

## ВІДГУК

завідувачки відділу клінічної фізіології та генетики ДУ «Національний науковий центр «Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини ім. академіка М.Д. Стражеска НАМН України», доктора медичних наук, професора

**Талаєвої Тетяни Володимирівни**

на дисертаційну роботу аспірантки Інституту фізіології  
ім. О.О. Богомольця НАН України

**Денисової Майї Володимирівни**

**«Механізми розвитку та попередження доксорубіциніндукованого пошкодження серця»,**

представлену на спеціалізовану вчену раду ID 5867 Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України для розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії у галузі 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина»

### **Актуальність проведених досліджень**

Протягом останніх років прогрес у лікуванні онкологічних захворювань сприяв підвищенню виживання хворих на рак, але водночас це спричинило збільшення захворюваності та смертності через побічні явища/побічні ефекти протипухлинних препаратів.

За даними американської статистики, 5-річне виживання хворих на рак серед дорослого населення становить 67%. Однак використання в лікуванні хіміотерапії і променевої терапії часто стає причиною різних серцево-судинних ускладнень, що може зумовлювати передчасну захворюваність і смертність серед осіб, що вижили після раку. Так, за даними Управління з нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів США (FDA), протягом 7 років після виявлення онкологічного захворювання з 1807 хворих 33% померло від захворювань серця й 51% – від онкологічної патології.

Дані багатьох досліджень свідчать як про пряму кардіотоксичну дію окремих хіміотерапевтичних препаратів та їх комбінацій, так і про їх здат-

ність прискорювати розвиток серцево-судинних захворювань, особливо у хворих із факторами серцево-судинного ризику. Кардіотоксична побічна дія хіміотерапевтичних препаратів є однією з основних причин захворюваності й смертності серед пацієнтів, які вижили після онкологічних захворювань. Кардіотоксичні ускладнення можуть проявлятися у вигляді аритмій, артеріальної гіпертензії, ішемії міокарда, тромбоемболії, серцевої недостатності, систолічної дисфункції міокарда чи іншими побічними ефектами. У зв'язку з цим ще у 2016 р. Європейське товариство кардіологів опублікувало перший програмний документ, у якому систематизовано накопичені дані про серцево-судинні ускладнення на тлі протипухлинного лікування та запропоновано стратегії виявлення й терапевтичні підходи до ведення пацієнтів із кардіотоксичними проявами, з подальшим його щорічним оновленням.

Антрацикліни і трастузумаб є хіміотерапевтичними препаратами, які найчастіше застосовуються та мають велику частку побічних реакцій з боку серцево-судинної системи. Перше повідомлення про кардіотоксичну дію антрациклінових антибіотиків було опубліковане у 1973 році E.Lefrak et al. Авторами було відмічено, що лікування онкологічних хворих цими цитостатиками супроводжувалось розвитком застійної серцевої недостатності. На сьогодні частота виникнення таких ускладнень при використанні антрациклінів складає від 1,5 до 67%. Найбільш виражену кардіотоксичність має доксорубіцин. За даними літератури при застосуванні курсової дози доксорубіцину в дозі 250-400 мг/м<sup>2</sup> прояви кардіотоксичності виявлені у 1-5% випадків хворих. Частота розвитку клінічно значущої дилатаційної кардіоміопатії при сумарній дозі доксорубіцину менше 550 мг/м<sup>2</sup> становить 0,27-4%, при дозі більше 550 мг/м<sup>2</sup> – тільки 30%. Значно підвищений ризик виникнення пошкодження серця відмічається у дітей, у хворих віком старше 65 років і у жінок. Деякі дослідники відмічають субклінічні зміни кардіальної функції при застосуванні доксорубіцину у дозі 300-500 мг/м<sup>2</sup> у 31-70% хворих.



Дослідженню патогенеза антрациклінового ураження серця присвячені численні дослідження. Проте широкий діапазон патологічних змін, що викликають антрациклінові антибіотики, на різних рівнях структурної організації серця, робить вивчення даного питання досить складним та приводить до отримання дослідниками неоднозначних, а інколи і зовсім суперечливих результатів. Разом з тим, аналіз сучасної літератури дозволяє виділити наступні патогенетичні механізми кардіотоксичної дії антрациклінів : активацію локального оксидантного стресу з перекисним окисленням ліпідів, дисфункцію мітохондрій та саркоплазматичного ретикулума, порушення натрій-кальцієвого обміну, адренергічна дисфункція, дисфункція ендотелію та порушення метаболізму NO, втручання в метаболізм жирних кислот, ліпідів та білків в кардіоміоцитах, взаємодія з ядерною та мітохондріальною ДНК. Багато дослідників вважають, що основою доксорубіцинової кардіотоксичності є викликаний даним препаратом апоптоз і некроз кардіоміоцитів.

Однією з основних причин ураження міокарду при застосуванні доксорубіцину є мітохондріальна дисфункція. Оскільки доксорубіцин накопичується переважно в мітохондріях і ядрах, величезна кількість мітохондрій саме у міокарді у поєднанні з менш активним антиоксидантним захистом в серці визначає кардіоселективну токсичність препарату. Токсичність доксорубіцину також пов'язують з активацією iNOS, що призводить до збільшення утворення високо цитотоксичних пероксинітритів. Це може бути причиною інактивації міофібрилярної креатинкінази.

Підвищена продукція АФК, що індукується хіноновим фрагментом антрациклінів, підвищує внутрішньоклітинний рівень кальцію шляхом його вивільнення з саркоплазматичного ретикулума за допомогою активації ріанодинових рецепторів, може бути причиною розвитку аритмій серця.

Механізми доксорубіцинової кардіотоксичності включають активацію окисного/нітрозативного стресу, матричних металопротеаз, а також пору-

шення енергозабезпечення кардіоміоцитів, що в кінцевому підсумку призводить до загибелі клітин шляхом некрозу або апоптозу.

Разом з тим, на сьогодні не вдалося остаточно визначити всі патогенетичні механізми ушкодження міокарду при застосуванні доксорубіцину, що значно обмежує можливість попередження даних змін при проведенні хіміотерапії.

Один із основних ендогенних механізмів захисту клітини при зниженні її енергоресурсів - активація АТФ-чутливих калієвих каналів. За даними літератури фармакологічні активатори АТФ-чутливих калієвих каналів зменшують зону інфаркту міокарда, попереджують ішемічну хворобу та серцеву недостатність, ремоделювання та гіпертрофію шлуночків серця. Проте їх захисна роль у попередженні доксорубіцинового пошкодження міокарда на сьогодні ще не вивчена.

Таким чином, дисертаційне дослідження Денисової М.В., метою якого було вивчення патогенетичних механізмів доксорубіцинового пошкодження міокарда щурів на експериментальній моделі антрациклінової кардіоміопатії та ролі активації АТФ-чутливих калієвих каналів флокаліном у попередженні розвитку доксорубіцин-індукованого ураження серця, безумовно свідчить про актуальність проведеного дослідження.

### **Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення**

Автором представленого дисертаційного дослідження при експериментальному моделюванні доксорубіцинового ураження міокарду отримано нові данні, які доповнюють уявлення щодо патогенетичних механізмів розвитку кардіотоксичності при застосуванні антрациклінового антибіотику.



На експериментальній моделі доксорубіцинового ураження на щурах встановлено, що основною мішенню розвитку кардіотоксичності є дисфункція мітохондрій. Дане дисертаційне дослідження відрізняє великий діапазон досліджень, як на рівні цілого організму з визначенням ознак порушення структурно-функціональних властивостей міокарду, ЕКГ-ознак кардіотоксичності, визначенням біохімічних маркерів пошкодження міокарду, так і унікальні дослідження визначення показників оксидативного стресу, конститутивного та індукційного синтезу NO, продуктів ПОЛ та вмісту H<sub>2</sub>S у мітохондріях серця щурів, відкриття мітохондріальної пори транзиторної провідності, ультраструктурне дослідження міокарду, а також дослідження процесів розслаблення та скорочення на м'язових препаратах аорти.

Одним з найбільш значущих фрагментів роботи є підтвердження участі АТФ-чутливих калієвих каналів у попередженні розвитку кардіотоксичності у відповідь на застосування доксорубіцину.

В роботі наведено нові дані відносно того, що застосування флокаліну в ролі екзогенного активатора АТФ-чутливих калієвих каналів супроводжується зменшенням вираженості дисфункції мітохондрій, пригніченням Ca<sup>2+</sup>-індукованого відкриття мітохондріальної пори та інгібує її підвищену чутливість до індуктора кальцію у мітохондріях серця тварин.

Автор підтвердив наявність ознак оксидативного та нітрозативного стресів в мітохондріях кардіоміоцитів у щурів після введення їм доксорубіцину та можливість їх попередження за допомогою активації АТФ-чутливих калієвих каналів. Вперше встановлено попередження як хронотропної дисфункції серця, порушення провідності й кровопостачання міокарда, в тому числі, внаслідок відновлення процесів скорочення та розслаблення артеріальних судин за допомогою активації АТФ-чутливих калієвих каналів.

Автором охарактеризовані ультраструктурні зміни серця щурів при застосування доксорубіцину. Відмічено набухання та аутофагію мітохондрій, значну міофібрилярну та сарколемальну деструкцію. Активація АТФ-чутливих калієвих каналів при одночасному введенні доксорубіцину та флокаліну попереджала порушення мітохондріального біогенезу та структури міофібрилярного апарату.

З огляду на отримані результати, дане дисертаційне дослідження практично рівною мірою носить як фундаментальний характер, а саме розширяє уявлення про патогенетичні механізми розвитку доксорубіцинового ураження міокарду, так і містить дані щодо спрямованості практичного застосування отриманих результатів щодо попередження доксорубіцинового ураження міокарду за допомогою активації АТФ-чутливих калієвих каналів, що може значно подовжити життя онкологічним хворим після проведеної хіміотерапії.

### **Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи**

Дисертаційну роботу Денисової Майї Володимирівни характеризує великий обсяг проведеного експериментального дослідження (було включено 150 щурів-самців лінійки Вістар). Аналіз сучасної літератури дозволив автору обрати найбільш оптимальну короткострокову модель доксорубіцинової кардіотоксичності, у відповідності до якої доксорубіцин «Ебеве» 50 мг/25 мл («Фарма Гесюмюб», Австрія) вводили у загальній дозі 15 мг/кг двома внутрішньочеревними ін'єкціями. Наукові положення дисертаційної роботи ґрунтовані на широкому та відповідному поставленим задачам застосуванні різних методичних підходів, що використовуються у фізіологічних, медико-біологічних та медичних дослідженнях.

Для вирішення поставлених завдань автором був використаний комплекс сучасних методичних підходів, що дозволило детально та всебічно



оцінити зміни функції мітохондрій при застосуванні щурам доксорубіцину. Автор об'єднав дослідження на цілому організмі щурів з дослідженнями на ізольованих м'язових препаратах аорти та ультраструктурні дослідження міокарду. Дисертант оцінював не тільки безпосередні зміни в мітохондріях кардіоміоцитів: показників оксидативного стресу, конститутивного та індукційного синтезу NO, продуктів ПОЛ та вмісту H<sub>2</sub>S у мітохондріях серця щурів, відкриття мітохондріальної пори транзиторної провідності, але і вплив дисфункції ендотелію, викликаній доксорубіцином, на кровопостачання міокарду. Зміни в міокарді підтверджувались дослідженнями кардіогемодинаміки та ЕКГ-дослідженнями. Основна увага дисертанта ролі дисфункції мітохондрій у розвитку доксорубіцинової кардіотоксичності та можливості попередження патологічних змін за допомогою активації АТФ-чутливих калієвих каналів.

На основі отриманих даних автором проведено адекватні порівняння та обґрунтовані висновки.

Достатній обсяг проведеного експериментального дослідження, застосування сучасних стандартизованих методів, математичного статистичного аналізу отриманих даних свідчать про достовірність та достатню обґрунтованість основних положень роботи. Висновки, сформульовані автором, відповідають основним положенням дисертації і впливають із отриманих автором даних та їх аналізу.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційна робота Денисової Майї Володимирівни виконана в рамках наукових програм відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України «Роль мітохондріальних механізмів у розвитку та попередженні порушень серцево-судинної функції при старінні» (№ держреєстрації 0123U102876) та «Редоксзалежні механізми змін функціонування серцево-судинної системи при старінні та доксорубіциніндукованої серцевій недостатності» (№ держреєстрації 0124U001684)

## **Структура і обсяг дисертації, оцінка її завершеності та відповідності встановленим вимогам**

Дисертаційна робота Денисової М.В. написана за загальноприйнятою формою у відповідності до вимог МОН України. Робота викладена на 158 сторінках і включає анотації українською та англійською мовами, вступ, розділ власних досліджень, розділ аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновки, список використаних джерел. Текст дисертації містить 28 рисунків та 7 таблиць. Список використаних джерел нараховує 361 позицію.

У вступі представлені основні побічні реакції застосування антрациклінів при проведенні хімотерапії. Основна увага прикута до механізмів кардіотоксичності доксорубіцину та її клінічних проявів. Представлені сучасні уявлення про роль активації АТФ-чутливих калієвих каналів, які є потужним ендogenousним захисним механізмом клітини у разі дефіциту енергії, у реалізації кардіопротекторних механізмів.

Обґрунтовано актуальність дисертаційної роботи, визначено мету та завдання дослідження, відзначено зв'язок роботи з основним планом наукової тематики відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де виконувалася дисертаційна робота. Визначена наукова новизна, теоретична та практична значимість проведеного дослідження, представлено особистий внесок здобувача, публікації за темою дисертаційної роботи та апробацію матеріалів дослідження.

У розділі 1 (Огляд літератури) автором детально описані епідеміологічні дані та характер перебігу токсичної дилатаційної доксорубіцинової кардіоміопатії. Представлені сучасні дані щодо механізмів протипухлинної дії антрациклінів та їх побічних реакцій. Автором на основі сучасних літературних даних представлені патогенетичні механізми розвитку доксорубіцинової кардіотоксичності, а саме – розвиток оксидантного та нітрозативного стресів, активацію фероптозу в кардіоміоцитах, порушення обміну глюкози в міокарді. Наведені дані літератури щодо участі



мітохондріальної пори у доксорубіциновому пошкодженні міокарду. Автором представлені також сучасні дані літератури щодо патогенезу судинного ураження при застосуванні доксорубіцину, а саме – розвитку ендотеліальної дисфункції. Також автор наводить дані щодо ролі АТФ-чутливих калієвих каналів у функціонуванні серцево-судинної системи та захисний вплив їх активаторів, в тому числі і фторвмісних.

Наведені дані літератури повністю відповідають меті та завданням дисертаційної роботи.

У розділі 2 (Матеріали та методи) надана детальна характеристика досліджуваних тварин, біохімічних методів, що включали визначення показників оксидантного стресу та активності NO-синтаз у мітохондріях кардіоміоцитів, активності маркерів пошкодження міокарда та вмісту глюкози у плазмі крові щурів, методів оцінки показників кардіодинаміки та реєстрації скорочення-розслаблення м'язових препаратів аорти. Чітко описаний метод дослідження відкривання неспецифічної мітохондріальної пори транзиторної провідності (МП) та ультраструктурного морфологічного дослідження серця.

Достатня кількість досліджуваних тварин дозволила провести достовірну оцінку отриманих результатів та водночас вказує на правильні методичні підходи при виконанні дослідження. Автором ґрунтовно описані всі методи, а також методи статистичного аналізу, що дає підстави вважати використані в дисертаційній роботі методи сучасними і високоінформативними.

У розділі 3 (Результати досліджень та їх обговорення), що містить 7 підрозділів, представлені основні результати досліджень. В підрозділі 1 проаналізовано зміни показників оксидативного стресу та активності NO-синтаз в мітохондріях міокарду піддослідних тварин при дії доксорубіцину та можливість їх попередження за допомогою флокаліну. У підрозділі 2 проаналізовано  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане набухання ізольованих мітохондрій серця щурів та чутливість мітохондріальної пори транзиторної провідності до її природного індуктора  $\text{Ca}^{2+}$  в умовах дії доксорубіцину та вплив на ці процеси

індукованої активації  $K_{ATP}$ -каналів. У підрозділі 3 досліджено вплив доксорубіцину на процеси розслаблення та скорочення артеріальних судин на основі проведення експериментальних досліджень на ізольованих препаратах аорти та можливість попередження даних порушень за допомогою фторвмісного активатора  $K_{ATP}$ -каналів. У підрозділі 4 проведено оцінку ЕКГ-ознак доксорубіцинового ураження міокарду та можливість попередження розвитку доксорубіцинової кардіотоксичності за допомогою активації флокаліном  $K_{ATP}$ -каналів. У підрозділі 5 автор визначав динаміку вмісту маркерів пошкодження міокарду при дії доксорубіцину. У цьому ж підрозділі автор приділив увагу впливу доксорубіцину на обмін глюкози у щурів під дією доксорубіцину і вивчав можливість попередження даних змін за допомогою флокаліну.

У підрозділі 6 проаналізовано зміни показників кардіогемодинаміки у щурів після введення доксорубіцину та можливість попередження пригнічення структурно-функціональних змін за допомогою активації  $K_{ATP}$ -каналів флокаліном.

У підрозділі 7 автор провів оцінку ультраструктурних змін міокарду у щурів під впливом доксорубіцину, а також при одночасному застосуванні доксорубіцину та флокаліну.

У розділі 4 представлений аналіз та узагальнення отриманих результатів дослідження, де здобувач логічно підводить підсумок проведених досліджень, а також окреслює ще не вирішені проблеми та можливі перспективи їх подальшого вирішення.

Завершують роботу висновки й практичні рекомендації, які в повній мірі відповідають поставленій меті і завданням роботи і логічно впливають з проведеного дослідження.

### **Викладення матеріалу дисертації в наукових публікаціях.**

Основні положення дисертаційної роботи в достатній мірі відображені у 3 статтях у фахових наукових виданнях України категорії А, що



включені до науково-метричної бази Scopus та 9 тезах доповідей на наукових вітчизняних та зарубіжних конференціях. Результати дисертаційної роботи доповідалися на 8 наукових форумах (у тому числі з міжнародною участю).

### **Запитання до дисертанта.**

1. Автор зазначає, що доза доксорубіцину, яку вводили щурам, відповідає дозі препарату у людини в межах 240-360 мг/м<sup>2</sup>. За даними літератури при застосуванні такої курсової дози прояви кардіотоксичності виявлені у 1-5% випадків хворих. Частота розвитку клінічно значущої дилатаційної кардіоміопатії при сумарній дозі доксорубіцину менше 550 мг/м<sup>2</sup> становить 0,27-4%, при дозі більше 550 мг/м<sup>2</sup> – тільки 30%. Чому у всіх піддослідних тварин були ознаки кардіотоксичності? Якщо у щурів відмічається підвищена чутливість до доксорубіцину, то чи можна результати роботи щодо попередження доксорубіцинової кардіотоксичності, отримані в експерименті, застосовувати у людини?
2. Якщо розвиток оксидантного стресу є патогенетичним механізмом розвитку доксорубіцинового ураження міокарду, чому в такому випадку застосування антиоксидантів не попереджає розвиток кардіоміопатії?
3. Наскільки специфічними показниками ураження кардіоміоцитів є підвищення вмісту у крові АЛТ та АСТ?  
  
АЛТ та АСТ можуть бути виявленими у нирках, міокарді, скелетних м'язах, головному мозку, підшлунковій залозі, селезінці та легенях, хоча найбільша тканинна концентрація активності даних ферментів спостерігається у печінці. Для підтвердження міокардіального походження збільшення вмісту АЛТ та АСТ необхідно було застосовувати коефіцієнт Рітіса.
4. Чи зможуть активатори КатФ-каналів повністю попередити доксорубіцинове ураження міокарду?

## **Зауваження до дисертації.**

1. Автор розглядає підвищення вмісту глюкози крові при дії доксорубіцину тільки як результат зменшення її поглинання кардіоміоцитами та вихід її з клітин у кров. В той же час, це результат системної дії доксорубіцину, в результаті чого активується розвиток оксидантного стресу і системного запалення, що призводить до розвитку системної інсулінорезистентності та до пригнічення поглинання клітинами глюкози внаслідок порушення фосфорилування IRS та пригнічення транслокації на поверхню клітин GLUT-4.

Проте ці зауваження в значній мірі є дискусійними, відображують складність проблеми, яка вирішувалась, її новизну і не знижують в цілому позитивної оцінки проведеного дослідження, його наукової та практичної значимості.

## **Загальний висновок.**

Дисертаційна робота Денисової Майї Володимирівни «Механізми розвитку та попередження доксорубіциніндукованого пошкодження серця», яка подана на здобуття ступеня доктора філософії, за своїм науковим рівнем та практичною цінністю, змістом та оформленням повністю відповідає вимогам Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44, вимогам до опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук, затверджених наказом Міністерства освіти і науки України № 1220 від 23 вересня 2019 року, вимогам щодо оформлення дисертації, затвердженими наказом МОН України № 40 від 12.01.2017 р. та відповідає напряму наукових досліджень освітньо-наукової



спеціальності 222 «Медицина» третього освітньо-наукового рівня вищої освіти Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України у галузі 22 «Охорона здоров'я» зі спеціальності 222 «Медицина».

## Опонент

**Завідувачка відділу клінічної фізіології та генетики ДУ «Національний науковий центр «Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини ім. академіка М.Д. Стражеска НАМН України», доктор медичних наук, професор**



**Тетяна ТАЛАСОВА**

**Підпис Т.Таласової засвідчую:**

зав. відділом кадрів

ДУ «ННЦ «Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини ім. академіка М.Д.Стражеска НАМН України»



**Наталя АСТАШКІНА**

24.06.2024