та iNOS і виражалася у пікомолях новоутвореного L-цитруліну протягом 1 хв на 1 мг загального білка у зразку.

Визначення вмісту глюкози та маркерів пошкодження міокарда. Вміст аланінаміно-трансферази (АЛТ), аспаратамінотранс-

ферази (АСТ), креатинінфосфокінази міокардіальної фракції (КФК МБ) та глюкози визначали у плазмі крові за допомогою біохімічного аналізатора Cobas 311 – фотометричної системи з іон-селективними електродами. Для дослідження використовували тест-системи Roche Diagnostics (Німеччина).

Для статистичної обробки результатів розраховували середнє арифметичне варіаційного ряду (M), а для оцінки ступеня мінливості її вибіркового значення визначали середню помилку (m). Результати обробляли за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel. Для визначення статистичної значущості відмінності між двома вибірками використовували непараметричний критерій Манна-Уїтні (U) та критерій t Ст'юдента. За критерієм U знаходили відмінність двох вибірок (P), яку вважали вірогідною при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ми оцінювали візуальні флуктуації форм хвиль ЕКГ у щурів після гострого введення доксорубіцину, щоб визначити ЕКГ-показники для ранньої діагностики кардіотоксичності, а саме: тривалість та амплітуду основних зубців та інтервалів, а також ЧСС (табл. 1). На рис. 1, а продемонстровано відносні зміни показників ЕКГ при доксорубіциніндукованій кардіотоксичності у дорослих щурів порівняно з контрольними.

Так, на ЕКГ щурів після введення доксорубіцину спостерігали незначно пригнічену АВ-провідність у вигляді розширеного на 3,3 мс інтервалу PR (див. табл. 1) порівняно з контролем. Цей інтервал відображає поширення деполяризації від передсердь до шлуночків серця і характеризує роботу АВ-з'єднання. Він визначається вимірюванням часу від початку зубця P до початку комплексу QRS, який відображає збудження шлуночків і клінічно відповідає систолі шлуночків, своїм початком має зубець Q, а закінчується у щурів точкою переходу зубця S у T. У

Таблиця 1. Зміни основних показників електрокардіограми дорослих щурів (M ± m, n = 10)

Схема досліджу	Тривалість, мс						Амплітуда, мВ		Частота серцевих скорочень, хв ⁻¹
	PR	QRS	ST	RR	QT	QTc	R	STe	
Контроль	50,43± 2,07	21,86± 1,77	30,24± 1,14	129,0 ± 7,40	52,82 ± 1,79	185,54± 1,38	0,252± 0,028	0,14 ± 0,008	457,33 ± 26,43
Доксору- біцин	53,71± 5,09	27,57± 4,50*	82,41± 5,03**	156,80± 8,43**	110,67± 5,22**	237,17± 6,74**	0,238± 0,060	0,242± 0,072*	373,17± 28,53

Примітка: тут і в табл. 2 і 3. *P<0,05; **P<0,01 щодо контрольної групи

нашому дослідженні показано розширення на 30% комплексу QRS у тварин дослідної групи (див. рис. 1, а), що свідчить про порушення внутрішньошлуночкової провідності внаслідок ультраструктурних морфологічних змін міокарда, серед яких: поділ вставного диска, розпад міофібрилярного апарата, загибель кардіоміоцитів внаслідок апоптозу, вакуолізацію цитоплазми, набухання т-тубулярної системи, мітохондрій та саркоплазматичного ретикулула – які потенційно можуть призвести до аномальної рефрактерності [14]. Слід відмітити зменшення амплітуди зубця R комплексу QRS на 0,014 мВ (на 6 %) у щурів дослідної групи (див. табл. 1; рис. 1, б), що говорить про погіршення інотропної функції лівого шлуночка.

У наших експериментах було виявлено збільшення на 22% тривалості інтервалу RR (див. табл. 1) у щурів після введення доксорубіцину, що суттєво зменшило на 84 хв⁻¹ ЧСС у цих тварин. Інтервал RR – це час між послідовними піками зубця R [11], що має значення для обчислення ЧСС. Відомо, що причиною цього явища може бути фіброз сіноатріального вузла та апоптоз його клітин [15].

Слід відмітити також, що тривалість QT збільшилася вдвічі (P < 0,01) та QTc на 27% (P < 0,01) після введення доксорубіцину (див. рис. 1, а; 2). Інтервал QT описує час від зубця Q до кінця T і відображає час деполяризації та реполяризації кардіоміоцитів шлуночків. Збільшення його тривалості свідчить про порушення електричної активності серця

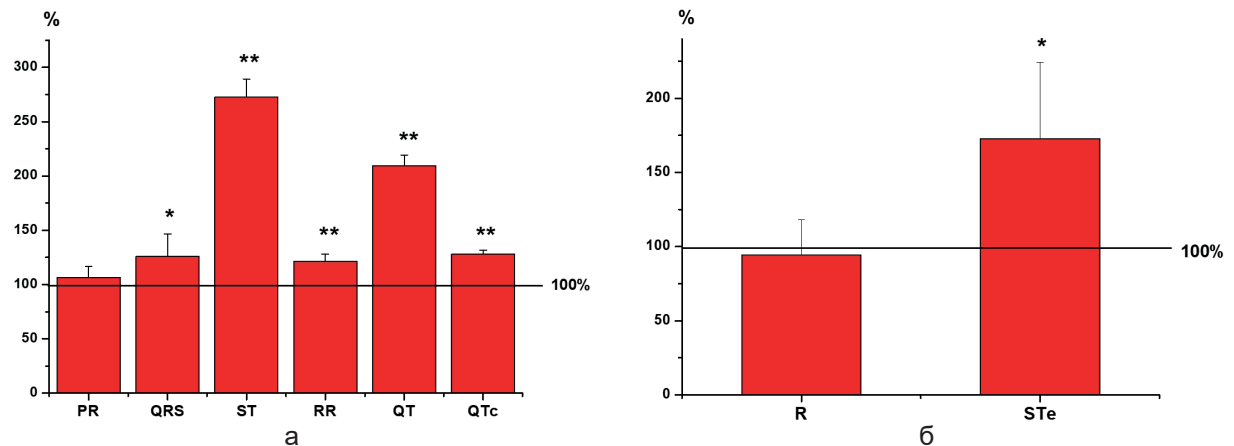


Рис. 1. Вплив доксорубіцину на нормовані значення тривалості інтервалів PR, QRS, ST, RR, QT, QTc (а) та амплітуди зубця R і сегмента ST (б) на ЕКГ дорослих щурів. *P < 0,05, **P < 0,01 щодо значень контрольної групи, які прийнято за 100%

через, у тому числі, і токсичний вплив лікарських препаратів. Оскільки тривалість інтервалу QT залежить від ЧСС, для більш об'єктивної оцінки розраховували коригований QTc. Подовження інтервалу QT та QTc внаслідок прийому протипухлинних препаратів, особливо антрациклінів, є величезною проблемою у онкології [16]. У деяких працях описано, що подовження інтервалу QT та QTc, яке виникає при лікуванні доксорубіцином пацієнтів з онкологією, зумовлене подовженням потенціалів дії кардіоміоцитів шлуночків [14], корелює з тяжкістю гістологічного ураження серця та може бути маркером раптової серцевої смерті. Тому подовження цих інтервалів є найбільш точним і прогностично раннім ЕКГ-маркером кардіотоксичності антрациклінів.

Ми спостерігали виражену елевацію сегмента ST на 73% ($P < 0,05$) у щурів після введення доксорубіцину (рис. 1,б; 2), а також його подовження у 1,7 раза ($P < 0,01$; див. рис. 1,а; 2) порівняно з контрольними тваринами. Сегмент ST відповідає за час, коли шлуночки деполяризовані, і визначається як проміжок від кінця комплексу QRS до початку зубця T. У нормі він є ізоелектричним і відіграє ключове значення у діагностиці ішемії міокарда.

Однією з причин таких патологічних змін у роботі серця може бути дисфункція кровопостачання міокарда. В експериментах на ізольованих судинних кільцях аорти нами показано доксорубіциніндуковані

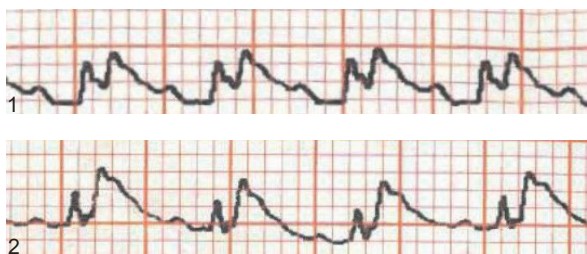


Рис. 2. Елевація та подовження сегмента ST, подовження інтервалу QT на ЕКГ щурів після введення доксорубіцину (швидкість плівки 50 мм/хв, 1 мВ = 10 мм): 1 – елевація ST до 3 мм, подовження QT до 0,1 с; 2 – елевація ST до 3,5 мм, подовження QT до 0,12 с

порушення механізмів як розслаблення, так і скорочення судин (рис. 3). Зокрема, зниження ендотелійзалежних вазодилаторних ефектів ацетилхоліну може свідчити про зміни у системі оксиду азоту, який є потужним механізмом релаксації судин, в тому числі і через такі сигнальні шляхи, як активація цГМФ та АТФ-чутливі калієві канали [17]. Наведені вище ознаки ішемії міокарда без атеросклеротичного ураження коронарних судин у щурів після введення доксорубіцину можуть бути саме наслідком порушення ендотелійзалежної релаксації коронарних судин. Зокрема, в наших експериментах релаксація судинних препаратів у дослідних тварин при дозі ацетилхоліну 0,1 мкмоль/л була майже вдвічі меншою (на 47%, $P = 0,038$), ніж у контролі. При дозі ацетилхоліну 1 мкмоль/л така різниця у ефектах вазорелаксації становила 20% (див. рис. 3, а).

Вірогідно, що в ішемічні зміни міокарда без атеросклеротичного ураження коронарних судин у щурів після введення доксорубіцину може включатись сигнальний шлях ендотеліну (ET-1), оскільки експресія його вазоконстриктора та рецепторів збільшена в міокарді тварин, що отримували препарат [18]. Вазоконстрикторна активність ET-1 у судинах у нормі врівноважується дією NO, але внаслідок дії доксорубіцину, продукція NO гальмується і порушується артеріальна вазодилатація. Водночас ефекти скорочення судинних кілець щурів за дії доксорубіцину у відповідь на вплив норадреналіну у наших експериментах були на 59% ($P = 0,0017$) меншими порівняно з контролем (див. рис. 3, а). Це може свідчити також про порушення скорочувальної функції судинних препаратів під дією доксорубіцину, принаймні у відповідь на вплив норадреналіну.

Розглянемо декілька сигнальних шляхів, що можуть бути задіяні у порушенні ендотелійзалежної вазорелаксації артеріальних судин. По-перше, зміна регуляції судинного тону пов'язана із гальмуванням утворення

NO у гладеньком'язових клітинах судинної стінки. У ендотелії судин NO синтезується з амінокислоти L-аргініну під дією eNOS, яка зв'язується із зовнішньою мембраною ендотеліальної клітини у кавеолах. Патологічні стимули (АФК, гіперглікемія, окиснені ліпопротеїди та медіатори запалення) активують протеїнкіназу С, яка фосфорилує eNOS, гальмуючи синтез NO і, таким чином, порушуючи процеси скорочення-розслаблення [9]. По-друге, в основі судинотоксичної дії доксорубіцину лежать оксидативний та нітрозативний стреси – стани, які призводить до втрати функцій ендотеліальних клітин. У процесі активації НАДФ – оксидази, ксантинооксидази та НАДФ – залежної цитохром Р-450 редуктази активується генерація $\cdot\text{O}_2^-$ та H_2O_2 через посередництво супероксиддисмутази, а згодом і високореактивного $\cdot\text{OH}$ -радикала [19]. Утворені в мітохондріях та ендотеліальних клітинах $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ та H_2O_2 реагують з мембранними фосfolіпідами з появою продуктів ПОЛ – високотоксичних сполук ДК та МДА. Ці речовини негативно впливають на мембрани та ініціюють апоптоз, що призводить до ендотеліальної дисфункції та бар'єрної недостатності [20].

З іншого боку, сам доксорубіцин індукує транскрипцію eNOS і підвищує її активність в ендотелії [21]: зв'язується з редуктазним доменом eNOS, відновлюючи кисень з

утворенням кисневого радикала, за якого фермент продукує $\cdot\text{O}_2^-$ замість NO. Окрім цього, у разі посилення вільнорадикальних процесів, супероксидний аніон може реагувати з NO, утворюючи пероксинітрил – високоактивний окисник ДНК, білків, перекисних ліпідів і кардіоліпіну. В дослідженнях на серцевих трабекулах щурів показано, що молекули пероксинітриту порушують спорідненість міофіламентів до Ca^{2+} і це призводить до блокування процесу розслаблення-скорочення. Тобто як eNOS, так і iNOS, можуть бути залучені до ефектів доксорубіцину [4]. Таким чином, дія NO нейтралізується, судини стають жорсткими, гірше розслаблюються, а збільшення концентрації $\cdot\text{O}_2^-$ призводить до розвитку ендотеліальної дисфункції.

Як видно з табл. 2 після введення доксорубіцину збільшується активність iNOS у 3,7 раза і водночас пригнічується cNOS у 4,8 раза в мітохондріях серця щурів, що свідчить про неспряжений стан фермента для конститутивного синтезу оксиду азоту. При цьому в дослідній групі значно підвищується вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів – ДК у 4 рази та МДА у 2,5 рази відповідно порівняно з контролем. Раніше нами було показано значне збільшення швидкості генерації супероксид-аніона та гідроксильного радикала у мітохондріях серця за умов впливу доксорубіцину [10].

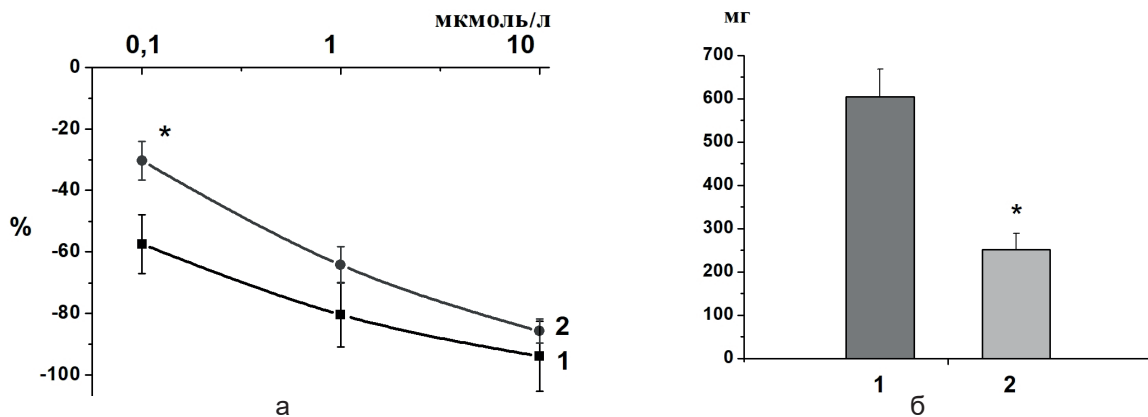


Рис. 3. Ефекти ендотелійзалежної релаксації кілець аорти при дії ацетилхоліну (а) та їх скорочення в умовах впливу норадреналіну у концентрації 10 мкмоль/л (б): 1 – контроль, 2 – введення доксорубіцину. *P < 0,05 відносно контролю

Таблиця 2. Біохімічні показники в мітохондріях серця дорослих щурів (M ± m, n = 10)

Схема досліджу	NO-синтаза, пмоль · хв ⁻¹ мг ⁻¹ білка		Дієнові кон'югати, нг · мг ⁻¹ білка	Малоновий діальдегід, нмоль · мг ⁻¹ білка
	конститутивна	індуцибельна		
Контроль	8,57±0,97	1,85±0,15	2,61±0,16	2,04±0,05
Доксорубіцин	1,8±0,13*	6,78±0,34*	10,82±0,54*	5,11±0,31*

Інтенсифікація вільнорадикальних процесів вказує на тісний зв'язок між синтезом NO і виробленням активних форм кисню у мітохондріях серця щурів після введення доксорубіцину, що може лежати в основі кардіо- та судинотоксичності препарату. Отже, є межа діапазону концентрацій, в яких NO у мітохондріях здійснює або фізіологічну регуляцію, або пошкоджувальну дію. У наших експериментах на ізольованих мітохондріях серця дорослих тварин після введення доксорубіцину пригнічувалася активність cNOS, що значно сприяло розвитку оксидативно-нітрозативного стресу на тлі активації індуцибельного синтезу NO. Це свідчить про посилення вільнорадикальних процесів, що лежать в основі кардіотоксичності та судинотоксичності препарату доксорубіцину.

Відомо, що доксорубіцин порушує функцію дихального ланцюга і синтез АТФ у кардіоміоцитах, викликаючи помітне зменшення його вмісту у серці і, як наслідок, підвищення концентрації внутрішньоклітинного кальцію. Зміни метаболічних процесів у мітохондріях супроводжується перетворенням пірувату в молочну кислоту, що призводить до зменшення клітинного рН та метаболічного ацидозу. Для відновлення цитозольного рН

та іонного балансу активується Na⁺- H⁺ - та Na⁺-Ca²⁺-обмінники. На тлі зменшення продукції АТФ, концентрація Ca²⁺, а також активних форм кисню в ушкодженій тканині міокарда ще підвищуються [22]. Таким чином, у серці відбувається індуція МП у режимі високої провідності, що надалі спричиняє загибель кардіоміоцитів. Але МП деякий час під час гострої доксорубіцинової токсичності залишається закритою через інгібування її кислим рН. У клітинах тимчасово маємо лише апоптоз через активацію доксорубіцином у тому числі й проапоптотичних білків, а саме каспаз. У наших дослідях *in vitro* на ізольованих мітохондріях органели додатково навантажували Ca²⁺, внаслідок чого все-таки спостерігали відкриття МП на моделі гострої доксорубіциніндукованої кардіотоксичності [10].

Оскільки у більшості клітин за умов гострої кардіотоксичності на початкових періодах не відбувається некроз, то на цьому етапі міофіламенти масово не пошкоджуються з вивільненням їх назовні, що підтверджується нашими результатами, в яких ми не спостерігали різниці у значеннях маркера некрозу міокарда тропоніну I між контрольною та дослідною групами (табл. 3).

Активність ферментів АЛТ і АСТ у щурів,

Таблиця 3. Зміна активності факторів пошкодження міокарда та вмісту глюкози у плазмі крові щурів (M ± m, n = 10)

Схема досліджу	Аланінаміно- трансфераза, од/л	Аспартатаміно- трансфераза, од/л	Креатинфосфо- кіназа МВ, од/л	Глюкоза, ммоль/л	Тропонін I, нг/мл
Контроль	39,16±6,07	135,83±20,6	590,17±47,87	4,9±0,6	0,1±0,003
Доксорубіцин	85,62±16,78**	195,97±22,4*	802,8±68,50 **	6,26±0,67*	0,11±0,002

яким вводили доксорубіцин, підвищилася у 2,2 та 1,4 раза відповідно порівняно з контрольною групою тварин (див. табл. 3). Це було індикатором пошкодження міокарда і печінки. Відомо, що локалізація АЛТ більша у цитоплазмі, тоді як АСТ – у мітохондріях. Тому підвищення вмісту АСТ свідчить про загибель клітини, а АЛТ – про порушення цілісності мембрани (також внаслідок дії ПОЛ). Як АЛТ, так і АСТ наявні у кардіоміоцитах, при цьому концентрація АСТ значно більша.

За даними літератури, ізотопний аналіз серцевої тканини після введення доксорубіцину через значне виснаження енергетичних субстратів та підвищення активних форм кисню продемонстрував зсув метаболічних реакцій від окиснення жирних кислот до окиснення глюкози, що вступає на шлях анаеробного гліколізу [23]. Порушення метаболізму глюкози спостерігається від зменшення експресії фосфофруктокінази до зміни окиснення пірувату через виснаження НАДФ та інгібування переносників глюкози GLUT-1, GLUT-4 [24]. Введення доксорубіцину призводило до транзиторного підвищення на 50% поглинання глюкози в кардіоміоцитах протягом першої години, після чого було значне його зниження на тлі підвищення концентрації глюкози у крові [25]. Ми виявили, що вміст глюкози у крові дослідних щурів збільшився у 1,3 раза (див. табл. 3). Також збільшувався вміст серцевої креатинкінази у 1,5 раза, яка діє як модулятор енергетичного запасу, перетворюючи креатин на фосфокреатин, використовуючи АТФ як субстрат. При зростаючій потребі він може бути поповнений з внутрішньоклітинних пулів фосфокреатину через збільшення вмісту активної цитозольної креатинкінази. Взаємодія димерних цитозольних та октамерних мітохондріальних ізоферментів КФК являє собою «енергетичний буфер», а також забезпечує «енергетичний шлюз», що з'єднує місця генерації енергії з місцями споживання енергії. Отже, дослідження зміни

ЕКГ та активності факторів пошкодження міокарда і вмісту глюкози у плазмі крові можуть бути ранніми індикаторами доксорубіциніндукованої кардіотоксичності.

ВИСНОВКИ

1. Виявлені зміни на ЕКГ дорослих щурів, які виникли на тлі введення доксорубіцину у загальній кумулятивній дозі 15 мг/кг. Порушувалася провідність, автоматизм та скоротливість серця, що свідчить про погіршення систоло-діастолічної функції лівого шлуночка і є раннім проявом розвитку гострої токсичної серцевої недостатності.

2. Показано доксорубіциніндуковані порушення скоротливої функції судин: значне зменшення ендотеліязалежних реакцій релаксації судинних препаратів аорти у дорослих щурів на дію ацетилхоліну та реакцій скорочення на дію норадреналіну.

3. Встановлено, що короткотривале застосування доксорубіцину сприяло значному підвищенню продукції ПОЛ, а також забезпечує надмірну активність індукбельного синтезу NO на тлі зниження його конститутивного синтезу у мітохондріях серця дорослих тварин.

4. Виявлені зміни активності ферментів АСТ, АЛТ, КФК МБ і вмісту глюкози в плазмі крові, які є специфічними маркерами патологічних процесів, а саме пошкодження міокарда в процесі виникнення ранньої доксорубіциніндукованої кардіотоксичності.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

**M.V. Denysova, N.A. Strutynska, Yu.P. Korkach,
L.A. Mys, O.M. Magomedov, R.B. Strutynskiy,
V.F. Sagach**

EARLY MARKERS OF ACUTE DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY AND MECHANISMS OF ITS DEVELOPMENT

*Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: mayadenisova81@gmail.com*

Arrhythmias and congestive heart failure, which pose the greatest risk of toxic cardiomyopathy, are the clinically limiting side effects of doxorubicin, the main highly active anticancer agent. The difficulty of early diagnosis of cardiomyopathy and timely detection of cardiac dysfunction associated with chemotherapy remains a significant medical problem. The aim of our study was to identify early signs of acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in adult rats by assessing ECG changes and biochemical parameters. Acute cardiotoxicity was modelled by short-term intraperitoneal injection of doxorubicin at a total dose of 15 mg/kg. On the 5th day of the experiment, visual fluctuations of electrocardiogram (ECG) waveforms, duration and amplitude of the main teeth and intervals, as well as heart rate (HR) in the control and experimental groups of rats were studied to determine early ECG signs of cardiotoxicity. The most significant ECG changes were a doubling of the QT interval duration and significant ST-segment elevation in the rats of the experimental group. In experiments on isolated aortic rings, we demonstrated doxorubicin-induced disruption of both vascular relaxation and contraction mechanisms. The endothelium-dependent relaxation of vascular preparations of animals after administration of doxorubicin to acetylcholine (0.1 $\mu\text{mol/l}$) was 47% less than in the control group. The vascular ring contractions in rats under the influence of norepinephrine (10 $\mu\text{mol/l}$) were 59% lower than in control rats. After doxorubicin administration, oxidative stress developed against the background of cardiovascular disorders. Thus, the content of diene conjugates and malondialdehyde increased by 4 and 2.5 times, respectively. At the same time, in isolated cardiac mitochondria, the activity of inducible NO synthase increased 3.7-fold with a simultaneous significant 4.8-fold inhibition of constitutive NO synthase. An increase in the content of acute-phase biochemical parameters that are markers of damage, namely alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and creatine phosphokinase myocardial fraction (CPK MB) by 2.2, 1.4 and 1.5 times, respectively, was detected. Thus, the acute cardiotoxic effect of doxorubicin results in changes in the systolic-diastolic function of the left ventricle of the heart and its conduction, automaticity and contractility, as well as impaired relaxation and contraction of isolated preparations of the aorta against the background of increased activity of inducible and decreased constitutive NO synthesis, accompanied by oxidative stress and increased content of biochemical markers of myocardial damage.

Key words: doxorubicin; electrocardiogram; vascular reactions; oxidative stress; NO-synthases; markers of myocardial damage.

REFERENCES

1. Farmer H. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005;434:917-21.
2. Pang B, Qiao X, Janssen L, Velds A, Groothuis T, Kerkhoven R, Nieuwland M, Ovaa H, Rottenberg S, van Tellingen O. Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin. *Nat Commun*. 2013;4:1908.
3. De Angelis A, Urbanek K, Cappetta D, Piegari E, Ciuffreda L. P, Rivellino A. Doxorubicin cardiotoxicity and target cells: A broader perspective. *Cardiooncology*. 2016;21:2-12.
4. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol*. 2012; 52(6):1213-25.
5. Mehdi S Hazari, Najwa Haykal-Coates, Darrell W. Winsett, Daniel L Costa, Aimen K Farraj. Hypertension and cardiac arrhythmias. *Curr Pharm Des*. 2007;13: 2545-55.
6. Grant D, Williams T, Zahaczewsky M, Dicker A. Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere). *Int J Cancer*. 2002;104:121-9.
7. Jia G, Aroor A, Jia C, Sowers R. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865:1802-9.
8. Francis S, Busch J, Corbin J. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev*. 2010;62(3):525-63.
9. Strutynska NA, Korkach YuV, Mys LA, Luchkova AY, Sagach VF. Aminoguanidine restores endogenous hydrogen sulfide synthesis, constitutive nitric oxide synthesis, endothelium-dependent vasodilation and inhibits mitochondrial permeability transition pore opening in the heart of old rats. *Fiziol Zh*. 2019; 65(6):12-21. [Ukrainian].
10. Denysova MV, Strutynska NA, Mys LA, Korkach YuV, Rozova RV, Sagach VF. Development of mitochondrial dysfunction in the acute cardiotoxic effect of doxorubicin in adult rats. *Fiziol Zh*. 2023; 69(6): 3-11.
11. Konopelski P, Ufnal M. Electrocardiography in Rats: a Comparison to Human. *Exp Ph Lab Med*. 2016;18:201-6.
12. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978;86(1):271-8.
13. Boyde J, Rahmotullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal Biochem*. 1989;107(2): 424-31.
14. Jensen R, Acton M, Peters H. Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: comparison of electrocardiogram, transmembrane

- potential, and structural effects. *J Cardiovasc Ph.* 1984;54:35-50.
15. Wu Y, Anderson M. CaMKII in sinoatrial node physiology and dysfunction. *Front Pharmacol* 2014;5:48.
 16. Roden M. A current understanding of drug-induced QT prolongation and its implications for anticancer therapy. *Cardiovasc Res* 2019;115:895-903.
 17. Strutynskyi R, Strutynska N, Piven O, Mys L, Goshovska Y, Fedichkina R, et al. Upregulation of ATP-sensitive potassium channels as the potential mechanism of cardioprotection and vasorelaxation under the action of pyridoxal-5-phosphate in old rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2023;28:107456490742.
 18. Sayed-Ahmed M, Khattab M, Gad M, Osman A. Increased plasma endothelin-1 and cardiac nitric oxide during doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Pharmacol Toxicol.* 2001;89:140-4.
 19. Angsutararux P, Luanpitpong S, Issaragrisil S. chemotherapy-induced cardiotoxicity: overview of the roles of oxidative stress. *Oxid Med Cell Long.* 2015;2015:795602.
 20. Zhao X, Alexander J, Zhang S, Zhu Y, Sieber N, Aw T, Carden D. Redox regulation of endothelial barrier integrity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281: L879-86.
 21. Kalivendi S, Kotamraju S, Zhao H. Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-oxide synthase. Effect of antiapoptotic antioxidants and calcium. *J Biol Chem.* 2001;276: 47266-76.
 22. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev.*2008;88:581-609.
 23. Carvalho R, Sousa R, Cadete V, Lopaschuk G, Palmeira C, Bjork J, Wallace K. Metabolic remodeling associated with subchronic doxorubicin cardiomyopathy. *Toxicology.* 2010;270:92-8.
 24. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Energy metabolism in heart failure. *J Physiol.* 2003; 555 (1):1-13.
 25. Hrelia S, Fiorentini D, Maraldi T. Doxorubicin induces early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1567:150-6.

*Матеріал надійшов
до редакції 14.11.2023*