

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Денисова Майя Володимирівна

УДК 612.174:331.432:615.1+616-035.7:615.03

**ДИСЕРТАЦІЯ
МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ
ДОКСОРУБЦИНІНДУКОВАНОГО ПОШКОДЖЕННЯ СЕРЦЯ**

222 «Медицина»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Денисова М.В. _____

Науковий керівник: **Сагач Вадим Федорович**
чл.-кор. НАН України, доктор медичних наук, професор

Київ-2024

АНОТАЦІЯ

Денисова М.В. Механізми розвитку та попередження доксорубіциніндукованого пошкодження серця. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина». – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2024.

Дисертаційна робота присвячена вивченню механізмів кардіотоксичної дії доксорубіцину та ролі активації АТФ-чутливих калієвих каналів у попередженні розвитку доксорубіциніндукованого пошкодження міокарда у щурів. Була застосована короткострокова модель гострого пошкодження серця шляхом внутрішньоочеревинного введення доксорубіцину у дозі 7,5 мг/кг два дні. Активація K_{ATP} -каналів досягалася внутрішньоочеревинним введенням флокаліну у дозі 2,5 мг/кг п'ять днів поспіль, у перші два дні – через 30 хв. після введення доксорубіцину. Експерименти проводилися на 5 добу для всіх груп щурів. Досліджено зміни міокарда на біохімічному, функціональному та ультраструктурному рівнях. Відомо, що доксорубіцин накопичується у мітохондріях у концентраціях, значно вищих, ніж у плазмі, отже мітохондрії вважаються основною мішенню доксорубіцину, а мітохондріальна дисфункція є ознакою кардіотоксичності препарату та лежить в основі доксорубіциніндукованого ураження серця. Для з'ясування механізмів, що є підґрунтям кардіотоксичної дії доксорубіцину, проведено дослідження біохімічних параметрів, критичних для метаболізму і функціонування мітохондрій. Показано, що в умовах впливу доксорубіцину збільшується у 5-10 разів утворення активних форм кисню (АФК), зменшується у 2,6 раза вміст ендogenous сірководню (H_2S), пригнічується у 4,8 раза кальційзалежний *de novo* синтез оксиду азоту (сNOS) та активується у 3,7 раза кальційнезалежний *de novo* синтез оксиду азоту (іNOS). Продемонстровано, що ці фактори призводять до збільшення на два порядки

чутливості мітохондріальної пори транзиторної провідності (МП) до кальцію та високоамплітудного набухання мітохондрій, ізольованих із серцевої тканини, що свідчить про збільшення неспецифічної провідності мітохондріальних мембран кардіоміоцитів та індукцію клітинної смерті. Виявлено, що при спільному введенні доксорубіцину та флокаліну швидкість генерації АФК та активність iNOS у мітохондріях достовірно нижчі у 4-5 разів порівняно зі значеннями у щурів, ушкоджених доксорубіцином, вміст H_2S та активність sNOS залишаються на рівні контрольних значень, а чутливість МП до індуктора та амплітуда набухання мітохондрій, ізольованих із серцевої тканини, практично не відрізняються від таких у контрольних тварин. Показано, що доксорубіцин збільшує у 2-4 рази вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в мітохондріях, що супроводжується пошкодженням мембран кардіоміоцитів, вивільненням глюкози та збільшенням у 1,5 рази активності маркерів пошкодження міокарда в плазмі. З'ясовано, що введення флокаліну на тлі дії доксорубіцину здійснює потужний мембранопротекторний ефект, що проявляється в зниженні у 1,6-3,5 рази ПОЛ, зменшенні у 1,2 рази концентрації глюкози та у 1,4 рази активності маркерів пошкодження міокарда у плазмі крові. Показано, що введення доксорубіцину призводить до сповільнення частоти серцевих скорочень, погіршення провідності міокарда у вигляді подовженого вдвічі інтервалу QT (QTc) на ЕКГ та вираженої елевації сегмента ST – ознаки гострої ішемії серцевого м'яза. На ізольованих судинних препаратах аорти щурів після введення доксорубіцину продемонстрована значна дисфункція, що проявляється зменшенням у 1,8 рази ендотеліязалежної релаксації та послабленням у 2,4 рази скорочення під дією ацетилхоліну та норадреналіну відповідно. Встановлено, що введення флокаліну разом із доксорубіцином запобігає хронотропній дисфункції серця та попереджає порушення провідності та процесів скорочення-розслаблення препаратів артеріальних судин, зменшуючи ішемію. При реєстрації функції серця у досліджах *in vivo* за допомогою внутрішньошлуночкового мікроскатетера показано, що після введення доксорубіцину у щурів погіршується

ефективність роботи серцевого м'яза (зменшення ФВ на 27%), що призводить до перевантаження об'ємом лівого шлуночка та збільшення його розмірів у 1,2-1,5 рази, його систолічної дисфункції та виснаження компенсаторних механізмів. Виявлено, що показники насосної та систолічної функції серця після введення флокаліну на тлі дії доксорубіцину наближаються до контрольних. Продемонстровано, що на ультраструктурному рівні дія доксорубіцину призводить до пошкодження мітохондрій та міофібрил. Встановлено, що введення флокаліну спільно з доксорубіцином активізує мітохондріальний біогенез та запобігає руйнуванню міофібрилярного апарату у серці щурів. Таким чином, вперше показана можливість попередження ремоделювання серця та порушення серцево-судинної функції внаслідок гострої токсичної доксорубіциніндукованої кардіоміопатії у щурів через фармакологічну активацію K_{ATP} -каналів флокаліном. Активація K_{ATP} -каналів ефективно запобігає цито- та мітотоксичній дії доксорубіцину та розвитку пошкодження серця щурів через ряд механізмів: 1) зменшення оксидативного стреса через пригнічення генерації АФК та активності iNOS, підтримання активності sNOS та продукції H_2S в мітохондріях; 2) інгібування МП; 3) зменшення ПОЛ та стабілізація мембран кардіоміоцитів; 4) покращення ендотелійзалежної релаксації судин через стимуляцію конститутивного синтезу NO.

Ключові слова: серце; серцево-судинна функція; доксорубіцин; K_{ATP} канали; оксидативний стрес; мітохондрії; пора транзиторної провідності; чутливість до кальцію; ендотелійзалежна релаксація; оксид азоту; частота серцевих скорочень; ударний об'єм; ремоделювання серця; глобальна систолічна деформація лівого шлуночка; серцеві аритмії.

SUMMARY

Denysova M.V. Mechanisms of development and prevention of doxorubicin-induced heart damage. - Qualification scientific work in the form of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 22 "Health care" in the specialty 222 "Medicine" - Bogomolets Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2024.

This dissertation is devoted to the study of the mechanisms of cardiotoxic action of doxorubicin and the role of activation of ATP-sensitive potassium channels by flocalin in preventing the doxorubicin-induced myocardial injury in rats. A short-term model of acute cardiac injury by submaximal dose of doxorubicin in two consecutive injections 7,5 mg/kg was used. Activation of K_{ATP} channels was achieved by administration of 2,5 mg/kg flocalin for 5 days. Changes in the myocardium at the biochemical, functional and ultrastructural levels were studied. It is known that doxorubicin accumulates in mitochondria at many times higher than in plasma, so mitochondria are considered the main target of doxorubicin, and mitochondrial dysfunction is a sign of cardiotoxicity of the drug and underlies doxorubicin-induced cardiac damage. In this work, special attention is paid to the pathogenetic mechanisms of doxorubicin effect on the mitochondrial apparatus of cardiomyocytes. It has been shown that under the conditions of doxorubicin exposure, the reactive oxygen species (ROS) generation significantly increased by 5-10 times, the content of endogenous hydrogen sulfide (H_2S) decreased by 2,6 times, calcium-dependent de novo synthesis of nitric oxide (by cNOS) was inhibited by 4,8 times and calcium-non-dependent de novo synthesis (by iNOS) in cardiac mitochondria was activated by 3,8 times. It was demonstrated that these factors led to increased sensitivity to calcium and high-amplitude swelling of cardiac mitochondria that was inhibited by cyclosporine indicating mPTP-dependent mechanism. It was found that the administration of flocalin significantly prevented doxorubicin-induced increase of ROS generation by 4-5 times, decrease of H_2S content and cNOS activity that reached control values. Flocalin administration preserved doxorubicin-induced changes of mitochondrial sensitivity to calcium ions and the amplitude of cardiac mitochondrial swelling were the same as in control animals. It was shown that doxorubicin increased by 2-4 times the content of lipid peroxidation products (LPP) in mitochondria, which was accompanied by damage

to cardiomyocyte membranes, glucose release and increased by 1,4 times activity of myocardial injury markers in blood plasma. It was found that the activation of K_{ATP} channels under the influence of doxorubicin had a powerful membrane-protective effect, which was confirmed by a lower content of LPP and lower concentration of glucose and activity of myocardial injury markers in plasma. It was shown that doxorubicin administration led to a slowing of the heart rate, deterioration of myocardial conduction in the form of prolongation twice of the QT interval (QTc) and marked ST-segment elevation, a sign of acute cardiac ischaemia. Doxorubicin administration significantly impaired by 1,8 times endotheliumdependent vasorelaxation and 2,4 times contractile activity of isolated aortic rings under the influence of acetylcholine and norepinephrine, respectively. It was found that administration of flocalin with doxorubicin prevents chronotropic cardiac dysfunction and prevents impaired conduction and contraction-relaxation processes of arterial vessels preparations, reducing ischaemia. In vivo studies have shown that after administration of doxorubicin in rats, the efficiency of the heart muscle deteriorated (EF by 27%), leading to left ventricular volume overload by 1,2-1,5 times, systolic dysfunction and depletion of compensatory mechanisms. It was found that the parameters of cardiac pumping and systolic function after activation of K_{ATP} channels under flocalin in the setting of doxorubicin administration were close to the control ones. It was demonstrated that at the ultrastructural level, doxorubicin led to damage to mitochondria, myofibrils and breakdown of intercellular connections. It was found that the administration of the ATP-sensitive potassium channel activator flocalin in combination with doxorubicin activated mitochondrial biogenesis and prevented the destruction of the myofibrillar apparatus in the rat heart. Thus, for the first time, the possibility of preventing cardiac remodelling and cardiovascular dysfunction due to acute toxic doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats through pharmacological activation of K_{ATP} channels by flocalin was shown. The activation of K_{ATP} channels effectively prevented the cytotoxic and mitotoxic effects of doxorubicin and the development of rat heart damage through a number of mechanisms: 1) reduction of oxidative stress through inhibition of ROS

generation and iNOS, preservation of cNOS activity and H₂S production in mitochondria; 2) inhibition of mPTP; 3) reduction of LPO and stabilisation of cardiomyocyte membranes; 4) preservation of endothelium-dependent vascular relaxation through stimulation of constitutive NO.

Key words: heart; cardiovascular function; doxorubicin; KATP channels; oxidative stress; mitochondria; permeability transition pore; calcium sensitivity; endotheliumdependent relaxation; nitric oxide; heart rate; stroke volume; cardiac remodeling; left ventricle global systolic strain; cardiac arrhythmias.

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. **М.В. Денисова**, Н.А. Струтинська, Л.А. Мись, Ю.П. Коркач, К.В. Розова, В.Ф. Сагач. Розвиток мітохондріальної дисфункції при гострій кардіотоксичній дії доксорубіцину у дорослих щурів. *Фізіол журн.* 2023; 69(6):3-14. *(особистий внесок здобувача: інформаційний пошук, експериментальні дослідження, опис та статистичне опрацювання результатів, графічна підготовка результатів та написання статті)*
DOI: <https://doi.org/10.15407/fz69.06.003>
2. **М.В. Денисова**, Н.А. Струтинська, Л.А. Мись, Ю.П. Коркач, О.М. Магомедов, Р.Б. Струтинський, В.Ф. Сагач. Ранні маркери гострої доксорубіциніндукованої кардіотоксичності та деякі механізми її розвитку. *Фізіол журн.* 2024; 70(1): 3-13. *(особистий внесок здобувача: інформаційний пошук, експериментальні дослідження, опис та статистичне опрацювання результатів, графічна підготовка результатів та написання статті)*
DOI: <https://doi.org/10.15407/fz70.01.003>
3. **M.V. Denysova**, N.A. Strutynska, L.A. Mys, Y.P. Korkach, V.F. Sagach, R.B. Strutynskiy. Activation of ATP-sensitive potassium channels prevents doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction in the heart and impaired vascular responses in rats. *Fiziol Zh.* 2024; 70(2): 3-11. *(особистий внесок*

здобувача: інформаційний пошук, експериментальні дослідження, опис та статистичне опрацювання результатів, графічна підготовка результатів та написання статті)

DOI: <https://doi.org/10.15407/fz70.02.003>

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ:

Тези доповідей:

1. **M.V. Denysova**, N.A. Strutynska, V.F. Sagach. Administration of doxorubicin increases the sensitivity of the mPTP to Ca²⁺ and causes pathological changes in the ECG. Heart Failure 2023 & 10th World Congress on AHF, 20-23 May, 2023, Prague, Czechia, European Journal of Heart Failure. 2023;25(Suppl. S2).
2. **Денисова М.В.**, Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. ЕКГ як метод ранньої діагностики гострої доксорубіциніндукованої кардіотоксичності у щурів. XI науково-практична конференція «European Scientific Congress», 27-29.11.2023, Харків, Україна. Збірник наукових матеріалів конференції ISBN 978-84-15927-34-1 (С. 59).
3. **Денисова М.В.**, Розова К.В., Сагач В.Ф. Порівняльне ультраструктурне дослідження тканини міокарда щурів після введення різних доз доксорубіцину. X Міжнародна науково-практична конференція «Modern Problems of Science and Education», 4-6.12.2023, Київ, Україна. Збірник наукових матеріалів конференції ISBN 978-966-8219-87-0 (С. 201).
4. **Денисова М.В.**, Магомедов О.М., Сагач В.Ф. Вплив доксорубіцину на активність внутрішньоклітинних ензимів кардіоміоцитів та вміст глюкози у плазмі щурів. СХХХVI Міжнародна науково-практична конференція «Зимові наукові читання – 2023», 22.12.2023, Київ, Україна. Збірник наукових матеріалів конференції «Наука і практика» ISBN 978-1-6497-6221-4 (С. 72).

5. **Денисова М.В.**, Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Оксидативно-нітрозативний стрес як основний механізм розвитку доксорубіциніндукованої кардіотоксичності. XI Міжнародна науково-практична конференція «Modern Problems of Science and Education», 8-10.01.2024, Київ, Україна. Збірник матеріалів конференції ISBN 978-966-8219-87-0 (С. 152).
6. **Денисова М.В.**, Струтинський Р.Б., Сагач В.Ф. Вплив активації K_{ATP} -каналів на ЕКГ та біохімічні маркери гострої доксорубіциніндукованої кардіотоксичності. Науково-практична конференція «Актуальні питання сучасної науки», 19.01.2024, Харків, Україна, Мультидисциплінарний науковий часопис «Нотатки сучасної науки» ISSN 2786-6777. 2024;11(1):109-112.
7. **Денисова М.В.**, Коркач Ю.П., Струтинська Н.А., Струтинський Р.Б., Сагач В.Ф. Мітопротекторні ефекти активатора K_{ATP} -каналів при доксорубіциніндукованому пошкодженні серця. СXXXVII Міжнародна науково-практична конференція «Розвиток науки та техніки: виклики 2024», 19.01.2024, Чернівці, Україна, Збірник наукових матеріалів конференції «Наука і практика» ISBN 978-1-6497-6221-4 (С.91).
8. **Денисова М.В.**, Розова К.В., Сагач В.Ф. Вплив активації АТФ-чутливих калієвих каналів на ультраструктуру кардіоміоцитів та кардіогемодинаміку щурів, ушкоджених доксорубіцином. Науково-практична конференція «Актуальні питання сучасної науки», 20.02.2024, Харків, Україна, Мультидисциплінарний науковий часопис «Нотатки сучасної науки» ISSN 2786-6777. 2024;13(3):74-76.
9. **M.V. Denysova**, Y.P.Korkach, N.A. Strutynska, V.F. Sagach. Doxorubicin leads to increased oxidative stress and opening of the mPTP. Heart Failure 2024 & 11th World Congress on Acute Heart Failure (11-14 May, 2024, Lisbon, Portugal, European Journal of Heart Failure).

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ЗМІСТ.....	10
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	13
ВСТУП.....	15
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	23
1.1. Доксорубіциніндукована токсична дилатаційна кардіоміопатія, особливості перебігу у дітей та дорослих	23
1.2. Доксорубіцин – представник антрациклінових антибіотиків.....	23
1.2.1. Фармакологічні властивості доксорубіцину.....	25
1.2.2. Механізми протипухлинної дії доксорубіцину.....	26
1.2.3. Побічні ефекти.....	27
1.3. Механізми доксокардіотоксичності.....	28
1.3.1. Індукція оксидативного стресу за дії доксорубіцину.....	28
1.3.2. Нітрозативний стрес.....	30
1.3.3. Фероптоз як наслідок дії доксорубіцину.....	31
1.3.4. Зв'язок з кардіоліпіном.....	32
1.4. Роль мітохондріальної пори транзиторної провідності у доксорубіциніндукованому пошкодженні серця.....	33
1.4.1. Структура мітохондріальної пори.....	33
1.4.2. Вплив доксорубіцину на кальцієвий гомеостаз та індукцію мітохондріальної пори у кардіоміоцитах.....	38
1.5. Патогенетичні механізми впливу доксорубіцину на артеріальні судини.....	40
1.6. Застосування методу електрокардіографії для реєстрації ранніх ознак доксокардіотоксичності у щурів.....	42
1.7. Метаболічне ремоделювання серця внаслідок дії доксорубіцину...	43

1.7.1. Вплив доксорубіцину на пул високоенергетичних фосфатів.....	44
1.7.2. Вплив доксорубіцину на обмін глюкози.....	45
1.8. Вплив доксорубіцину на скоротливий апарат міокарда.....	47
1.9. Досягнення у профілактиці та лікуванні доксорубіциніндукованого пошкодження.....	48
1.10. К _{АТФ} -канали та їх роль у серцево-судинній системі.....	50
1.10.1. Роль К _{АТФ} -каналів у коронарному кровообігу.....	52
1.10.2. К _{АТФ} -канали та серцеві аритмії.....	53
1.11. Роль активаторів К _{АТФ} -каналів у захисті та відновленні міокарда	54
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	56
2.1. Експериментальні тварини.....	56
2.2. Обґрунтування вибору моделі та ефективних доз препаратів.....	56
2.3. Схема досліджу.....	57
2.4. Біохімічні дослідження.....	58
2.4.1. Визначення показників оксидативного стресу та активності NO-синтаз у мітохондріях серця щурів.....	58
2.4.2. Визначення активності маркерів пошкодження міокарда та вмісту глюкози у плазмі крові щурів.....	60
2.5. Дослідження відкривання неспецифічної мітохондріальної пори транзиторної провідності.....	62
2.6. Реєстрація скорочення-розслаблення м'язових препаратів аорти...	63
2.7. Електрокардіографічне дослідження.....	63
2.8. Оцінка параметрів кардіогемодинаміки.....	65
2.9. Ультроструктурне морфологічне дослідження.....	67
2.10. Статистична обробка результатів.....	67
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	69
3.1. Зміни показників оксидативного стресу та активності NO-синтаз в мітохондріях серця щурів при дії доксорубіцину та флокаліну.....	69

3.2. Вплив доксорубіцину та активатора K_{ATP}-каналів на відкриття МП у серці щурів та її чутливість до індуктора Ca^{2+}	76
3.2.1. Дослідження спонтанного та Ca^{2+}-індукованого набухання ізольованих мітохондрій серця щурів в умовах введення доксорубіцину та флокаліну.....	77
3.2.2. Дослідження чутливості МП до дії індуктора Ca^{2+} в серці щурів в умовах дії доксорубіцину та флокаліну.....	83
3.3. Процеси скорочення-розслаблення ізольованих препаратів аорти щурів після введення доксорубіцину та флокаліну.....	86
3.4. Динаміка розвитку ЕКГ-ознак гострої доксорубіциніндукованої кардіотоксичності та під впливом активатора K_{ATP}-каналів.....	90
3.4.1. Дослідження ЕКГ-ознак впливу доксорубіцину та флокаліну на провідну функцію серцевого м'язу щурів.....	92
3.4.2. Дослідження ЕКГ-ознак впливу доксорубіцину та флокаліну на автоматизм, скоротливість серця щурів та амплітуду сегмента ST.....	95
3.5. Зміна активності маркерів пошкодження міокарда та вмісту глюкози у плазмі щурів після пошкодження доксорубіцином та дії активатора K_{ATP}-каналів.....	99
3.6. Кардіогемодинаміка щурів при дії доксорубіцину та флокаліну... 	103
3.6.1. Дослідження насосної функції серця.....	103
3.6.2. Дослідження систолічної функції ЛШ.....	106
3.6.3. Дослідження діастолічної функції ЛШ.....	108
3.7. Вплив доксорубіцину та активатора K_{ATP}-каналів на ультраструктурні зміни в кардіоміоцитах щурів.....	109
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	118
ВИСНОВКИ.....	125
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	127
ДОДАТОК 1.	
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.....	156

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АЛТ – аланінамінотрансфераза

АСТ – аспартатамінотрансфераза

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активні форми кисню

ДК – дієнові кон'югати

ДКМП – дилатаційна кардіоміопатія

K_{АТФ}-канали – аденозинтрифосфатчутливі калієві канали

КДО – кінцевий діастолічний об'єм

КДТ – кінцевий діастолічний тиск

КСО – кінцевий систолічний об'єм

КСТ – кінцевий систолічний тиск

КФК МБ – серцева фракція креатинфосфокінази

ЛШ – лівий шлуночок

МДА – малоновий діальдегід

МП – мітохондріальна пора транзиторної провідності

НАД(Ф) – нікотинамідаденіндинуклеотид(фосфат)

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

СН – серцева недостатність

УО – ударний об'єм

УР – ударна робота

ФВ – фракція викиду

ФКр – фосфокреатин

ХОК – хвилинний об'єм крові

ЧСС – частота серцевих скорочень

$\cdot\text{O}_2^-$ – супероксидний аніон

$\cdot\text{OH}$ – гідроксильний радикал

ANT – аденіннуклеотидний транслокатор

cNOS – конститутивна ізоформа синтази оксиду азоту

CsA – циклоспорин А

Сур-D – циклофілін Д

dP/dt_{\max} – максимальна швидкість збільшення тиску у лівому шлуночку

dP/dt_{\min} – максимальна швидкість розслаблення у лівому шлуночку

eNOS – ендотеліальна ізоформа синтази оксиду азоту

H_2O_2 – пероксид водню

H_2S – сірководень

Kir – калієві канали вхідного випрямлення

LOOH – гідропероксид ліпідів

mtNOS – мітохондріальна ізоформа синтази оксиду азоту

ONOO^- – пероксинітрит

PiC – мітохондріальний фосфатний переносник

SUR – рецептор сульфонілсечовини

VDAC – потенціалзалежний аніонний канал

tw – ізоволіумічна константа розслаблення

ВСТУП

Актуальність теми. Доксорубіцин (адриаміцин) був виділений з колоній *Streptomyces peucetius caesius* на початку 1960-х років й досі залишається одним з найефективніших протиракових препаратів, тому широко призначається у світі та становить основу клінічного протокольного лікування як дітей, так і дорослих з гострими лейкеміями, лімфомами, абсолютною більшістю солідних пухлин (рак молочної залози, гінекологічні, сечостатеві, ендокринні злоякісні новоутворення, рак шлунка), а також саркоми Юінга і Капоші (Casali et al., 2018). Проте препарат негативно впливає на нейрони, нирки, легені, слизові оболонки, шлунок та серцево-судинну функцію, спричиняючи нудоту, алопецію, когнітивні ускладнення, пронос, лихоманку (Ramalingaуа et al., 2017), гіпотензію (Medrano et al., 2001), аритмії та застійну серцеву недостатність, яка є прямим наслідком токсичної кардіоміопатії (Angsutararux et al., 2015) та найбільш серйозною й дозолімітуючою побічною дією хіміотерапії раку (Jones et al., 2006; Villani et al., 2006). Ураження міокарда доксорубіцином має дозозалежний, прогресуючий та потенційно летальний характер. Частота виникнення у пацієнтів доксорубіциніндукованої кардіоміопатії може становити 36-48% в залежності від дози, а рівень смертності від неї становить понад 50% (Wallace et al., 2020; Cardinale et al., 2020). Серед усіх вікових категорій найбільш чутливими до кардіотоксичної дії доксорубіцину є діти (Volkova and Russell, 2011). Рання та прогресуюча кардіотоксичність адриаміцину, асоційовані зі зниженням фракції викиду лівого шлуночка, можуть проявлятися протягом року у вигляді дилатаційної кардіоміопатії у дорослих або рестриктивної кардіоміопатії у пацієнтів молодшого віку (Cardinale et al., 2020; Saleh et al., 2020). Антрациклінова кардіотоксичність також може проявлятися через тривалий проміжок часу після закінчення лікування як пізня незворотна серцева недостатність (Cardinale et al., 2020), що спостерігалось у 65% пацієнтів дитячого віку та у

12% дорослих (Saleh et al., 2020). Єдиним ефективним методом лікування пізньої серцевої недостатності на термінальній стадії залишається трансплантація серця (Oliveira et al., 2021). Відомо, що доксорубіцин накопичується у мітохондріях у концентраціях, значно вищих, ніж у плазмі, отже мітохондрії вважаються основною мішенню доксорубіцину, а мітохондріальна дисфункція є ознакою кардіотоксичності препарату та лежить в основі доксорубіциніндукованого ураження серця (Wu et al., 2022). Було показано, що механізми розвитку доксорубіциніндукованої кардіоміопатії включають: генерацію активних форм кисню (АФК), індукцію мітохондріальної пори транзиторної провідності (МП), неспряження окисного фосфорилування та зменшення вироблення АТФ, перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) та пошкодження мембран, пригнічення експресії специфічних генів, апоптоз та некроз кардіоміоцитів (Wallace et al., 2020). Беручи до уваги ці різноманітні фактори, були випробувані різні підходи, спрямовані на нівелювання основних механізмів пошкоджуючої дії доксорубіцину, а саме: використання антиоксидантів, аналогів доксорубіцину, альтернативних способів введення препарату, хелатування заліза (Takemura et al., 2007; Lan et al., 2017; Chen et al., 2022), але здатність цих методів захистити серце від пошкодження була обмеженою. Отже, краще розуміння механізмів, які лежать в основі кардіотоксичності доксорубіцину, дасть змогу розробити методи попередження та лікування серцевої недостатності, яку він спричиняє. Одним із прогресивних підходів до профілактики та лікування серцево-судинних захворювань є розробка та використання лікарських засобів на основі активації АТФ-чутливих калієвих каналів, які є потужним ендogenousним захисним механізмом клітини у разі дефіциту енергії (Агорова et al., 2001) та центральною ланкою кардіопротекції при ішемії-реперфузії міокарда (Alekseev et al., 2005; Moibenko et al., 2008; Zhou et al., 2011). Оскільки в основі механізму цито- та мітопротекторної дії фармакологічних активаторів каналів лежить гіперполяризація плазматичної мембрани з одного боку та деполіаризація внутрішньої мембрани мітохондрій з іншого, це призводить до

зменшення надходження Ca^{2+} в клітину та попередження відкривання МП, отже їх застосування веде до розслаблення та зменшення тонуусу серцевого м'язу й гладенької мускулатури судин (Suzuki et al., 2001) та реалізації кардіопротекторних механізмів (Strutynskyi et al., 2013). В останні роки велику увагу приділяють фторвмісним активаторам, потужні антиішемічні, вазодилататорні, антиоксидантні та кардіопротекторні властивості яких були показані в експериментах (Puvovar et al., 2008; Strutynskyi et al., 2018). Але механізми попередження пошкодження міокарда фторвмісним активатором флокаліном в умовах дії доксорубіцину ще не були досліджені. Ця робота присвячена вивченню механізмів пошкодження міокарда щурів доксорубіцином та ролі активації АТФ-чутливих калієвих каналів флокаліном у попередженні розвитку доксорубіциніндукованого ураження серця. Особлива увага приділяється патогенетичним механізмам впливу доксорубіцину та флокаліну на мітохондріальний апарат кардіоміоцитів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана відповідно до загального плану науково-дослідних робіт відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Роль мітохондріальних механізмів у розвитку та попередженні порушень серцево-судинної функції при старінні», 2019-2023 рр. (№ держреєстрації 0123U102876) та «Редоксзалежні механізми змін функціонування серцево-судинної системи при старінні та доксорубіциніндукованій серцевій недостатності», 2024-2026 рр. (№ держреєстрації 0124U001684).

Мета і завдання дослідження.

Метою роботи було вивчення механізмів розвитку та попередження доксорубіциніндукованого пошкодження серця у щурів.

Для досягнення поставленої мети сформульовані такі завдання:

1. З'ясувати вплив доксорубіцину та спільного з доксорубіцином введення флокаліну на показники оксидативного стресу, активність конститутивного та індукційного синтезу оксиду азоту (NO), вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та ендogenous сірководню (H_2S) в мітохондріях серця щурів.
2. Оцінити зміну показників оптичної щільності суспензії мітохондрій серця щурів та чутливість мітохондріальної пори транзиторної проникності (МП) до індуктора її відкриття кальцію в умовах дії доксорубіцину та при одночасному введенні флокаліну з доксорубіцином.
3. Вивчити механізми впливу доксорубіцину та спільного з ним введення флокаліну на процеси скорочення-розслаблення ізольованих судинних препаратів аорти щурів.
4. Дослідити зміни електорокардіограми (ЕКГ) щурів після впливу доксорубіцину, а також за умов дії фторвмісного активатора K_{ATP} -каналів разом з доксорубіцином.
5. Визначити вплив доксорубіцину та одночасного з ним введення флокаліну на активність маркерів пошкодження міокарда, а також вміст глюкози у плазмі крові щурів.
6. Дослідити зміни кардіогемодинаміки щурів *in vivo* за умов розвитку доксорубіциніндукованого пошкодження міокарда та активації АТФ-чутливих калієвих каналів на тлі дії доксорубіцину.
7. Дослідити ультраструктурні зміни кардіоміоцитів під впливом доксорубіцину та спільного введення доксорубіцину та флокаліну.

Об'єкт дослідження: Проблема механізмів розвитку токсичної кардіоміопатії.

Предмет дослідження: Мітохондріальні механізми розвитку доксорубіциніндукованої кардіоміопатії, вивчення та розробка способів їх корекції.

Методи дослідження: визначення показників оксидативного стресу, конститутивного та індукційного синтезу NO, продуктів ПОЛ та вмісту H₂S у мітохондріях серця щурів, а також активності маркерів пошкодження міокарда та вмісту глюкози у плазмі крові щурів проводили біохімічними методами; виділення мітохондрій – методом диференційного центрифугування; дослідження відкривання МП – за допомогою спектрофотометричної реєстрації оптичної щільності суспензії мітохондрій серця за наявності індуктора та інгібітора МП; реєстрацію скорочення-розслаблення м'язових препаратів аорти – методом тензометрії; електрофізіологічну функцію серця вивчали за допомогою електрокардіографічного дослідження; параметри кардіогемодинаміки – за допомогою внутрішньошлуночкового мікрокатетера Millar Instruments *in vivo*; ультраструктурний апарат кардіоміоцитів досліджували методом електронної мікроскопії.

Наукова новизна отриманих результатів. Проведено дослідження механізмів кардіотоксичної дії доксорубіцину у щурів та механізмів попередження розвитку гострого доксорубіциніндукованого пошкодження міокарда через активацію АТФ-чутливих калієвих каналів вітчизняним фторвмісним препаратом флокаліном. Була застосована короткострокова модель гострого пошкодження міокарда субмаксимальною дозою доксорубіцину у двох введеннях. Оскільки мітохондріальний апарат кардіоміоцитів є однією з основних мішеней кардіотоксичної дії доксорубіцину, першочергова увага приділялася дослідженню патогенетичних механізмів впливу доксорубіцину та флокаліну на рівні мітохондрій. Вперше встановлено, що порівняно з доксорубіцином, сумісне введення флокаліну запобігає проявам оксидативного стресу в мітохондріях серця щурів, про що свідчить зменшення генерації АФК: супероксидного та гідроксильного радикалів і пероксиду водню. Також встановлено достовірне зменшення вмісту продуктів ПОЛ (дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду), що вказує на потужний мембранопротекторний ефект активації

АТФ-чутливих калієвих каналів. Це підтверджується зменшенням у плазмі крові щурів концентрації глюкози та активності маркерів пошкодження міокарда порівняно з тваринами, ураженими доксорубіцином. Вперше показано, що спільне застосування доксорубіцину з фторвмісним активатором АТФ-чутливих калієвих каналів запобігає зменшенню вмісту H_2S та активності cNOS у мітохондріях серця щурів, водночас активність iNOS залишається низькою. Вперше продемонстровано, що активація K_{ATP} -каналів флокаліном на тлі дії доксорубіцину пригнічує Ca^{2+} -індуковане відкриття МП та інгібує її підвищену чутливість до індуктора кальцію у мітохондріях серця тварин. Вперше проведено ЕКГ-дослідження щурів після одночасного введення препаратів та встановлено попередження як хронотропної дисфункції серця, так і порушення провідності й кровопостачання міокарда, зокрема, внаслідок запобігання розладу процесів скорочення-розслаблення артеріальних судин. Вперше проведено *in vivo* комплексне кардіогемодинамічне дослідження тварин після введення флокаліну на тлі дії доксорубіцину та виявлено, що активація K_{ATP} -каналів частково попереджає насосну та систолічну дисфункцію лівого шлуночка, спричинену адріаміцином. Вперше виявлено, що одночасне введення флокаліну з доксорубіцином запобігає порушенню мітохондріального біогенезу та руйнуванню міофібрилярного апарату у серці щурів. Отже, вперше показано попередження розвитку гострої токсичної доксорубіциніндукованої кардіоміопатії у щурів шляхом активації K_{ATP} -каналів флокаліном.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів.

Отримані результати представляють як теоретичну (фундаментальну), так і практичну цінність. Результати комплексного дослідження функціональних та структурних проявів гострої доксорубіциніндукованої кардіоміопатії та механізмів, асоційованих з цими змінами, відносяться до фундаментальних відомостей щодо розвитку даної патології, розширюють існуючі уявлення про неї та обґрунтовують як можливість попередження, так і ризики прогресування ремоделювання міокарда з розвитком незворотної серцевої

недостатності. Результати дослідження функціональних та структурних змін міокарда після активації АТФ-чутливих калієвих каналів флокаліном на тлі токсичної дії доксорубіцину вперше демонструють можливість попередження гострої доксорубіциніндукованої кардіоміопатії при відкриванні K_{ATP} -каналів та мають практичну цінність. Отримані результати можуть бути використані для подальшого вивчення механізмів попередження розвитку токсичної кардіоміопатії, а також впроваджені у клінічну практику.

Особистий внесок здобувача. Формулювання назви, мети та завдань дослідження, протоколів проведення експериментів та обговорення отриманих результатів проводилися здобувачем спільно з науковим керівником чл.-кор. НАН України, д.м.н., професором Сагачем В.Ф. Самостійно була розроблена експериментальна модель, проведена підготовка тварин, аналіз літератури по темі дослідження, статистична обробка результатів, оформлення усіх рисунків та таблиць, написання статей і тез. Підготовка, проведення та аналіз електрокардіографічного та кардіогемодинамічного досліджень здійснено дисертантом самостійно. Вимірювання біохімічних показників у серцевих мітохондріях, що є маркерами оксидативного стресу, проведено за участю ст.н.с., к.б.н. Коркач Ю.П, реєстрацію відкривання МП – за участю пров.н.с., к.б.н. Струтинської Н.А. та н.с., к.б.н. Мись Л.А. у відділі фізіології кровообігу. Реєстрацію скорочення-розслаблення м'язових препаратів аорти здійснено за участю пров.н.с. відділу загальної та молекулярної патофізіології, д.б.н. Струтинського Р.Б. Дослідження ультраструктурного апарату кардіоміоцитів – за участю пров.н.с. відділу гіпоксії, д.б.н. Розової К.В. Вимірювання концентрації глюкози та біохімічних показників у плазмі крові щурів, що є маркерами пошкодження міокарда, проведено спільно зі співробітниками медичної лабораторії ДУ Інституту травматології та ортопедії НАМН України м. Києва (зав. лаб. д.м.н. Магомедов О.М.).

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи були представлені на науково-практичних конференціях: Heart Failure 2023 & 10th World Congress on Acute Heart Failure (20-23.05.2023, Прага, Чехія); XI наукова конференція «European Scientific Congress» (27-29.11.2023, Харків, Україна); X Міжнародна конференція «Modern Problems of Science and Education» (4-6.12.2023, Київ, Україна); СXXXVI Міжнародна конференція «Зимові наукові читання – 2023» (22.12.2023, Київ, Україна); XI Міжнародна конференція «Modern Problems of Science and Education» (8-10.01.2024, Київ); Наукова конференція «Актуальні питання сучасної науки» (19.01.2024, 20.02.2024, Харків); СXXXVII Міжнародна конференція «Розвиток науки та техніки: виклики 2024» (19.01.2024, Чернівці); Heart Failure 2024 & 11th World Congress on Acute Heart Failure (11-14.05.2024, Лісабон, Португалія).

Публікації. Результати досліджень опубліковано у 12 наукових працях: зокрема 3 публікації у наукових фахових виданнях України категорії А, що включені до науково-метричної бази Scopus та 9 тез доповідей на наукових вітчизняних та зарубіжних конференціях. Відповідно до п.8 Постанови КМУ № 44 від 12 січня 2022 року, враховано кількість 3.0 публікацій, у яких висвітлені результати дисертаційної роботи.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаної літератури, що включає в себе 361 найменування. Основний текст роботи викладено на 126 сторінках. Загальний обсяг роботи складає 158 сторінок. Результати проілюстровано 28 рисунками та 7 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Доксорубіциніндукована токсична дилатаційна кардіоміопатія, особливості перебігу у дітей та дорослих

Термін «кардіоміопатія» (КМП) об'єднує гетерогенну групу хвороб серцевого м'яза, що включає дилатаційну (ДКМП), гіпертрофічну (ГКМП), рестриктивну (РКМП), аритмогенну правого шлуночка та некласифіковану КМП, котрі рано чи пізно маніфестують серцеву недостатність (Heidenreich et al., 2022; Arbustini et al., 2014). ДКМП визначається як збільшення об'єму шлуночків серця та зниження їхньої систолічної функції в умовах відсутності значущого ураження коронарних артерій (Elliott, 2000), і є однією з основних причин розвитку серцевої недостатності (Mahmalju et al., 2021; Reichart et al., 2019). Існує близько десяти загальних причин, що призводять до розвитку ДКМП, серед них окремо виділяють доксорубіцин (Lipshultz et al., 2013). Частота виникнення у пацієнтів доксорубіциніндукованої кардіоміопатії може сягати 36-48%, а рівень смертності від неї становить понад 50% (Wallace et al., 2020). Ступінь кардіотоксичності доксорубіцину чітко залежить від загальної кумулятивної дози препарату та віку пацієнта. У сучасній ад'ювантній терапії раку доксорубіцин використовується у середніх дозах 240-360 мг/м², що збільшуються до 550 мг/м² в окремих випадках. Згідно з проведеними ретроспективними дослідженнями, кардіоміопатія та застійна серцева недостатність розвинулися у 2% пацієнтів, що отримували дозу 240 мг/м², у 5,1% пацієнтів при дозі 400 мг/м² (Gianni et al., 2008), у понад 5% пацієнтів, які отримали кумулятивну дозу від 500 до 550 мг/м², збільшуючись до 36%, коли доза перевищувала 550 мг/м² і 48%, коли доза перевищувала 600 мг/м² (Steinherz et al., 1991). Серед усіх вікових категорій найбільш чутливими до кардіотоксичної дії доксорубіцину є діти. Виявлено, що тридцятирічні пацієнти, які лікувалися від раку у дитинстві, мали у 15 разів вищий рівень

захворюваності на серцеву недостатність, ніж очікувалося (Gianni et al., 2008). Рання та прогресуюча кардіотоксичність препарату, асоційовані зі зниженням фракції викиду лівого шлуночка, можуть проявлятися протягом року у вигляді дилатаційної кардіоміопатії у дорослих або рестриктивної кардіоміопатії у пацієнтів молодшого віку (Cardinale et al., 2020; Saleh et al., 2020). Антрациклінова кардіотоксичність може також проявлятися через тривалий проміжок часу після закінчення лікування у вигляді пізньої незворотної серцевої недостатності – це спостерігалось у 65% пацієнтів дитячого віку та у 12% дорослих (Saleh et al., 2020; Volkova and Russell, 2011). У багатьох, хто вижив після лікування доксорубіцином, серцева недостатність розвинулася через 6-10 років. Діти мають підвищений ризик розвитку пізніх ускладнень порівняно з дорослими. Причиною «прихованої» серцевої недостатності вважають «мітохондріальну пам'ять» доксокардіотоксичності (Wallace et al., 2020). Єдиним ефективним методом лікування пізньої серцевої недостатності на термінальній стадії залишається трансплантація серця (Oliveira et al., 2021). Раннє виявлення та лікування субклінічних серцево-судинних змін протягом першого року після протипухлинної терапії може призвести до повного або часткового відновлення серцевої функції (Cardinale et al., 2020).

1.2. Доксорубіцин як представник групи антрациклінових антибіотиків

Антрацикліни – потужні цитотоксичні антибіотики з широкою сферою клінічного застосування в якості протипухлинних засобів (Henriksen et al., 2018; Octavia et al., 2012). Доксорубіцин (адриаміцин) та його варіанти, даунорубіцин та ідарубіцин (Pang et al., 2013) – антрацикліни, дозволені FDA для застосування у клініці. Доксорубіцин був вперше виділений з колоній *Streptomyces peucetius caesius* ще у 1967 році (Bonadonna et al., 1992). С тих пір вивчалися механізми розвитку пухлин та медикаментозні підходи до лікування, були розроблені лікарські засоби (Farmer et al., 2005), але попри те, що такі препарати зазвичай мають менше побічних ефектів, резистентність пухлин розвивається до них швидко (De Angelis et al., 2016; Wallace et al.,

2020). Тому доксорубіцин широко призначається у світі та становить основу клінічного протокольного лікування як дітей, так і дорослих з гострими лейкеміями, лімфомами, абсолютною більшістю солідних пухлини (рак молочної залози, гінекологічні, сечостатеві, ендокринні злоякісні новоутворення, рак шлунка), а також саркоми Юінга і Капоші (Casali et al., 2018). За останні роки цей препарат був включений до 500 зареєстрованих досліджень по всьому світу для вивчення кращих комбінацій його застосування (Henriksen et al., 2018; Octavia et al., 2012).

1.2.1. Фармакологічні властивості доксорубіцину

Доксорубіцина гідрохлорид – кристалічний або аморфний порошок помаранчево-червоного або червоного кольору, брутто-формула $C_{27}H_{29}NO_{11}HCl$, молекулярна маса 580,0 г/моль. Розчинний у воді, погано розчинний в метанолі, майже нерозчинний в ацетоні. рН водного розчину 4,0-5,5 (в концентрації 5 мг/мл).

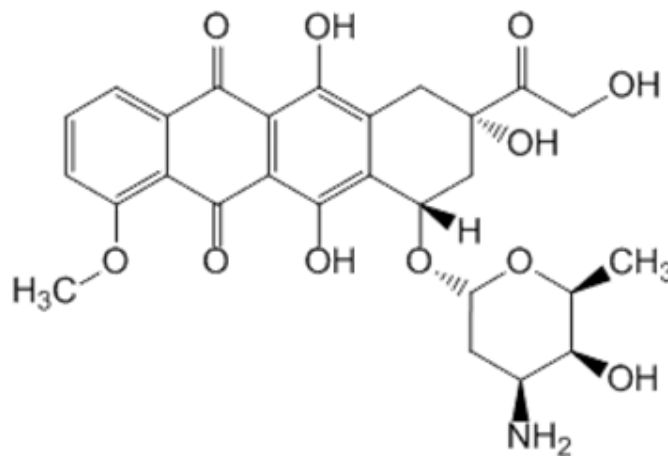


Рис. 1.1. Хімічна формула доксорубіцину (Wallace et al., 2020).
 Doxorubicinum ((8S-цис)-10-[(3-Аміно-2,3,6-тридезоксі-альфа-L-ліксогексопіранозил)оксі]-7,8,9,10-тетрагідро-6,8,11-тригідрокси-8-(гідроксиацетил)-1-метокси-5,12-нафтацендіон (також у вигляді гідрохлориду) $C_{27}H_{29}NO_{11}$)’.

Метаболізується доксорубіцин у печінці протягом однієї години з утворенням активного метаболіту у, який надалі концентрується у печіці,

нирках, міокарді, селезінці, легенях. Початковий період напіввиведення препарату становить близько 5 хв та свідчить про швидке його розподілення в тканинах, термінальний період напіввиведення – 20-48 год. Зв'язок доксорубіцину та його головного метаболіту, доксорубіцинолу, з білками плазми складає 74-76% та не залежить від концентрації препарату в плазмі. Препарат не проникає крізь гематоенцефалічний бар'єр (Zuranec et al., 2020).

1.2.2. Механізми протипухлинної дії доксорубіцину

Нині відомо декілька можливих механізмів протипухлинної ефективності адриаміцину. По-перше, доксорубіцин пригнічує прогресію пухлини через втручання в реплікацію та транскрипцію її ДНК завдяки інтеркаляції та розкручуванню ланцюга ДНК, зміні активності геліказ (Hortobagyi, 1997), витісненню гістонів з відкритих і транскрипційно активних ділянок хроматину та зміні епігеному. Витіснення гістонів є АТФ-незалежним, специфічним для доксорубіцину механізмом пошкодження і може бути наслідком інтеркаляції препарату в певні структури хроматину через наявність аміноцукру у його формулі (Pang et al., 2013). Ця особливість має велике значення для індукції апоптозу в бластних клітинах, у яких спостерігається втрата убіквітинування гістонів інгібіторами протеасом і, можливо, є основним механізмом у лікуванні пацієнтів з гострими лейкозами. По-друге, доксорубіцин інгібує топоізомеразу II α (Tarr et al., 1990; de Jong et al., 1990), утворюючи комплекс ТОРII α -Докс-ДНК, що призводить до дволанцюгових розривів ДНК (Nitiss et al., 2009). Пошкодження ДНК активує сигнальні шляхи, що з одного боку ініціюють репараційні механізми (Misteli & Soutoglou, 2009), а з іншого – апоптоз (Yoshida, 2009). Цей механізм загибелі є основним для ракових клітин, які експресують високий вміст ТОРII α (Press et al., 2009; O'Malley et al., 2011). На відміну від пухлинних клітин, кардіоміоцити не експресують ТОРII α , натомість вони експресують ТОРII β (Murabito et al., 2020; Zhang et al., 2012), яка теж може утворювати комплекс ТОРII β -Докс-ДНК, викликати дволанцюгові розриви ДНК та спричиняти

загибель кардіоміоцитів. У фундаментальній роботі Zhang et al. у 2012 було продемонстровано, що втручання доксорубіцину у топоізомеразу кардіоміоцитів призводить до пошкодження ядер, активації p53, пригнічення функції мітохондрій та дефектного мітохондріального біогенезу.

1.2.3. Побічні ефекти

Було продемонстровано, що препарат негативно впливає на нейрони, нирки, легені, слизові оболонки, шлунок та серце. Побічні ефекти включають: нудоту, блювання, облісіння, когнітивні ускладнення, пронос та лихоманку (Ramalingaуа et al., 2017; Bonadonna et al., 1992), порушення серцево-судинної функції, що включають гіпотензію (Medrano et al., 2001), серцеві аритмії (Ferrans et al., 1997) та застійну серцеву недостатність (Chatterjee et al., 2010), яка є найбільш серйозною та дозолімітуючою побічною дією хіміотерапії раку (Jones et al., 2006; Villani et al., 2006; Steinberg et al., 1987), і є прямим наслідком токсичної кардіоміопатії (Angsutararux et al., 2015). Ураження міокарда доксорубіцином має дозозалежний, прогресуючий та потенційно летальний характер. Було запропоновано різні механізми для пояснення кардіоспецифічної токсичності препарату. До них відносять високу кількість кардіоліпіну в мітохондріях серця, дефіцит антиоксидантів, наявність специфічної кардіальної мітохондріальної НАДН-дегідрогенази, порушення експресії кардіоспецифічних генів (Horenstein et al., 2000). Адриаміцин може спричиняти гостру, хронічну та пізню кардіотоксичність (Cardinale et al., 2020; Saleh et al., 2020). Гостра токсичність доксорубіцину проявляється після прийому одноразової дози (Menna et al., 2008; Pecoraro et al., 2016) або короткого курсу терапії у період від декількох хвилин до тижня після початку лікування, при цьому можливі транзиторні порушення на ЕКГ та гіпотензія, частота яких сягає до 60% (Kilickar et al., 2007; Larsen et al., 1992). Хронічні наслідки лікування доксорубіцином – це дозозалежні, незворотні кардіоміопатичні зміни, що призводять до застійної серцевої недостатності з несприятливим прогнозом. Розвиток кумулятивної та незворотньої

мітохондріальної кардіоміопатії є найскладнішим для прогнозування та клінічного лікування (Wallace, 2003; Zhou et al., 2001).

1.3. Механізми доксокардіотоксичності

Мітохондрії – важливі посередники клітинного життя. У процесі мітохондріального дихання у кардіоміоцитах виробляється понад 90% АТФ, необхідної для функціонування серцевого м'яза (Harris and Das, 1991), а загибель клітин міокарда внаслідок мітохондріальної дисфункції лежить в основі багатьох серцево-судинних захворювань (Lesnefsky et al., 2001). Відомо, що доксорубіцин пошкоджує ядерну ДНК клітини, ініціюючи апоптоз. Деякі автори припускають, що мітохондріальна ДНК порівняно з ядерною може бути більш чутливою до подібних пошкоджень через її невисоку здатність до репарації та близькість до дихального ланцюга. Враховуючи, що мітохондріальна ДНК кодує біля 37 генів, необхідних для функціонування окисного фосфорилування (Wallace et al., 2020), стає зрозумілим, що активність ферментів дихального ланцюга знижується під впливом доксорубіцину, що призводить до мітохондріальної дисфункції. Оскільки доксорубіцин накопичується переважно у мітохондріях і ядрах (Cova et al., 1992), велика кількість мітохондрій саме у міокарді разом з менш активною антиоксидантною системою серця порівняно, наприклад, із печінкою, може пояснювати кардіоселективну токсичність препарату (Kaiserova et al., 2022; Ascensao et al., 2005; Doroshov et al., 1980). Дослідження останніх років виявили ряд механізмів кардіоцитотоксичності доксорубіцину, які розглянемо нижче.

1.3.1. Індукція оксидативного стресу за дії доксорубіцину

Перший механізм кардіотоксичності доксорубіцину пов'язаний з редокс-циклічною активністю препарату в клітині (Linnyk et al., 2015, 2016). Як демонструють численні експериментальні моделі, доксорубіцин пригнічує

мітохондріальне дихання (Studneva et al., 2019; Cunha-Oliveira et al., 2018; Montaigne et al., 2011). У 1994 р. Solem et al. показали, що мітохондрії, ізольовані з серця щурів, які отримували доксорубіцин, демонстрували зниження ефективності окисного фосфорилування без зміни швидкості – такі ефекти характерні для речовин, які приймають та перенаправляють електрони з дихального ланцюга, тобто компонентів окисно-відновного циклу. Tokarska-Schlattner et al. у 2006 р. в досліджах *in vitro* та *in vivo* довели, що чутливі до доксорубіцину ділянки розташовані в комплексах I (НАДН-оксидоредуктаза), II (сукцинатоксидоредуктаза), III (цитохром-*c*), з особливою вразливістю активності IV комплексу (цитохрому *c*-оксидази), що може бути пов'язане зі значним зниженням експресії субодиниці COX5A цитохром-*c*-оксидази в кардіоміоцитах після лікування доксорубіцином (Zhang et al., 2020). Важливу роль в утворенні АФК у мітохондріях під впливом доксорубіцину відіграють ферменти матриксу органел, а саме: НАДФ-оксидаза, ксантиноксидаза та НАДФ-залежна цитохром Р-450 редуктаза (Damiani et al., 2016). За допомогою цих ферментів доксорубіцин відновлюється до напівхінону, результатом чого є генерація вільних радикалів: супероксидного аніона ($\cdot\text{O}_2^-$), пероксиду водню (H_2O_2) через посередництво мітохондріальної супероксиддисмутази (MnSOD), який згодом метаболізується токсичним шляхом у реакціях Фентона та Хабер-Вейса з утворенням гідроксильного радикала ($\cdot\text{OH}$) (Angsutararux et al., 2015). Цикл одноелектронного відновлення/окиснення доксорубіцину може функціонувати тривалий час, що призводить до виснаження клітинних запасів глутатіонредуктази та глутатіону, каталази та супероксиддисмутази і, як наслідок, до зниження окисно-відновного потенціалу кардіоміоцитів та додаткового посилення оксидативного стресу (Klatt et al., 2000). З іншого боку, утворені в мітохондріях $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ та H_2O_2 реагують з мембранними фосфоліпідами. У ході першого ланцюга перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) реакція ініціюється АФК або іонами заліза і починається з утворення гідропероксиду фосфоліпідів. Далі під дією активованої фосфоліпази A_2 вивільняються гідропероксиди ліпідів (LOOH). При наявності в клітині

достатнього рівня глутатіонпероксидази, LOOH деградує до ліпідного спирту (LOH), але на тлі дії доксорубіцину навпаки, запускаються нові реакції окиснення ліпідів за наявності іонів заліза Fe^{2+} . Отже, LOOH утворюють пероксил-радикали ($LOO\cdot$) і алкоксил-радикали ($LO\cdot$). Другий ланцюг характеризується дією АФК та ФЛ A_2 на стабільні молекули мембранних фосфоліпідів з утворенням ліпідних радикалів ($L\cdot$), які реагують з киснем з утворенням $LOO\cdot$. Накопичення окиснених ліпідів вводить гідрофільні молекули мембрани у гідрофобну фазу з наступною зміною проникності мембрани. Відомо, що при збільшенні концентрації Ca^{2+} підвищується активність фосфоліпази A_2 , що додатково посилює руйнування клітин (Fujita, 2002). Непрямим доказом концепції оксидативного стресу, що індукує доксорубіцин, є підвищення концентрації малонового діальдегіду (МДА) та дієнових кон'югатів (ДК) як продуктів ПОЛ.

1.3.2. Нітрозативний стрес

Другий механізм кардіоцитотоксичності доксорубіцину пов'язаний з впливом препарату на обмін NO-синтаз. Добре відомо про роль конститутивної Ca^{2+} -залежної синтази оксиду азоту (cNOS), яка має фізіологічне значення та каталізує синтез оксиду азоту (NO) в необхідних для нормального метаболізму невеликих кількостях. Індуцибельна синтаза оксиду азоту (iNOS) навпаки є Ca^{2+} -незалежним ферментом, активується дуже швидко, зазвичай лише за патологічних станів, та забезпечує синтез NO протягом тривалого часу, в кількостях, що в тисячу разів перевищують продукцію NO в нормі (Moïbenko et al., 2004; Dudzinski et al., 2006). Як eNOS, так і iNOS, можуть бути залучені до доксокардіотоксичності (Octavia et al., 2012). Відомо, що доксорубіцин утворює кисневий радикал, безпосередньо відновлюючись в редуктазному домені cNOS (Vasquez-Vivar et al., 1997), а при підвищенні концентрації препарату спостерігається неспряжений стан cNOS, за якого фермент замість NO генерує $\cdot O_2^-$ (Kalivendi et al., 2001). З іншого боку, оксидативний стрес індукує активну експресію iNOS з наступним синтезом

NO у великій кількості. За умов посилення вільнорадикальних процесів, NO реагує з $\bullet\text{O}_2^-$, утворюючи пероксинітрит (ONOO^-), який є високоактивним окиснювачем ДНК, білків, ліпідів та кардіоліпіну. Важливо відмітити, що ця реакція відбувається швидше, ніж реакція $\bullet\text{O}_2^-$ з супероксиддисмутазою. Також відомо, що ONOO^- індукує перетворення ксантиндегідрогенази в оксидазу, тим самим посилюючи продукцію АФК (Octavia et al., 2012). Було продемонстровано, що зростання активності неспряженого фермента пропорційна патологічній відповіді міокарда на доксорубіцин, а утворення АФК відіграє значну роль у дисфункції серця, а саме у розвитку та важкості перебігу каріоміопатії, міокардитів та гострої ішемії (Moens et al., 2009; Neilan et al., 2007).

1.3.3. Фероптоз як наслідок дії доксорубіцину

Третій механізм цитотоксичності доксорубіцину пов'язаний з його впливом на обмін заліза. Наявне у плазмі крові трансферинзв'язане залізо з'єднується з рецептором трансферину цитоплазматичної мембрани, утворюючи комплекс, який дає змогу йону проходити крізь клітинну мембрану шляхом ендцитозу, після чого Fe^{3+} стає частиною пулу лабільного цитозольного заліза, яке може бути включене у гем або секвеструватися феритином (Vela et al., 2020). Гомеостаз заліза у клітині регулюється ядерними факторами, а також залізорегуляторними білками IRP1 та IRP2. Фероптоз – це спосіб регульованої загибелі клітини, що характеризується залізоіндукованим перекисним окисненням ліпідів (Friedmann et al., 2014; Fang et al., 2019). Доксорубіцин може ініціювати фероптоз через індукцію ядерного фактора Nrf2 з опосередкованим підвищенням регуляції гемоксигенази-1, яка каталізує деградацію гема з наступним вивільненням йонів Fe (Fang et al., 2019). Також препарат інактивує в кардіоміоцитах як IRP1, так і IRP2, внаслідок чого порушується трансферинопосередковане поглинання заліза та феритинопосередковане накопичення заліза (Minotti et al., 2001; Shi et al., 2011). Tadokoro et al. у 2016 показали, що доксорубіцин може індукувати

фероптоз через зниження регуляції глутатіонпероксидази, а як було вже зазначено вище, цей ензим відіграє суттєву роль у захисті мембран клітин від продуктів ПОЛ, а саме при наявності в клітині достатньої активності глутатіонпероксидази, LOOH деградує до LOH. Але за умов дії доксорубіцину навпаки, запускаються реакції утворення LOO \cdot та LO \cdot за наявності Fe $^{2+}$ (Fujita, 2002). Отже, вищезазначені процеси призводять до накопичення у клітині негемового заліза. Надалі доксорубіцин формує комплекс з іонами заліза, відновлюючись в ньому, що через реакцію Фентона призводить до утворення гідроксильного радикала. На відміну від $\cdot\text{O}_2^-$ та H_2O_2 , які можуть бути детоксиковані системою антиоксидантного захисту клітини, гідроксильний радикал є стійким до ферментативної деградації, пошкоджує ДНК, білки та ліпіди, що призводить до загибелі клітини (Karrus et al., 1980). Залізо, що вже зв'язане, також, по мірі накопичення АФК реагує з $\cdot\text{O}_2^-$ і вивільняється із залізовз'язуючих білків (трансферин, феритин) у вигляді Fe $^{2+}$, надалі реагуючи з H_2O_2 з утворенням $\cdot\text{OH}$ у реакції Фентона (Minotti K, 1998).

1.3.4. Зв'язок з кардіоліпіном

Кардіоліпін – негативно заряджений фосфоліпід з 4-хацильним ланцюгом, локалізований на зовнішній поверхні внутрішньої мембрани мітохондрій. Він є спільним алостеричним ефектором для цитохрому *c* та аденіннуклеотидного транслокатора (Cheneval et al., 1989), а саме виступає якірною точкою для першого (близько 15% цитохрому *c* міцно зв'язане з кардіоліпіном) і необхідний для активності другого (Duncan et al., 2018). У разі підвищення вмісту АФК, кардіоліпін-специфічна оксигеназа каталізує утворення гідроперекису кардіоліпіну, що призводить до конформаційних змін останнього. Внаслідок цього відбувається його переміщення на зовнішню мембрану мітохондрії, що сприяє індукції мітохондріальної пори транзиторної провідності та виходу цитохрому *c* (Kagan et al., 2004). З іншого боку, власне доксорубіцин має сильну афінність до кардіоліпіну (Parker et al., 2001). Він утворює майже незворотний комплекс з фосфоліпідом, утримуючись таким

чином у внутрішній мембрані мітохондрій (Goormaghtigh et al., 1990). Після утворення комплексу, кардіоліпін стає недоступний для закріплення цитохрому *c* (Cheneval et al., 1994).

Згідно з останніми дослідженнями, важливим компонентом доксорубіциніндукованого пошкодження серця є запалення. АФК активують NLRP3 з утворенням інфламасоми, стимулюють експресію каспази-1 та секрецію прозапальних цитокінів IL-1, IL-18, що спричиняє запальну реакцію серцевої тканини (Chen et al., 2022).

1.4. Роль мітохондріальної пори транзиторної провідності (МП) у доксорубіциніндукованому пошкодженні серця

1.4.1. Структура мітохондріальної пори

Сьогодні МП визначається як мультипротеїновий комплекс внутрішньої та зовнішньої мітохондріальних мембран, який формує йонну, залежну від напруги, неселективну пору (Endlicher et al., 2023). Вперше МП була описана Хавортом і Хантером у 1979 році як неселективний канал, відкриття якого сприяє підвищенню проникності мітохондріальних мембран (Haworth and Hunter, 1979). Відтоді структура та функції МП активно вивчались, і нині відомо, що довготривале її відкриття у режимі високої провідності супроводжується вільним проходженням крізь внутрішню мітохондріальну мембрану метаболітів розміром до 1,5 кДа. Це призводить до тривалої та незворотної деполяризації, неспряження дихального ланцюга, припинення синтезу АТФ, набухання мітохондрій, вивільнення апоптогенних факторів, розриву мембран і гибелі клітини (Rasola et al., 2011; Feissner et al., 2009; Halestrap., 2009). Натомість короткочасне відкриття МП у низькопровідному «мерехтливому» режимі, що супроводжується вільним проходженням крізь внутрішню мітохондріальну мембрану субстратів розміром 0,3-0,7 кДа, бере участь у фізіологічній регуляції мітохондріального

гомеостазу, забезпечуючи швидке вивільнення Ca^{2+} та АФК з матриксу (Zorov et al., 2014). Враховуючи такий зв'язок МП з функцією та загибеллю клітини, проникність внутрішньої мембрани мітохондрій є предметом чисельних досліджень щодо вивчення впливу на загибель клітини при багатьох захворюваннях (Martin et al., 2009; Millay et al., 2008; Ramachandran et al., 2011) та старінні (Mys et al., 2017). Показано, що ендогенні та екзогенні фактори модулюють відкривання МП, а його зворотність регулюється співвідношенням активуючих та інгібуючих агентів. Концентрація цих модуляторів змінюється за різних умов, встановлюючи поріг, вище якого відкривання МП стає незворотним. Основними регуляторними факторами є йони Ca^{2+} , АФК, неорганічні фосфати і аденіннуклеотиди. Найважливішим регуляторним білком є циклофілін D (Cyp-D), який активує відкривання МП (Baines et al., 2005). Інші регуляторні білки включають мітохондріальні сіртуїни, креатинкіназу, гексокіназу II та члени родини Bcl-2. Найсильнішим відомим екзогенним інгібітором МП є циклоспорин А (CsA), а ендогенним – негативний потенціал мітохондріальної мембрани. Інші інгібітори включають йони Mg^{2+} і низький рН мітохондріального матриксу (Halestrap et al., 2004).

Спочатку припускали, що МП складається з потенціалзалежного аніонного каналу (VDAC) у зовнішній мітохондріальній мембрані, аденіннуклеотидного транслокатора (ANT) у внутрішній мітохондріальній мембрані, його регулятора в матриксі мітохондрій циклофіліну D (Cyp-D), гексокінази II (HK) та мітохондріальної креатинкінази (СК), що стабілізують цей комплекс (Halestrap et al., 2014; Crompton et al., 1998). Але зараз прийнята кардинально інша модель (рис. 1.2).

Циклофілін D (Cyp-D). Пептидил-проліл-цис-транс-ізомераза мітохондріального матриксу Cyp-D є генетично верифікованим і беззаперечним регулятором функції МП. Це – матричний білок розміром 18 кДа, який кодується ядерним геном PPIF. Залучення Cyp-D до регуляції МП було виявлено при дослідженні імуносупресивного препарату CsA, введення

якого зменшувало набухання мітохондрій, і пізніше було показано зменшення чутливості МП до Ca^{2+} внаслідок інгібуючої дії CsA (Crompton et al., 1988; Halestrap and Davidson, 1990).

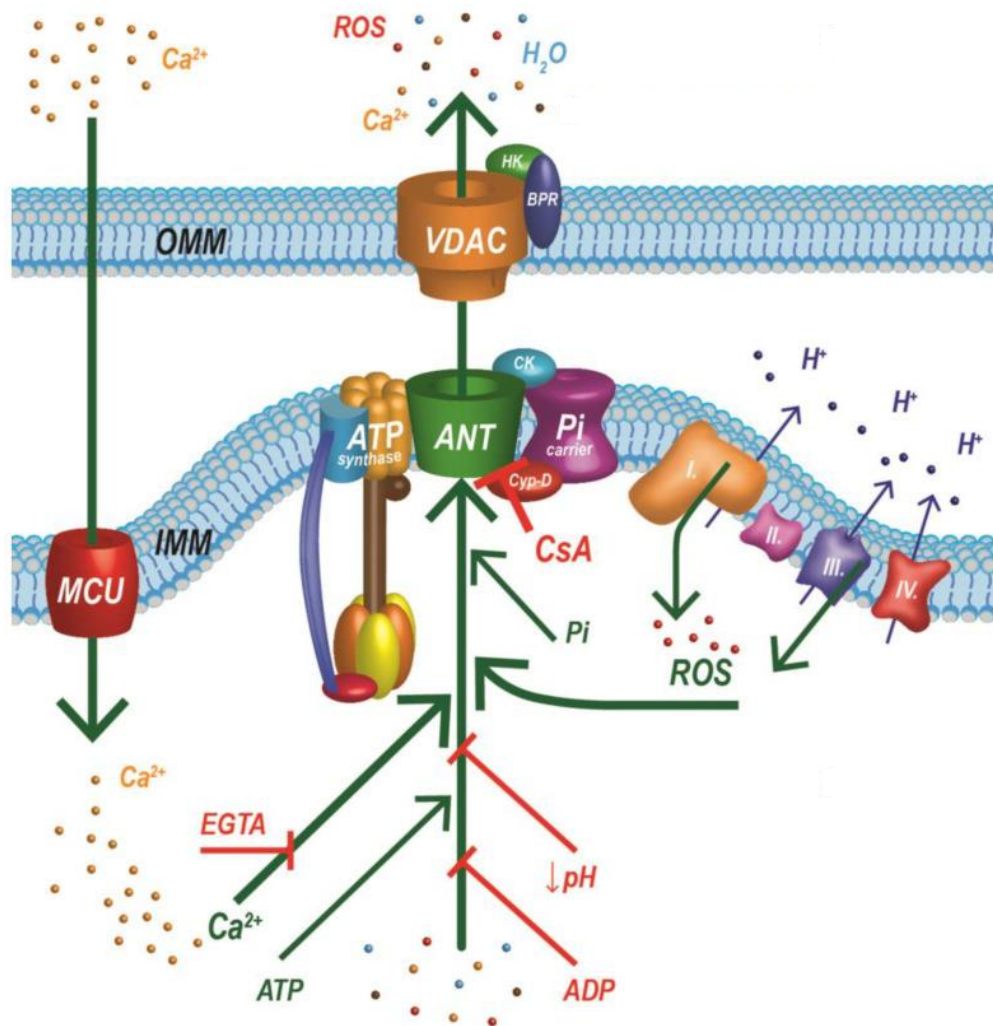


Рис. 1.2. Сучасне уявлення про структуру МП (Endlicher et al., 2023).

Потенціалзалежний аніонний канал (voltage dependent anion channel, VDAC). Раніше було припущено, що VDAC, або порин, слугує зовнішнім мембранним компонентом МП і функціонує як самостійна неселективна пора для аніонів і катіонів, тому що електрофізичні властивості VDAC були подібними до властивостей МП (Szabo and Zoratti, 1993). Але генетичні дослідження, проведені пізніше, показали здатність мітохондрій змінювати проникність за відсутності всіх трьох ізоформ VDAC, що спростувало

твердження про важливість VDAC як основного структурного компонента МП, а натомість регуляторного (Baines et al., 2007).

Аденіннуклеотидний транслокатор (adenine nucleotide translocator, ANT). ANT є внутрішньомембранним транспортером масою 32 кДа, відповідальним за надходження АДФ у мітохондріальний матрикс в обмін на АТФ, і є невід'ємним компонентом мітохондріального механізму синтезу АТФ (Klingenberg, 2008). Крім того, ANT зв'язаний з Cyp-D (Crompton et al., 1998; Woodfield et al., 1998). У нещодавніх дослідженнях було показано, що пригнічення експресії генів усіх трьох ізоформ ANT, а також гена Cyp-D призвело до повної дезактивації МП. Це вказує на те, що ANT може являти собою незалежну пору з низькою провідністю (Karch et al., 2019).

Мітохондріальний фосфатний переносник (P_iC). P_iC – це внутрішній мембранний білок, який є основним транспортером неорганічного фосфату (P_i) в мітохондріальний матрикс (Kolbe et al., 1984). Таким чином, P_iC відіграє ключову роль у мітохондріальному окисному фосфорилуванні та продукції енергії, оскільки він постачає мітохондріям P_i, необхідний для синтезу АТФ (Palmieri, 2004). Результати досліджень (Gutiérrez-Aguilar et al., 2014; Kwong et al., 2014) дають змогу припустити, що P_iC не є безпосереднім компонентом МП, а його здатність змінювати вміст матриксного P_i опосередковано впливає на відкривання пори.

F₀F₁ АТФ-синтаза. Нині мітохондріальна F₀F₁ АТФ-синтаза розглядається як основний структурний компонент МП. Представляє собою багатокомпонентний ферментативний комплекс, який функціонально поєднує транслокацію протонів через внутрішню мембрану з синтезом АТФ. Складається з F₀-протонтранслокуючого домена АТФ-синтази, вбудованого у внутрішню мембрану і з'єднаного з каталітичним доменом F₁ за допомогою центральної та периферичної ніжок (Jonckheere et al., 2012). Розглядаються дві потенційні моделі МП за участю F₀F₁ АТФ-синтази: 1) димеризація молекул F₀F₁ АТФ-синтази через місця контакту між мономерами з формуванням МП

та 2) перетворення кільця c -субодиниці домену F_0 під дією Ca^{2+} на чутливий до напруги канал, який перетворюється на МП. Показано, що у мітохондрії з дефіцитом c -субодиниці утворюється значно менший канал, чутливий до CsA (Alavian et al., 2014; Giorgio et al., 2013). Отже, оскільки ANT та АТФ-синтаза розглядаються як можливі структурні компоненти МП, ймовірно, що ці білки утворюють дві різні пори: з низькою та високою провідністю відповідно (Endlicher et al., 2023).

F_0F_1 АТФ-синтаза, ANT та P_iC не тільки функціонально пов'язані з мітохондріальною продукцією АТФ, але й фізично об'єднані у внутрішньомембранний суперкомплекс, який називається АТФ-синтасомою (Halestrap et al., 2014). Втрата будь-якого з компонентів АТФ-синтасоми призводить до порушення мітохондріального окисного фосфорилування (Graham et al., 1997) та виробництва енергії (Kwong et al., 2014; Tatuch and Robinson, 1993). Тому АТФ-синтасома також була запропонована як ймовірна модель МП (Beutner et al., 2016). Отже, не виключно, що МП не має єдиної власної молекулярної основи, натомість існує кілька різних пор, які можуть складатися з різних компонентів.

Мітохондрії є основним джерелом утворення не тільки АТФ, але й АФК. Як було зазначено вище, надлишок АФК призводить до пошкодження комплексів дихального ланцюга, спричиняючи зниження мітохондріального потенціалу та продукції АТФ. Також АФК є основним регуляторним фактором МП, а саме збільшують зв'язування Сур- D з ANT, підвищують чутливість МП до Ca^{2+} , сприяючи прискореному старінню і загибелі клітин. Тим не менш, фізіологічні рівні АФК можуть лежати в основі таких процесів, як гомеостаз іонних каналів й експресія генів (Fang et al., 2011; Wang et al., 2008). Мітохондрії відіграють провідну роль також у процесах Ca^{2+} -сигналізації внаслідок їхньої здатності накопичувати та вивільняти значні кількості іонів Ca^{2+} (Kolomiyes et al., 2017; DeLuca et al., 1961), що є визначальним для функціонування клітини в цілому, оскільки продукція мітохондріями АТФ

залежить від концентрації цього катіона в матриксі (Tsai et al., 2014; Carafoli et al., 1965). Концентрація вільного Ca^{2+} в мітохондріях підтримується на певному оптимальному гомеостатичному рівні і залежить від одночасного перебігу трьох процесів, що складають так звану «уніфіковану модель» регуляції транспорту Ca^{2+} : накопичення, зв'язування з внутрішньомітохондріальними буферами та вивільнення (Szabadka et al., 2008). Надходження Ca^{2+} у органели контролюється мітохондріальними кальцієвим уніпортером (MCU) та ріанодіновими рецепторами (mRyR) (Vaughan et al., 2011), в той час як вивільнення – мітохондріальними $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Palty et al., 2010) та $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмінниками (Jiang et al., 2009; Tsai et al., 2014). Як згадувалось вище, АФК є потужними активаторами МП. Чутливість МП до дії іонів кальцію значно потенціюється в умовах оксидативного стресу. І навпаки, перевантаження мітохондрій кальцієм може призвести до збільшення продукції АФК. Ефект кальцієвого перевантаження призводить до «втечі» електронів з електронно-транспортного ланцюга, зокрема комплексів I та III (Tajeddine et al., 2016). Збільшення надходження НАДН через стимульовану кальцієм активність ферментів циклу Кребса підвищує інтенсивність ПОЛ (McCormack et al., 1990). Також було показано, що іони Ca^{2+} конкурують з цитохромом *c* за місця зв'язування з кардіоліпіном, що може блокувати потік електронів від комплексу III до IV. Серцева недостатність асоціюється з кумулятивним виснаженням кардіоміоцитів. Хоча дисфункції серцевого м'яза передують безліч подій, основу пошкодження кардіоміоцитів становить порушення регуляції кальцієвого гомеостазу (Luo et al., 2018), недостатність продукції АТФ (Ingwall, 2009) та оксидативний стрес (Mitry et al., 2020). Оскільки всі ці фактори є умовами для відкриття МП, було висунуто гіпотезу, що цей канал може бути таргетною точкою впливу при пошкодженні міокарда з метою запобігання гибелі кардіоміоцитів.

1.4.2. Вплив доксорубіцину на кальцієвий гомеостаз та індукцію мітохондріальної пори у кардіоміоцитах

Йони Ca є потужними індукторами відкриття МП, яка стає високопроникною для розчинів і речовин з молекулярною масою до 1,5 кДа. В літературних джерелах зазначено, що доксорубіцин порушує Ca^{2+} -гомеостаз, а саме: індукує вивільнення Ca^{2+} із саркоплазматичного ретикулуму, зв'язуючись з ріанодиноними рецепторами (Holmberg et al., 1990), інгібує $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмінник у сарколемі (Caroni et al., 1981), а також підвищує активність Ca^{2+} -каналів L-типу (Keung et al., 1991). У кардіоміоцитах мітохондрії розташовані поблизу місць вивільнення кальцію із саркоплазматичного ретикулуму і можуть акумулювати велику його кількість. Це призводить до стійкого накопичення та перевантаження мітохондріального матриксу кальцієм і, як наслідок, індукції МП. Після тривалого незворотного відкриття МП загибель клітин міокарда може відбутися двома шляхами: 1) через некроз внаслідок неспряженого окисного фосфорилування та розсіювання протонного градієнта, коли АТФ-аза переходить у реверсний стан і починає гідролізувати АТФ. В результаті цього кардіоміоцити не можуть підтримувати необхідний вміст АТФ і гинуть (Halestrap et al., 2004, 2006); 2) через апоптоз внаслідок набухання матричного компартменту при підвищенні проникності внутрішньої мембрани для води та високу концентрацію матричних білків, що чинить тиск на зовнішню мембрану, яка зрештою розривається. Це спричиняє вивільнення цитохрому *c* та проапоптотичних білків родини Bcl2 (Green et al., 2004; Crompton et al., 2002; Martinou et al., 2001). Однак, якщо пора знову закриється і синтез АТФ буде підтримуватися на мінімальному рівні, апоптотична загибель переважатиме над некротичною. Згідно з літературними даними, окисне фосфорилування під впливом доксорубіцину може пригнічуватися також через зниження експресії АНТ та вмісту цитохрому *c* у серці щурів (Pereira et al., 2016; Oliveira et al., 2006). В експериментах було продемонстровано, що кардіоміоцити (Zhou et al., 2001; Solem et al., 1996), а також мітохондрії, ізольовані з серця щурів, що субхронічно отримували доксорубіцин (Solem et al., 1996; Oliveira et al., 2004; Zhou et al., 2001), демонструють підвищену чутливість МП до

кальцію. Це є раннім кардіоспецифічним ефектом на введення препарату (Oliveira et al., 2004; Pereira et al., 2012). Відкриття МП також було ідентифіковано в передсердних трабекулах людини, в яких реєстрували зниження мітохондріального дихання та трансмембранного електричного потенціалу разом із скоротливою дисфункцією (Montaigne et al., 2011). Доведено, що преінкубація *in vitro* з CsA мітохондрій щурів після введення доксорубіцину відновлює знижену здатність органел до навантаження Ca^{2+} .

1.5. Патогенетичні механізми впливу доксорубіцину на артеріальні судини

Головною метою хіміотерапії раку є знищення пухлинних клітин. Проте це досягається не лише через пригнічення клітинної проліферації, але й токсичного ураження функціонуючого судинного ендотелію, оскільки пухлинні клітини мають потребу в кровопостачанні для свого росту і розмноження (Grant et al., 2002). Доведено, що *in vitro* доксорубіцин індукує підвищення проникності ендотелію та важку ендотеліальну дисфункцію, призводить до порушення регуляції судинного тонуусу, збільшення артеріальної жорсткості, порушення ангиогенезу та репарації судин (Wolf and Baynes, 2006; Jia et al., 2019). Розглянемо декілька сигнальних шляхів, що можуть бути задіяні у порушенні ендотелійзалежної релаксації артеріальних судин. По-перше, порушення регуляції судинного тонуусу пов'язане із зменшенням біодоступності NO для гладеньком'язових клітин судинної стінки. Основна функція NO у серцево-судинній системі – вазодилатація, а також гальмування проліферації гладенької мускулатури, зменшення адгезії та агрегації тромбоцитів, інгібування адгезії і міграції моноцитів у стінку судини (Jia et al., 2019). Відомо, що у ендотелії оксид азоту утворюється з L-аргініну за допомогою eNOS. Фермент локалізується у зовнішній мембрані ендотеліальних клітин у кавеолах поряд з кавеоліном – така «фіксація» полегшує регуляцію його активності. За умов патологічних стимулів (АФК,

гіперглікемія, продукти ПОЛ, медіатори запалення) активується протеїнкіназа С, яка фосфорилує eNOS по треоніну в 495 положенні, гальмуючи синтез NO і таким чином, порушуючи процеси скорочення-розслаблення (Lum et al., 2001). По-друге, в основі судинотоксичної дії доксорубіцину лежать оксидативний та нітрозативний стреси – стани, що призводять до втрати ендотеліальними клітинами їх функцій (Lum et al., 2001; Kalyanaraman et al., 2002). За допомогою НАДФ-оксидази, ксантиноксидази та НАДФ-залежної цитохром Р-450-редуктази, доксорубіцин відновлюється до напівхінону, результатом чого є генерація вільних радикалів $\bullet\text{O}_2^-$, надалі H_2O_2 та $\bullet\text{OH}$ (Angsutararux et al., 2015). Утворені в мітохондріях та ендотеліальних клітинах АФК реагують з мембранними фосфоліпідами з утворенням сполук ДК та МДА. Ці речовини негативно впливають на мембрани та ініціюють апоптоз ендотеліоцитів, що призводить до ендотеліальної дисфункції та бар'єрної недостатності (Zhao et al., 2001; Cotgreave et al., 1998; Nyslop et al., 1988). Було показано, що H_2O_2 , утворений навіть при субмікромолярних концентраціях доксорубіцину, сприяє токсичному ураженню як кардіоміоцитів, так і ендотеліоцитів. Деякі автори припускають, що токсичне ураження саме ендотеліальних, а не ракових клітин, може бути основним механізмом протипухлинної дії доксорубіцину (Wolf, 2006). З іншого боку, доксорубіцин зв'язується з редуктазним доменом eNOS і відновлюється з утворенням кисневого радикала. За умов посилення вільнорадикальних процесів супероксидний аніон може реагувати з NO, утворюючи пероксинітрит, який є високоактивним окиснювачем ДНК, білків, ліпідів, кардіоліпіну тощо. У дослідженнях на серцевих трабекулах щурів показано, що молекули пероксинітриту порушують спорідненість міофіламентів до Ca^{2+} і це призводить до блокування процесу розслаблення-скорочення (Octavia et al., 2012). Вірогідно, що до механізмів порушення вазодилатації може бути задіяний сигнальний шлях ендотеліну (ET). Показано, що експресія вазоконстриктора ET-1 та його рецепторів підвищена в міокарді щурів із серцевою недостатністю (Picard et al., 1998), у пацієнтів із дилатаційною

кардіоміопатією (Pieske et al., 1999) та у пацієнтів, що отримували доксорубіцин (Sayed-Ahmed et al., 2001). Вазоконстрикторна активність ET-1 у судинах у нормі врівноважується дією NO, але внаслідок дії доксорубіцину, продукція оксиду азоту гальмується, і спостерігається порушення процесів скорочення-розслаблення.

1.6. Застосування методу електрокардіографії для реєстрації ранніх ознак доксокардіотоксичності у щурів

Побічні ефекти лікарських препаратів часто проявляються у змінах на електрокардіограмі (ЕКГ) (Lind et al., 2021; Özbay1 et al., 2022). Це дослідження є одним із основних способів діагностики захворювань серцево-судинної системи та аналізу серцево-судинної функції через його ефективність та неінвазивність, який також застосовують для оцінки кардіотоксичності в експериментальній кардіології. Показано, що патологічні ознаки, пов'язані з захворюваннями або впливом токсичних речовин, проявляються однаково на ЕКГ гризунів і людей (Peters et al., 2000; Wellenius et al., 2004; Zareba et al., 2001; Nadziejko et al., 2004). Наприклад, глибокий зубець Q або елевація сегменту ST – характерна ознака некрозу серцевого м'яза – були продемонстровані на багатьох моделях інфаркту міокарда та кардіоміопатії у щурів (Farraj et al., 2011; A. Carll et al., 2011). Такі зміни, як збільшення зубця P, подовження інтервалів PQ, QT та комплексу QRS, відхилення вісі QRS, патологічний зубець Q або елевація сегмента ST, зміни зубця T, якщо їх порівнювати з супутніми оцінками гістології, мають високу прогностичну цінність для багатьох форм серцево-судинних захворювань у щурів (Farraj et al., 2011). Зміни сегмента ST часто асоціюються з гострою ішемією, гіпертрофією шлуночків або кардіоміопатією (Fatula et al., 2020). Хоча на нормальній ЕКГ щурів сегмент ST виділяють досить умовно, результатом одного з перших основоположних досліджень з використанням високих доз доксорубіцину була елевація сегмента ST, що свідчило про ішемічне ураження

міокарда токсичного генезу (Johnston et al., 1981; Osborne, 1981). Jensen et al. у своїх фундаментальних працях, присвячених вивченню доксокардіотоксичності, демонстрували прогресуюче розширення комплексу QRS, збільшення з наступним зменшенням амплітуди зубців R та S, що свідчило про порушення внутрішньошлуночкової провідності та скоротливості лівого шлуночка відповідно, а також подовження інтервалу QT (QTc), що обумовлене збільшенням тривалості фази III потенціалу дії шлуночків внаслідок впливу доксорубіцину на Ca²⁺-канали L-типу (Jensen et al., 1984; Keung et al., 1991). Пізніше було доведено, що ступінь подовження інтервалу QT (QTc) корелює з тяжкістю гістологічного ураження серця та є фактором ризику виникнення летальної поліморфної шлуночкової тахікардії типу *torsades de pointes* (Duan et al., 2018; Chan et al., 2009). Сучасні дослідження показали існування IKr та IKs-каналів, відповідальних за вихід K⁺ під час фази III потенціалу дії (McCauley et al., 2016). Ген HERG, що кодує IKr-канал, є мішенню для кардіотоксичних препаратів і, ймовірно, є відповідальним за QT-асоційовані порушення ритму (Vandenberg et al., 2012). Вважається, що подовження інтервалу QT (QTc) є найбільш точним ЕКГ-маркером кардіотоксичності антрациклінів і розглядається як суттєва проблема в онкології (Roden et al., 2019; Duan et al., 2018). У щурів, які отримували доксорубіцин, згодом розвивалося також подовження інтервалу PQ, що свідчило про порушення провідності по АВ-з'єднанню (Puri et al., 2005).

1.7. Метаболічне ремоделювання серця внаслідок дії доксорубіцину

Іншою помітною реакцією на лікування доксорубіцином є зміна метаболічного обміну та мітохондріального біогенезу, що є спробою мітохондрій відновити свою біоенергетичну здатність, втрачену в процесі медикаментозного ураження. Хоча багато показників системної токсичності препарату було успішно ідентифіковано, тканинно-специфічні біомаркери

міокарда все ще потребують подальшого вивчення, щоб забезпечити більш повне розуміння патологічних процесів, що відбуваються під час розвитку доксорубіциніндукованої кардіоміопатії.

1.7.1. Вплив доксорубіцину на пул високоенергетичних фосфатів

Міокард потребує великої кількості енергії для підтримання скоротливої здатності, в той час як пошкоджені доксорубіцином мітохондрії втрачають здатність генерувати АТФ. Це визначається експериментально за показниками клітинного дихання та такими співвідношеннями, як фосфокреатин (ФКр)/креатин, ФКр/АТФ, АТФ/АДФ, а модулятором енергетичного резервуару виступає креатинкіназа, перетворюючи креатин на ФКр у прямому та зворотньому напрямку, з вивільненням АТФ (Tokarska-Schlattner et al., 2006; Nicolay et al., 1987). Так, на ізольованих кардіоміоцитах було показано, що доксорубіцин знижує концентрацію внутрішньоклітинних АТФ та ФКр більш ніж на 50% протягом 24 годин після першого введення (Jeyaseelan et al., 1997) і на 20% після 70-хвилинної інфузії (Pelikan et al., 1986), також спостерігали значне зниження активності серцевої креатинкінази (Miura et al., 2000). Tokarska-Schlattner et al. у 2002, довели здатність доксорубіцину інгібувати активність серцевої мітохондріальної креатинкінази (sMtCK) внаслідок порушення її октамерного стану та здатності зв'язуватися з мембраною. Ймовірно, що MtCK є мішенню для кисневих радикалів, які генеруються у процесі відновлення антрациклінів (Weinstein et al., 2000; Olson et al., 1990). З іншого боку, сам фермент виявляє високу спорідненість до кардіоліпіну, локалізується у мітохондріальних кристах та периферичному міжмембранному просторі, де утворює комплекси з порином у зовнішній та аденілатним транслокатором у внутрішній мембрані мітохондрій, запобігаючи відкриванню МП (Dolder et al., 2003), а як вже розглядалося вище, доксорубіцин має сильну афінність до кардіоліпіну (Parker et al., 2001). Таким чином, порушення функції та структури MtCK впливає на мітохондріальне дихання, а також призводить до зміни проникності мітохондріальних мембран

(Schlattner et al., 2006; Saks et al., 2006). Було показано, що лікування доксорубіцином знижувало швидкість транскрипції також цитозольної серцевої креатинфосфокінази (Olson and Mushlin, 1990). Взаємодія між димерним цитозольним та октамерним мітохондріальним ізоферментами креатинфосфокінази являє собою «енергетичний буфер», а також забезпечує «енергетичний шлюз», що з'єднує місця генерації енергії з місцями її споживання (Wallimann et al., 1992). Окремо слід відмітити, що зниження кількості АТФ може виникати через величезні енергетичні витрати на заміщення пошкоджених білків серцевого м'яза, наприклад, титину, які руйнуються внаслідок активації доксорубіциніндукованого апоптозу (Sawyer et al., 2002; Kumar et al., 2002; Lim et al., 2004).

1.7.2. Вплив доксорубіцину на обмін глюкози

Внаслідок токсичної дії доксорубіцину порушується функція дихального ланцюга, зменшується синтез АТФ та підвищується концентрація внутрішньоклітинного кальцію. Через виснаження енергетичних субстратів та збільшення АФК, які пошкоджують мембрани та мембраноасоційовані білки, відбувається зсув метаболічних процесів від окиснення жирних кислот до окиснення глюкози, що було показано в ізотопному аналізі серцевої тканини щурів після лікування їх доксорубіцином (Carvalho et al., 2010). Перетворення пірувату в молочну кислоту призводить до зменшення клітинного рН та метаболічного ацидозу, а для відновлення цитозольного рН та іонного балансу активуються Na^+/H^+ та $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінники. Але на тлі дефіциту АТФ, концентрація Ca^{2+} , а також АФК в ушкодженій тканині міокарда ще більше підвищуються (Murphy et al., 2008). Всі ці процеси індукують відкривання МП, що призводить до некротичної загибелі кардіоміоцитів. Деякий час МП може залишатися в закритому стані через інгібування її низькими значеннями рН. Якщо рівень АТФ підтримується на певному субпороговому рівні, більшість кардіоміоцитів буде перебувати у стані апоптотичної загибелі із можливістю відновлення. Порушення метаболізму глюкози починається від зниження

експресії фосфофруктокінази та окиснення пірувату до транслокації переносників глюкози GLUT-1 та GLUT-4 (Ventura-Clapier et al., 2003). Відомо, що серце експресує як ізоформу GLUT-4, важливу для нормального функціонування кардіоміоцитів, що транслокується на поверхню клітини під впливом інсуліну та гіпоксії, так і GLUT-1, що влаштовується у плазматичну мембрану за дії інсуліну, серотоніну та катехоламінів. Було показано, що лікування доксорубіцином призводило спочатку до збільшення поглинання кардіоміоцитами глюкози з крові, після чого відбувалося значне зменшення поглинання з відповідним транзиторним підвищенням концентрації глюкози у крові – такі коливання можуть відбуватися спочатку через швидку транслокацію транспортерів на плазматичну мембрану з утилізацією клітиною глюкози, а надалі – вивільнення її у кров через незворотно пошкоджені мембрани (Hrelia et al., 2002). Раніше повідомлялося, що доксорубіцин викликає пригнічення циклу β -окиснення жирних кислот (Sayed-Ahmed et al., 1997; Zheng et al., 2019). Ці дані підтверджуються результатами диференційної експресії генів у серцях щурів, які субхронічно отримували доксорубіцин, й демонструють зниження експресії транскриптів генів, які кодують ензими циклу окиснення жирних кислот. Ймовірно, що не останню роль у цьому процесі відіграє здатність доксорубіцину інгібувати систему карнітинпальмітоїлтрансферази CPT-I та CPT-II (Berthiaume and Wallace, 2007). У низці досліджень були також показані зміни у регуляції цитратного циклу під дією доксорубіцину, що має велике значення для енергозабезпечення клітини (Tan et al., 2011; Sabatine et al., 2005). Деякі автори не виключають, що метаболічне «перепрограмування» міокарда під впливом доксорубіцину регулюється через ядерні рецептори PPAR (Yang et al., 2015). Так, введення доксорубіцину гризунам призводило до зниження регуляції PPAR α , PPAR γ та PPAR σ тканини міокарда (Arunachalam et al., 2012; Chen et al., 2013).

1.8. Вплив доксорубіцину на скоротливий апарат міокарда

Вище ми розглянули патофізіологічні механізми розвитку доксорубіциніндукованих серцевих аритмій та ішемії міокарда. Порушення скоротливості серцевого м'яза є ще однією важливою ознакою серцевої дисфункції, викликаній препаратом (Linnyk et al., 2016). Доксорубіцинопосередковане пригнічення цитохром *c*-оксидази (Lebrecht et al., 2003), фосфофруктокінази, мітохондріальної креатинкінази порушує вироблення енергії кардіоміоцитами, а інгібування Ca^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикулуму перешкоджає секвестрації цитозольного вільного кальцію після систоли, викликаючи діастолічну дисфункцію (Jeyaseelan et al., 1997). Дія доксорубіцину спричиняє негативний інотропний ефект через пошкодження мембран кардіоміоцитів АФК, зниження вмісту АТФ і ФКр в міокарді, перевантаження клітини Ca^{2+} та відкриття МП. Зв'язування ТОРП, інгібування синтезу ДНК та РНК, пригнічення доксорубіцином синтезу нуклеїнових кислот та білків також сприяє втраті міофібрил з унеможливленням їх відновлення (Yang et al., 2014). Міокардіальні біопсії щурів, пролікованих доксорубіцином, підтверджують значну зміну ультраструктури кардіоміоцитів: втрату міофібрил, розширення саркоплазматичного ретикулуму, набухання та вакуолізацію мітохондрій (Uradhyay et al., 2020, Denysova et al., 2023). Внаслідок дії препарату знижується рівень експресії специфічних білків серцевого м'яза (Colombo et al., 2005; Grzanka et al., 2005). Було показано, що доксорубіцин інгібує синтез актину на транскрипційному етапі шляхом зменшення кількості мРНК, а також негативно впливає на його полімеризацію, змінюючи якісно і кількісно полімер (Kim et al., 2003; Aries et al., 2004). Відомо, що лікування доксорубіцином виснажує білок GATA-4, який регулює експресію важкого ланцюга міозину, а також тропонін (Murphy et al., 1997). Експериментальні дослідження на рибах показали значне пригнічення доксорубіцином транскрипції легкого ланцюга та ізоформи α важкого ланцюга міозина, активність яких відображає нормальну скоротливу функцію серця (Carrelli et

al., 1989; Parsaeifar et al., 2017). Також у літературі зазначено, що доксорубіциніндукований оксидативний стрес модифікує структуру міозину шляхом карбонілювання, що знижує активність ізоформи α та призводить до зменшення сили серцевих скорочень та порушень ритму (Hydock et al., 2012). Титин, або коннектин, простягається як молекулярний каркас через саркомер, нагадує пружину Франка-Старлінга та є ключовим компонентом серцевих саркомерів (Fukuda et al., 2001). Оксидативний стрес, порушення гомеостазу кальцію спричиняють фосфорилування, опосередковане протеїнкіназою, з утворенням дисульфідних зв'язків у молекулі титину, що призводить до підвищення жорсткості білка та руйнації його кальпаїнами – це сприяє нестабільності міофіламентів та розвитку систоло-діастолічної дисфункції (Lim et al., 2004).

1.9. Досягнення у профілактиці та лікуванні доксорубіциніндукованого пошкодження

Редокс-пошкодження вважається ключовим механізмом цитотоксичності доксорубіцину. Експериментальні дослідження, проведені за останні десятиріччя з додаванням до схем протипухлинної терапії таких природних антиоксидантів, як вітамін Е, N-ацетилцистеїн (Myers et al., 1987), супероксиддисмутаза (Cervantes et al., 1988), глутатіон (Yoda et al., 1986), каталаза (Cervantes et al., 1988), пробукол (Siveski-Iliskovic et al., 1995), апігенін (Zare et al., 2019), лютеолін (Zhang et al., 2020), кверцитин (Aziz et al., 2021) та антагоністів Ca^{2+} -каналів (Yamanaka et al., 2003), не показали суттєвого зменшення пошкоджуючого впливу доксорубіцину на структурно-функціональний стан міокарда, хоча й продемонстрували певний антиапоптотичний, протизапальний та антиаутофагічний ефекти (Chen et al., 2022). Додаткові стратегії, які випробовувалися, включали використання аналогів доксорубіцину (пірарубіцин, акларубіцин, мітоксантрон) (Weiss, 1992), альтернативні способи введення препарату (безперервна повільна

інфузія, інкапсульована форма препарату у ліпосомах) (Alberts et al., 2004; Zhao et al., 2017; Makwana et al., 2021), але й вони не мали більш ніж обмеженого успіху (Takemura et al., 2017). Залізохелатуючий агент дексразоксан (ICRF-187) суттєво знижував частоту розвитку доксорубіциніндукованої кардіоміопатії на тваринних моделях (Huihui et al., 2022; Yu et al., 2020; Hasinoff et al., 2003), і зрештою був введений у клінічні протоколи. Нині дексразоксан є єдиним кардіопротектором, затвердженим FDA для попередження доксорубіциніндукованих ускладнень (Yu et al., 2020), але виявилось, що його застосування пов'язане з тяжкою мієлосупресією, а також із можливим антагонізмом до протипухлинної дії доксорубіцину через наявність у нього сайту зв'язування не тільки для ТОРПβ, але й ТОРП α (Chen et al., 2022; Chow et al., 2022). Згідно з останніми рекомендаціями, препарат показаний тільки тим пацієнтам, які з приводу метастатичного раку молочної залози отримали дозу доксорубіцину більше 300 мг/м² і які вимушені продовжувати лікування (Chen et al., 2022; de Baat et al., 2022). На мишачій моделі доксорубіциніндукованої кардіоміопатії було виявлено кардіопротекторний ефект рекомбінантного людського еритропоєтину rhEPO (Li L et al., 2006). Цей препарат використовується у клініці для лікування важких анемій, у тому числі після хіміотерапії. rhEPO стимулює у кістковому мозку мітоз та диференціацію еритроїдних клітин-попередників. Вважається, що rhEPO стимулює мітохондріальний біогенез через SIRT1/NRF1 сигнальний шлях, подібно до ресвератролу (Lan C et al., 2017). Отже, досі не існує специфічного лікування доксорубіциніндукованої кардіоміопатії. І, як правило, ця патологія погано піддається симптоматичному лікуванню β -блокаторами, інгібіторами ангіотензинперетворюючого ферменту, сечогінними, антагоністами рецепторів ангіотензину II, антиаритмічними препаратами та ін. Трансплантація серця залишається єдиним варіантом лікування пацієнтів з термінальною стадією доксорубіциніндукованої серцевої недостатності (Thomas et al., 2002; Kalyanaraman et al., 2002; Oliveira et al., 2021).

1.10. K_{ATP} -канали та їх роль у серцево-судинній системі

Аденозинтрифосфатчутливі калієві канали (K_{ATP} -канали): сарколемальні та мітохондріальні або гладеньком'язеві й ендотеліальні транспортувальні структури, що були відкриті Noma і Inoue (Inoue et al., 1991), – виявлені в скелетних та гладеньких м'язах, клітинах підшлункової залози, мозку. Представляють один з найважливіших ендогенних механізмів регуляції життєво важливих процесів, в т.ч. кардіопротекції (Moibenko et al., 2008). Ці канали належать до групи калієвих каналів вхідного випрямлення (K^+ inward rectifier, або K_{ir}) та об'єднані в родину K_{ir6} (Tucker et al., 1997). АТФ-чутливий калієвий канал утворений чотирма основними субодинами ($K_{ir6.X}$), що формують пору каналу та містять високоселективний фільтр, маючи високу провідність для K^+ , та чотирма допоміжними білками-рецепторами SUR (sulfonyl urea receptor), що містять сайти зв'язування активаторів і блокаторів та являють собою метаболічний сенсор, який відповідає за активацію каналу в умовах метаболічного стресу (Vadzuk, 2014) (рис. 1.3).

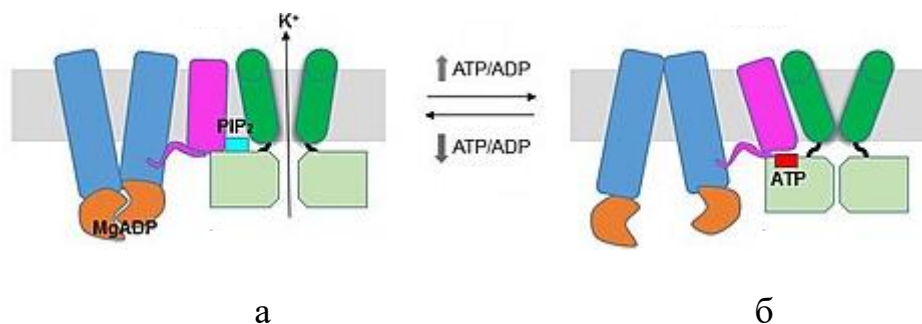


Рис 1.3. Структура K_{ATP} -каналу. а – відкритий стан, б – закритий стан. Зелений колір – трансмембранні домени $K_{ir6.X}$; салатовий – цитоплазматичні домени $K_{ir6.X}$; рожевий – SUR1-TMD0; синій – SUR1-TMD1,2; помаранчевий – SUR1-NBDs; червоний – молекула АТФ; блакитний – PIP2.

Субодина SUR складається з трьох трансмембранних доменів (TMD0, TMD1, TMD2), які відповідають за активацію каналу. SUR належать до класу АВС-транспортів (ATP-binding cassette transporters). Також між TMD1 і

TMD2 та після TMD2 на цитоплазматичному боці мембрани знаходяться нуклеодитзв'язувальні домени (NBD1, NBD2) (Jones et al., 2004; Davidson et al., 2008). Для відкриття K_{ATP} -каналів потрібна наявність молекул фосфатидилінозитол-4,5-біс-фосфату (PIP2). За допомогою криоелектронної мікроскопії було досліджено структури комплексу АТФ-чутливого калієвого каналу щура (Gregory et al., 2017). Робочий канал тварини являє собою октамер, в центрі якого знаходиться тетрамер з субодиниць Kir6, кожна з яких на периферії поєднана з білком SUR. Ключовим місцем контакту між Kir6 та SUR у комплексі є домени TMD0. Для різних тканин характерні різні комбінації субодиниць. Відтак, для гладенької мускулатури судин притаманний набір Kir6.1-SUR2B, а для серця характерна комбінація Kir6.2-SUR2A. Вони утворюють підтип « K_{ATP} - K_{HDF} », який названий так, аби підкреслити важливість їх активації за допомогою нуклеозиддифосфатів (Beech et al., 1993). Інгібування каналу визначається наявністю іонів Mg, рівнем рН та співвідношенням концентрацій АТФ/АДФ, що є найбільш важливим регулятором, який пов'язує активність каналу з клітинним метаболізмом (Beech et al., 1993; Terzic et al., 1994). В основі механізму кардіопротекції лежить швидке відкриття K_{ATP} -каналів у відповідь на зниження вмісту АТФ в клітині, тому цей тип каналів вважають центральним енергетичним сенсором клітини (Zingman et al., 2003; Alekseev et al., 2005). Активація K_{ATP} -каналів кардіоміоцитів або ендотелію судин спричиняє з одного боку трансмембранний потік з клітин іонів калію та гіперполяризацію мембрани, що призводить до зменшення тривалості рефрактерного періоду, зменшення періоду надходження кальцію в клітину і зменшення скоротливої активності міокарду, а, з іншого боку, – вивільнення молекул оксиду азоту та вазодилатацію (Nichols et al., 2006; Olson et al., 2010). На відміну від K_{ATP} -каналів плазматичної мембрани, що широко досліджуються на молекулярному рівні, та субодиниці яких клоновано (Voitychuk et al., 2011; Shuba, 2010; Meredith et al., 2004), немає узгодженої думки стосовно структури АТФ-чутливого переносника іонів калію в мітохондріях (Vadzuk, 2014).

Зазначається, що активація мітохондріальних K_{ATP} -каналів клітини призводить до деполяризації внутрішньої мітохондріальної мембрани через надходження іонів калію до мітохондрій, внаслідок чого зменшується потік іонів кальцію у органели, що запобігає їх перевантаженню і виникненню оксидативного стресу. Відповідно до альтернативної теорії, активація вищезгаданих каналів може викликати помірне мітохондріальне набухання, яке певною мірою захищає органели, зберігаючи функцію і структуру їх міжмембранного простору (Strutynskyi et al., 2001).

1.10.1. Роль K_{ATP} -каналів в коронарному кровообігу

Раніше була показана важлива роль K_{ATP} -каналів у коронарній вазодилатації під час гіпоксії та ішемії. Автори спостерігали помітне зменшення реактивної гіперемії (Aversano et al., 1991), збільшення коронарного судинного опору та перфузійного тиску (Daut et al., 1990), зменшення вазодилатації дрібних артеріол (Cole et al., 1991) під час блокування K_{ATP} -каналів специфічними інгібіторами. В судинному руслі активація K_{ATP} -каналів у відповідь на зменшення внутрішньоклітинного вмісту АТФ та співвідношення АТФ/АДФ забезпечує регуляцію кровопостачання та базального тону судин шляхом підсилення кровотоку, наприклад, у зоні гіпоксії, наслідком чого є розширення судин і посилення постачання кисню та енергоресурсів до гіпоксичної тканини, а також зменшення опору коронарних судин та зниження післянавантаження на міокард (Nelson et al., 1995). Фактором, що також регулює функціонування каналу у гладенькій мускулатурі судин, є фосфорилування протеїнкіназами (Quinn et al., 2004; Shi et al., 2007). Протеїнкіназа А, в активації якої беруть участь вазодилататори (аденозин, β -антагоністи), активує канал, що призводить до гіперполяризації клітин гладенької мускулатури та розслабленню судин. Також Xu et al., у 2001 та Ribalet et al., у 2005 показали, що у разі закиснення цитозолу відбувається зменшення спорідненості K_{ATP} -каналу до АТФ, що призводило до збільшення ймовірності його відкриття.

Ці дані добре узгоджуються зі встановленим фактом, що K_{ATP} -канали серця і судин активуються в умовах ішемії, яка супроводжується закисненням внутрішньоклітинного середовища (Vadzuk, 2014). Активація каналу може потужно стимулюватися мембранними фосфоліпідами, зокрема PIP2, який взаємодіє з каналоутворювальними субодиницями (Enkvetchakul et al., 2003). K_{ATP} -канали міокарда за фізіологічних умов перебувають у постійно закритому стані, так як в цій тканині постійно підтримується висока концентрація АТФ, а відкриваються за умов його перевантаження, гіпоксії чи ішемії. Гостра ішемія міокарда супроводжується іонною та електричною нестабільністю через вкорочення потенціалу дії кардіоміоцитів та позаклітинне накопичення калію завдяки зовнішньому калієвому струму, у який залучені K_{ATP} -канали – такий феномен називають «ішемічне прекодиціювання» (Yellon et al., 2003). K_{ATP} -канали кардіоміоцитів реалізують взаємозв'язок енергетичної, електричної та скоротливої функцій міокарда (Alekseev et al., 2005; Zhou et al., 2011). Порухення цих функцій призводить до двох типів захисних реакцій: зниження навантаження на ушкоджений міокард та зменшення витрат АТФ (Wilde et al., 1991). Також важливим у кардіопротекторному механізмі активації K_{ATP} -каналів є гальмування анаболічних процесів та активація катаболітичних ферментів, що відбувається в основному через зменшення вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} (Strutynskyi et al., 2009). Ці дослідження підтверджують оригінальну гіпотезу *Noma* про відкривання K_{ATP} -каналів під час ішемії, що призводить до гіперполяризації плазматичної мембрани, вкорочення потенціалу дії шляхом пригнічення притоку кальцію через енергозалежні кальцієві канали, і, як наслідок, розслаблення м'язів та збереження внутрішньоклітинного АТФ.

1.10.2. K_{ATP} -канали та серцеві аритмії

Роль K_{ATP} -каналів в індукції або пригніченні серцевої аритмії неоднозначна. Chi et al., у 1990 виявили, що пінацидил є профібрилятором у моделі раптової коронарної смерті – це пов'язували із надмірним відтоком

калію під час реполяризації міокарда, критичним скороченням тривалості потенціалу дії та ефективного рефрактерного періода. На противагу цьому, Fish та Spinelli et al., у 1990, вивчаючи ранню та пізню реполяризації показали, що деякі активатори $K_{ATФ}$ -каналів були ефективними антиаритмічними засобами. Вважається, що зменшення тривалості потенціалу дії запобігає внутрішньоклітинному перевантаженню кальцієм, що може бути відповідальним за тригерну активність. Отже, науковці дійшли висновку, що активація $K_{ATФ}$ -каналів може бути ефективною терапевтичною стратегією при аритміях, пов'язаних з подовженням інтервалу QT. Таким чином, модуляція активності $K_{ATФ}$ -каналів може бути антиаритмічною або аритмогенною, в першу чергу, залежно від типу наявної аритмії (Fish et al., 1990).

1.11. Роль активаторів $K_{ATФ}$ -каналів у захисті і відновленні міокарда

Як виявилось, відкривати $K_{ATФ}$ -канали можливо і фармакологічним шляхом за допомогою активаторів цих каналів, що значно покращує стан клітин за патологічних умов (Aguilar-Bryan et al., 1999). Фармакологічні активатори зв'язуються з SUR-субодиницею каналів, конформуючи її. Оскільки наслідком є гіперполяризація плазматичної мембрани, то застосування активаторів призводить до розслаблення та зменшення тонуусу серцевого м'яза та гладенької мускулатури судин (Suzuki et al., 2001). Отже, екзогенна активація $K_{ATФ}$ -каналів призводить до реалізації потужних кардіопротекторних механізмів (Strutynskyi et al., 2001). Дія блокаторів, як і дія активаторів, теж опосередковується взаємодією із регуляторною субодиницею (Hambrock et al., 2004). З моменту розробки специфічних фармакологічних модуляторів $K_{ATФ}$ -каналів, до яких відносяться: міноксидил, діазоксид, нікорандил, проглікем, кромакалім, пінацидил, а також антагоністів, таких як сульфонілсечовина, глібенкламід, татолбутамід, танесульфонілсечовинна сполука, деканоат натрію – накопичено значну кількість доказів того, що відкривання цих каналів у серці може сприяти

функціональному відновленню регіонально ішемізованих або ізольованих глобально ішемізованих сердець та зменшенню розмірів інфаркту серця *in situ* (Aversano et al., 1991; Daut et al., 1990; Cole et al., 1991). Флокалін – це вітчизняний оригінальний фторвмісний активатор АТФ-чутливих калієвих каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран підроддини ціаногунідинів з властивостями міотропного спазмолітика, коронаролітика та кардіопротектора (Moibenko et al., 2008; Ryvovar et al., 2008). Особливістю флокаліна є його значно менша токсичність порівнянно з іншими препаратами цієї групи (флокалін відноситься до малотоксичних сполук III класу). Крім того, введення фтору у молекулу препарату призводить до збільшення її стабільності, ліпофільності і пролонгації дії препарату. Флокалін був ідентифікований як фармакологічний активатор мітохондріальних K_{ATP} -каналів через індукцію характерного помірного набухання ізольованих мітохондрій серця та його попередження специфічним інгібітором цих каналів мітохондріальної мембрани 5-гідроксидеканоевою кислотою (Strutynska et al., 2013). В експериментах *in vivo* було показано, що флокалін має потужні дозозалежні гіпотензивні та вазодилататорні властивості, підвищує рівень конститутивного синтезу азоту, володіє значною антигіпоксичною дією та значно посилює оксигенацію плазми артеріальної крові, пригнічує вільнорадикальні процеси та проявляє антиоксидантні властивості, а також сприяє зменшенню зони інфаркту міокарда після ішемії-реперфузії (Strutynskyi et al., 2009).

Отже, краще розуміння механізмів кардіотоксичності доксорубіцину дасть змогу розробити методи попередження та лікування серцевої недостатності, яку він спричиняє. Ця робота присвячена вивченню механізмів пошкодження міокарда щурів доксорубіцином та ролі активації АТФ-чутливих калієвих каналів флокаліном у попередженні розвитку доксорубіциніндукованого ураження серця.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Експериментальні тварини

Експерименти виконані на 150 щурах-самцях лінійки Вістар масою 310-400 г, віком бміс. Тварини знаходились у віварії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де їх утримували на стандартному харчовому раціоні, та перебували у схожих умовах. Усі маніпуляції з тваринами проводилися відповідно до Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986) та Директиви ЄС 2010/63/EU «Стосовно захисту тварин, що використовуються у наукових цілях». Протоколи експериментів були затверджені Комітетом з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (дозвіл № 4/23 від 01.12.2023).

2.2. Обґрунтування вибору моделі та ефективних доз препаратів

В літературі описано багато моделей на щурах для вивчення доксорубіциніндукованої кардіотоксичності, які відтворюють патологічний процес, однак дози та інтервали між введеннями препарату тваринних протоколів різноманітні і не збігаються з клінічним режимом пацієнтів (Nakahara et al., 2018). Так, у сучасній ад'ювантній терапії раку доксорубіцин використовується у середніх дозах 240-360 мг/м², що для щура масою 350 г із перерахунку по формулі площі поверхні тіла Мостеллера ($ППТ=0,0167*m^{0,5}*h^{0,5}$) означає прийом препарату у дозі 28-45 мг/кг. Тоді як доза 30 мг/кг вважається летальною, оскільки призводить до 100% смертності у щурів від серцевої недостатності до 7-ої доби експерименту, а рівень смертності після введення загальної дози 15 мг/кг становить до 82% на 28-му добу експерименту (O'Connell et al., 2017; Kawasaki et al., 1996).

У короткострокових моделях для оцінки гострої кардіотоксичності використовують дозу доксорубіцину 10-30 мг/кг одноразово або у двох ін'єкціях, або 2-3,4 мг/кг через день 6 разів (кумулятивна доза 12-20 мг/кг) (Nakahara et al., 2018; Razmaraii et al., 2016; Zhang et al., 2015; Kawasaki et al., 1996). Довгострокові експериментальні моделі для оцінки хронічної кардіотоксичності передбачають введення 1-5 мг/кг препарату щотижня протягом 2-12 тижнів, з кумулятивною дозою 3-25 мг/кг. (Oliveira et al., 2013; Lightfoot et al., 2010; Kenk et al., 2010; Mettler et al., 1977).

Зважаючи на це, для відтворення гострого доксорубіциніндукованого пошкодження міокарда ми використовували короткострокову модель. Доксорубіцин «Ебеве» 50 мг/25 мл («Фарма Гесюмюб», Австрія) вводили у загальній дозі 15 мг/кг двома внутрішньоочеревинними ін'єкціями. Для визначення ролі K_{ATP} -каналів у попередженні зазначеної патології застосовували флокалін (N-(4-дифторометоксифеніл)-N'-пінаколіл-N''-ціаногунанідин) – вітчизняний оригінальний фторвмісний активатор АТФ-чутливих калієвих (K_{ATP}) каналів сарколемальної та мітохондріальної клітинних мембран, що був синтезований та досліджений у результаті співпраці установ НАН України, Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця (академік НАН України О.О. Мойбенко і д.б.н. Р.Б. Струтинський) та Інституту органічної хімії (проф. Л.М. Ягупольський) (Voitychuk et al., 2011; Strutyns'kyi et al., 2013; Strutyns'ka et al., 2013). Було показано, що ефективними разовими дозами флокаліна для профілактики та лікування захворювань серця у тварин при пероральному та внутрішньоочеревинному введенні є дози 1,5-3,2 мг/кг. При введенні тваринам зазначених доз препарату внутрішньоочеревинно не відмічалось ніяких порушень з боку серцево-судинної системи (Strutynskyi et al., 2008; Strutyns'ka et al., 2013).

2.3. Схема досліду

Дослідження тривало 5 днів для всіх груп щурів, препарати вводили внутрішньоочеревинно. Щурів рандомізовано розподіляли на три групи: I група – контрольні, яким вводили фізіологічний розчин (3 мл/кг); II група – щури, яким вводили доксорубіцин у дозі 7,5 мг/кг 2 дня поспіль (загальна доза 15 мг/кг); III група – щури, яким сумісно вводили доксорубіцин у тому ж режимі та флокалін у дозі 2,5 мг/кг 5 днів поспіль (загальна доза 12,5 мг/кг), у перші два дні – через 30 хв після введення доксорубіцину. Флокалін попередньо розчиняли за схемою: до 1 мг препарату додавали 0,032 мл диметилсульфоксиду та 0,9 мл фізіологічного розчину. На 5-й день дослідження у тварин всіх груп реєстрували відповідні показники та проводили забір матеріалу з наступним виведенням щурів з експерименту.

2.4. Біохімічні дослідження

2.4.1. Визначення показників оксидативного стресу та активності NO-синтаз у мітохондріях серця щурів

Всі процедури проводились у центрифужних пробірках з кришками, для забезпечення герметичності. Вміст білка у зразках визначали за методом Лоурі (Lowry et al., 1951).

Визначення швидкості утворення супероксиду

Метод визначення супероксид-аніона ($\bullet\text{O}_2^-$) ґрунтується на здатності цитохрому *c* окиснювати $\bullet\text{O}_2^-$ до O_2 . Зміни екстинції проб реєстрували після 30 хв інкубації (37°C) при $\lambda=550$ нм. Для розрахування концентрації супероксиду застосовували молярний коефіцієнт поглинання $28\ 000\ \text{моль}^{-1} * \text{см}^{-1}$ (Kuthan et al., 1982).

Визначення швидкості утворення гідроксильного радикалу

Швидкість генерування гідроксильного радикалу ($\bullet\text{OH}$ -радикала) визначали методом окиснення дезоксирибози. Швидкість утворення $\bullet\text{OH}$ -

радикалу реєстрували через 30 хв інкубації (37°C) при $\lambda=532$ нм, а його кількість визначали за допомогою молярного коефіцієнта поглинання $156\ 000$ моль⁻¹ * см⁻¹ (Halliwell et al., 1988).

Визначення вмісту пероксиду водню

Метод визначення вмісту пероксиду водню (H₂O₂) базувався на опосередкованій реєстрації споживання H₂O₂ під час окиснення йодиду (I⁻) до йоду (I₃⁻) за наявності надлишку лактопероксидази. Формування I₃⁻ реєстрували спектрофотометрично при $\lambda=353$ нм, а його кількість визначали за допомогою молярного коефіцієнта поглинання $26\ 000$ моль⁻¹ * см⁻¹ (Huwiler et al., 1984).

Визначення вмісту дієнових кон'югатів

Дієнові кон'югати (ДК) виявляли шляхом екстракції ліпідів із зразків органічним розчинником (гептан/ізопропанол 1:1) та вимірюванням оптичної щільності при $\lambda=232$ нм. Вміст ДК обчислювали за допомогою молярного коефіцієнта поглинання $21\ 000$ моль⁻¹ * см⁻¹ (Gavrilov et al., 1988).

Визначення вмісту малонового діальдегіду

Метод визначення малонового діальдегіду (МДА) базувався на його реакції з 2'-тіобарбітуровою кислотою та утворенні триметинового комплексу з максимумом поглинання при $\lambda=532$ нм. Вміст МДА обраховували за допомогою молярного коефіцієнта поглинання $156\ 000$ моль⁻¹ * см⁻¹ (Mihara and Uchiyama, 1978).

Визначення вмісту ендogenousного сірководню

До 0,5 мл 1% розчину ацетату цинку (Zn(CH₃COO)₂) додавали аліквоти проб та інкубували при температурі 37,5°C протягом 30 хвилин. Потім додавали 0,5 мл 20 ммоль/л N,N-DPD (диметил-п-фенілендіамін) і 0,5 мл 30 ммоль/л розчину FeCl₃. Отриману суміш інкубували в холодному (4°C) та темному місці протягом 10 хв., після чого додавали 1 мл 10 % трихлороцтової

кислоти і центрифугували при 1,5 тис. об/хв впродовж 5 хв. Далі проводили фотоелектроколориметричне вимірювання оптичної щільності надосадової рідини при $\lambda=670$ нм. Кількість сірководню (H_2S) у зразках розраховували на основі калібрувальної кривої $NaHS$, а концентрацію H_2S виражали в нмоль/г білка (Strutynska et al., 2022).

Визначення активності NO-синтаз

Активність конститутивної (cNOS) та індукцйбельної (iNOS) синтази оксиду азоту виявляли за здатністю ензиму використовувати L-аргінін як субстрат при виробництві L-цитруліну. Активність cNOS визначали шляхом змішування проб з реакційною сумішшю наступного складу (ммоль/л): НАДФН – 1, L-аргінін – 2, KH_2PO_4 – 50, $MgCl_2$ – 1, $CaCl_2$ – 2 та інкубації ($37^\circ C$) протягом 60 хв. Для визначення активності iNOS такі ж зразки інкубували в подібній реакційній суміші лише з додаванням EGTA – 5 замість $CaCl_2$. Надалі суміш піддавали центрифугуванню при швидкості 3500 g протягом 10 хв і збирали 1 мл супернатанту для вимірювання L-цитруліну за методом Бойда (Boyd et al. 1980). Суміш кип'ятили 15 хв на водяній бані, охолоджували та визначали величину екстинції при $\lambda=465$ нм. Концентрацію L-цитруліну виявляли за допомогою калібрувальних кривих. Активність ферменту виражали у пікомолях новоутвореного L-цитруліну протягом 1 хв на 1 мг загального білка у зразку.

2.4.2. Визначення активності маркерів пошкодження міокарда та вмісту глюкози у плазмі крові щурів

Біохімічні показники плазми крові щурів досліджували на базі медичної лабораторії ДУ Інституту травматології та ортопедії НАМН України, м. Київ. Підрахунки здійснювали на автоматичному біохімічному аналізаторі Cobas 311. Cobas – це фотометрична система з йон-селективними електродами для дослідження клінічних біохімічних показників плазми крові. Використовували тест-системи та набори Roche Diagnostics (Швейцарія) в умовах повноцінної системи якості – з калібраторами і контрольними

сироватками Roche «нормального» і «патологічного» діапазонів. До цільної крові одразу після взяття проби додавали антикоагулянт, після чого піддавали центрифугуванню при швидкості 3000 об/хв протягом 15 хв. Одержану плазму відокремлювали та охолоджували.

Визначення активності трансаміназ

Дослідження активності аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспаратамінотрансферази (АСТ) здійснювали за методом Райтмана-Френкеля, який ґрунтується на принципі переамінування аланіну або аспарагінової кислоти з утворенням пірвіноградної кислоти. Визначення базується на фотометричному вимірюванні оптичної щільності пірвіноградної кислоти при $\lambda=340$ нм у лужному середовищі, що є пропорційною співвідношенню активностей трансаміназ (Ostapchenko et al., 2018).

Визначення активності серцевої фракції креатинфосфокінази

Для визначення активності серцевої фракції креатинфосфокінази (КФК-МВ) використовували метод, який базується на інгібуванні субдиниці М специфічними антитілами. Швидкість утворення під час реакції НАДФ вимірюється фотометрично при $\lambda=340$ нм та є пропорційною активності субдиниці В (Chiu et al., 1999).

Визначення концентрації глюкози

Концентрацію глюкози визначали гексокіназним методом. Цей метод ґрунтується на двох реакціях, що відбуваються послідовно: а) процес утворення з глюкози еквімолярних кількостей глюкозо-6-фосфату, що каталізується гексокіназою і б) подальше перетворення глюкозо-6-фосфату під впливом глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в 6-фосфоглюконат. Кількість НАДФН, що утворилася під час цієї реакції, вимірюється фотометрично при $\lambda=340$ нм та є пропорційною кількості глюкози в розчині (Peshkova et al., 2010).

Визначення вмісту тропоніну I

Вміст тропоніну I визначали та кількісно оцінювали за допомогою імуноферментного методу. Метод є твердофазним ферментнозв'язаним імуносорбентним аналізом, в якому використовується 4 види антитіл. Тропонін I, що наявний у зразку, зв'язується з антитілами, які зафіксовані на дні лунок планшету, та з антитілами, які зв'язані з ензимним кон'югатом. В результаті інкубації утворюються імунні комплекси, кількість яких визначали додаванням тетраметилбензидину. Інтенсивність забарвлення, що розвивається, прямо пропорційна кількості тропоніну I у досліджуваному зразку (Chiu et al., 1999).

2.5. Дослідження відкривання неспецифічної мітохондріальної пори транзиторної провідності (МП)

Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування у нашій модифікації (Sagach et al., 2004). Серця промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl (4°C). Тканину серця подрібнювали та гомогенізували у середовищі виділення (ммоль/л): сахароза – 250, EDTA – 1, тріс-HCl – 25; pH 7,4. Гомогенат центрифугували при швидкості 700 g протягом 8 хв при 2°C, щоб осадити ядра та клітинні фрагменти. Супернатанат, що отримали, піддавали центрифугуванню при швидкості 11000 g протягом 16 хв і 2°C для осадження фракції мітохондрій і повторно промивали. Осад зберігали в середовищі ресуспендування (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-HCl – 25; pH 7,2. Через 30 хв виділені органели використовували в експерименті.

Відкривання МП досліджували методом спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій за допомогою спектрофотометра UV 1900 Shimadzu (Japan). Органели поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): KCl – 120, тріс-HCl – 25, KH_2PO_4 – 3, сукцинат натрію – 5, pH 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл), і реєстрували зниження оптичної щільності суспензії мітохондрій при $\lambda=520$ нм за 5 хв до і впродовж 10 хв їх набухання за наявності індуктора Ca^{2+} , який додавали на 5-й хвилині вимірювання.

Преінкубацію з циклоспорином А у концентрації 10^{-5} моль/л здійснювали протягом 5 хв до додавання індуктора. Зміну амплітуди (ΔD_{520}) набування органел визначали як різницю між амплітудою набування мітохондрій на 15-й хвилині та відносно вихідного значення на 1-й хвилині. Зменшення оптичної густини розчину з мітохондріями свідчило про їх набування. Концентрація білка становила 0,4 мг/мл у кожній пробі. Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі без індуктора з подальшою реєстрацією оптичної щільності протягом 15 хв (Sagach et al., 2004).

2.6. Реєстрація скорочення-розслаблення м'язових препаратів аорти

Дослідження скорочення-розслаблення інтактних м'язових препаратів судин грудного відділу аорти проводили в режимі тензометрії.

Температуру розчину в експериментальній камері (37°C з точністю до $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) підтримували за допомогою автоматичного термостата KISS 208В «Huber». Робочий розчин насичували киснем за допомогою карбогену (газова суміш 95% O_2 і 5% CO_2). Перед вимірюванням препарати, закріплені в експериментальній камері, витримувалися протягом 60 хв у нормальному розчині Кребса 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 за допомогою норадреналіну і ацетилхоліну, які додавали до перфузуючого розчину Кребса (Strutynskiy et al., 1998). Усі тестування здійснювали в ізометричному режимі при початковій заданій напруженості, при якій вони генерували максимальну силу у відповідь на інфузію норадреналіну (10 мкмоль/л).

2.7. Електрокардіографічне (ЕКГ) дослідження

Перед ЕКГ-дослідженням щурам 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 (Konopelski et Ufnal., 2016; Hirota et al., 1996). Глибину наркозу оцінювали клінічно за педальним рефлексом. Тварину вкладали на операційний стіл, розміщуючи фронтально у вентральному положенні, фіксуючи кінцівки та голову. Під шкіру кінцівок вводили голчасті електроди. ЕКГ реєстрували на швидкості плівки 50мм/с, калібрували 1мВ – 10мм. Різницю електричних потенціалів з поверхні тіла гризунів записували за допомогою портативного 12-канального ЕКГ-апарата Heart Screen 80G-L1 Innomed Medical (Угорщина). Стандартна система включає біполярні відведення I, II, III та додаткові уніполярні відведення aVL, aVR, aVF, що реєструють різницю потенціалів у фронтальній площині. Біполярна система розміщує відведення на правій (червоний електрод), лівій верхній кінцівці (жовтий електрод) та лівій нижній кінцівці (зелений електрод), права нижня – заземлення (чорний електрод). За II стандартним відведенням визначали зміни частоти серцевих скорочень (ЧСС), тривалість проміжку RR, інтервалів PQ, QT, тривалість та амплітуду зубців комплексу QRS, зміни сегмента ST. Використовували значення QTc, яке коригували за ЧСС і вираховували за формулою Sagie (Framingham): $QTc = QT + (0.154(1-RR)) * 1000$. У нормі на ЕКГ щура відсутній зубець Q, інтервал ST короткий та зливається з асиметричним зубцем Т (рис. 2.1).

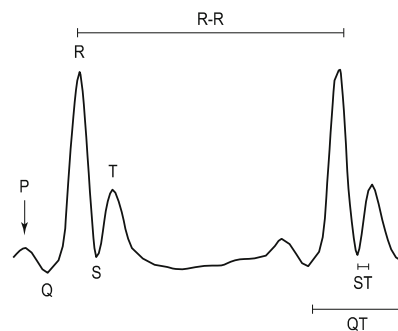


Рис. 2.1. Зубці та інтервали нормальної ЕКГ дорослого щура (Naticc Aygun et al., 2020).

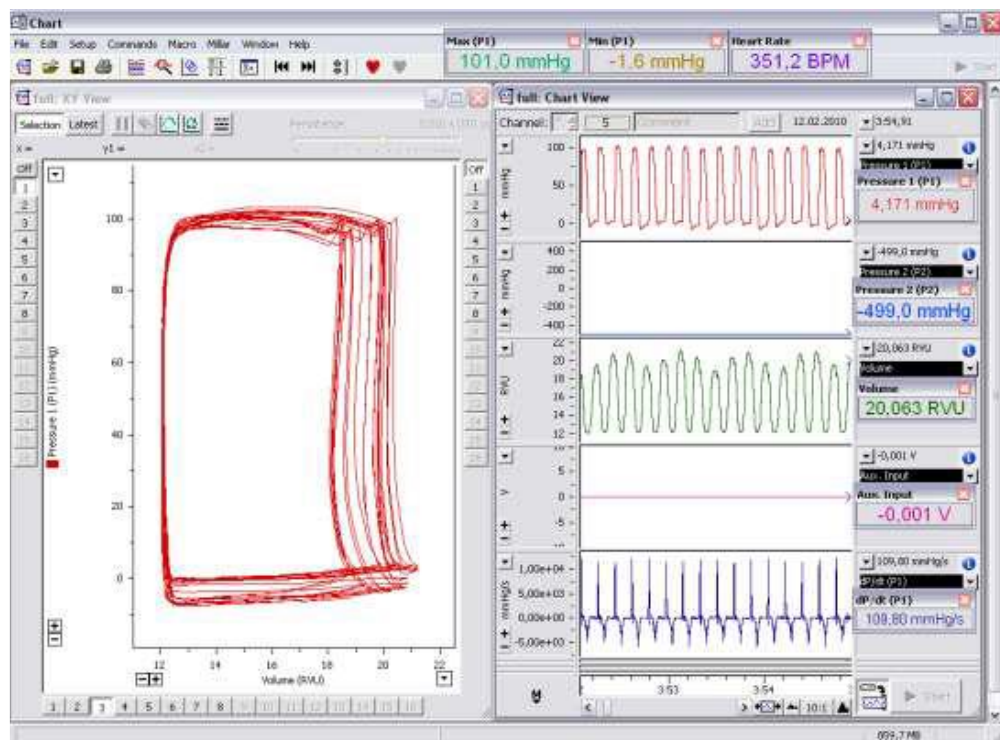
Ізоелектричну точку визначали як середнє значення 5-ти найнижчих відповідних ділянок, що виникають перед зубцем Р. Зубець Q приймали за ділянку, в якій ізоелектрична лінія перехоплює екстраполяцію підйому зубця R. За кінець зубця S приймали точку, в якій напруга збільшувалася від мінімуму (пік зубця S) до перехрещення з ізолінією. За верхівку зубця Т вважали хвилю після зубця S, в якій середнє значення 5-ти найближчих комплексів є максимальним (Osborne, 1981).

2.8. Оцінка параметрів кардіогемодинаміки

Перед експериментом щурам вводили уретан (150 мг/100 г маси внутрішньоочеревинно). Глибину наркозу оцінювали клінічно за педальним рефлексом. Попередньо калібрували за об'ємом стандартний 2F мікрокатетер для реєстрації тиску-об'єму з відстанню між сигнальними електродами у 9,0 мм (SPR-838, Millar Instruments, США) через його занурення у калібрувальну кювету (P/N 910-1048), яка складає ряд циліндричних отворів відомого діаметру (від 2 до 15 мм) та об'єму (від 28,27 до 1590 мкл), заповнених кров'ю щура з додаванням гепарину.

Тварину вкладали на операційний стіл, розмішуючи фронтально у вентральному положенні, фіксуючи кінцівки та голову. У ділянці ший робили серединний розріз і, пошарово відсуваючи тканини скляними гачками, знаходили праву сонну артерію. Виділяли її, від'єднуючи від нервового пучка та адвентиції і проксимально перетискали лігатурою, а на 1,5-2 см дистальніше – металевою клеммою. Далі робили надріз стінки артерії і вводили металевий провідник, по якому ретроградно у лівий шлуночок (ЛШ) вводили мікрокатетер з датчиком тиску. Металеву клемму знімали, перев'язавши артерію у цьому місці лігатурою (Pál Pacher et al., 2008). Запис показників кардіогемодинаміки в умовах закритої грудної порожнини здійснювали за допомогою програми Chart™v.5.4.2 (AD Instruments, Millar Instruments, США). Співвідношення тиску та об'єму ЛШ аналізували, використовуючи програмне

забезпечення PVAN 3.6 (AD Instruments, Millar Instruments, США) з конвертацією відносних одиниць об'єму (RVU) в абсолютні за формулою, отриманою через попереднє калібрування мікрокатетеру. Застосування системи MPVS 400 дає змогу в реальному часі отримувати криві, що описують залежність тиску від об'єму ЛШ протягом кожного серцевого циклу (рис. 2.2, а). Реєстрували показники максимального та мінімального тиску, частоти серцевих скорочень, об'єму ЛШ, а також першої похідної тиску – dP/dt (рис. 2.2, б).



а

б

Рис. 2.2. Нативні криві залежності тиску від об'єму (а) та тиск, об'єм ЛШ і dP/dt_{max} зверху вниз відповідно (б).

Насосну функцію лівого шлуночка оцінювали за комплексом показників: ЧСС, ударний об'єм ($УО=КДО-КСО$), фракція викиду ($ФВ=УО/КДО$), ударна робота ($УР=УО*P_{сер}$), хвилинний об'єм крові ($ХОК=УО*ЧСС$). Систолічну функцію та скорочувальну активність – за кінцево-систолічним об'ємом (КСО), кінцево-систолічним тиском (КСТ),

максимальним тиском вигнання (P_{\max}) та максимальною швидкістю збільшення тиску в лівому шлуночку (dP/dt_{\max}). Артеріальну жорсткість розраховували як КСТ/УО. Діастолічну функцію лівого шлуночка аналізували за кінцево-діастолічним об'ємом (КДО), кінцево-діастолічним тиском (КДТ), максимальною швидкістю розслаблення міокарда (dP/dt_{\min}) та ізovolюмічною константою розслаблення (τ_w) за методом Вайса (Weiss, 1976; Suga 1990).

2.9. Ультроструктурне морфологічне дослідження

Відбирали шматочки тканини з верхівки серця. Матеріал фіксували згідно із загальноприйнятою методикою і вносили зразки тканин у забуферений 2,5%-й розчин глутарового альдегіду (0,1 М фосфатний буфер, рН 7,4). Дофіксацію матеріалу здійснювали за допомогою реактиву Колфілда на основі 2%-го розчину чотириокису осмію, рН 7,4 («Sigma», США). Згодом зневоднювали матеріал у спиртах зростаючої концентрації, абсолютних спиртах і ацетоні з наступною заливкою в епон-аралдит («Fluka», Швейцарія). Ультратонкі зрізи товщиною 40-60 нм для перегляду в електронному мікроскопі контрастували 1%-м розчином уранілацетату і 0,4%-м розчином цитрату свинцю («Sigma», США) за методикою Рейнольдса (Kaguri, 1984). Перегляд препаратів здійснювали за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К (Україна).

Морфометричні дослідження проводили, базуючись на підходах Вейбеля (Weibel, 1970) з використанням комп'ютерної програми для морфометричних підрахунків Image Tool Version 3 (США) у 130-150 полях для кожного досліджуваного впливу. При цьому визначали загальну кількість мітохондрій, кількість структурно пошкоджених мітохондрій, їх діаметр.

2.10. Статистична обробка результатів дослідження

Для статистичного аналізу отриманих результатів використовували програми Excell (MS Office 2021), та Origin 8.0 («Microcal Software Inc.», США). Порівняння груп проводили за критерієм t Стюдента для параметричної вибірки та Манна-Уїтні для непараметричної вибірки. Тест Шапіро-Вілکا використовувався для оцінки нормальності розподілу даних у групах. Однорідність дисперсії серед груп оцінювалась за допомогою теста Левене, а у випадку виявлення однорідності проводився односторонній дисперсійний аналіз (ANOVA) для порівняння середніх показників між однорідними групами з подальшим тестом Bonferroni post hoc. Результати були виражені як середнє арифметичне значення \pm стандартна похибка середнього ($M \pm m$). Значення $P < 0,05$ вважалися статистично достовірними.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Зміни показників оксидативного стресу та активності NO-синтаз в мітохондріях серця щурів при дії доксорубіцину та флокаліну

Відомо, що доксорубіцин накопичується у мітохондріях у концентраціях, що у 100 разів більше, ніж у плазмі (Govender et al., 2014). При цьому концентрація препарату в матриксі органел майже на два порядки більша за цитозольну (Takemura, 2007). Саме велика кількість мітохондрій у міокарді може пояснювати кардіоселективну токсичність препарату (Doroshov et al., 1986; Kaiserova et al., 2022). Доксорубіцин індукує Ca^{2+} -перевантаження мітохондрій, гіперпродукцію ними АФК та зниження концентрації ендогенного газотрансмітера сірководню – ці процеси призводять до порушення мітохондріальних механізмів (Strutynskiy et al., 2023) та лежать в основі розвитку патології серцево-судинної системи, що має вирішальне значення при кардіоміопатії, характерною рисою яких є дисфункція та загибель кардіоміоцитів (Quiles et al., 2002). Молекула доксорубіцину для переходу в активний стан має відновитися до напівхінону. Відновлення препарату відбувається у дихальному ланцюгу переважно у I комплексі. Результатом є генерація вільних радикалів $\cdot\text{O}_2^-$ та H_2O_2 , який згодом метаболізується у реакції Фентона та Хабер-Вейса з утворенням гідроксильного радикала $\cdot\text{OH}$ (Angsutararux et al., 2015). Останній, реагуючи з мембранними фосfolіпідами, ініціює ПОЛ, розпад яких призводить до утворення високотоксичних сполук ДК і МДА. Ці речовини негативно впливають на мембрани та ініціюють апоптоз (Fujita, 2002). Окрім цього, доксорубіцин утворює кисневі радикали, безпосередньо відновлюючись в редуктазному домені eNOS (Vasquez-Vivar et al., 1997). При підвищенні концентрації доксорубіцину спостерігається неспряжений стан cNOS, за якого фермент продукує $\cdot\text{O}_2^-$ замість NO. Натомість NO виробляється у надзвичайно

великій кількості внаслідок активації iNOS. У підсумку, $\bullet\text{O}_2^-$ реагує з NO, утворюючи високотоксичний ONOO⁻, який є високоактивним окислювачем ДНК, білків, ліпідів і кардіоліпіну. Також було доведено, що доксорубіцин відновлюється у вільному нехелатованому залізі, утворюючи Fe^{2+} , яке є ініціатором ПОЛ та каталізатором реакції Фентона (Fujita, 2002). Ці фактори роблять внутрішню мембрану мітохондрій різко проникною для всіх розчинених речовин з молекулярною масою до 1,5 кДа. Відкриття МП призводить до набухання, розриву та загибелі мітохондрій клітин.

Останнім часом з'являється все більше даних про кардіопротекторні властивості активаторів K_{ATP} -каналів, які зумовлені їх здатністю пригнічувати оксидативно-нітрозативний стрес. Раніше в експериментах на собаках було показано, що активація K_{ATP} -каналів зменшувало у плазмі крові пули сечової кислоти, що може свідчити про пригнічення активності ксантиноксидази, яка виступає каталізатором у відновленні доксорубіцину з утворенням $\bullet\text{O}_2^-$, також флокалін пригнічував активність гемоксигеназної реакції, зменшуючи пули вільного нехелатованого заліза (Strutynskyi et al., 2009). Разом з цим активність ключових ферментів антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази та каталази, не змінювалась. Відкриття K_{ATP} -каналів флокаліном стимулювало окисний метаболізм аргініну, а саме конститутивний синтез оксиду азоту, про що свідчило збільшення пулів цитруліну і підвищення активності cNOS у плазмі крові собак (Strutynskyi et al., 2018). Проте, як змінюється доксорубіциніндукований оксидативний стрес при введенні флокаліну дотепер залишалось не вивченим.

Одним із наших завдань було дослідити вплив активації K_{ATP} -каналів на показники оксидативного стресу та активності NO-синтаз в мітохондріях, ізольованих із тканин серця експериментальних щурів. Ми визначали відповідні біохімічні показники в мітохондріях серця тварин контрольної та дослідних груп (табл. 3.1). Показано, що швидкість утворення нестабільних форм кисню, а саме $\bullet\text{O}_2^-$, як результат функціонування ксантиноксидази,

НАДФН-оксидази чи дихального ланцюга, а також $\bullet\text{OH}$ -радикала у мітохондріях серця достовірно збільшувалася після введення доксорубіцину у 10,5 та 3,4 раза відповідно (див. табл. 3.1). Вміст H_2O_2 у щурів, яким вводили доксорубіцин, порівняно з інтактними тваринами достовірно збільшився у 5,3 раза. Також спостерігали суттєве збільшення – у 4,1 та 2,5 раза відповідно вмісту ДК та МДА. Це свідчить про значне посилення вільнорадикальних процесів в органелах серця.

Таблиця 3.1.

Швидкість генерації $\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{OH}$ -радикалів, пули стабільного H_2O_2 , маркери ПОЛ та активність NO-синтаз в мітохондріях серця щурів при введенні їм доксорубіцину (15 мг/кг) та флокаліну (12,5 мг/кг), ($\text{M}\pm\text{m}$).

Показники	Контроль	Дія доксорубіцину 15 мг/кг	Дія доксорубіцину 15 мг/кг і флокаліну 12,5 мг/кг
Швидкість генерації $\bullet\text{O}_2^-$, нмоль/хв*мг білка	4,10±0,38	42,9±2,86**	10,7±4,69 ^{##}
Швидкість генерації $\bullet\text{OH}$, нмоль/хв*мг білка	3,28±0,24	11,31±0,23*	6,98±0,19 [#]
Пули H_2O_2 , нмоль/мг білка	1,87±0,16	9,93±0,25**	2,17±0,30 ^{##}
Малоновий диальдегід, нмоль/мг білка	2,04±0,05	5,11±0,31*	3,24±0,34
Дієнові кон'югати, нг/мг білка	2,61±0,16	10,82±0,54*	3,11±0,26 [#]
Коститутивна NOS, нмоль/хв*мг білка	8,57±0,97	1,8±0,13**	8,74±0,24 ^{##}
Індуцибельна NOS, нмоль/хв*мг білка	1,85±0,15	6,78±0,34*	4,01±0,18 [#]
H_2S , нмоль/мг білка	3,83±0,14	1,46±0,02*	3,73±0,21 [#]

*P<0,05, **P<0,01 відносно значень контрольних тварин; #P<0,05, ##P<0,01 відносно значень тварин після введення доксорубіцину

Введення щурам флокаліну на тлі дії доксорубіцину значно знижувало показники оксидативного стресу (див. табл. 3.1, рис. 3.1). Зокрема, швидкість генерації $\bullet\text{O}_2^-$ знижувалася у 4 рази (на 75%, P<0,01), швидкість утворення найбільш активного кисневого радикала $\bullet\text{OH}$ після активації K_{ATP} -каналів знижувалася в 1,6 рази (на 38%, P<0,05), рівні H_2O_2 були нижчими у 4,6 рази (на 78%, P<0,01) порівняно зі значеннями у щурів, ушкоджених доксорубіцином. Введення флокаліну також зменшувало у 3,5 і 1,6 рази (на 71%, P<0,05 та 37%) вміст ДК та МДА відповідно порівняно з такими показниками після введення доксорубіцину (див. табл. 3.1, рис. 3.1). Таким чином активація K_{ATP} -каналів флокаліном запобігає вільнорадикальним процесам в мітохондріях серця, активованим внаслідок токсичного впливу доксорубіцину, а також здійснює потужний мембранопротекторний ефект.

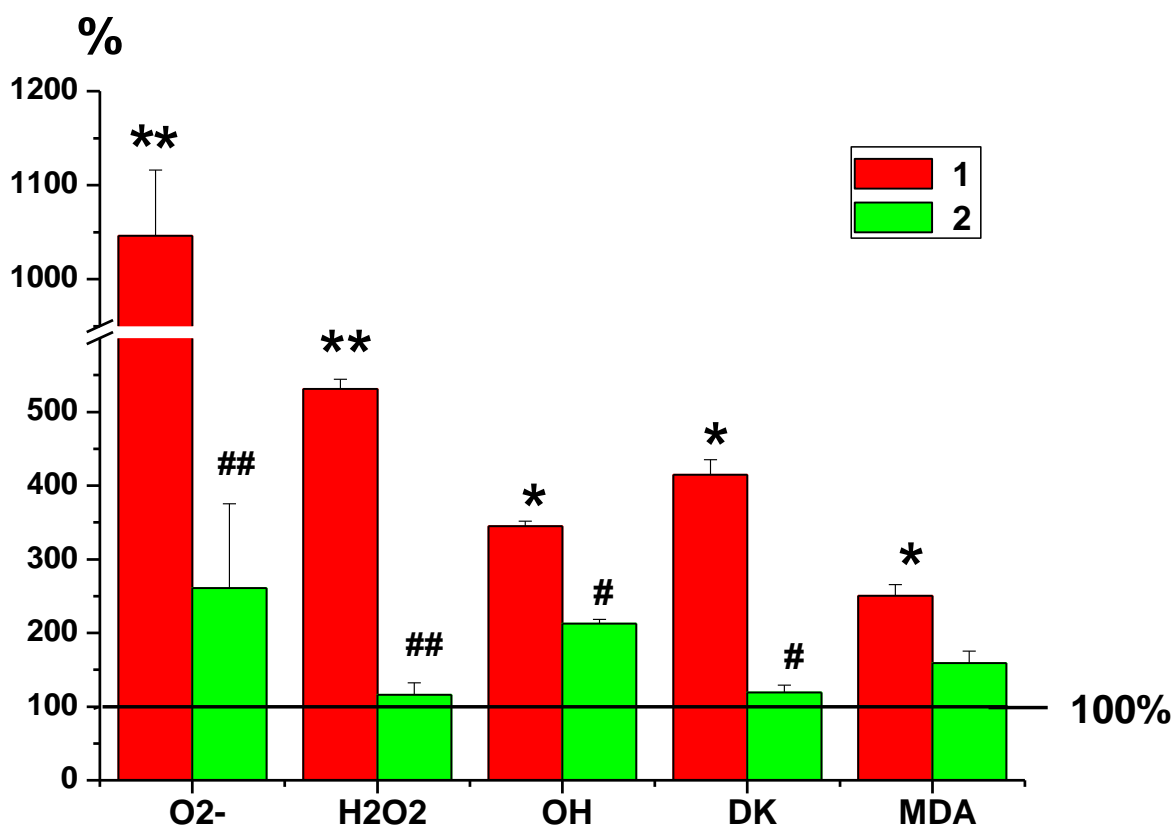


Рис. 3.1. Вплив доксорубіцину (1) у дозі 15 мг/кг та флокаліну (2) у дозі 12,5 мг/кг в умовах впливу доксорубіцину на нормовані величини (%) показників оксидативного стресу в мітохондріях серця щурів. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ відносно значень контрольних тварин, які прийнято за 100%; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ відносно значень тварин після введення доксорубіцину.

Як видно з табл. 3.1. та рис. 3.2, після ушкодження тварин доксорубіцином в мітохондріях серця значно зменшувалася активність cNOS, а саме пригнічувався кальційзалежний *de novo* синтез NO у 4,8 раза (на 79%, $P < 0,01$), водночас зростала активність iNOS у 3,7 раза ($P < 0,05$), що свідчить про неспряжений стан фермента для конститутивного синтезу оксиду азоту. При цьому продуктом взаємодії NO з супероксидом є високотоксичний пероксинітрит (ONOO-), який руйнує клітинні мембрани та інші внутрішньоклітинні структури. Відкриття K_{ATP} -каналів на тлі введення доксорубіцину продемонструвало достовірно високу активність cNOS у мітохондріях серця щурів, а саме у 4,9 раза ($P < 0,01$) вищу порівняно із такою у тварин після введення доксорубіцину. Водночас активність iNOS була у 1,7 раза нижчою ($P < 0,05$) аналогічного показника у тварин після введення доксорубіцину (див. табл. 3.1, рис. 3.2).

Таким чином, флокалін попереджає порушення конститутивного синтезу оксиду азоту. Цілком можливо, що це відбувається внаслідок зниження утворення супероксид-аніона, позаяк він є інгібітором як експресії, так і активності ферменту cNOS або навпаки, активація K_{ATP} -каналів збільшувала Ca^{2+} -залежний синтез через стимуляцію метаболізму аргініну (Strutynskyi et al., 2018).

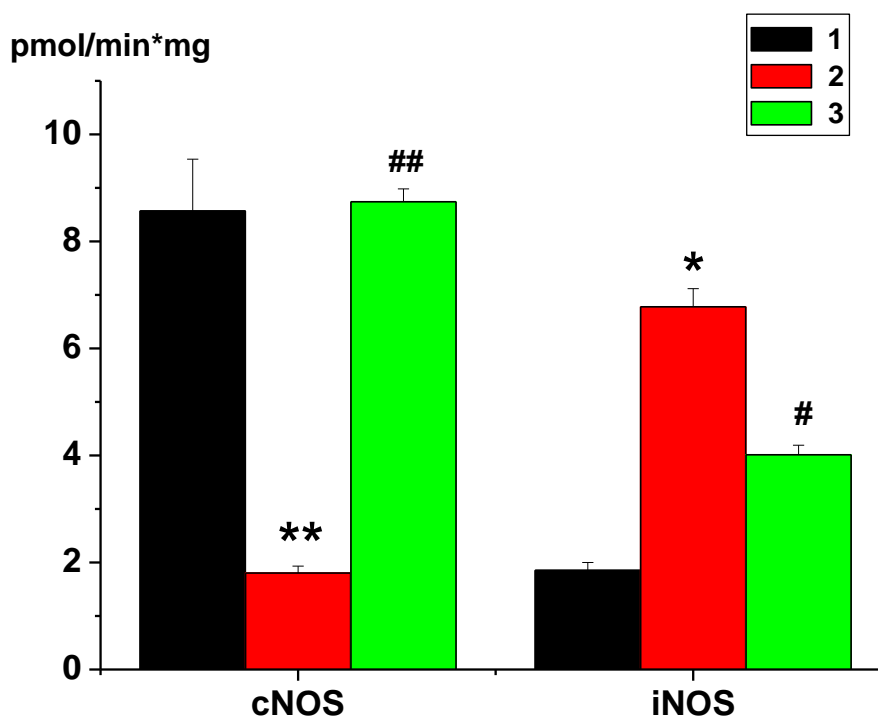


Рис. 3.2. Активність cNOS та iNOS в мітохондріях серця контрольних тварин (1), щурів, що піддавалися дії доксорубіцину (15 мг/кг) (2) та сумісній дії доксорубіцину (15 мг/кг) та флокаліну (12,5 мг/кг) (3). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ відносно значень контрольних тварин; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ відносно значень тварин після введення доксорубіцину.

Окремо треба відмітити, що введення доксорубіцину зменшувало у 2,6 рази (на 62%, $P < 0,05$) вміст H_2S в мітохондріях серця. Водночас після активації K_{ATP} -каналів на тлі дії доксорубіцину вміст ендogenousного трансмітера знаходився майже на рівні вихідних значень (див. табл. 3.1, рис. 3.3). Відомо, що біологічно активна молекула H_2S має сильні відновлювальні властивості через зменшення АФК, забезпечення сульфгідратації білків, підвищення експресії антиоксидантних ферментів, підвищення внутрішньоклітинного вмісту глутатіону тощо (Strutynska et al., 2022). За даними різних дослідників, захисні механізми H_2S -опосередкованої дії можуть бути пов'язані з активацією АТФ-залежних K^+ -каналів, відновленням конститутивного Ca^{2+} -залежного синтезу оксиду азоту, гальмуванням оксидативного стресу

(Strutynska et al., 2013; Mys et al., 2020). Однак H_2S не зменшував оксидативний стрес у мишей з мутацією гену cNOS. Отже, клітинний захист, який здійснюється за допомогою H_2S , тісно корелює з активацією cNOS та генеруванням NO (King et al., 2014). Крім того, зниження концентрації H_2S у плазмі крові пацієнтів зараз розглядається як маркер серцево-судинних розладів, таких як гіпертонічна хвороба та ішемічна хвороба серця (David et al., 2014). Також відомо, що H_2S та NO, діючи сумісно, покращують функцію лівого шлуночка під час розвитку серцевої недостатності через VEGF/cGMP шлях (Wu et al., 2018). Отже, флокалін здатен попереджати порушення синтезу H_2S в умовах впливу доксорубіцину.

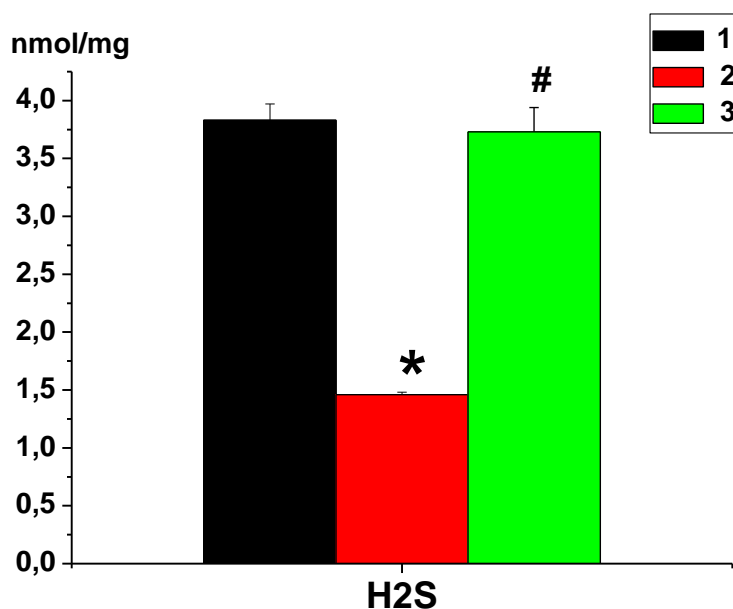


Рис. 3.3. Вміст ендogenous сірководню в мітохондріях серця контрольних тварин (1), щурів, що піддавалися дії доксорубіцину (15 мг/кг) (2) та сумісній дії доксорубіцину (15 мг/кг) та флокаліну (12,5 мг/кг) (3). * $P < 0,05$ відносно значень контрольних тварин; # $P < 0,05$ відносно значень тварин після введення доксорубіцину.

Таким чином, проведене дослідження свідчить, що активація K_{ATP} -каналів флокаліном пригнічує вільнорадикальні процеси, викликані доксорубіцином, а саме: зменшує генерацію супероксид-аніона, пероксиду

водню та гідроксильного радикала; проявляє антиоксидантні та мембранопротекторні властивості, знижуючи вміст ДК та МДА; підвищує активність конститутивного синтезу оксиду азоту, зменшує індукційний синтез оксиду азоту та попереджає зниження вмісту ендogenous H_2S в мітохондріях, що у наших дослідах викликалось введенням доксорубіцину.

3.2. Вплив доксорубіцину та активації K_{ATP} -каналів на відкривання МП у серці щурів та її чутливість до індуктора Ca^{2+}

Відомо, що за фізіологічних умов МП функціонує в режимі низької провідності. Згідно з даними, пошкоджуючий вплив доксорубіцину на мітохондрії може бути наслідком індукції МП (Wallace et al., 2022). Це робить внутрішню мембрану мітохондрій різко проникною для всіх розчинених речовин з молекулярною масою до 1,5 кДа. Відкривання МП призводить до колапсу потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій, роз'єднання дихального ланцюга, надходження йонів кальцію, припинення синтезу АТФ, вивільнення проапоптотичних білків і, врешті-решт, набухання, розриву мембран та загибелі мітохондрій клітин (Zhou et al., 2001; Halestrap et al., 2009).

Доксорубіцин індукує порушення кальцієвого гомеостазу, змінюючи функції саркоплазматичного ретикулума через інгібування SERCA або зниження рівня експресії її мРНК, а також активацію Ca^{2+} -каналів L-типу. Збільшення концентрації Ca^{2+} індукує відкривання МП, при цьому чутливість її до цього індуктора значно посилюється в умовах виснаження АТФ і посилення вільнорадикальних процесів (Halestrap et al., 2004). Також було показано, що вивільнення Ca^{2+} із саркоплазматичного ретикулума кардіоміоцитів щура та оксидативний стрес під дією доксорубіцину призводять до активації кальційзалежних протеїназ кальпаїнів з розщепленням прокаспаз-12 та подальшою ініціацією апоптозу (Nakagawa et al., 2000).

Ca^{2+} -перевантаження мітохондрій та гіперпродукція АФК органелами лежать в основі патології серцево-судинної системи та мають вирішальне значення для розвитку кардіоміопатій, характерною рисою яких є дисфункція та загибель кардіоміоцитів (Campos et al., 2016; Picard et al., 2016; Tocchi et al., 2015). Мітохондріальні кардіоміопатії мають важкі наслідки, включаючи серцеву недостатність, порушення ритму та асистолію (Campos et al., 2016; El-Nattab et al., 2016; Tocchi et al., 2015).

Водночас, існують ендогенні механізми захисту у відповідь на ці метаболічні зсуви. Одним із них є система аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів (K_{ATP} -каналів) цитоплазматичних і мітохондріальних мембран. Їх вважають центральним метаболічним сенсором енергозабезпечення, і їх відкриття запускає механізми захисту від пошкодження і загибелі клітин при дії патологічних чинників (Nichols, 2006; Olson et al., 2010; Strutyns'kyi et al., 2019).

Одним із завдань роботи було дослідити Ca^{2+} -індуковане набухання ізольованих мітохондрій серця щурів та чутливість МП до її природного індуктора Ca^{2+} в умовах дії доксорубіцину та при активації K_{ATP} -каналів на тлі введення доксорубіцину.

3.2.1. Дослідження спонтанного та Ca^{2+} -індукованого набухання ізольованих мітохондрій серця щурів в умовах введення доксорубіцину та флокаліну

У досліджах *in vitro* на ізольованих мітохондріях серця щурів вивчали зміни амплітуди набухання та чутливість МП до дії її природного індуктора – йонів Ca^{2+} .

Було показано, що зміна амплітуди набухання органел (ΔD_{520}) у безкальцієвому середовищі за поглинанням становила 0,043 та 0,099 у.о. у контрольних щурів та щурів після курсового введення доксорубіцину відповідно (рис. 3.4). При навантаженні йонами кальцію (0,1 ммоль/л) у

середовищі інкубації реєстрували високоамплітудне набухання суспензії мітохондрій серця тварин контрольної групи та групи після введення доксорубіцину, яке суттєво розрізнялося за амплітудою: ці показники зростали до 0,181 та 0,275 у.о. відповідно (див. рис. 3.4). Збільшення амплітуди спонтанного і Ca^{2+} -індукованого набухання мітохондрій у серці дорослих щурів після введення доксорубіцину порівняно з контрольними свідчить про збільшення неспецифічної провідності мітохондріальних мембран у серці після введення препарату.

Для з'ясування участі МП у доксорубіциніндукованій чутливості мітохондрій до кальцію та набухання, застосували CsA. Преінкубація з CsA (0,01 ммоль/л) суспензії ізольованих мітохондрій серця щурів після введення їм доксорубіцину майже повністю запобігала розвитку високоамплітудного кальційіндукованого набухання органел. Амплітуда набухання мітохондрій у кальцієвому середовищі за умов додавання CsA становила 0,078 у.о. (див. рис. 3.4). Пригнічення відкриття МП при дії її специфічного інгібітора свідчить про формування циклоспоринчутливої МП.

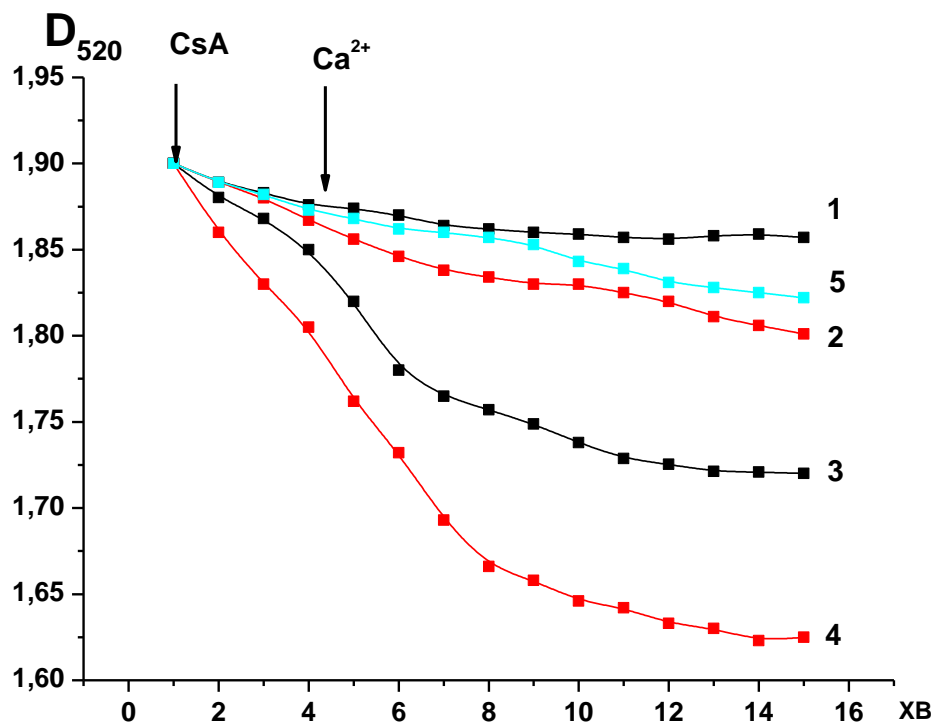


Рис. 3.4. Типові криві набухання суспензії мітохондрій серця щурів в умовах впливу доксорубіцину у дозі 15 мг/кг: 1 – безкальцієве середовище, 2 – безкальцієве середовище і доксорубіцин, 3 – дія Ca^{2+} (0,1 ммоль/л), 4 – дія Ca^{2+} і доксорубіцин, 5 – преінкубація мітохондрій *in vitro* з CsA (0,01 ммоль/л), дія Ca^{2+} , доксорубіцин.

Раніше було доведено, що імуносупресивний препарат CsA захищає ізольовані кардіоміоцити від пошкодження (Argaud et al., 2005). Він зв'язує та інгібує активність Сур-D – верифікованого регулятора функціонування МП. Тобто відкривання останньої, яке запускається Ca^{2+} та АФК, пов'язане з конформаційною зміною мембранного білка. Таким чином, таргетування МП має доведений потенціал як фармакологічна мішень для зменшення ушкоджень серця та мозку. Однак в клініці CsA не використовується для кардіопротекції через його міцне зв'язування з цитозольним циклофіліном А і, як наслідок, інгібування Ca^{2+} -чутливої протеїнфосфатази, кальциневрину та небажану імуносупресивну активність (Periasamy et al., 2002). Преінкубація з CsA культивованих неонатальних кардіоміоцитів, ізольованих мітохондрій щурів, а також кардіоміоцитів передсердних трабекул людини після введення доксорубіцину показало відновлення зниженої здатності цих мітохондрій до навантаження Ca^{2+} , збільшення їх трансмембранного потенціалу та покращення окисного фосфорилування (Montaigne et al., 2011).

Було встановлено, що особливістю мітохондрій серця щурів після введення доксорубіцину було перевищення значення амплітуди набухання у безкальцієвому середовищі у 2,3 раза ($P < 0,05$) порівняно з контрольними (рис. 3.5). При навантаженні мітохондрій серця щурів дослідної групи йонами Са відбувалося суттєве набухання органел: спостерігали збільшення амплітуди набухання у 1,5 раза ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Після преінкубації з CsA за тих самих умов, амплітуда набухання мітохондрій серця щурів, яким

вводили доксорубіцин, значно зменшувалась і наближалася до значень контрольного набухання у безкальцієвому середовищі (див. рис. 3.5).

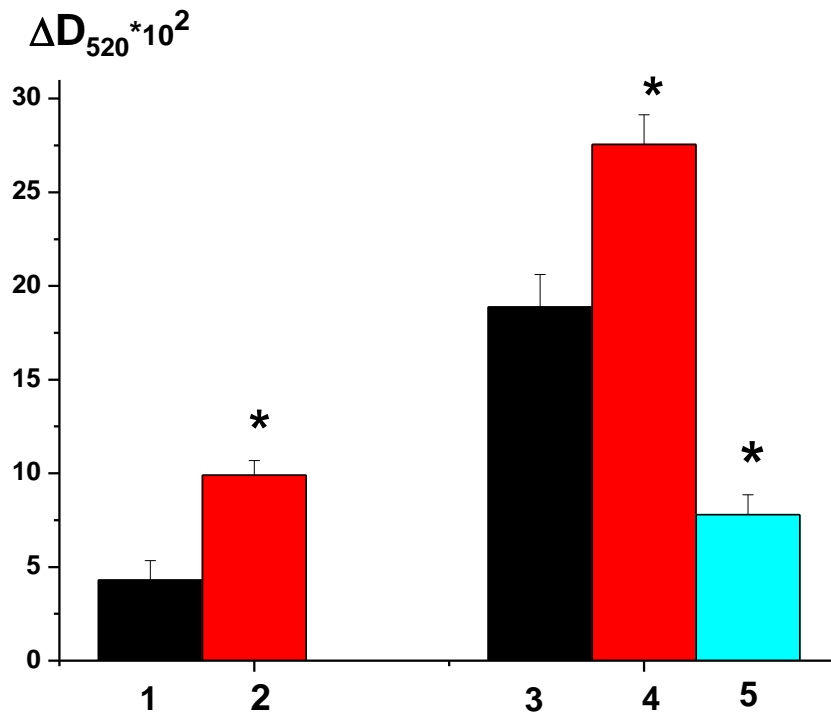
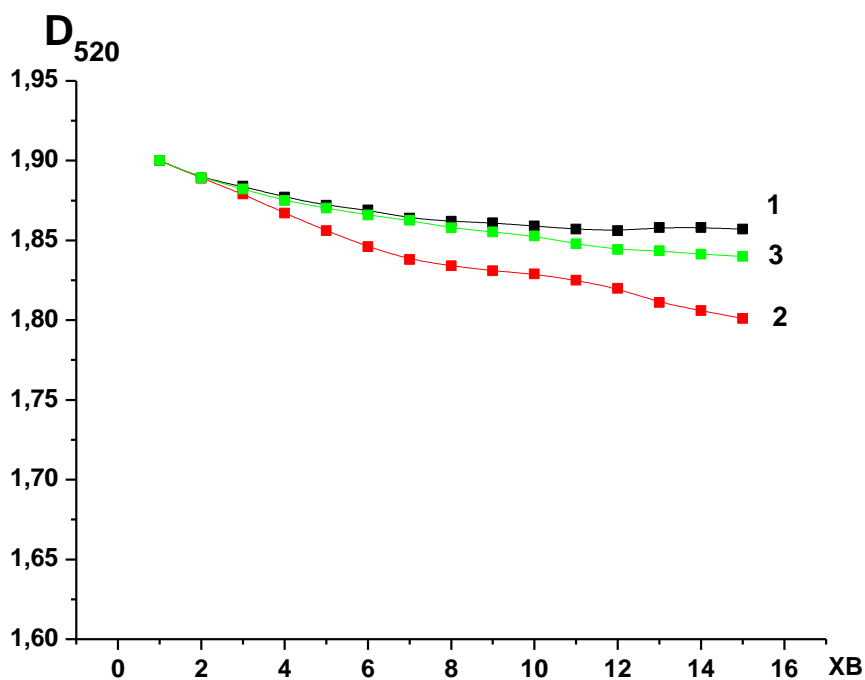
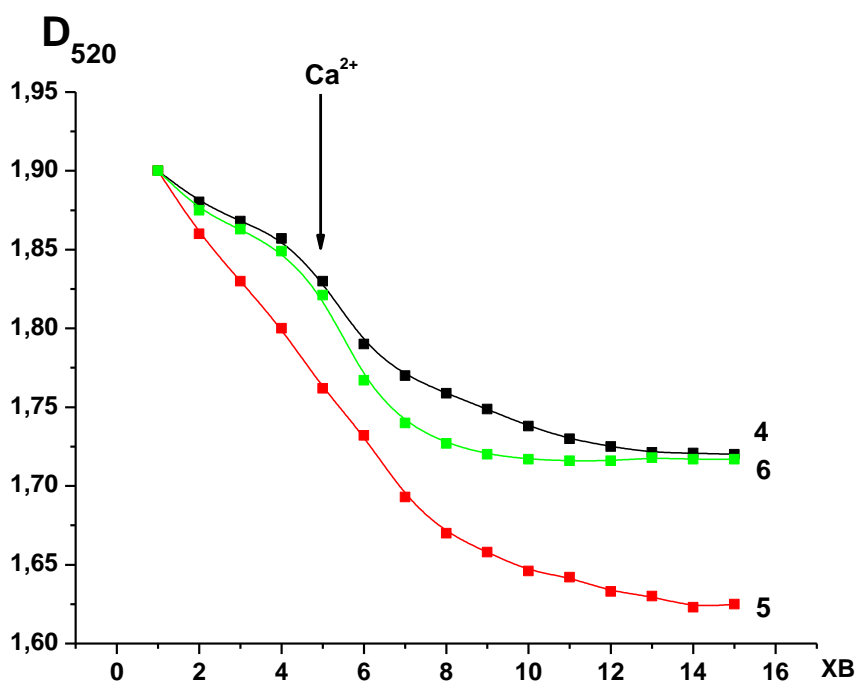


Рис. 3.5. Амплітуда набухання мітохондрій серця дорослих щурів в умовах впливу доксорубіцину у дозі 15 мг/кг: 1 – безкальцієве середовище, 2 – безкальцієве середовище і доксорубіцин, 3 – дія Ca^{2+} (0,1 ммоль/л), 4 – дія Ca^{2+} і доксорубіцин, 5 – преінкубація мітохондрій *in vitro* з CsA (0,01 ммоль/л), дія Ca^{2+} , доксорубіцин. * $P < 0,05$ щодо значень контрольної групи.

В експериментах з активацією K_{ATP} -каналів флокаліном для індукції відкриття МП використовували Ca^{2+} у концентрації 0,1 ммоль/л. У нашому дослідженні було виявлено, що при використанні флокаліну сумісно з доксорубіцином значення амплітуди набухання мітохондрій у безкальцієвому середовищі становило 0,06 у.о. (рис. 3.6 а). При застосуванні індуктора МП йонів кальцію амплітуда набухання мітохондрій серця щурів після дії флокаліну практично не відрізнялася від амплітуди у контрольних тварин (рис. 3.6 б).



а



б

Рис 3.6. Типові криві набухання мітохондрій серця щурів в умовах впливу доксорубіцину у дозі 15 мг/кг та флокаліну у дозі 12,5 мг/кг: а – безкальцієве середовище. 1 – контроль, 2 – дія доксорубіцину, 3 – дія доксорубіцину та флокаліну; б – з додаванням Ca^{2+} (0,1 ммоль/л). 4 – контроль, 5 – дія доксорубіцину, 6 – дія доксорубіцину та флокаліну.

Таким чином, введення флокаліну ефективно запобігало мітотоксичній дії доксорубіцину, яка проявлялася у індукції відкриття МП.

Було встановлено, що особливістю мітохондрій серця щурів, котрим вводили доксорубіцин сумісно з флокаліном, було зниження амплітуди набухання у безкальцієвому середовищі у 1,7 раза ($P < 0,05$) порівняно з тваринами, котрим вводили тільки доксорубіцин (рис. 3.7). За дії цієї комбінації препаратів навантаження мітохондрій серця щурів йонами Са не призводило до збільшення амплітуди набухання органел, а навпаки – цей показник був на рівні контрольних тварин, що свідчить про запобігання відкриття МП (див. рис. 3.7).

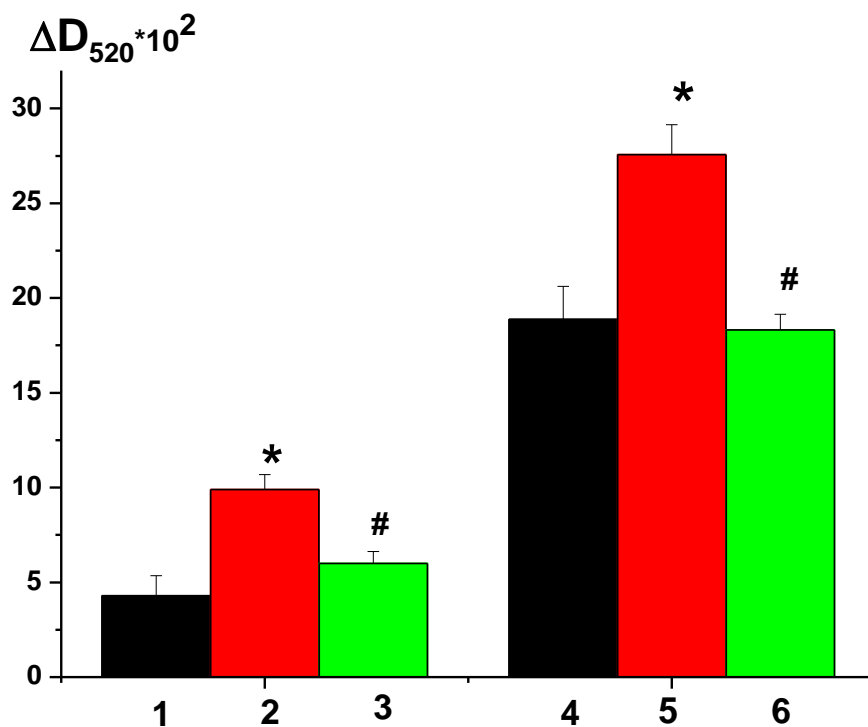


Рис 3.7. Амплітуда набухання мітохондрій серця дорослих щурів в умовах впливу доксорубіцину у дозі 15 мг/кг та флокаліну у дозі 12,5 мг/кг: 1 – безкальцієве середовище, 2 – безкальцієве середовище і доксорубіцин, 3 – безкальцієве середовище, доксорубіцин і флокалін, 4 – дія Ca^{2+} (0,1 ммоль/л), 5 – дія Ca^{2+} і доксорубіцин, 6 – дія Ca^{2+} , доксорубіцин і флокалін. * $P < 0,05$ щодо

значень контрольної групи, $^{\#}P < 0,05$ щодо значень групи щурів після введення тільки доксорубіцину.

Отже, збільшення амплітуди спонтанного і Ca^{2+} -індукованого набухання мітохондрій серця щурів після введення доксорубіцину порівняно з контрольними, відбувалося внаслідок токсичного впливу препарату на кардіоміоцити і свідчить про збільшення неспецифічної провідності мітохондріальних мембран. Додавання *in vitro* CsA, в свою чергу, нівелювало вплив доксорубіцину через пряму інгібуючу дію на відкривання МП. Сумісне з доксорубіцином застосування фторвмісного активатора K_{ATP} -каналів флокаліну попереджало доксорубіциніндуковане відкривання МП.

Досліджуючи механізми регуляції МП у серці щурів під впливом активатора K_{ATP} -каналів, раніше було показано, що в умовах преінкубації мітохондрій з флокаліном спостерігалось зменшення кальційіндукованого набухання органел у серці дорослих щурів (Strutynska et al., 2022). Також було виявлено, що ін'єкція флокаліну зменшує чутливість МП до кальцію у серці щурів (Strutynska et al., 2013). У літературі існує декілька пояснень даного ефекту препаратів цього класу. З одного боку, це – зменшення надходження йонів кальцію у мітохондрії, що є наслідком деполяризації внутрішньої мембрани мітохондрій після активації мітохондріальних K_{ATP} -каналів. З іншого боку, це помірне мітохондріальне набухання, що виникає внаслідок надходження іонів калію та одночасного пасивного надходження аніонів слабких кислот та води, що певною мірою захищає мітохондрії, зберігаючи структуру і функції їх міжмембранного простору.

3.2.2. Дослідження чутливості МП до дії індуктора Ca^{2+} в серці щурів в умовах пошкодження доксорубіцином та активації K_{ATP} -каналів

Для підтвердження ролі флокаліну у пригніченні відкривання доксорубіциніндукованої МП через вплив на її чутливість до природного

індуктора Ca^{2+} , була проведена серія експериментів з дією кальцію у діапазоні концентрацій 10^{-7} - 10^{-4} моль/л (рис. 3.8). Поріг чутливості відповідав найменшій концентрації Ca^{2+} , яка викликала набухання мітохондрій у серці.

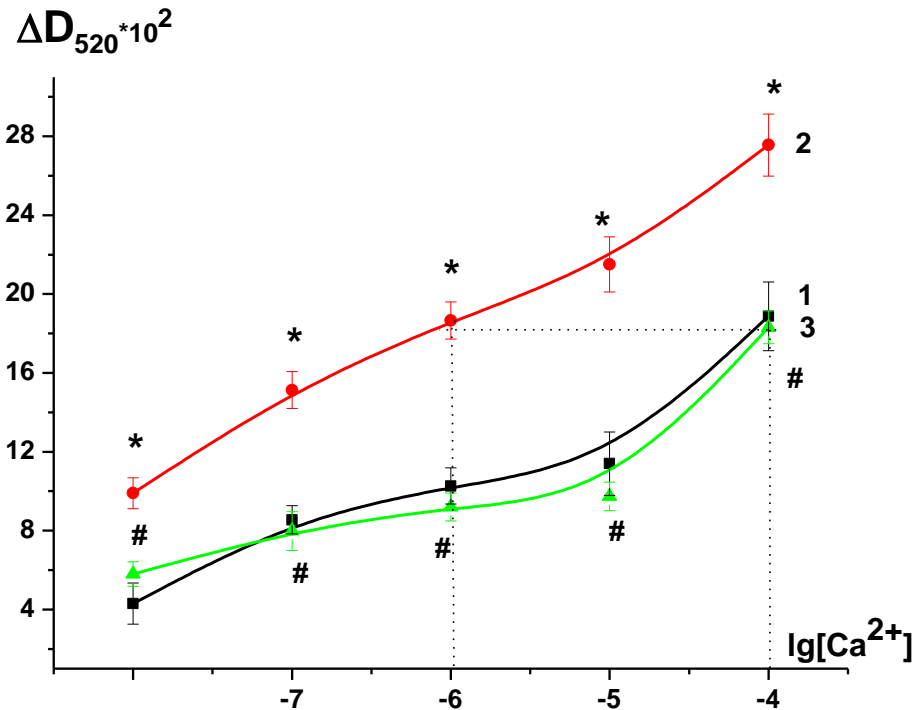


Рис. 3.8. Зміна оптичної щільності суспензії мітохондрій серця щурів у відповідь на дію індуктора МП йонів Ca^{2+} (10^{-7} - 10^{-4} моль/л) за умов введення флокаліну у дозі 12,5 мг/кг та доксорубіцину у дозі 15 мг/кг: 1 – контрольна група (дорослі щури), 2 – дія доксорубіцину, 3 – дія доксорубіцину і флокаліну. * $P < 0,05$ щодо значень контрольної групи, # $P < 0,05$ щодо значень групи щурів після введення доксорубіцину.

У мітохондріях серця щурів після введення доксорубіцину значно підвищувалась амплітуда набухання відносно контролю на всіх застосованих концентраціях Ca^{2+} : спостерігали зміщення концентраційної кривої вгору, що свідчить про зниження порога дії Ca^{2+} на набухання органел, і, як наслідок, збільшення чутливості МП до цього йона (див. рис. 3.8). Амплітуда набухання мітохондрій за дії Ca^{2+} у концентрації 10^{-6} моль/л після введення доксорубіцину відповідала такому набухання, яке спостерігали при дії

індуктора у концентрації 10^{-4} моль/л у щурів контрольної групи. Отже, збільшувалася чутливість МП до Ca^{2+} внаслідок зниження на два порядки порогової концентрації індуктора, яка спричиняла набухання органел.

Таким чином, введення тваринам доксорубіцину стимулювало Ca^{2+} -індуковане відкривання МП через збільшення чутливості до її індуктора у серці щурів.

Також ми виявили, що активація $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналів флокаліном значно зменшувала амплітуду набухання мітохондрій щурів, яким вводили доксорубіцин, за дії індуктора на всіх концентраціях (див. рис. 3.8). Амплітуда набухання мітохондрій за дії кальцію у концентрації 10^{-4} моль/л після курсового введення флокаліну на тлі дії доксорубіцину дорівнювала такому набуханню, яке спостерігали при дії кальцію у концентрації 10^{-6} моль/л у щурів після введення тільки доксорубіцину. Отже, спостерігалось зменшення чутливості МП до кальцію внаслідок підвищення на два порядки порогової концентрації кальцію, що спричиняла набухання мітохондрій. Таким чином, введення флокаліну пригнічувало Ca^{2+} -індуковане відкривання МП через зменшення її чутливості до кальцію у серці щурів при дії доксорубіцину.

У цьому розділі ми досліджували участь МП у патогенезі гострого доксорубіциніндукованого пошкодження серця та роль системи АТФ-чутливих калієвих каналів у його попередженні, оскільки формування високопровідного мегаканалу лежить в основі клітинної смерті. Відкривання МП асоціюється з дією потужних ендогенних індукторів МП, а саме АФК та Ca^{2+} , реалізацією чого є колапс мітохондріального потенціалу, зменшення синтезу АТФ та вивільнення апоптогенних факторів у цитозоль. Нами було показано, що активація АТФ-чутливих калієвих каналів флокаліном запобігає доксорубіциніндукованій дисфункції мітохондрій серця, інгібуючи, зокрема, відкривання МП. Результати, отримані у цьому дослідженні, свідчать про потенційні міто- та кардіопротекторні властивості флокаліну при гострому

токсичному ураженні міокарда доксорубіцином, що в подальшому може бути використане для медикаментозної корекції цієї патології.

3.3. Процеси скорочення-розслаблення ізольованих препаратів аорти щурів після введення доксорубіцину та флокаліну

Поряд з теорією пошкодження геному пухлинної клітини, деякі автори припускають, що токсичне ураження саме ендотеліальних клітин з розвитком важкої ендотеліальної дисфункції є основним механізмом протипухлинної дії доксорубіцину (Wolf, 2006). Як відомо, ендотелій судин відіграє надзвичайну роль, формуючи розподільний бар'єр між кров'ю та тканинами, а також регулюючи судинний тонус. Дисфункція ендотелію є поширеним явищем при багатьох хворобах, не виключенням є токсичні ураження різної етіології. Такий дисбаланс у системі кровообігу, як нестабільність артеріального тиску у вигляді значного його підвищення, часто спостерігається у пацієнтів під час лікування доксорубіцином, що є додатковим фактором ризику серцево-судинних ускладнень і потребує введення препаратів кардіологічних груп у схеми протипухлинного лікування (Livingston et al., 1984; Zajko et al., 1997; Wolf and Baynes, 2006; Jia et al., 2019). Вважається, що утворення аніонів супероксидного радикала в результаті окисно-відновних циклів доксорубіцину має вирішальне значення в опосередкуванні ендотеліотоксичності, що призводить до втрати ендотелієм бар'єрної функції, підвищення його проникності, порушення регуляції судинного тону та збільшення артеріальної жорсткості (Jeyaseelan et al., 1997; Wolf and Baynes, 2006; Jia et al., 2019).

Фармакологічне відкривання K_{ATP} -каналів гладеньком'язових та ендотеліальних клітин призводить до розширення кровеносних судин та посиленого постачання кисню й енергоресурсів до тканин. Слід зауважити, що вазодилаторні ефекти активаторів цих каналів, зокрема фторвмісних, є досить потужними та дозозалежними навіть при патологічних станах, що

супроводжуються значним порушенням системного артеріального тиску (Puvovar et al., 2004). Наприклад, в експериментах на ізольованих смужках аорти щурів зі спонтанною гіпертензією ефекти фторвмісного активатора калієвих каналів флокаліну за своєю амплітудою практично не відрізнялися від таких у тварин з нормальним тиском (Nelson et al., 1995; Quayle et al., 1997; Strutynskiy et al., 2001). В експериментах *in vivo* було встановлено, що внутрішньовенне і пероральне введення флокаліну дозозалежно знижує системний артеріальний тиск і розширює коронарні судини. Відповідно до зниження артеріального тиску, дозозалежним чином зменшувався загальнопериферійний опір судин (Strutynskiy et al., 2013).

Наступним завданням нашої роботи було дослідити вплив вітчизняного фторвмісного активатора K_{ATP} -каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран флокаліну на процеси скорочення та розслаблення ізольованих препаратів аорти щурів на тлі дії доксорубіцину.

В експериментах на ізольованих судинних кільцях аорти нами були показані доксорубіциніндуковані порушення механізмів як розслаблення, так і скорочення судин. Зокрема, ефекти скорочення судинних кілець аорти щурів після введення доксорубіцину у відповідь на дію норадреналіну (10 мкмоль/л) були меншими у 2,4 раза (на 58%, $P < 0,01$) порівняно з контрольними тваринами (рис. 3.9).

Аналогічне послаблення індукованого норадреналіном скорочення в аорті щурів, яким вводили доксорубіцин, було показано в дослідженнях Ahmadiasl et al. у 2002 та Olukman et al. у 2009. Причому у периферійних судинах зміни були статистично незначущими – автори це пояснювали регіональними відмінностями в щільності α -адренорецепторів у судинах тварин та зменшенням кількості відповідних рецепторів через дію доксорубіцину. Але механізм селективного зниження регуляції α -адренорецепторів у цих експериментах не було з'ясовано (Ahmadiasl et al., 2002; Olukman et al., 2009).

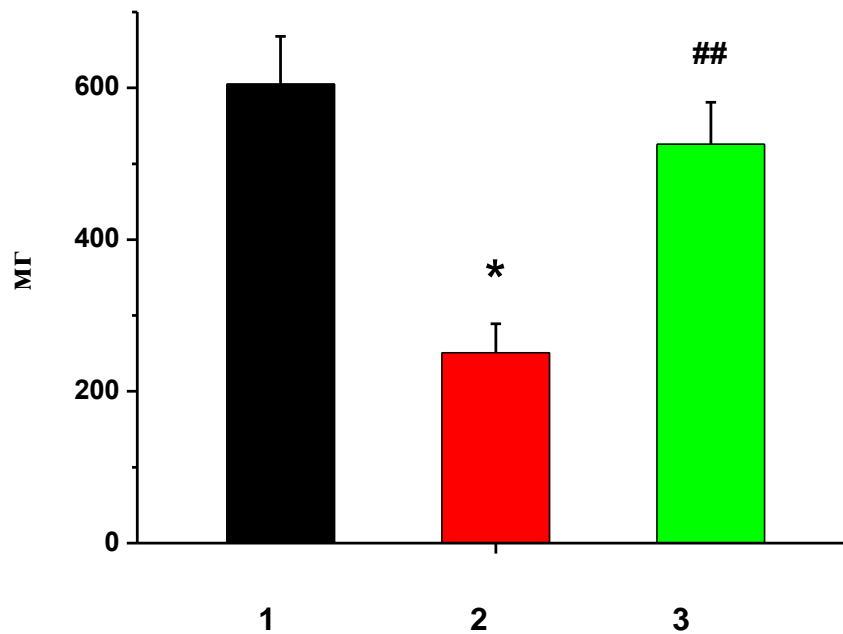


Рис. 3.9. Реакції скорочення кілець аорти за дії норадреналіну (10 мкмоль/л). 1 – контрольна група, 2 – дія доксорубіцину (15 мг/кг), 3 – дія доксорубіцину (15 мг/кг) і флокаліну (12,5 мг/кг) * $P < 0,05$ щодо значень контрольної групи, ## $P < 0,01$ щодо значень групи щурів після введення тільки доксорубіцину.

Водночас, релаксація судинних препаратів дослідних щурів при дозі ацетилхоліну 0.1 мкмоль/л була меншою у 1,8 раза (на 46%, $P < 0,05$), ніж у контрольних тварин (рис. 3.10), що підтверджує загальні уявлення про послаблення ендотелійзалежної релаксації судин на тлі введення доксорубіцину (Olukman et al., 2009; Clayton et al., 2020).

Зниження ендотелійзалежних вазодилаторних ефектів ацетилхоліну може свідчити про порушення 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 (Strutynskyi et al., 2023).

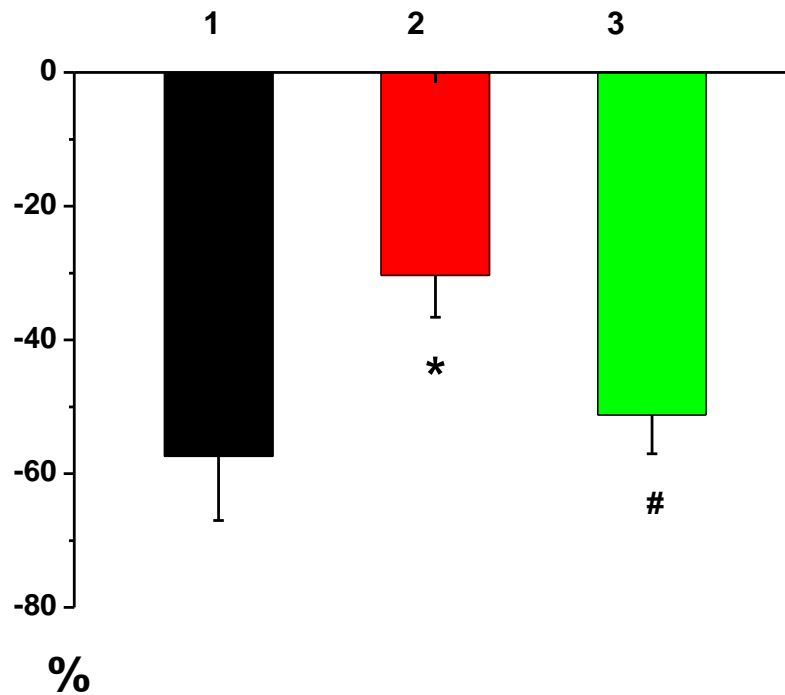


Рис. 3.10. Ендотелійзалежна релаксація кілець аорти у відповідь на дію ацетилхоліну (0,1 мкмоль/л). 1 – контрольна група, 2 – дія доксорубіцину (15 мг/кг), 3 – дія доксорубіцину (15 мг/кг) і флокаліну (12,5 мг/кг) * $P < 0,05$ щодо значень контрольної групи, # $P < 0,05$ щодо значень групи щурів після введення тільки доксорубіцину.

Отже, ендотеліальна дисфункція, продемонстрована нами у експериментах на ізольованих судинних кільцях аорти щурів при впливі доксорубіцину, свідчить про судиннотоксичну дію препарату, спричинену вільними радикалами – продуктами відновлення адріаміцину, які негативно впливають на мембрани ендотеліоцитів (Zhao et al., 2001; Cotgreave et al., 1998; Nyslop et al., 1988), а також зменшенням біодоступності NO.

Введення активатора АТФ-чутливих калієвих каналів флокаліну сумісно з доксорубіцином значно зменшувало порушення як скорочення, так і розслаблення судинних препаратів. Зокрема, після введення флокаліну, скорочувальні відповіді ізольованих кілець аорти щурів встановилися практично на рівні значень контрольних тварин, а саме збільшувалися у 2,1

раза ($P < 0,01$) порівняно з тваринами при дії доксорубіцину (див. рис. 3.9). Водночас, ендотелійзалежні вазодилаторні ефекти ацетилхоліну ($0,1$ мкмоль/л) за дії флокаліну покращилися у $1,6$ раза (на 69% , $P < 0,05$) порівняно з щурами за умов дії тільки доксорубіцину (див. рис. 3.10).

Отже, активація K_{ATP} -каналів гладеньком'язевих та ендотеліальних клітин артерій щурів, за ушкоджуючої дії доксорубіцину, попереджає значні порушення скоротливої функції судин. Механізмом, що лежить в основі вазодилаторних ефектів відкривання K_{ATP} -каналів, є гіперполяризація сарколемальної мембрани, зменшення періоду надходження Ca^{2+} в гладеньком'язову клітину в результаті вкорочення рефрактерного періоду, та зменшення тонуусу судин. У розвитку вазодилаторних реакцій можуть брати участь і K_{ATP} -канали мітохондріальних мембран, відкривання яких, через низку сигнальних шляхів, зокрема, протейнінази та АФК, може призводити до відкривання K_{ATP} -каналів сарколемальної мембрани (Strutynskyi, 2018; Ruvovar et al., 2004; Sanada, 2001).

3.4. Динаміка розвитку ЕКГ-ознак гострої доксорубіциніндукованої кардіотоксичності та під впливом активатора K_{ATP} -каналів

Електрокардіографія є однією зі стандартних методик, що використовуються для моніторингу та оцінки серцевої функції, а також для розуміння механізмів розвитку патології міокарду. Протягом останніх двох десятиліть кардіотоксичність лікарських препаратів все частіше вивчається за допомогою ЕКГ гризунів (Mehdi Nazari et al., 2009). Моделі щурів мають низку переваг порівняно з іншими тваринами через меншу мінливість, доступність трансгенних моделей і дослідницьких інструментів (Carll et al., 2011).

Кардіальна токсичність, спричинена доксорубіцином, має широкий клінічний спектр і проявляється ранніми та пізніми ускладненнями. Ранні зміни можна виявити на ЕКГ за такими ознаками, як елевація сегмента ST,

коливання амплітуди зубців, подовження тривалості комплексу QRS та інтервалів PQ, QT (Mehdi Hazari et al., 2009), зміна частоти серцевих скорочень (ЧСС) (Segredo et al., 2014; Ali et al., 2010). Подібна графіка може вказувати на наявність ішемії міокарда, порушення функцій провідності та скоротливості, що призводять до зниження іотропних та хронотропних ресурсів серцевого м'язу. Причинами таких патологічних змін у роботі серця може бути дисфункція провідної системи серця внаслідок токсичного впливу доксорубіцину на водії ритму різних порядків, порушення функції іонних каналів зі зміною тривалості потенціалу дії кардіоміоцитів (Keung et al., 1991; Vandenberg et al., 2012). Раніше було показано, що введення доксорубіцину призводить до помітного зниження експресії та порушення функції коннексину-43, що є характерним також при кардіоміопатії та ішемії міокарда (Allen et al., 1992; Johansen et al., 2011). Коннексин-43 є основою молекулярної складової щільних контактів (Boengler K et al., 2017), які відповідають за швидку електричну, механічну, сигнальну та метаболічну синхронізацію кардіоміоцитів (Pecoraro et al., 2017), тому ремодулювання коннексину-43 може бути відповідальним за внутрішньоклітинне перевантаження кальцієм (Thimm et al., 2005; Vol et al., 2017). Зниження експресії та функції коннексину-43 призводило до виникнення фібриляції передсердь у експериментальних тварин (Nagibin et al., 2016). Порушення кровопостачання міокарда внаслідок, по-перше, погіршення ендотеліязалежної релаксації коронарних судин, а, по-друге, оксидативного та нітрозативного стресів, що призводять до втрати функцій ендотеліальних клітин, розглядається як основна причина ішемічних змін при введенні доксорубіцину. Пригнічення процесів вазодилатації також може свідчити про порушення 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 (Strutynska et al., 2023). В судинному руслі розрізняють декілька функцій цих каналів. У першу чергу, це метаболічна регуляція кровотоку, регуляція базального тону та ауторегуляція судинного кровотоку. Як вже згадувалось раніше, активація

K_{ATP} -каналів гладеньком'язових клітин спричиняє трансмембранний вихід з клітини іонів калію та гіперполяризацію мембрани. Активація вищезгаданих каналів ендотеліальних клітин судин спричиняє звільнення молекул азоту. Результатом є розширення кровоносних судин та посилення постачання кисню та енергоресурсів у тканину (Strutynskyi et al., 2013).

У досліджах *in vivo* ми дослідили візуальні флуктуації форм хвиль ЕКГ у контрольній групі, групах після введення доксорубіцину та сумісного введення доксорубіцину та флокаліну з метою оцінки впливу активації K_{ATP} -каналів на ЕКГ-показники доксокардіотоксичності, а саме: тривалість та амплітуду основних зубців та інтервалів, а також ЧСС.

3.4.1. Дослідження ЕКГ-ознак впливу доксорубіцину та флокаліну на провідну функцію серцевого м'язу щурів

Здатність атипичних кардіоміоцитів спонтанно генерувати потенціал дії лежить в основі функціонування провідної системи серця. По досягненню порогового потенціалу клітини рівня у -55 - 60 мВ виникає потенціал дії, що проходить через 4 фази. Потенціал дії запускається через почергову активацію субодиницею G-білка нуклеотидзалежних K^+ - (cyclic nucleotide-gated ion channels, CNG) (Biel et al., 2009; Kaupp et al., 2002) та Na^+ -каналів (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels or I funny, HCN) (Xia et al., 2021; VanSchouwen et al., 2017), а надалі потенціалзалежних Ca^{2+} -каналів T та L-типу та G-білокрегульованих K^+ -каналів родини Kir. Типові кардіоміоцити отримують електричний сигнал від клітин-пейсмейкерів, що розташовані на різних «поверхах» провідної системи серця: від синоатріального вузла до волокон Пуркін'є, збуджуються і проводять хвилю деполяризації в усі боки по тканині серцевого м'яза через мережу міжклітинних контактів для забезпечення одночасного його скорочення. Кожна фаза потенціалу дії типового кардіоміоцита відповідає певним сегментам, інтервалам або зубцям ЕКГ. Значення основних показників ЕКГ щурів під впливом препаратів представлені у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2.

Зміни основних показників ЕКГ щурів при введенні їм доксорубіцину (15 мг/кг) та флокаліну (12,5 мг/кг) ($M \pm m$).

Схема досліджу	Тривалість, мс					Амплітуда, мВ		Частота уд/хв
	PQ	QRS	RR	QT	QTc	R	ST	
Контроль	50,4± 2,1	21,8± 1,8	129,0± 7,40	52,82± 1,8	185,54± 1,38	0,252± 0,03	0,05± 0,008	457,33± 26,43
Доксорубіцин 15 мг/кг	53,7± 5,1*	27,5± 3,50*	156,8± 8,4**	110,67± 5,2**	237,17± 6,7**	0,208± 0,040*	0,242± 0,017**	393,17± 28,53*
Доксорубіцин 15 мг/кг + флокалін 12,5 мг/кг	50,5± 2,9	25,7± 5,06	130,0± 11,5 ^{##}	79,5± 3,3 [#]	218,5± 12,48 [#]	0,240± 0,03 [#]	0,1± 0,004 ^{##}	455,0± 28,86 [#]

*P<0,05, **P<0,01 відносно значень контрольної групи; #P<0,05, ##P<0,01 відносно значень групи щурів після введення доксорубіцину

Так, на ЕКГ щурів після введення доксорубіцину спостерігали незначно пригнічену АВ-провідність у вигляді розширеного на 3,3 мс (7%, P<0,05) інтервалу PQ порівняно з контролем, а після сумісного введення флокаліну та доксорубіцину провідність через АВ-вузол відповідала контрольному значенню (див. табл 3.2, рис. 3.11). Інтервал PQ відображає поширення збудження від передсердь до шлуночків серця, характеризує роботу АВ-з'єднання та визначається вимірюванням часу від початку зубця Р до початку комплексу QRS, який в свою чергу характеризує збудження шлуночків і клінічно відповідає ранній систолі шлуночків, своїм початком має зубець Q, а

закінчується у щурів точкою переходу зубця S у T (Hoffman et al. 1960, Beinfield and Lehr, 1968).

У нашому дослідженні показано розширення на 5,7 мс (26%, $P < 0,05$) комплексу QRS у тварин після введення доксорубіцину (див. табл. 3.2, рис. 3.11), що може свідчити про порушення внутрішньошлуночкової провідності внаслідок ультраструктурних морфологічних змін міокарда, серед яких: поділ вставного диска, розпад міофібрилярного апарата, загибель кардіоміоцитів, набухання т-тубулярної системи, мітохондрій та саркоплазматичного ретикулула – які потенційно можуть призвести до аномальної рефрактерності (Jensen, 1984, 2013; Agen et al., 1992). У щурів, яким вводили доксорубіцин з флокаліном, тривалість комплексу QRS була меншою на 1,8 мс (7%) відносно тварин, лікованих адриаміцином (див. табл. 3.2, рис. 3.11).

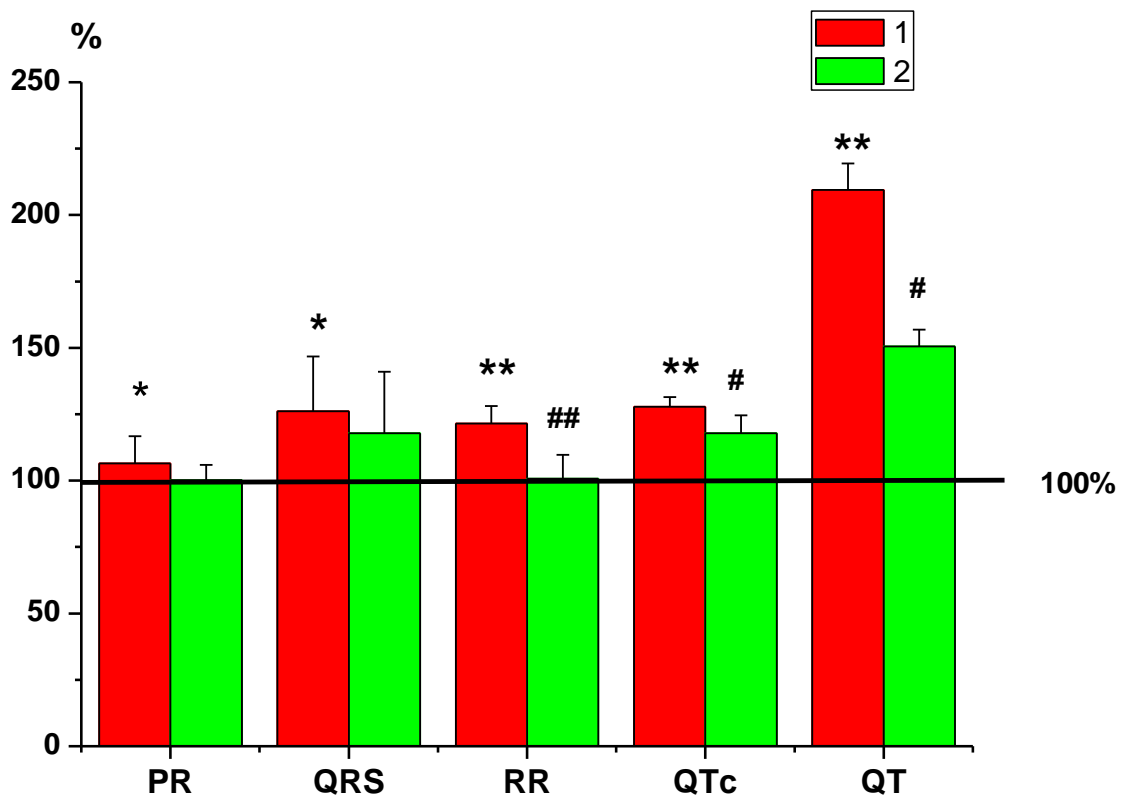


Рис. 3.11. Вплив доксорубіцину (1) у дозі 15 мг/кг та флокаліну (2) у дозі 12,5 мг/кг в умовах впливу доксорубіцину на нормовані величини (%) показників тривалості інтервалів PQ, RR, QT, QTc та комплексу QRS на ЕКГ.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ відносно значень контрольної групи, яку прийнято за 100%;
 # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ відносно значень групи щурів після введення доксорубіцину.

Слід відмітити також, що тривалість інтервалу QT збільшилася вдвічі ($P < 0,01$) та QTc на 51,6 мс (28%, $P < 0,01$) після введення доксорубіцину, а при сумісному використанні доксорубіцину з флокаліном тривалість інтервалу QT була меншою на 31,2 мс (29%, $P < 0,05$), а QTc на 18,7 мс (10%, $P < 0,05$) (див. табл. 3.2, рис. 3.11, рис. 3.13) відносно щурів після введення доксорубіцину.

Інтервал QT описує час від зубця Q до кінця зубця T і відображає деполяризацію та реполяризацію кардіоміоцитів, тобто клінічно відповідає повній систолі шлуночків. Збільшення його тривалості свідчить про порушення електричної активності серця через, у тому числі, і токсичний вплив лікарських препаратів. Подовження інтервалу QT (QTc) внаслідок прийому протипухлинних препаратів, особливо доксорубіцину, є величезною проблемою в онкології (Roden et al., 2019; Duan et al., 2018). Така графіка ЕКГ зумовлена подовженням потенціалу дії кардіоміоцитів шлуночків, корелює з тяжкістю гістологічного ураження серця та може бути маркером раптової серцевої смерті (Cirillo et al., 2000; Duan et al., 2018). Тому подовження інтервалу QT (QTc) є найбільш прогностично точною та загрозовою ранньою ЕКГ-ознакою кардіотоксичності адриаміцину. Отже, активація K_{ATP} -каналів запобігала порушенню функції провідності кардіоміоцитів шлуночків та передсердь у щурів після введення доксорубіцину.

3.4.2. Дослідження ЕКГ-ознак впливу доксорубіцину та флокаліну на автоматизм, скоротливість серця щурів та амплітуду сегмента ST

У наших експериментах було виявлено порушення автоматизму синусового вузла у щурів після введення доксорубіцину, що проявлялось збільшенням на 22% тривалості проміжку RR, що суттєво зменшило ЧСС на 84 уд/хв. Після сумісного введення флокаліну та доксорубіцину не

спостерігалось хронотропної дисфункції, а саме показники RR та ЧСС були на рівні контрольних значень (див. табл. 3.2, рис.3.11). Інтервал RR – це час між двома послідовними піками зубця R (Konopelski et al., 2016), що має значення для обчислення ЧСС. Відомо, що причиною патологічного зменшення ЧСС може бути фіброз сіноатріального вузла та апоптоз його клітин (Wu Y, 2014). Отже, активація АТФ-чутливих K^+ -каналів попереджала розвиток порушення автоматизму водія ритму 1-го порядку.

Слід відмітити зменшення амплітуди зубця R комплексу QRS на 0,014 мВ (18%) у щурів після введення доксорубіцину, а після введення фторвмісного активатора АТФ-чутливих калієвих каналів разом з доксорубіцином амплітуда зубця R наблизилась до контрольного значення (див.табл. 3.2, рис. 3.12). Отримані результати дають змогу припустити, що флокалін покращує інотропну функцію серця.

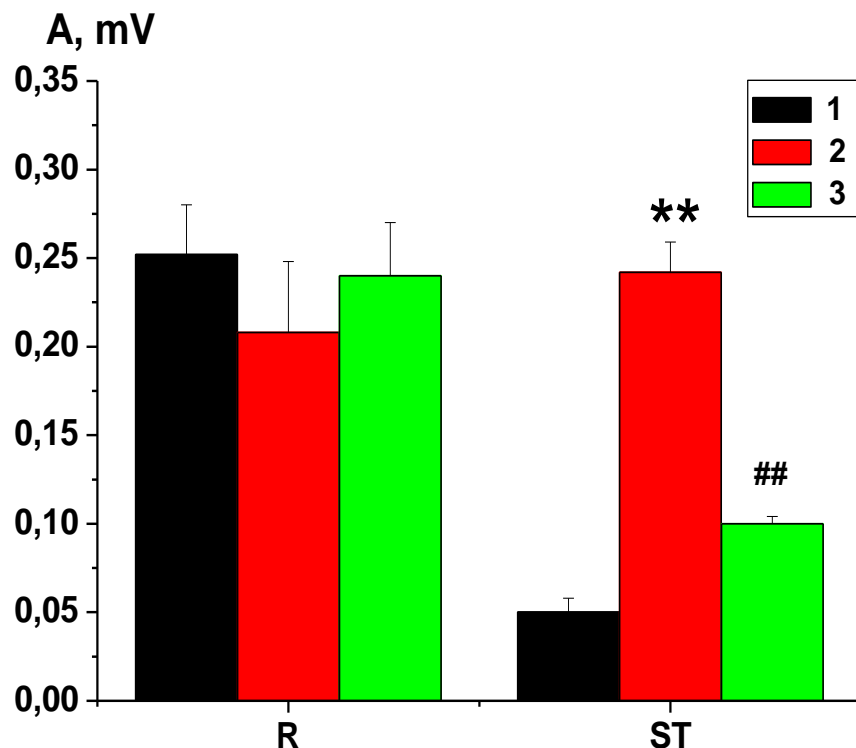
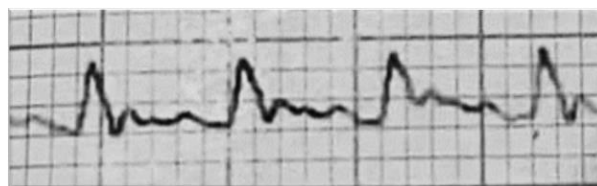


Рис. 3.12. Зміни амплітуди зубця R та сегменту ST на ЕКГ контрольних щурів (1), тварин, що піддавалися дії доксорубіцину (15 мг/кг) (2) та сумісній дії доксорубіцину (15 мг/кг) та флокаліну (12,5 мг/кг) (3). **P<0,01 щодо

значень контрольної групи, $^{##}P < 0,01$ щодо значень групи щурів після введення доксорубіцину.

Ми спостерігали виражену елевацію сегмента ST до 0,45 мВ в окремих випадках (рис. 3.13 Б, В) на ЕКГ щурів після введення доксорубіцину порівняно з контрольними. Сегмент ST представляє час, коли шлуночки деполаризовані і визначається як проміжок від кінця комплексу QRS до початку зубця Т. В нормі є ізоелектричним, а високий сегмент ST частіше свідчить про гостре ішемічне ураження міокарда. Як вже згадувалося вище, причинами таких патологічних зміни у роботі серця може бути дисфункція кровопостачання міокарда через оксидативний стрес, патологічні зміни у системі оксиду азоту та доксорубіциніндуковані порушення механізмів як розслаблення, так і скорочення артеріальних судин. Також в літературних джерелах зазначено, що, вірогідно, до ішемічних змін міокарда без ознак атеросклеротичного ураження коронарних судин у щурів після введення доксорубіцину може задіюватися сигнальний шлях ендотеліну-1 (ЕТ-1). Було показано, що експресія вазоконстриктора ЕТ-1 та його рецепторів підвищена в міокарді пацієнтів, що отримували доксорубіцин (Sayed-Ahmed et al., 2001). Вазоконстрикторна активність ЕТ-1 у судинах у нормі врівноважується дією NO, але внаслідок дії доксорубіцину продукція NO пригнічується і спостерігається порушення артеріальної вазодилатації. На ЕКГ тварин після сумісного введення доксорубіцину та флокаліну елевація сегменту ST в середньому не перевищувала 0,05-0,1 мВ (рис. 3.13 Г). Вірогідно, активація K_{ATP} -каналів запобігає порушенням ендотелійзалежної вазодилатації.



А.

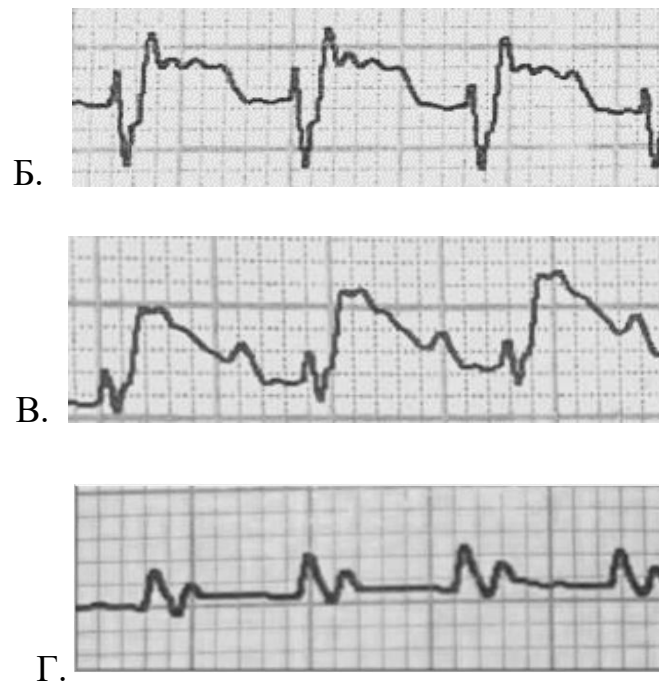


Рис. 3.13. ЕКГ щурів: А – контрольна група (ST на ізолінії, інтервал QT 50 мс, амплітуда зубця R 0,25 мВ, ЧСС 500 уд/хв); Б, В – в умовах впливу доксорубіцину (елевація сегмента ST до 0,4(Б)-0,45(В) мВ, подовження інтервалу QT до 120(Б)-140(В) мс, зниження амплітуди зубця R до 0,1(В)-0,15(Б) мВ, зменшення ЧСС до 330(В)-375(Б) уд/хв), Г – після введення доксорубіцину та флокаліну (висота сегмента ST 0,05 мВ, інтервал QT 50 мс, амплітуда зубця R 0,19 мВ, ЧСС 462 уд/хв). Швидкість плівки 50 мм/с, 10мм=1мВ, 10мм=200 мс.

Згідно з результатами проведеного ЕКГ-дослідження можна зробити висновок, що доксорубіциніндукована кардіотоксичність асоціюється зі змінами на ЕКГ. Ми спостерігали такі коливання тривалості та амплітуди зубців та інтервалів, що свідчать про порушення провідності, автоматизму, скоротливості та гостре ішемічне ураження міокарда у тварин після введення доксорубіцину. Дані чисельних досліджень, описаних в літературі, узгоджуються з нашими результатами, а саме: подовження інтервалу QT та елевація сегмента ST, а також зміни ЧСС та зменшення амплітуди зубця R, спричинені введенням доксорубіцину, є характерними наслідками такого

пошкодження. У нашій роботі вперше було показано, що сумісне з доксорубіцином введення вітчизняного фторвмісного активатора АТФ-чутливих калієвих каналів флокаліну значно послаблювало доксорубіциніндуковані порушення ЕКГ-параметрів. Це призводило до достовірного зменшення тривалості комплексу QRS, інтервалів PQ та QT (QTc), зниження сегмента ST майже до ізолінії, збільшення ЧСС та амплітуди зубця R, що свідчило про попередження розвитку порушення функцій серця. Позитивні зміни на ЕКГ за дії флокаліну, підтверджують його кардіопротекторну та антиішемічну дію.

3.5. Зміна активності маркерів пошкодження міокарда та вмісту глюкози у плазмі щурів після пошкодження доксорубіцином та активації K_{ATP} -каналів

Як було показано вище, доксорубіцин індукував утворення високотоксичних сполук ПОЛ, а саме: вміст ДК та МДА у мітохондріях серця щурів збільшувався у 4,1 та 2,5 раза відповідно на 5 добу спостереження порівняно з контрольними тваринами. Водночас, проведені нами дослідження продемонстрували потужні мембранопротекторні властивості активатора K_{ATP} -каналів, а саме: введення флокаліну доксорубіциномодифікованим щурам зменшувало у 3,5 й 1,6 раза вміст ДК та МДА відповідно порівняно з такими після введення доксорубіцину. У літературних джерелах зазначається, що накопичення у кардіоміоцитах окиснених ліпідів вводить гідрофільні молекули мембрани у гідрофобну фазу з наступним пошкодженням мембрани, що призводить до некротичної загибелі клітини та супроводжується вивільненням ферментів – маркерів пошкодження міокарда – у кров (Luo et al., 1997; Hrelia et al., 2002). Ензими – біологічні каталізатори, що прискорюють метаболічні процеси у структурних елементах клітини, безперервно синтезуються і за надмірної проникності клітинних мембран здатні попадати у кров'яне русло, демонструючи там підвищену активність

(Hariv, 2016). Тому дослідження активності у плазмі крові таких ферментів, як аспартатамінотрансфераза (АСТ), аланінамінотрансфераза (АЛТ) та серцева фракція креатинфосфокінази (КФК МБ), є обов'язковим у клініці поряд з електрокардіографічним дослідженням.

Отже, з метою дослідження доксорубіциніндукованого пошкодження мембран кардіоміоцитів та його попередження активатором АТФ-чутливих калієвих каналів нами було проведено визначення активностей АСТ, АЛТ та КФК МБ в плазмі крові контрольних та дослідних щурів. Отримані значення біохімічних показників тварин контрольної групи знаходились у межах референтних значень відповідних показників для лабораторних щурів (Wolford et al., 1986).

Як видно з табл. 3.3, АСТ та АЛТ мали значно більшу активність – у 1,6 раза (на 60%, $P < 0,05$) та вдвічі ($P < 0,01$) відповідно – у тварин після введення доксорубіцину порівняно з контрольними, що було індикатором пошкодження мембран клітин міокарда та печінки.

Таблиця 3.3.

Зміна активності маркерів пошкодження міокарда та вмісту глюкози у плазмі крові щурів при введенні їм доксорубіцину (15 мг/кг) та флокаліну (12,5 мг/кг), ($M \pm m$).

Схема досліджу	Аланінамі нотрансфе раза, од/л	Аспаргата мінотранс фераза, од/л	Креатинфо сфокіназа МБ, од/л	Глюкоза, ммоль/л	Тропонін І, нг/мл
Контроль	49,16±6,1	105,83±10,6	590,17±27,9	4,9±0,4	0,1±0,003
Доксорубіцин 15 мг/кг	98,62±9,8**	168,9±12,4*	802,8±38,5 **	6,26±0,47*	0,11±0,002
Доксорубіцин 15 мг/кг + флокалін 12,5 мг/кг	75,7±6,8 [#]	117,64±13,6 [#]	657,72±20,6 [#]	5,25±0,3 [#]	0,1±0,005

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ відносно значень контрольної групи; # $P < 0,05$ відносно значень групи щурів після введення доксорубіцину

Відомо, що локалізація АЛТ більша у цитоплазмі, тоді як АСТ – у мітохондріях. Тому можна сказати, що підвищення активності АСТ свідчить про загибель клітини, а АЛТ – про порушення цілісності мембрани. Після введення флокаліну сумісно з доксорубіцином активність АСТ та АЛТ у плазмі крові щурів була нижчою у 1,4 (30%, $P < 0,05$) та 1,3 (23%, $P < 0,05$) раза відповідно порівняно з тваринами, котрим вводили тільки доксорубіцин (див. табл. 3.3).

Також після введення доксорубіцину збільшувався вміст серцевої креатинкінази у 1,5 раза (на 36%, $P < 0,01$) порівняно з контролем (див. табл. 3.3). КФК МБ діє у клітині як модулятор енергетичного запасу, перетворюючи креатин на ФКр, використовуючи АТФ як субстрат (Tokarska-Schlattner et al., 2005; Nicolay et al., 1987). При зростаючій потребі, АТФ може бути поповнений з внутрішньоклітинних пулів ФКр через збільшення рівня активної креатинкінази. Luo et al. експериментально продемонстрували вивільнення креатинфосфокінази через пошкоджені продуктами ПОЛ мембрани кардіоміоцитів щурів, яким вводили доксорубіцин. У нашому дослідженні введення шурам флокаліну явно продемонструвало його мембраностабілізуючий ефект: активність КФК МБ у крові щурів була меншою у 1,2 раза (18%, $P < 0,05$) порівняно з тваринами після введення доксорубіцину.

Збільшення активностей АСТ, АЛТ, КФК МБ в плазмі крові щурів, яким вводили доксорубіцин, було показано у багатьох дослідженнях (Tan et al., 2011; Singh et al., 2020; Ку et al., 2014), проте мембраностабілізуючий ефект активації АТФ-чутливих калієвих каналів у цьому контексті показано нами вперше. У клініці ці показники прийнято вважати ранніми маркерами доксокардіотоксичності (Gianni et al., 2008; Christenson et al., 2015).

Продукт вуглеводневого обміну, який найчастіше визначають в плазмі крові – глюкоза. Ми виявили збільшення вмісту глюкози у плазмі щурів після введення доксорубіцину у 1,3 раза (на 28%, $P < 0,05$) порівняно з контрольною групою, а після відкриття K_{ATP} -чутливих каналів її концентрація була нижчою у 1,2 раза (16%, $P < 0,05$) порівняно з щурами, ушкодженими доксорубіцином, проте її концентрація залишалася вищою порівняно з контрольними, що свідчить про зменшення секреції інсуліна клітинами підшлункової залози в умовах впливу активатора K_{ATP} -каналів (див. табл. 3.3). Експериментальні дослідження показали, що введення доксорубіцину індукує перерозподіл транспортерів GLUT-1 та GLUT-4 в плазматичній мембрані, що призводить до швидкого поглинання глюкози кардіоміоцитами протягом першої години після його введення (Ventura-Clapier et al., 2003; Hrelia et al., 2002). Вважається, що поряд з фізіологічною активацією K_{ATP} -каналів підшлункової залози, це також є ранньою фазою адаптивної відповіді серця на зниження АТФ і є його унікальною властивістю відновлювати енергію. Але через прогресуюче й незворотнє пошкодження мембран кардіоміоцитів поступово спостерігається зменшення поглинання глюкози клітинами та вихід її у кров (Hrelia et al., 2002). Зменшення концентрації глюкози у плазмі крові щурів після введення флокаліну на тлі дії доксорубіцину додатково підтверджує мембранопротекторний ефект препарату.

Вище нами було зроблено припущення, що у більшості кардіоміоцитів за умов гострої кардіотоксичності на початковому етапі пошкодження не відбувається некроз, так як МП деякий час залишається у режимі низької провідності через інгібування її кислим рН. Тому не відбувається масового пошкодження міофіламентів з виходом їх назовні. Це підтверджується нашими результатами, в яких ми не спостерігали на 5 добу після введення доксорубіцину різниці у значеннях маркера некрозу міокарда тропоніну I – структурного та функціонального білкового компонента м'язових клітин – між контрольною та дослідними групами (див. табл. 3.3).

3.6. Кардіогемодинаміка щурів при дії доксорубіцину та флокаліну

Дилатаційна кардіоміопатія (ДКМП) – це структурне та функціональне ушкодження серцевого м'яза, характерною ознакою якого є дифузне розширення камер серця, що супроводжується порушенням систолічної функції міокарда та симптомами серцевої недостатності (Elliot et al., 2008). Протипухлинна терапія доксорубіцином розглядається як окрема причина розвитку важкої ДКМП через потужний мітотоксичний ефект препарату, що індукує апоптоз та некроз кардіоміоцитів (Jing et al., 2018; Zhao et al., 2017). Отже, актуальним є питання розробки нового, ефективного методу попередження та корекції доксорубіциніндукованого пошкодження міокарда, але проведені чисельні дослідження по використанню антиоксидантів (Chen et al., 2022), хелатора заліза (Yi et al., 2007; Hasihoff et al., 2003), альтернативних шляхів введення доксорубіцину (Weiss, 1992) не показали бажаних результатів (Takemura et al., 2017). Останнім часом особливого значення набуває активатор АТФ-чутливих калієвих каналів флокалін, потужні кардіопротекторні, мембраностабілізуючі та антиоксидантні ефекти якого на тлі дії доксорубіцину були показані нами раніше.

Завданням наступного етапу нашого дослідження було виявити особливості кардіогемодинаміки у щурів після введення доксорубіцину та сумісного введення доксорубіцину та флокаліну. Незважаючи на численні дослідження порушення функціонального стану міокарда антрациклінами, часто аналізу підлягають лише окремі показники роботи серця – тому актуальною є саме комплексна оцінка його функцій. Використання системи Millar Instruments (США) для реєстрації залежності тиску-об'єму лівого шлуночка (ЛШ) у щурів *in vivo* дозволило нам оцінити функціональний стан серцево-судинної системи дослідних тварин більш повно і розглянути окремо кожну з фаз серцевого циклу.

3.6.1. Дослідження насосної функції серця

Дослідження насосної функції ЛШ дало змогу встановити суттєві відмінності між показниками щурів після введення доксорубіцину порівняно

з контролем (табл. 3.4): були достовірно нижчими фракція викиду (ФВ) на 27% ($P<0,05$), хвилиний об'єм крові (ХОК) на 19% ($P<0,05$), ударна робота (УР) на 15% ($P<0,05$), а також ЧСС на 24% ($P<0,05$).

Таблиця 3.4.

Зміна показників насосної функції серця у щурів при введенні їм доксорубіцину (15 мг/кг) та флокаліну (12,5 мг/кг), ($M\pm m$).

Показники	Контроль	Дія доксорубіцину 15 мг/кг	Дія доксорубіцину 15 мг/кг і флокаліну 12,5 мг/кг
Ударний об'єм, мкл	84,3±13	89,6±12,6	80,2±12,3
Фракція викиду, %	40,6±5,9	29,6±3,5*	36,2±2,1 [#]
Хвилиний об'єм крові, мкл*хв	34343,8±1209,7	27964,1±1904,2*	28831,9±1987,9
Ударна робота, мм.рт.ст*мкл	8430,4±525,8	7200,2±648,2*	8700,3±602,9 ^{##}
ЧСС, уд/хв	407,4±12,8	312,1±13,8*	359,5±12,8 [#]

* $P<0,05$ відносно значень контрольної групи; [#] $P<0,05$, ^{##} $P<0,01$ відносно значень групи щурів після введення доксорубіцину

Отже, у щурів після введення доксорубіцину зменшувалась ефективність роботи серцевого м'яза під час кожного удару, що може призводити до перевантаження ЛШ об'ємом та застійних явищ у малому та великому колах кровообігу. Якщо врахувати значне зниження ЧСС, то стає зрозумілим, що внаслідок зменшення ХОК (серцевого викиду) серце щурів після введення доксорубіцину перекачувало достовірно менший об'єм крові порівняно з контролем, що з одного боку, додатково може спричиняти розвиток застійних явищ та збільшувати переднавантаження на ЛШ, а з іншого

– свідчити про неспроможність міокарда через первинне його ураження доксорубіцином компенсувати збільшення об'єму ЛШ підвищенням частоти (ритмо-інотропна залежність) та сили (закон Франка-Старлінга) серцевих скорочень.

У щурів після сумісного введення доксорубіцину та флокаліну спостерігалось достовірне збільшення ФВ на 22% ($P < 0,05$) та УР на 21% ($P < 0,05$) на тлі підвищення ЧСС на 15% ($P < 0,05$) та зменшення УО на 10%, що свідчило про збільшення ефективності роботи серця та відсутність перевантаження об'ємом ЛШ порівняно з щурами, ураженими доксорубіцином (див. табл. 3.4, рис. 3.14).

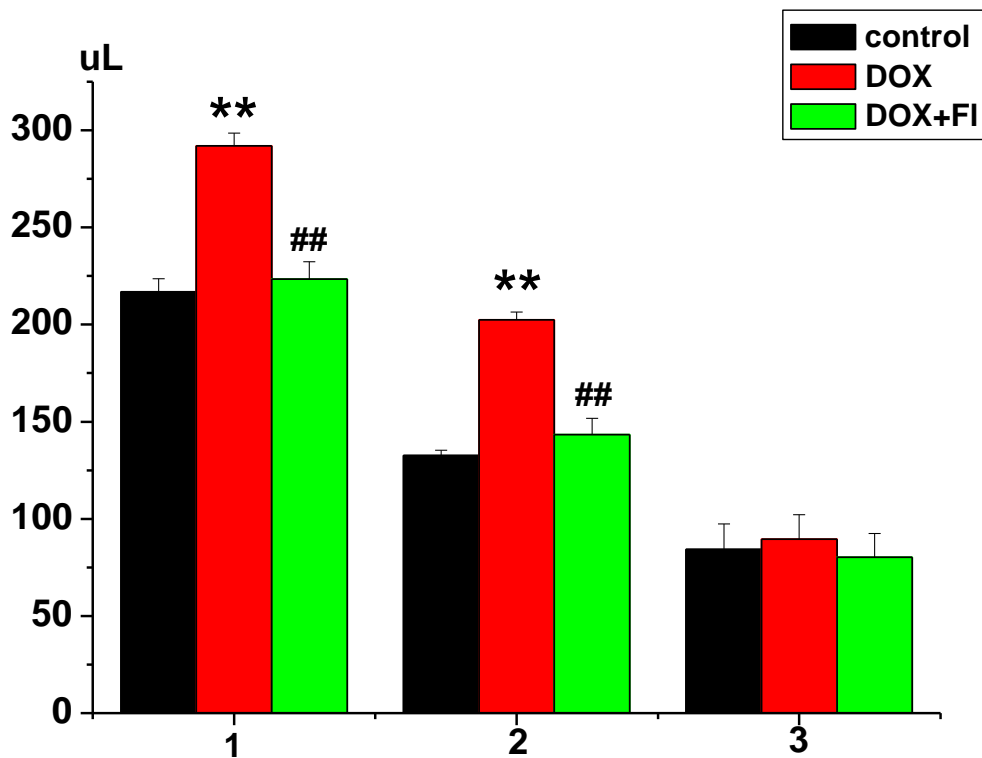


Рис. 3.14. Зміна об'ємів ЛШ під дією доксорубіцину (15 мг/кг) та флокаліну (12,5 мг/кг): 1 – КДО, 2 – КСО, 3 – УО. ** $P < 0,01$ відносно значень контрольної групи; ## $P < 0,01$ відносно значень групи щурів після введення доксорубіцину

Погіршення насосної функції серця у щурів після введення доксорубіцину є наслідком порушення обміну Ca^{2+} , енергетичної дисфункції та пошкодження мітохондріально-міофібрилярної ультраструктури

кардіоміоцитів з розвитком некрозу та апоптозу клітин, що призводило до структурної деформації камер серця: показано значне збільшення кінцево-діастолічного об'єму (КДО) на 35% ($P < 0,01$) та кінцево-систоличного об'єму (КСО) на 53% ($P < 0,01$) ЛШ. Активація K_{ATP} -каналів на тлі введення доксорубіцину попереджала розвиток дилатації ЛШ, а саме: КДО зменшився на 24% ($P < 0,05$), а КСО на 30% ($P < 0,05$) порівняно з щурами після введення тільки доксорубіцину (див. рис. 3.14, табл. 3.5, табл. 3.6).

3.6.2. Дослідження систолічної функції ЛШ

Збільшення переднавантаження на ЛШ та дилатація камер серця після введення доксорубіцину призводили до зміни показників систолічної функції ЛШ порівняно з контролем (табл. 3.5).

Таблиця 3.5.

Зміна показників систолічної функції серця у щурів при введенні їм доксорубіцину (15 мг/кг) та флокаліну (12,5 мг/кг), ($M \pm m$).

Показники	Контроль	Дія доксорубіцину 15 мг/кг	Дія доксорубіцину 15 мг/кг і флокаліну 12,5 мг/кг
dP/dt_{max} , мм.рт.ст/сек	14447,8±1038,9	8270,4±641,6**	11106,4±1276,5 [#]
Максимальний тиск, мм.рт.ст.	136,4±2,9	91,4±2,2**	120,3±4,4 [#]
Кінцевий систоличний тиск, мм.рт.ст.	110,2±3,9	85,5±2,4**	114,4±5,2 ^{##}
Кінцевий систоличний об'єм, мкл	132,6±2,7	202,4±4,1**	143,3±8,5 ^{##}
Артеріальна жорсткість, мм.рт.ст/мкл	1,3±0,1	1,1±0,1	1,28±0,2

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ відносно значень контрольної групи; [#] $P < 0,05$, ^{##} $P < 0,01$ відносно значень групи щурів після введення доксорубіцину

З'ясовано, що швидкість ізвольюмічного напруження dp/dt_{max} була достовірно менша на 43% ($P<0,01$), а максимальний тиск вигнання та кінцево-сistolічний тиск (КСТ) зменшувались на 33% ($P<0,01$) та 23% ($P<0,01$) відповідно (див. табл. 3.5, рис. 3.15), що вказує на виснаження компенсаторних механізмів кардіоміоцитів та прогресування серцевої недостатності.

Водночас ми не спостерігали суттєвих змін значень артеріальної жорсткості (див. табл. 3.5). Ефективна артеріальна жорсткість – це збірне поняття, запропоноване Sunagawa у 1985, містить у собі такі основні елементи судинного навантаження, як загальний периферичний опір судин, піддатливість судин, тривалість систоли та діастолі. Отже, неспроможність ЛШ, ушкодженого доксорубіцином, більшою мірою була зумовлена первинним структурним ураженням міокарда і, як наслідок, переднавантаженням та фактично не залежила від післянавантаження.

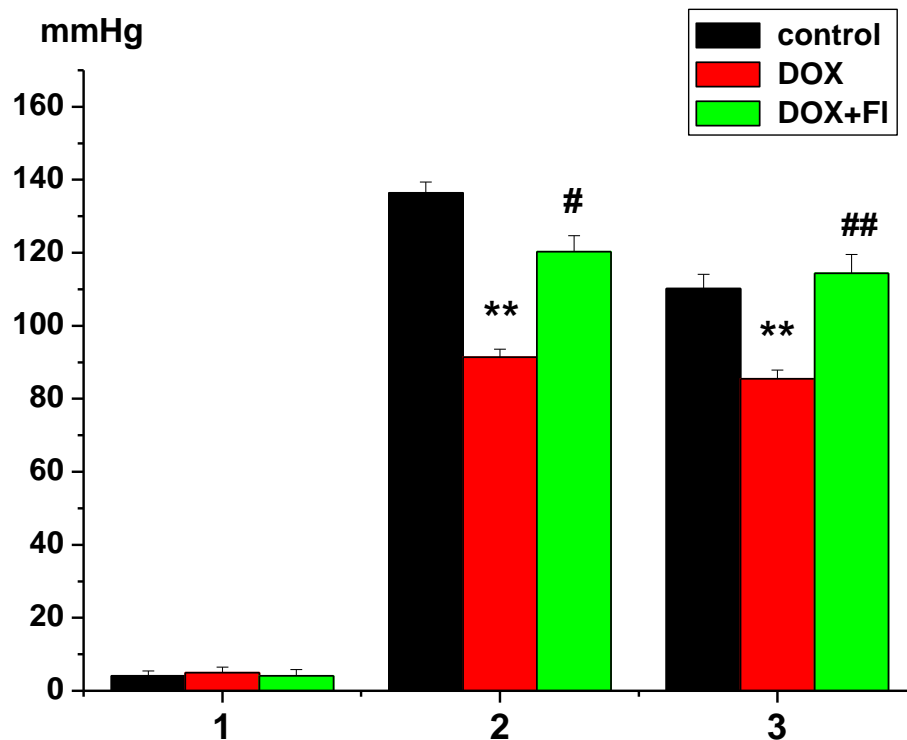


Рис. 3.15. Зміна тисків ЛШ під дією доксорубіцину (15 мг/кг) та флокаліну (12,5 мг/кг): 1 – КДТ, 2 – максимальний тиск вигнання, 3 – КСТ. * $P<0,05$, ** $P<0,01$ відносно значень контрольної групи; # $P<0,05$, ## $P<0,01$ відносно значень групи щурів після введення доксорубіцину

У групі щурів після сумісного введення доксорубіцину та флокаліну спостерігалася достовірно краща систолічна функція порівняно з групою після введення лише доксорубіцину, а саме: збільшення dP/dt_{max} на 34% ($P<0,05$), максимального тиску вигнання та КСТ на 32% ($P<0,05$) та 34% ($P<0,01$) відповідно (див. табл. 3.5, рис. 3.15).

3.6.3. Дослідження діастолічної функції ЛШ

Діастола ЛШ складається з низки гемодинамічних подій, першою з яких є розслаблення – активний енергозалежний процес, що зумовлює швидке зниження тиску в ЛШ після закінчення його скорочення. Виявлено, що у щурів після введення доксорубіцину була незначно порушена функція розслаблення ЛШ. Про це свідчить недостовірне зниження швидкості ізвольомічного розслаблення dP/dt_{min} на 8%, проте ізвольомічна константа розслаблення τ_w збільшилася достовірно на 44%, що опосередковано підтверджує зростання переднавантаження на ЛШ (див. табл. 3.6).

Таблиця 3.6.

Зміна показників діастолічної функції серця у щурів при введенні їм доксорубіцину (15 мг/кг) та флокаліну (12,5 мг/кг), ($M\pm m$).

Показники	Контроль	Дія доксорубіцину 15 мг/кг	Дія доксорубіцину 15 мг/кг і флокаліну 12,5 мг/кг
dP/dt_{min} , мм.рт.ст/сек	-6553,1±360,3	-6062,6±337	-6715±274,8 [#]
τ_w , мсек	8,1±0,8	11,7±0,9*	10,1±1,1 [#]
Кінцевий діастолічний тиск, мм.рт.ст.	4,1±1,4	5,0±1,5	4,1±1,7
Кінцевий діастолічний об'єм, мкл	216,9±6,7	292±6,5**	223,5±8,9 [#]

* $P<0,05$, ** $P<0,01$ відносно значень контрольної групи; [#] $P<0,05$, ^{##} $P<0,01$ відносно значень групи щурів після введення доксорубіцину

Крім належної кардіоміоцитам здатності до розслаблення, на діастолічну функцію серця впливає також геометрія та властивості порожнини ЛШ, які відіграють суттєву роль під час другої фази діастолі – наповнення: КДО за дії доксорубіцину значно збільшувався на 35%, проте КДТ достовірно не відрізнявся від контрольного (див. табл. 3.6, рис. 3.14, 3.15). Величина тиску ЛШ визначається характером (об'ємом) наповнення та пасивними властивостями стінок ЛШ (ступінь фіброзу), але також може бути модульована неповним розслабленням міокарда та варіабельністю його тону. Отже, оцінюючи співвідношення показників діастолічного об'єму та тиску за дії доксорубіцину, можна говорити саме про дилатацію ЛШ.

Таким чином, внутрішньоочеревинне введення щурам доксорубіцину у дозі 15 мг/кг індукувало розвиток гострої токсичної дилатаційної кардіоміопатії та призводило до порушення насосної, систолічної, частково – діастолічної функції серця. Сумісна з доксорубіцином активація АТФ-чутливих калієвих каналів флокаліном у дозі 12,5 мг/кг запобігала розвитку насосної та систоло-діастолічної дисфункції ЛШ.

3.7. Вплив доксорубіцину та активатора K_{ATP} -каналів на ультраструктурні зміни в кардіоміоцитах щурів

Доксорубіциніндуковане пошкодження серцевого м'яза з порушенням його структури та функції визначається як серцева дисфункція 1-го типу, що пов'язана з хіміотерапією та характеризується ультраструктурними змінами міокарда зі значною тенденцією до незворотності (Ewer et al., 2005). Оскільки доксорубіцин накопичується переважно в мітохондріях і ядрах, велика кількість мітохондрій саме у міокарді на тлі менш активної антиоксидантної мережі порівняно, наприклад, із печінкою, може пояснювати кардіоселективну токсичність препарату (Doroshov et al., 1980; Kaiserova et al., 2022). Мітохондріальна токсичність доксорубіцину пов'язана з індукцією апоптозу та некрозу кардіоміоцитів, що може сприяти розвитку кардіоміопатії

(Jing et al., 2018; Zhao et al., 2017; Bennink et al., 2004), тому ступінь ураження міокарда лівого шлуночка (ЛШ) є основною детермінантою несприятливих наслідків, а попередження цих порушень – ключовою терапевтичною метою (Alan et al., 2016). Замісний фіброз, або вогнищеве рубцювання, якому передують пошкодження міоцитів, виникає приблизно у третини пацієнтів, лікованих доксорубіцином (Masci et al., 2013). Наслідком є скоротлива неспроможність міокарда через витончення та дилатацію стінок ЛШ (Leeuw et al., 2001). Перебіг захворювання погіршує поява недостатності клапанів (Alan et al., 2016), злякисні шлуночкові аритмії (Ples et al., 2011; Leyva et al., 2012; Gulati et al., 2013), плеврит, периферичні набряки, гепатоспленомегалія, утворення тромбів (Ciarambino et al., 2021; Elliot et al., 2017). Досі не існує специфічного лікування доксорубіциніндукованої кардіоміопатії, і, як правило, ця патологія погано піддається симптоматичній терапії. Єдиним ефективним методом лікування пізньої серцевої недостатності на термінальній стадії залишається трансплантація серця (Stehlik et al., 2011; Oliveira et al., 2014). Раннє виявлення та лікування субклінічних серцево-судинних змін протягом першого року після протипухлинної терапії може призвести до цілковитого або часткового відновлення серцевої функції (Cardinale et al., 2015, 2020). Але не менш важливим, на наш погляд, є попередження розвитку пошкодження міокарда ще на етапі лікування доксорубіцином. Аденозинтрифосфатчутливі калієві канали представляють один з найважливіших ендогенних механізмів регуляції життєво важливих процесів, в т.ч. кардіопротекції (Moïbenko et al., 2008). Раніше була показана значуща роль K_{ATP} -каналів у коронарній вазодилатації під час гіпоксії та ішемії (Aversano et al., 1991; Komaru et al., 1991), їх екзогенна активація в експериментах справляла потужний антигіпоксичний та мембранопротекторний ефекти (Strutynskyi, 2010), у тому числі на тлі пошкоджуючої дії доксорубіцину (Denysova et al., 2024).

Отже, наступним завданням нашого дослідження було визначити вплив активації K_{ATP} -каналів на ультраструктурний апарат кардіоміоцитів на прикладі гострого доксорубіциніндукованого пошкодження міокарда.

У препаратах визначали загальну кількість мітохондрій (субсарколемальних та інтраміофібрилярних), кількість структурно пошкоджених мітохондрій, а також їх діаметр (табл. 3.7).

Таблиця 3.7.

Ступінь пошкодження мітохондріального апарату кардіоміоцитів у щурів при введенні їм доксорубіцину (15 мг/кг) та флокаліну (12,5 мг/кг) ($M \pm m$).

Схема експерименту	Загальна кількість мітохондрій, од./10 мкм ²		Кількість структурно пошкоджених мітохондрій, %		Діаметр мітохондрій, мкм	
	суб-сарколемальні	інтра-міофібрилярні	суб-сарколемальні	інтра-міофібрилярні	суб-сарколемальні	інтра-міофібрилярні
Контроль	23,5±3,6	19,2±1,3	3,1±0,5	2,2±0,4	0,48±0,04	0,64±0,05
Доксорубіцин 15 мг/кг	18,3±1,8*	15,7±2,0*	8,5±1,4**	9,4±1,8**	0,62±0,07*	0,75±0,05*
Доксорубіцин 15 мг/кг + флокалін 12,5 мг/кг	25,6±2,1#	20,8±2,3#	7,4±1,8#	8,3±2,0#	0,58±0,05	0,70±0,08

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ відносно значень контрольних тварин; # $P < 0,05$ відносно значень тварин після введення доксорубіцину

У кардіоміоцитах, пошкоджених доксорубіцином, спостерігалися суттєві зміни ультраструктури порівняно з контролем. Значно зменшилась на 22% та 18% (у 1,3 та 1,2 рази, $P < 0,05$) загальна кількість субсарколемальних та інтраміофібрилярних мітохондрій відповідно та водночас збільшилася кількість структурно пошкоджених мітохондрій у 2,7 та 4,3 рази в обох популяціях відповідно ($P < 0,01$) (див. табл. 3.7). Пошкоджені мітохондрії мали вигляд повністю вакуолізованих, збільшених у діаметрі структур, інколи – у

вигляді апоптотичних тілець. Відомо, що доксорубіцин по-різному впливає на субсарколемальні та інтраміофібрилярні мітохондрії кардіоміоцитів, причому останні піддаються більшому впливу, що виявляється за допомогою коефіцієнта дихального контролю (Kavazis et al., 2017). Вважають, що інтраміофібрилярні мітохондрії більшою мірою задіяні у процесах метаболізму креатинфосфату.

Також після введення доксорубіцину порівняно з контролем спостерігалися виражені ознаки мітохондріальної дисфункції у вигляді набухання, вакуолізації, дисконкомплексації крист та активації аутофагії органел (рис. 3.16, рис. 3.17), що можна розглядати як факт утилізації структурно пошкоджених органел і перешкоджання надмірної активації мітохондріями апоптозу (Rozova et al., 2019).

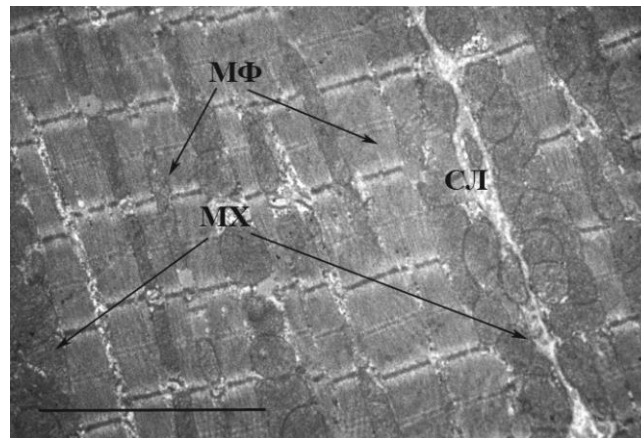


Рис. 3.16. Міокард контрольного щура. MX – мітохондрії, MF – міофібрили, SL – сарколема. Масштаб – 1 мкм.

Відомо, що аутофагія являє собою найбільш поширений механізм оновлення клітинних компонентів і значно посилюється при патологічних станах, таких як кардіоміопатія та гіпертрофія міокарда (Zhang et al., 2009). Ймовірно, що зазначені мітохондріальні порушення, спричинені доксорубіцином, задіяні не тільки як первинна подія, але також як наслідок порушення процесів елімінації пошкоджених структур, що призводить до загибелі кардіоміоцитів (Wallace et al., 2020). Мітохондрії функціонують на перехресті аутофагічних, апоптотичних та некротичних шляхів, оскільки білки

Bax/Bak беруть участь як в апоптозі, так і в некрозі на рівні зовнішньої мітохондріальної мембрани (Karch et al., 2013; Wei et al., 2001; Whelan et al., 2012). За умов легкого стресу індукується аутофагія, спрямована на переробку цитоплазматичних компонентів. Зі збільшенням стресу через вивільнення цитохрому *c* відбувається апоптоз. При екстремальному стресі відкривається МП, відбувається виснаження АТФ та настає некроз (Zhu et al., 2018).

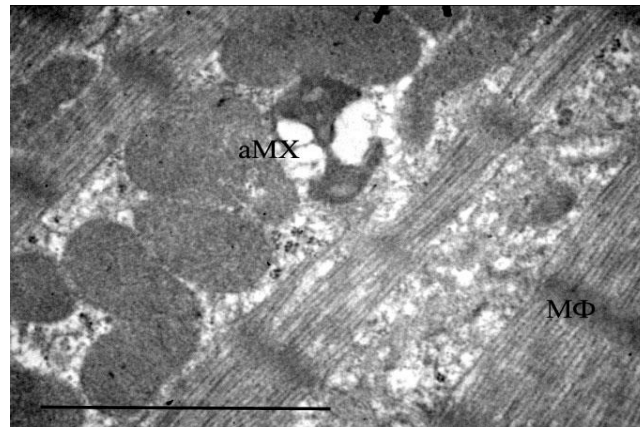


Рис. 3.17. Набухання, вакуолізація та активація аутофагії мітохондрій (aMX); розволокнення, вакуолярна дегенерація та набряк міофібрилярного апарату (MF) при дії доксорубіцину (15 мг/кг). Масштаб – 1 мкм.

Також після введення доксорубіцину визначалися вакуолярна дегенерація, набряк та розволокнення міофібрил (див. рис. 3.17, рис. 3.18), деструкція сарколеми з утворенням крайових випинань, у які переміщувалися субсарколемальні мітохондрії – така перебудова сарколеми спричиняє обмеження дифузії кисню з крові капілярів до мітохондрій, що свідчить про розвиток під дією доксорубіцину гіпоксії міокарда. З боку ендотелію спостерігалися ділянки активації піноцитозу або тотального набряку цитоплазматичних вуалей ендотеліальних клітин, часто з розходженням їх країв і утворенням щілин, що також вказує на наявність вторинної тканинної гіпоксії. Ядра пошкоджених кардіоміоцитів демонстрували різний ступінь дезорганізації хроматину. Слід відмітити появу вільних рибосом, місцями зібраних у розетки (полісоми), що вказує на їх активність (див. рис. 3.18).

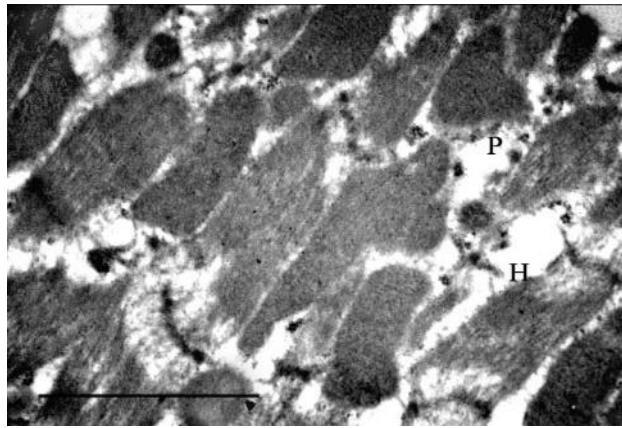


Рис. 3.18. Утворення набрякових вогнищ (Н) на місці міофібрил, поява вільних рибосом (Р) при дії доксорубіцину. Масштаб – 1 мкм.

Таким чином, дія доксорубіцину призводила до пошкодження мітохондрій, міофібрил, розриву міжклітинних зв'язків та загибелі клітини. Важливо, що структурні зміни в серцевій тканині виявляються значно раніше клінічних проявів серцевої недостатності. Ця очевидна невідповідність між функціональними та структурними порушеннями може відображати часову затримку між утворенням тканинних змін та розвитком клінічної серцевої недостатності (O'Connell et al., 2016).

Активатор K_{ATP} -каналів флокалін має потужні антигіпоксичні та кардіопротекторні властивості, здатен впливати на вираженість оксидативного стресу (Strutynskyi, 2023; Aversano et al., 1991). Отже, було проведене порівняльне ультраструктурне дослідження тканини міокарда після застосування препарату на тлі пошкоджуючої дії доксорубіцину.

Показано, що загальна кількість мітохондрій після введення флокаліну на тлі дії доксорубіцину достовірно збільшувалася порівняно з такою не тільки після ушкодження доксорубіцином, а й перевищувала контрольне значення на 9%, що свідчить про активацію мітохондріального біогенезу (див. табл. 3.7). При цьому на 13% зменшувалась кількість вакуолізованих та структурно змінених органел (у 1,1 раза в обох популяціях, $P < 0,05$), залишаючись все ж більшою, ніж у контрольному міокарді (див. табл. 3.7). Однак зміни носили компенсаторно-приспосувальний характер, а саме: розширення та

просвітлення міжкристних проміжків, що може свідчити про активацію синтезу макроергів, повздовжна асоціація органел, що вважається ознакою інтенсифікації синтезу АТФ та активація процесів fission-fusion мітохондрій (Rozova, 2019), що свідчить про посилення динаміки органел, котра була значно зменшена при дії доксорубіцину (рис. 3.19). Слід відмітити незначне, у вигляді тенденції, зростання порівняно з контролем діаметра мітохондрій, що вказує на зростання синтезу АТФ із залученням АТФ-чутливих K^+ -каналів (Mironova et al., 2004; 2018).

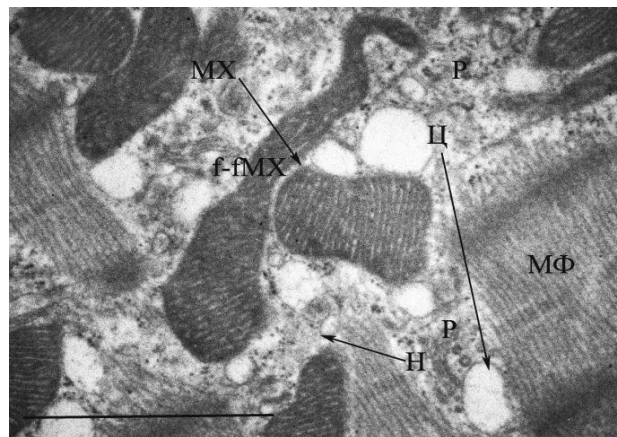


Рис. 3.19. Ознаки компенсаторно-приспосувальних процесів під впливом флокаліну (12,5 мг/кг) у мітохондріях, ушкоджених доксорубіцином (15 мг/кг), процеси fission-fusion мітохондрій, розширення цистерн ЕР, зростання кількості рибосом; МФ – міофібрили, МХ – мітохондрії, Р – рибосоми, Н – набряк, Ц – цистерни ЕР, f-f МХ – динаміка мітохондрій. Масштаб – 1 мкм.

Було виявлено значне розширення цистерн ендоплазматичного ретикулуму (ЕР) та збільшення їх кількості (див. рис. 3.19), ймовірно, через зміни обміну кальцію за умов експерименту. Також звертає на себе увагу зростання кількості рибосом та полісом, особливо в ділянках набряку (див. рис. 3.19), що вказує на компенсаторну активацію синтезу білка. Відмічається покращений стан міофібрил, проте помітні ділянки з їх вираженим набряком, розволокненням та деструктивними змінами (див. рис. 3.19, рис. 3.20), а також ділянки перескорочення міофібрил, що вказує на підвищене навантаження на

міокард. Але кількість таких ділянок значно зменшилась порівняно з міокардом, ураженим доксорубіцином.

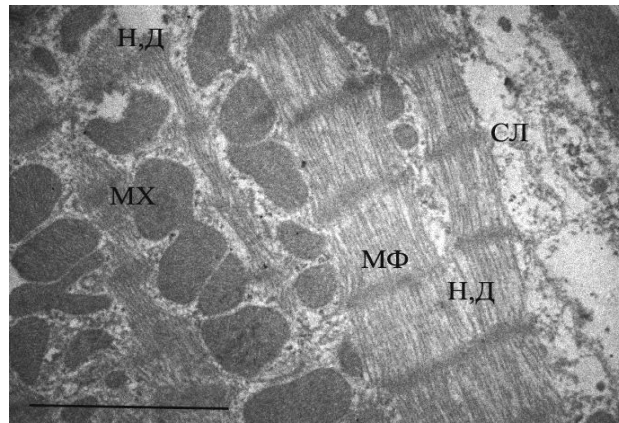


Рис. 3.20. Покращення стану міофібрил при сумісній дії доксорубіцину (15 мг/кг) та флокаліну (12,5 мг/кг). МФ – міофібрили, МХ – мітохондрії, Н, Д – набряк, деструкція, СЛ – сарколема. Масштаб – 1 мкм.

Однак, слід звернути увагу на ймовірне збереження структурного компонента сарколемальної дисфункції та тканинної гіпоксії, свідченням чого є наявність війкоподібних утворень з боку сарколеми, що, як зазначалося вище, обмежує дифузію кисню з крові капілярів до кисеньспоживаючих органел. Але значна кількість війкоподібних утворень не містила мітохондрій, а була лише ознакою набряку сарколеми (рис. 3.21).

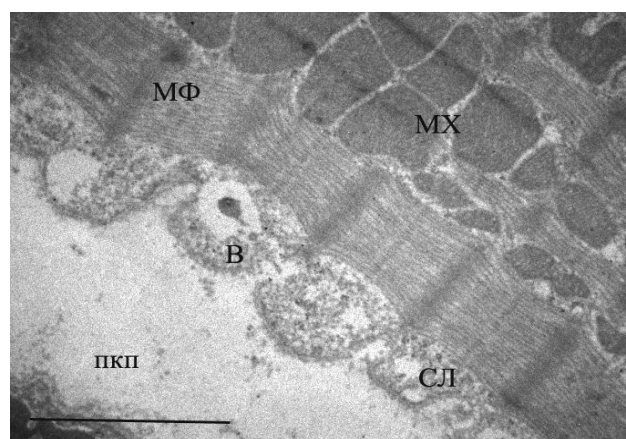


Рис. 3.21. Війкоподібні утворення як ознака збереження тканинної гіпоксії після введення флокаліну (12,5 мг/кг) на тлі дії доксорубіцину (15 мг/кг). МХ – мітохондрії, МФ – міофібрили, В – війкоподібні утворення, СЛ – сарколема, пкп – перикапілярний простір. Масштаб – 1 мкм.

Після активації K_{ATP} -чутливих каналів сумісно з введенням доксорубіцину у міокарді щурів не виявлялося структурного компоненту ендотеліальної дисфункції, а саме гіпергідратації та ознак деструкції (рис. 3.22).

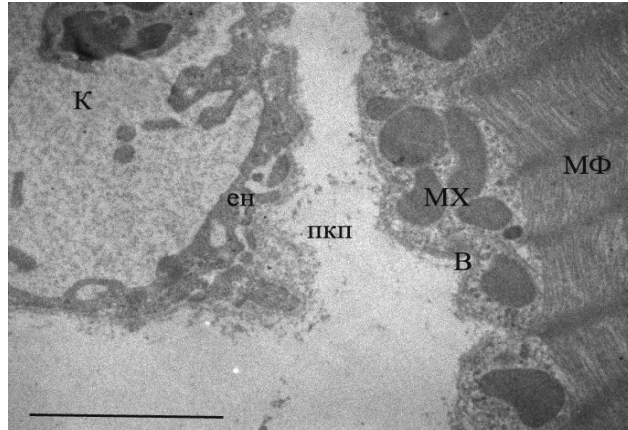


Рис. 3.22. Стан ендотелію без ознак деструкції після введення флокаліну (12,5 мг/кг) на тлі дії доксорубіцину (15 мг/кг). К – капіляр, ен – ендотелій, пкп – перикапілярний простір, МХ – мітохондрії, МФ – міофібрили, В – вейкоподібні утворення. Масштаб – 1 мкм.

Таким чином, проведено дослідження впливу активатора K_{ATP} -каналів на ультраструктуру міокарда, пошкодженого доксорубіцином, виявило суттєві позитивні зміни, які мали компенсаторно-приспосувальні ознаки щодо енергообміну, обміну кальцію та структури міофібрилярного апарата.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Антрацикліни – потужні цитотоксичні антибіотики з широкою сферою клінічного застосування як протипухлинних засобів (Octavia et al., 2012; Henriksen et al., 2018; Wallace et al., 2020). Одним із найбільш ефективних є доксорубіцин, який застосовують в сучасній онкогематологічній практиці для лікування гемобластозів, лімфопроліферативних захворювань і злоякісних новоутворень різних локалізацій (рак щитоподібної залози, сечового міхура, молочних залоз). Специфічний механізм протипухлинної дії препарату зумовлений, насамперед, здатністю інгібувати топоізомеразу II (Tarr et al., 1990) і порушувати синтез нуклеїнових кислот через взаємодію з молекулою ДНК, змінюючи її молекулярну структуру, процеси реплікації та транскрипції (Pang et al., 2013). Разом з високою протипухлинною активністю, доксорубіцину притаманна низка побічних ефектів (пригнічення гемопоезу, ушкодження травного тракту та легень), але найбільша небезпека – ушкодження серця, що має дозозалежний, прогресуючий та потенційно летальний характер (Chatterjee et al., 2010). Розвиток кардіоміопатії, яка буває настільки серйозною, що потребує припинення лікування ще до досягнення оптимального результату, є головним лімітуючим фактором проведення адекватної цитостатичної терапії (Cardinale et al., 2020; Angsutararux et al., 2015). Частота виникнення у пацієнтів доксорубіциніндукованої кардіоміопатії може сягати 36-48% в залежності від отриманої дози препарату, а рівень смертності від неї – понад 50% (Wallace et al., 2020). Серед усіх вікових категорій найбільш чутливими до кардіотоксичної дії доксорубіцину є діти (Volkova and Russell, 2011). Доксорубіцин накопичується у мітохондріях у концентраціях, значно вищих, ніж у плазмі, отже мітохондрії вважаються основною мішенню доксорубіцину, а мітохондріальна дисфункція є ознакою кардіотоксичності препарату та лежить в основі доксорубіциніндукованого ураження серця (Wu et al., 2022).

Важливим механізмом мітотоксичної дії доксорубіцину є індукція мітохондріальної пори транзиторної провідності (МП), відкриття якої може запускати загибель клітини (Wallace et al., 2020). Доксорубіцин індукує порушення кальцієвого гомеостазу, а чутливість МП до цього індуктора може бути значно посилена оксидативним стресом і виснаженням АТФ (Sagach et al., 2004; Halestrap et al., 2004). Відновлення препарату до напівхінону для переходу в активний стан відбувається у дихальному ланцюгу, за участю матричних ферментів, під час реакції з іонами заліза, а також в редуктазному домені cNOS, результатом чого є генерація вільних радикалів (Angsutararux et al., 2015), спостерігається неспряжений стан cNOS та збільшується утворення ONOO⁻. Ці фактори роблять внутрішню мембрану мітохондрій різко проникною для всіх розчинених речовин з молекулярною масою до 1,5 кДа. З іншого боку, утворені в мітохондріях активні форми кисню (АФК), вільне залізо та ONOO⁻ реагують з мембранними фосfolіпідами, утворюючи токсичні продукти перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) з наступною зміною проникності мембрани та руйнацією клітин (Fujita, 2002), що супроводжується вивільненням внутрішньоклітинних ензимів у кров (Hrelia, 2002). Перевантаження мітохондрій йонами кальцію, гіперпродукція ними АФК, дефіцит АТФ та руйнування клітинних мембран мають вирішальне значення при кардіоміопатіях і лежать в основі розвитку патології серцево-судинної системи (Campos et al., 2016). Водночас існують ендогенні механізми захисту у відповідь на ці метаболічні зміни (Moibenko et al., 2008). Одним із таких є система АТФ-чутливих калієвих каналів цитоплазматичних і мітохондріальних мембран. Їх вважають центральним метаболічним сенсором щодо енергозабезпечення (Агорова et al., 2001), при цьому відкриття каналів запускає механізми захисту від пошкодження і загибелі клітин при дії патологічних чинників (Olson et al., 2010). З метою вивчення механізмів попередження розвитку доксорубіциніндукованої кардіоміопатії був застосований фармакологічний активатор K_{АТФ}-каналів флокалін. У роботі

особлива увага приділена патогенетичним механізмам впливу доксорубіцину та флокаліну на мітохондріальний апарат кардіоміоцитів.

Для з'ясування механізмів, що є підґрунтям кардіотоксичної дії доксорубіцину, проведено дослідження біохімічних параметрів, критичних для метаболізму і функціонування мітохондрій. Виявлено, що дія доксорубіцину призводить до зменшення у 2,6 раза вмісту ендogenous сірководню (H_2S). Встановлено, що введення доксорубіцину також значно збільшує швидкість утворення нестабільних форм кисню, а саме $\bullet O_2^-$, $\bullet OH$ та вміст H_2O_2 у 10,5, 3,4 та 5,3 раза відповідно. Кальційзалежний *de novo* синтез NO пригнічується у 4,8 раза, а активність iNOS зростає у 3,7 раза, що свідчить про неспряжений стан фермента. Показано, що за дії доксорубіцину ці фактори призводять до посилення Ca^{2+} -індукованого набухання суспензії мітохондрій у 1,5 разів, а також до збільшення на два порядки чутливості МП до Ca^{2+} . Це свідчить про збільшення неспецифічної провідності мітохондріальних мембран у серцевих мітохондріях та ймовірність індукції клітинної смерті. Вперше встановлено, що в умовах сумісного введення доксорубіцину та флокаліну швидкість генерації $\bullet O_2^-$ та $\bullet OH$, вміст H_2O_2 та активність iNOS зменшуються у 4, 1,6, 4,6 та 1,7 раза відповідно порівняно з показниками щурів, ушкоджених доксорубіцином. Виявлено, що вміст H_2S та активність sNOS залишаються близько до контрольних значень. Продемонстровано, що амплітуда набухання мітохондрій серця щурів та чутливість МП кардіоміоцитів до кальцію після впливу флокаліну на тлі дії доксорубіцину практично не відрізняються від таких у контрольних тварин. В основі механізму мітопротекторної дії, що забезпечується відкриванням мітохондріальних K_{ATP} -каналів, лежить вхід йонів калію, деполяризація внутрішньої мембрани мітохондрій, зміни процесів окисного фосфорилування, зменшення надходження Ca^{2+} та попередження відкривання МП (Nichols et al., 2006; Olson et al., 2010; Strutynska et al., 2022). Запобігання порушенню конститутивного синтезу NOS, ймовірно, відбувається через зменшення утворення $\bullet O_2^-$ внаслідок пригнічення флокаліном активності

ксантинооксидази та гемоксигенази, а також через відновлення метаболізму аргініну (Strutynskyi et al., 2018). Показано, що доксорубіцин збільшує вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) – дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду (ДК та МДА) – у мітохондріях серця щурів у 4,1 та 2,5 рази відповідно, що супроводжується пошкодженням мембран кардіоміоцитів, вивільненням глюкози та збільшенням активності внутрішньоклітинних ферментів в плазмі крові щурів, а саме: АЛТ, АСТ та КФК МБ у 2, 1,6 та 1,5 рази відповідно. У клініці підвищення активностей цих показників у плазмі крові вважається раннім маркером пошкодження міокарда. Як було зазначено вище, активація K_{ATP} -каналів на тлі дії доксорубіцину сприяє зменшенню швидкості утворення АФК у мітохондріях, і, як наслідок, зменшує у 3,5 й 1,6 рази вміст ДК та МДА відповідно, демонструючи потужний мембранопротекторний ефект, що підтверджується меншою у 1,3, 1,4 й 1,2 рази активністю АЛТ, АСТ й КФК МБ відповідно та нижчою у 1,2 рази концентрацією глюкози у плазмі щурів.

На ЕКГ щурів після введення доксорубіцину продемонстровано сповільнення ЧСС, а також погіршення провідності міокарда у вигляді подовженого вдвічі інтервалу QT (QTc). Збільшення інтервалу QT (QTc) внаслідок прийому доксорубіцину, що зумовлене подовженням потенціалу дії кардіоміоцитів шлуночків через підвищення активності Ca^{2+} -каналів L-типу (Keung et al., 1991), є величезною проблемою в онкології (Roden et al., 2019; Duan et al., 2018), корелює з тяжкістю гістологічного ураження серця та може бути фактором ризику раптової серцевої смерті (Cirillo et al., 2000; Chan et al., 2009). На ЕКГ дослідних щурів виявлено виражену елевацію сегмента ST (до 0,45 мВ в окремих випадках) – як ознаку ішемії серцевого м'яза. Причинами такої патологічної зміни може бути дисфункція кровопостачання міокарда через доксорубіциніндуковані порушення механізмів як розслаблення, так і скорочення артеріальних судин. На ізольованих судинних кільцях аорти щурів після введення доксорубіцину продемонстрована значна ендотеліальна дисфункція, яка проявляється зменшенням у 2,4 рази скорочення, а також

релаксації у 1,8 раза у відповідь на дію норадреналіну та ацетилхоліну відповідно, що свідчить про судиннотоксичну дію препарату, спричинену вільними радикалами – продуктами відновлення адріаміцину. Ці речовини негативно впливають на мембрани ендотеліоцитів та ініціюють апоптоз (Zhao et al., 2001; Cotgreave et al., 1998; Hyslop et al., 1988). Пригнічення процесів вазодилатації також може свідчити про порушення у системі оксиду азоту, який є потужним механізмом релаксації судин (Olukman et al., 2009). Також відомо, що в ішемічні зміни міокарда без ознак атеросклеротичного ураження вінцевих судин у щурів після введення доксорубіцину може бути задієний сигнальний шлях ендотеліну-1 (ET-1): експресія вазоконстриктора ET-1 та його рецепторів була підвищена у міокарді пацієнтів, що отримували доксорубіцин (Sayed-Ahmed et al., 2001). У дослідженні вперше з'ясовано, що введення флокаліну сумісно з доксорубіцином попереджає хронотропну дисфункцію серця, утримуючи ЧСС на рівні контрольних значень, пришвидшує провідність через значне зменшення тривалості QT на 31,2 мс (29%), а QTc – на 18,7 мс (10%) відносно щурів після введення тільки доксорубіцину та попереджає порушення скорочення-розслаблення судин, відновлюючи кровопостачання міокарда ЛШ. Продемонстровано, що після введення флокаліну скорочувальні відповіді ізольованих кілець аорти щурів досягають значень контрольних тварин, а ендотелійзалежні вазодилаторні ефекти ацетилхоліну (0,1 мкмоль/л) за сумісної дії препаратів покращуються на 69% порівняно з щурами, ураженими доксорубіцином. Слід зауважити, що вазодилаторні ефекти активаторів калієвих каналів, зокрема фторвмісного, є досить потужними та дозозалежними навіть при патологічних станах, що супроводжуються значним порушенням системного артеріального тиску (Ryvovar et al., 2004). Механізмом, що лежить в основі вазодилаторних ефектів відкриття сарколемальних K_{ATP} -каналів, є гіперполяризація мембрани, зменшення періоду надходження Ca^{2+} в гладеньком'язову клітину в результаті вкорочення рефрактерного періоду, та зменшення тону судин. В розвитку вазодилаторних реакцій, ймовірно, можуть брати участь і

мітохондріальні K_{ATP} -канали, відкриття яких через низку сигнальних шляхів може призводити до відкриття K_{ATP} -каналів сарколемальної мембрани (Strutynskyi et al., 2019; Sanada et al., 2001; Ryvovar et al., 2004).

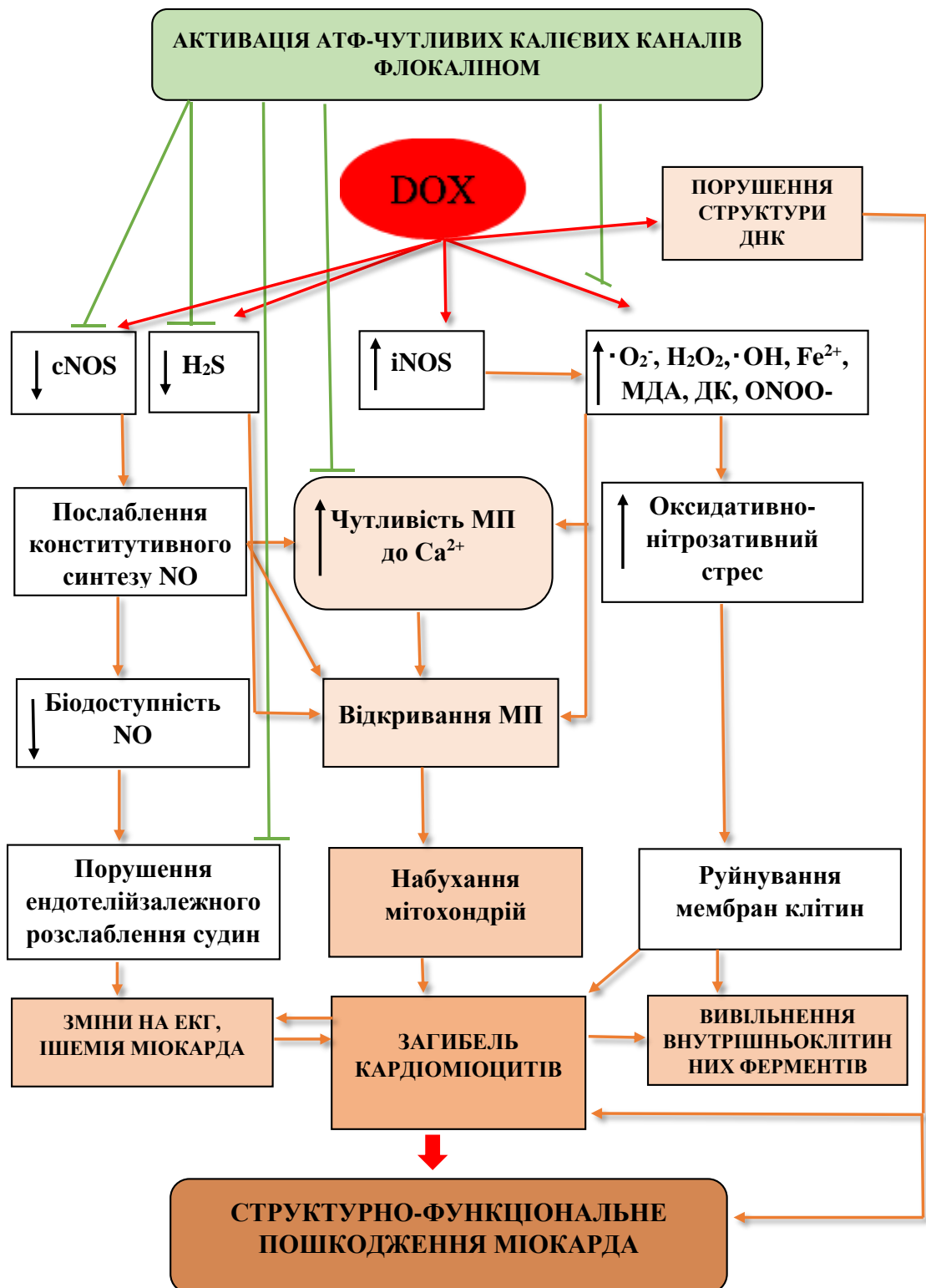
Після проведення кардіогемодинамічного дослідження *in vivo* виявлено, що у щурів після введення доксорубіцину зменшується ефективність роботи серцевого м'яза (зниження ФВ на 27%, ХОК – на 19%, УР – на 15%), що призводить до перевантаження ЛШ об'ємом, виснаження компенсаторних механізмів, суттєвого розширення камери ЛШ (збільшення КДО та КСО на 35% та 53% відповідно) та порушення його систолічної функції (зменшення dp/dt_{max} на 43%, P_{max} та КСТ на 33% та 23% відповідно) – такі зміни відповідають визначенню дилатаційної кардіоміопатії (Elliot et al., 2008) та свідчать про неспроможність міокарда через первинне його ураження доксорубіцином компенсувати збільшення об'єму ЛШ підвищенням частоти (ритмо-інотропна залежність) та сили (закон Франка-Старлінга) серцевих скорочень. Погіршення насосної функції серця у щурів при дії доксорубіцину є наслідком порушення обміну Ca^{2+} , енергетичної дисфункції та пошкодження мітохондріально-міофібрилярної ультраструктури кардіоміоцитів з розвитком апоптозу та некрозу клітин. Вперше показано, що активація K_{ATP} -каналів на тлі введення доксорубіцину попереджає порушення насосної та систолічної функції (спостерігали збільшення ФВ на 22%, УР – на 21%, зменшення КДО та КСО на 24% та 30% відповідно, збільшення dp/dt_{max} на 34%, P_{max} та КСТ – на 32% та 34% відповідно у порівнянні).

Після проведення ультраструктурного дослідження тканини міокарда методом електронної мікроскопії, виявлено, що гостра дія доксорубіцину призводить до пошкодження мітохондрій та міофібрил. Вперше показано, що введення флокаліну сумісно з доксорубіцином попереджає порушення мітобіогенезу та руйнування міофібрилярного апарату кардіоміоцитів щурів.

Результати, отримані у цьому дослідженні, свідчать про потенційні міто- та кардіопротекторні властивості флокаліну при гострому токсичному

ураженні міокарда доксорубіцином, що в подальшому може бути використане для медикаментозної корекції цієї патології.

Результати дослідження можуть бути представлені у вигляді схеми, яка характеризує механізми розвитку та попередження доксорубіциніндукованого пошкодження серця:



ВИСНОВКИ

Дисертація присвячена вирішенню наукової проблеми розвитку та попередження доксорубіциніндукованої кардіоміопатії. З цією метою проведено експериментальне дослідження механізмів розвитку даної патології, яку моделювали короткостроковим введенням щурам доксорубіцину у дозі 15 мг/кг. Продемонстровано спосіб попередження гострої токсичної кардіоміопатії фторвмісним активатором АТФ-чутливих калієвих каналів флокаліном, що був застосований у дозі 12,5 мг/кг спільно з доксорубіцином. Виявлено механізми мітохондріальної дисфункції, що лежать в основі розвитку експериментальної кардіоміопатії та є підґрунтям кардіотоксичної дії доксорубіцину, а також визначено роль $K_{\text{АТФ}}$ -каналів у процесах міто- та кардіопротекції за цієї патології. Відповідно до поставленої мети, сформульованих завдань та отриманих результатів, дійшли наступних висновків:

1. В умовах впливу доксорубіцину, у мітохондріях серця щурів суттєво збільшувалось у 5-10 разів утворення АФК й продуктів ПОЛ, пригнічувалась у 4,8 раза активність cNOS, зростала у 3,7 раза активність iNOS та зменшувався у 2,6 раза вміст ендogenous антиоксиданта H_2S , що свідчило про мітотоксичну дію препарату. В умовах застосування флокаліну разом з доксорубіцином спостерігали пригнічення у 4-5 раза оксидативного стресу, зменшення у 2-4 раза генерації ПОЛ та активності iNOS, водночас активність конститутивного синтезу NO та вміст H_2S були на рівні контрольних значень.
2. Застосування доксорубіцину призводило до індукції кальційзалежної CsA-чутливої МП у серці щурів, що проявлялося збільшенням амплітуди набухання та супроводжувалося підвищеною на два порядки чутливістю мітохондрій до індуктора. Введення щурам флокаліну спільно з доксорубіцином запобігало збільшенню неспецифічної провідності

- мітохондріальних мембран через зменшення чутливості МП до кальцію, що засвідчує мітопротекторні властивості препарату.
3. Дія доксорубіцину призводила до ендотеліальної дисфункції артеріальних судин. Відкривання K_{ATP} -каналів за ушкоджуючої дії доксорубіцину попереджало порушення розслаблення-скорочення артеріальних судин.
 4. Виявлено зменшення ЧСС, затримку вдвічі провідності та виражену елевацію сегмента ST на ЕКГ, що, ймовірно, відбувалося через доксорубіциніндуковане виснаження компенсаторних механізмів міокарда, порушення Ca^{2+} -обміну та недостатню релаксацію артеріол. За умов спільного введення флокаліну та доксорубіцину не спостерігали ознак хронотропної та провідної дисфункції серця, ішемічні зміни були відсутні.
 5. У плазмі крові щурів, яким вводили доксорубіцин, спостерігали збільшення у 1,5 раза активностей АСТ, АЛТ, КФК МБ та концентрації глюкози. Зменшення у 1,2-1,4 раза у плазмі вищезазначених речовин на тлі введення доксорубіцину демонструвало потужний мембраностабілізуючий ефект активації ATP -чутливих калієвих каналів.
 6. Проведення кардіогемодинамічного дослідження щурів *in vivo* після введення доксорубіцину виявило збільшення порожнини ЛШ у 1,5 раза, виснаження компенсаторних механізмів та зменшення ефективності роботи серця (зниження ФВ на 27%). Дія флокаліну запобігала розвитку доксорубіциніндукованої систоло-діастолічної дисфункції ЛШ.
 7. За допомогою ультраструктурного дослідження тканини серця щурів після введення доксорубіцину спостерігали набухання та аутофагію мітохондрій, а також значну міофібрилярну та сарколемальну деструкцію. Сумісна з доксорубіцином дія активатора K_{ATP} -каналів попереджала порушення мітохондріального біогенезу та структури міофібрилярного апарату.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Agen C, Bernardini N, Costa M, Del Tacca M. Reducing doxorubicin cardiotoxicity in the rat using deferred treatment. *Cancer Chemother Pharmacol* 1992; 30:95–9.
- Aguilar-Bryan L, Bryan J. *Endocr Rev*. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. 1999; 20(2):101–135.
- Ahmadiasl N, Rostami A, Rajabi F. Effects of noradrenaline and KCl on peripheral vessels in doxorubicin induced model of heart failure. *Path*. 2002; 8(4):259-262.
- Akopova O, Mankovska I, Nosar V, Kolchinskaya L, Sagach V. K_{ATP} Channels Functioning is Critical for Mitochondrial Bioenergetics under Physical Stress. *New Inn in Chem and Biochem*. 2021; 2:44-58.
- Alan G, Ankur G, Stuart A. The Diagnosis and Evaluation of Dilated Cardiomyopathy *J Am Coll Cardiol*. 2016 Jun 28; 67(25):2996-3010.
- Alavian N, Beutner G, Lazrove E, Li H. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mPTP. *Proc NAcad Sci*. 2014; 111:10580-85.
- Alberts D, Muggia F, Carmichael J. Efficacy and safety of liposomal anthracyclines in phase I/II clinical trials. *Semin Oncol*. 2004; 31:53-90.
- Alekseev A, Hodgson D, Karger A, Zingman V, Terzic A. K_{ATP}-channel/enzyme multimer: Metabolic gating in the hearts. *J Mol Cell Card*. 2005 Jun; 38(6):895-905.
- Ali M, Soto A, Bekheit-Saad S, BuzdarU, Hortobagyi G, Tashima C, et al. ECG changes after adriamycin chemotherapy. *Cancer* 2010; 43:465-71.
- Allen A. The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Sem On*. 1992; 19:529-542.
- Angsutararux P, Luanpitpong S, Issaragrisil S. Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity: the Roles of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell*. 2015; 7:95-602.
- Arbustini E, Navneet N, Tavazzi L. The MOGE(S) classification of cardiomyopathy for clinicians. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 64(3):304-1820.

- Argaud O, Gateau-Roesch D, Muntean L. Specific inhibition of the mPTP prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 38:367-374.
- Aries A, Paradis P, Lefebvre C. Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 101:6975- 6980.
- Arunachalam S, Kim S, Yi H, Yun B, Lee D, Hwang P, et al. Adriamycin inhibits adipogenesis through the modulation of PPAR γ and restoration of it by PPAR γ over-expression. *Tox Mech Meth.* 2012; 22:540-546.
- Ascensao A, Ferreira R, Oliveira PJ, Duarte JA. Moderate training prevents doxorubicin-induced mitochondriopathy and reduces the cardiac apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 74:76-89.
- Aversano T, Ouyang P, Silverman H. Blockade of the KATP-channel modulates reactive hyperemia in the canine coronary circulation. *Circ Res.* 1991; 69:618-22.
- Aziz T. Cardioprotective Effect of Quercetin and Sitagliptin in Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity in Rats, *Cancer Manag Res.* 2021; 13:2349-2357.
- Baines C, Kaiser K, Purcell N, Blair N, Osinska H, Haeton, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mPTP in cell death. *Nature* 2005; 434:658-662.
- Baines C, Kaiser R, Sheiko T, Craigen J, Molkenin D. VDAC are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol.* 2007; 9:550-555.
- Baughman M, Perocchi F, Girgis S, Strittmatter L, Goldberger O. Integrative genomics identifies MCU as an essential component. *Nature.* 2011; 476:341-345.
- Beech D, Zhang H, Nakao K, Bolton B. Single channel and whole-cell K-currents evoked by levcromakalim in smooth muscle cells. *J Pharmac.* 1993; 110(2):83-590.
- Beinfield W, Lehr D. P-R interval of the rat ECG. *Am J Phys.* 1968; 214(1):205-11.
- Bennink R, Hoff M, Hemert F. Annexin V imaging of acute doxorubicin cardiotoxicity (apoptosis) in rats. *J Nucl Med.* 2004; 45:842-848.

- Berthiaume J, Wallace K. Persistent alterations to the gene expression profile of the heart subsequent to chronic doxorubicin treatment. *Card Toxicol.* 2007;7:178–191.
- Beutner G, Alavian K, Jonas E, Porter G. The mPTP and ATP Synthase. *Handb Exp Pharmacol.* 2016; 240:21-46.
- Biel M, Stylianos M. Cyclic nucleotide-gated channels. *Exp Ph.* 2009; 191:111-36.
- Boengler K, Schulz R. Connexin 43 and Mitochondria in Cardiovascular Health and Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 982:227-246.
- Bol M, Wang N, De Bock M, Wacquier D. At the cross-point of connexins, calcium, and ATP: Blocking hemichannels and constriction. *Card Res.* 2017; 113:195-206.
- Bonadonna G, Monfardini S, Lena M, Beretta G. Phase I and preliminary. The anthracyclines: will we find a better doxorubicin? *Semin Oncol.* 1992; 19:670-686.
- Boyde T. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal Bioch.* 1980; 107(2):424-31.
- Campos J, Bozi H, Bechara R, Ferreira JC. Mitochondrial Quality Control in Cardiac Diseases. *Front Physiol.* 2016; 7:479.
- Cappelli V, Moggio R, Paracchini L, Piccinini F. Reduction of myofibrillar ATPase activity and isomyosin shift in delayed doxorubicin cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol.* 1989; 21(1):93-101.
- Carafoli E, Rossi S, Lehninger L. Uptake of adenine nucleotides by respiring mitochondria in active accumulation of Ca^{2+} and phosphate. *J Biol Chem.* 1965; 240(5):2254-61.
- Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G. Early detection of anthracycline cardiotoxicity, improvement with heart failure therapy. *Circ.* 2015; 131:1981-1988.
- Cardinale D, Iacopo F. Cardiotoxicity of anthracyclines. *Front Card Med.* 2020;7:26.
- Carll A, Willis M, Lust R, Costa D, Aimen K. Merits of non-invasive rat models of left ventricular heart failure. *Cardiovasc Toxicol.* 2011 Jun; 11(2):91-112.

- Caroni P, Villani F, Carafoli E. The cardiotoxic antibiotic doxorubicin inhibits the Na⁺/Ca²⁺ exchange of dog heart sarcolemmal vesicles. *FEBS Lett* 1981;130:1846.
- Carvalho R, Sousa R, Cadete V, Lopaschuk G, Wallace KB. Metabolic remodeling associated with subchronic doxorubicin cardiomyopathy. *Toxicol*. 2010; 270:92–98.
- Casali, Bielack, Abecassis, Aro, Bauer. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Oncol*. 2018; 29(Suppl 4).
- Cervantes A, Pinedo H, Lankelma J. The role of oxygen free radicals in the cytotoxicity of doxorubicin in resistant cancer cells. *Cancer Lett*. 1988; 41:169-177.
- Chan K, Chan H, Tse L, Chan IH, Cheung C, Lam W, et al. Life-threatening Torsades de Pointes result in from “natural” cancer treatment. *Clin Toxicol*. 2009; 47:592-94.
- Chatterjee K, Zhang J, Honbo N. Dox Cardiomyopathy. *Card*. 2010; 115:155-162.
- Chen C, Chen L. Doxorubicin-induced cardiac toxicity is mediated by lowering of peroxisome proliferator-activated receptor in rats. *PPAR Res*. 2013; 2013:456042.
- Chen Y, Shi S, Yan D. Research progress of therapeutic drugs for doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Biomed Pharm*. 2022; 156:113903.
- Cheneval D, Carafoli E, Powell L, Marsh D. A spin-label electron resonance study of the binding of mtCK to cardiolipin. *Eur J Biochem*. 1989; 186:415-419.
- Chi L, Prichard A, Lucchesi B. Profibrillatory actions of a pinacidil in a conscious canine model of sudden coronary death. *J Car Pharmacol*. 1990;15:452-64.
- Chiu A, Chan W, Cheng S. Troponin I, myoglobin and mass concentration of creatine kinase-MB in acute myocardial infarction. *J Med*. 1999; 92(12):711-718.
- Chow E, Aplenc R, Vrooman L, Doody D. Late health outcomes after dexrazoxane treatment: A report of Children's Oncology Group. *Cancer*. 2022; 128(4):788-796.
- Christenson E, James T, Agrawal V, Park B. Use of biomarkers for the assessment of chemotherapy-induced cardiac toxicity. *Clin Biochem* 2015; 48 (4-5):223-235.

- Ciarambino T, Menna G, Sans G. Cardiomyopathies. *J Mol Sci.* 2021; 22(14):77 22.
- Cirillo R, Sacco G, Venturella S, Manzini S. Doxorubicin-induced long-term progressive cardiotoxicity in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 35:100–8.
- Cole W, McPherson C, Sontas D. KATP-channels protect the myocardium against ischemidreperfusion damage. *Circ Res.* 1991; 69:571-81.
- Colombo C, Battezzati A. Growth failure in cystic fibrosis: a true need for anabolic agents? *J Pediatr.* 2005 Mar; 146(3):303-5.
- Cotgreave A, Gerdes R. Glutathione–protein interaction: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Bioch. Bioph. Res. Commun.* 1998; 242:1–9.
- Cova D, De Angelis L, Monti E, Piccinini F. Subcellular distribution of two spin trapping agents in rat heart: protective effects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Free Res Com.* 1992; 15:353-360.
- Crompton E, Barksby N, Johnson M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie.* 2002; 84:143-152.
- Crompton M, Virji S, Ward M. Cyp-D binds strongly to complexes of the VDA channel and the ANT to form the mPTP. *Eur J Biochem.* 1998; 258:729-735.
- Cunha-Oliveira T, Ferreira L, Oliveira P. Doxorubicin triggers bioenergetic failure and p53 activation in mouse stem cardiomyocytes. *Tox App Pharm.* 2018; 348:1-13.
- Damiani R, Moura D, Viau C, Henriques J. Pathways of cardiac toxicity: comparison doxorubicin and mitoxantrone. *Arch Toxicol.* 2016; 90: 2063-76.
- Danylovyh Y, Kolomiets O, Rodik R. Calixarene is an effective inhibitor of H (+)-Ca (2+)-exchanger in smooth muscle mitochondria. *Ukr Bioch J.* 2018; 90(1):25-33.
- Daut J, Maier-Rudolph W, Von Beckerath N. Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Science.* 1990; 247:1341-4
- Davidson A, Dassa E, Orelle C, Chen J. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Molec Biol Rev.* 2008; 72(2):317-364.

De Angelis A, Urbanek K, Cappetta D, Piegari S. Doxorubicin cardiotoxicity and target cells: a broader perspective. *Cardiooncology*. 2016; 2(1):2-8.

De Baat E, van Dalen E, Mulder R, Hudson M, Ehrhardt M, Engels, et al. Primary cardioprotection with dexrazoxane in patients with childhood cancer who are expected to receive anthracyclines. *Lancet Child Health*. 2022; 6(12):885-894.

De Jong S, Zijlstra G, Mulder NH. Reduced DNA top II activity in an adriamycin-resistant human small cell lung carcinoma cell line. *Cancer Res*. 1990;50:304-309.

DeLuca HF, Engstrom GW. Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1961;47(11):1744-1750.

Denysova M, Strutynska N, Mys L, Korkach Y, Magomedov O, Strutynskyi R, Sagach V. Early markers of acute doxorubicin-induced cardiotoxicity and some mechanisms of its development. *Fiziol Zh*. 2024; 70(1): 3-13. [Ukrainian]

Denysova M, Strutynska N, Mys L, Korkach Y, Rozova K, Sagach V. Development of mitochondrial dysfunction during acute cardiotoxic action of doxorubicin in adult rats. *Fiziol Zh*. 2023; 69(6):3-14. [Ukrainian]

Denysova M, Strutynska N, Mys L, Korkach Y, Sagach V, Strutynskyi R. Activation of ATP-sensitive potassium channels prevents doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction in the heart and impaired vascular responses in rats. *Fiziol Zh*. 2024; 71(2): 3-15.

Dolder M, Walzel B, Schlattner U, Wallimann T. Inhibition of the mPTP by CK substrates. *J Biol Chem*. 2003; 278(20):17760-6.

Doroshov J, Locker G, Myers C. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites by doxorubicin. *J Clin Invest*. 1980; 65:128-135.

Doroshov J, Davies K. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. Anthracycline formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem*. 1986; 261:3060-67.

Duan J, Tao J, Zhai M, Li C, Zhou N. Anticancer drugs-related QTc prolongation, torsade de pointes and sudden death. *Oncotarget* 2018; 9:25738-49.

- Dudzinski D, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006; 46:235-76.
- Duncan A, Ruprecht J, Kunji E, Robinson A. Cardiolipin dynamics and binding to conserved residues in the mt ADP/ATP carrier. *Bioch Biomer*. 2018; 1860:1035-45.
- El-Hattab A, Scaglia F. Mitochondrial Cardiomyopathies. *Fr Card Med*. 2016; 3:25.
- Elliott P. Cardiomyopathy. Diagnosis, treatment of DKMP. *Heart*. 2000; 84:106-12.
- Endlicher R, Kucera O. The mPTP, current knowledge. *Cells*. 2023; 12(9):1273.
- Enkvetchakul D, Nichols C. Gating mechanism of KATP channels: function fits form. *J Gen Physiol*. 2003 Nov;122(5):471-80.
- Ewer M, Lippman S. Type II chemotherapy-related cardiac dysfunction:time to recognize a new entity. *J Clin Oncol*. 2005; 23:2900-2.
- Fang H, Chen M, Ding Y, Shang W, Xu J, Zhang W, et al. Imaging superoxide flash and metabolismcoupled mPTP in living animals. *Cell Res*. 2011; 21:1295-1304.
- Fang X, Wang H, Han D, Xie E, Yang X, Wei J, et al. Ferroptosis as a Target for Protection against Cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci*. 2019; 116:2672-80.
- Farmer, H. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005; 434:917-921.
- Farraj A, Hazari M, Cascio W. The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology. *Toxicol Sci*. 2011 May;121(1):11-30.
- Fatula E, Rishko O, Shyutev M, Svystak V, Yu G, et al Mashura Fundamentals of practical electrocardiography. *UzhNU "Hoverla"*. 2020; 16:56-80 [Ukrainian].
- Feissner R, Skalska J, Gaum W, Sheu S. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca^{2+} and ROS. *Front Biosci*. 2009; 14:1197-218.
- Ferrans V, Clark J, Zhang J, Yu Z, Herman E. Pathogenesis and prevention of doxorubicin cardiomyopathy. *Tsitologiya* 1997; 39:928-936.

- Fish F, Prakash C, Roden D. Suppression of repolarization-related arrhythmias in vitro and vivo by low-dose potassium channel activators. *Circulation* 1990; 82:1362-9.
- Friedmann J, Schneider M, Aichler M, Walch A. Inactivation of the Ferroptosis Regulator Triggers Acute Failure in Mice. *Nat Cell Biol.* 2014; 16:1180-1191.
- Fujita T. Formation and removal of reactive oxygen species, lipid peroxides and free radicals, and their biological effects. *Yakugaku Zasshi* 2002; 122:203-218.
- Fukuda N, Sasaki D, Ishiwata S, Kurihara S. Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle. *Circulation.* 2001; 104(14):1639-1645.
- Gavrilov V, Gavrilova A, Khmara N. Measurement of diene conjugates in blood plasma using the UV absorption of heptane. *Lab Delo.* 1988; (2):60-4.
- Gianni L, Herman E, Lipshultz S. Anthracycline cardiotoxicity: From bench to bedside. *J Clin Oncol.* 2008; 26(22):3777-3784.
- Giorgio V, Stockum S, Antoniel M, Zoratti M, Szabo I. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the mPTP. *Proc Natl Acad Sci.* 2013; 110:5887-5892
- Goormaghtigh E, Huart P, Praet M, Brasseur R. Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Mitochondrial toxicity. *Biophys Chem.* 1990;35:247-257.
- Govender J, Loos B, Marais E. Mitochondrial Catastrophe during Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *J Pineal Res.* 2014; 57:367-380.
- Graham H, Waymire G, Cottrell B, Trounce A, MacGregor R, Wallace D, et al. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the ANT. *Nat Genet* 1997; 16:226-234.
- Grant L, Williams M, Zahaczewsky P, Dicker. Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel and docetaxel. *Int J Cancer* 2002; 104:121-129.
- Green D, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305:626-629.

- Gregory M, Yoshioka C, Rex E, Fay J, Xie Q. Cryo-EM structure of the KATP-channel illuminates mechanisms of assembly and gating. *eLife*. 2017;16:e241496.
- Grzanka D, Domaniewski J, Grzanka A. Effect of doxorubicin on actin reorganization in Chinese hamster ovary cells. *Neoplasma*. 2005; 52(1):46-51.
- Gulati A, Jabbour A, Ismail T. Fibrosis, mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *JAMA* 2013;309:896-908.
- Gutierrez-Aguilar M, Douglas L, Gibson K, Domeier L, Molkenin J. Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial phosphate carrier does not affect mPTP. *J Mol Cell Cardiol*. 2014; 72:316-325.
- Halestrap A, Davidson M. Inhibition of Ca²⁺(+)-induced large amplitude swelling of heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mtVDAC and preventing it interacting with the ANT. *Bioch J*. 1990; 268:153-160.
- Halestrap A, Pereira C, Pasdois P. The role of hexokinase in cardioprotection - mechanism and potential for translation. *Br J Pharm*. 2015; 172(8):2085-100.
- Halestrap A. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans*. 2006; 34:232-237.
- Halestrap A. The C ring of the F1Fo ATP synthase forms the mPTP. *Fr Oncol*. 2014; 4:234.
- Halestrap A. What is the mPTP? *J Mol Cell Cardiol*. 2009; 46:821-831.
- Halestrap S, Clarke S, Javadov Z. mPTP opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection. *Cardiovasc. Res*. 2004; 61:372–385.
- Halliwell B, Grootveld M, Gutteridge J. Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biomedical systems. *Methods Biochem Anal*. 1988; 33:59-90.
- Hambrock A, Kayar T, Stumpp D, Hartmut O. *Diabetes*. 2004; 53(3):128–134.
- Hariv K. *Vìsn. Dnìpropetr. Unìv. Ser. Bìol. Med*. 2016; 7(1):3-7.
- Harris A, Das M. Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem J*. 1991; 280:561-573.

- Hasinoff B, Patel D, Wu X. The oral iron chelator ICL670A (deferasirox) does not protect myocytes against doxorubicin. *Free Radic Biol Med*. 2003;35:1469–1479.
- Haworth R, Hunter D. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys*. 1979; 195:460–467.
- Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, Allen LA, 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure. *Circul*. 2022;145(18):e895-e1032.
- Henriksen PA. Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanisms, monitoring and prevention. *Heart*. 2018; 104:971-7.
- Hirota K, Lambert D. Ketamine: Its mechanism and uses. *Br J An*. 1996; 77:441-4.
- Hoffman B, Cranefield P, Stuckey J, Piera J: Electrical activity during the PR interval. *Circ Res*. 1960; 1200-1211.
- Holmberg SR, Williams AJ. Patterns of interaction between anthraquinone drugs and the calcium-release channel from cardiac SR. *Circ Res* 1990; 67:272–83.
- Horenstein MS, Vander Heide RS, L'Ecuyer TJ. Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. *Mol Genet Metab*. 2000; 71:436-444.
- Hortobagyi GN. Anthracyclines in the treatment. *Drugs*. 1997; 54 Suppl 4:1-7.
- Hrelia A. Doxorubicin induces early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes. *Bioch Bioph Ac*. 2002; 1567:150-156.
- Huihui H, Xie C, Weng Z, Yu P, Wang Y. Dexrazoxane Alleviated Doxorubicin-Induced Nephropathy in Rats Luchen Shan *Pharmacology*. 2022;107(3-4):206-215
- Huwiler M, Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H₂O₂/iodide system. *Eur J Biochem*. 1984;141(1):69-74.
- Hydock D, Lien C, Jensen B, Parry T, Schneider C. Rehabilitative exercise in rat model of doxorubicin cardiotoxicity. *Exp Biol Med*. 2012; 237(12):1483-1492.

- Hyslop A, Hinshaw D, Spragg R, Jackson J, Cochrane C. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 1988; 263:1665– 1675.
- Iles L, Pfluger H, Lefkovits L. Myocardial fibrosis predicts device therapy in patients with cardioverterdefibrillators. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57:821-8.
- Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. KATP-channels in the mitochondrial inner membrane. *Nature*.1991; 352(32):244-247.
- Jensen A, Acton M, Peters H. Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: comparison of ECG, transmembrane potential and structural effects. *J Car Pharm*. 1984; 6:186-200.
- Jensen B, Lien C, Hydock D, Hayward R. Exercise mitigates cardiac doxorubicin accumulation and preserves function in the rat. *J Cardiovasc Ph*. 2013; 62:263-269.
- Jeyaseelan R, Poizat C, Wu H, Kedes L. Molecular mechanisms of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Biol Chem*. 1997; 272:5828-5832.
- Jia G, Aroor R, Jia C, Sowers R. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. *Biochim Biophys Mol Basis Dis*. 2019; 1865:1802-1809.
- Jiang D, Zhao L, Clapham D. Genome-wide RNAi screen identifies *Letm1* as a mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter. *Sci*. 2009; 326:144-147.
- Jing X, Yang J, Jiang L, Chen J, Wang H, Xe D, et al. MicroRNA-29b regulates the mitochondria-dependent apoptotic pathway by targeting *bax* in doxorubicin cardiotoxicity. *Cell Physiol Biochem*. 2018; 48:692-704.
- Joanne S Ingwall. Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc Res*. 2009; 81(3):412-9.
- Johansen D, Cruciani V, Sundset R, Mikalsen S. Ischemia induces closure of gap junctional channels and opening of hemichannels in heart-derived cells and tissue. *Cell Ph Biochem*. 2011; 28:103-114.

- Johnston K, MacLeod A, Walker M. ECG and other responses to ligation of a coronary artery in the conscious rat. *Pharm Toxicol*. 1981; 15:243-252.
- Jonckheere I, Smeitink A, Rodenburg J. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inher Metab Dis*. 2012; 35:211-225.
- Jones K, George A. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004; 61(6):682–699.
- Jones K, Swanton L, Ewer M. Anthracycline toxicity. *Exp Drug*. 2006; 5:791-809.
- Kagan VE. Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine. *Biol Med*. 2004; 37:1963-85.
- Kaiserova H, Simunek T, Sterba M, Kvasnickova E, Bast A. New iron chelators in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol*. 2007; 7:145-150.
- Kalivendi SV, Kotamraju S, Zhao H, Joseph J. Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of eNOS. *J Biol Chem*. 2001; 276:47266-76
- Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S. Doxorubicin-induced apoptosis: Implications in cardiotoxicity. *Mol Cell Biochem*. 2002; 234:119-124.
- Kappus H, Muliawan H, Scheulen ME. In vivo studies on adriamycin-induced lipid peroxidation and effects of ferrous ions. *Dev Toxicol Environ Sci*. 1980; 8:635-8.
- Karch J, Kwong J, Burr, A.R. Bax and Bak as the outer membrane component of the mPTP in regulating necrotic cell death in mice. *Elife*. 2013; 2: e00772.
- Karch M, Bround J, Khalil H, Sargent A, Latchman N, Terada N, et al. Inhibition of mPTP by deletion of the ANT and CypD. *Sci Adv*. 2019; 5: e4597.
- Karupu VY. Electron microscopy. Higher school. 1984; 208-10.
- Kaupp U, Seifert R. Cyclic nucleotide-gated ion channels *Ph Rev*. 2002; 82(3):769-824.
- Kavazis A, Morton A, Hall S. Effects of doxorubicin on cardiac muscle subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Mitochondrion*. 2017; 34:9-19.

- Kawasaki N, Lee J, Shimizu H, Ishii Y. Cardiac energy metabolism at several stages of adriamycin-induced heart failure in rats. *Int J Cardiol.* 1996; 55 (3):217-25.
- Kenk M, Thackeray J, Thorn S, Chow B. Alterations noradrenergic signaling in a rat model of adriamycin-induced cardiotoxicity. *J Nucl Cardiol.* 2017; 1(2):254-263.
- Keung C, Toll L, Ellis M, Jensen A. L-type cardiac Ca-channels in doxorubicin cardiomyopathy: biochemical, functional correlations *J Cl Inv.* 1991; 87:2108-13.
- Kilickap S, Barista I, Akgul E, Aytemir K, Aksoy S, Tekuzman G. Early and late arrhythmogenic effects of doxorubicin. *South Med J.* 2007; 100:262-265.
- Kim Y, Ma A, Kitta K. Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: Implication of cardiomyocyte apoptosis. *Mol Pharmacol.* 2003; 63:368-377.
- King A, Polhemus J, Bhushan S. H₂S cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc Acad Sci.* 2014 111(8): 3182-7.
- Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem.* 2000; 267(16):4928-44.
- Klingenberg M. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1778:1978–2021.
- Kolbe V, Costello D, Wong A, Lu C. Scale isolation and characterization of the phosphate transport protein from heart mitochondria. *J Biol Ch.* 1984; 259:9115-20.
- Konopelski P, Ufnal M. ECG in Rats: a Comparison to Human. *Physiol Res.* 2016; 65(5):717-725.
- Kumar D, Lou H, Singal P. Oxidative stress and apoptosis in heart dysfunction. *Herz.* 2002; 27:662-8.
- Kuthan H, Ullrich V, Estabrook R. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. *Biochem J.* 1982; 203(3):551-8.
- Kwong Q, Davis J, Wang X. Genetic deletion of the mt phosphate carrier desensitizes the mPTP and causes cardiomyopathy. *Cell Death Differ.* 2014; 21:1209-1217.

- Ky B, Putt M, Sawaya H. Early increases in biomarkers predict cardiotoxicity in patients with cancer treated by doxorubicin. *J Am Cardiol.* 2014; 63(8):809-816.
- Lan C, Jin I, W Zhou. Erythropoietin activates SIRT1 to protect cardiomyocytes against doxorubicin-induced mitochondrial toxicity. *Tox Let.* 2017; 275:28-38.
- Larsen R, Jakacki R, Silber J, Barber G. ECG changes and arrhythmias after cancer therapy in children and young adults. *Am J Cardiol.* 1992;70:73-77
- Lebrecht D, Setzer B, Walker UA. Timedependent, tissue-specific accumulation of mtDNA and respiratory chain defects in dox cardiomyopathy. *Circ.* 2003;108:23-9.
- Leeuw N, Ruiters D, Balk A. Histopathologic findings in explanted heart tissue from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Trans Int.* 2001;14:299-306.
- Lesnefsky J, Tandler B, Kerner J, Hoppel L. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion and heart failure. *J Mol Cell Card.* 2001; 33:1065-89.
- Leyva F, Taylor R, Foley P. LV midwall fibrosis as a predictor of mortality after cardiac resynchronization therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 60:1659-67.
- Li L, Takemura G, Li Y. Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation* 2006; 113:535-543.
- Lightfoot J, D'Agostino R, Hamilton C, Jordan J. Novel approach to early detection of dox-cardiotoxicity by gadolinium-enhanced cardiovascular magnetic resonance imaging in an experimental model. *Circ Cardiovasc Imaging* 2010; 3(5):550-558.
- Lim C, Zuppinger C, Guo X. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2004; 279(9):8290-299.
- Lind L, Araujo J, Barchowsky A, Belcher S, Berridge B. Key Characteristics of Cardiovascular Toxicants. *Environ Health Perspect.* 2021 Sep;129(9):95001.
- Linnyk O, Tarasova G, Portnychenko G, Dosenko V, Mankovska I. Violation of the contractile activity of cardiomyocytes under the action of doxorubicin. *Fiz Zh.* 2016; 62(6):65-71. [Ukrainian]

- Linnyk O, Drevytska T, Gonchar O, Mankovska I. Mechanisms of violations of the antioxidant balance of cardiomyocytes under the action of doxorubicin. *Fiz Zh.* 2015; 61(5):90-98. [Ukrainian]
- Lipshultz S, Adams M, Colan S, Herman E. Long-term cardiovascular toxicity in children and young adults after cancer therapy. *Circulation.* 2013; 128:1927-1995.
- Livingston R, Stephens R, Bonnet J. Long-term survival and toxicity in small cell lung cancer. *Am J Med.* 1984; 77:414-417.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-75.
- Lum K, Roebuck S. Oxidant stress and endothelial dysfunction. *J. Physiol.* 2001; 280:C719-C741.
- Luo P, Zhu Y, Chen M, Yan H, Yang B, Yang X. HMGB1 contributes to adriamycin-induced cardiotoxicity via up-regulating autophagy. *Tox Lett.* 2018; 292:115-122.
- Luo Y, Cole D, Trines J, Benson L. Doxorubicin-induced changes in antioxidant status and cardiac function in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1997; 1360:45-52.
- Mahmaljy H, Singhal M. Dilated Cardiomyopathy. Stat Publishing. 2021; 45:56-89.
- Makwana V, Karanjia J, Haselhorst T, Rudrawar S. Liposomal doxorubicin as targeted delivery platform. *Int J Pharm.* 2021; 593:120117.
- Martin L, Gertz B, Pan Y, Price C. The mPTP in motor neurons: involvement in the pathobiology mice. *Exp Neurol.* 2009; 218: 333-346.
- Martinou J, Green D. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2:63-67.
- Masci P, Schuurman R, Andrea B. Myocardial fibrosis as a key determinant of LV remodeling in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cir Card Imaging.* 2013; 6:790-9.
- McCauley M, Vallabhajosyula S, Darbar D. Proarrhythmic and Torsadogenic Effects of Potassium Channel Blockers in Patients. *Card El Clin.* 2016; 8:481-93.

- McCormack G, Halestrap A, Denton M. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev.* 1990; 70:391-425.
- Medrano F, Munoz A, Sánchez V, Pérez-Herrero C. Cardiotoxicity of fluorouracil: Ischemia or myocardial toxicity? *Rev Clin Esp.* 2001; 201:106-107.
- Mehdi Hazari, Haykal-Coates, Winsett D, Costa D. Hypertension and cardiac arrhythmias. *Curr Phar. Des.* 2007; 13:2545-2555.
- Menna P, Salvatorelli E, Minotti G. Cardiotoxicity of antitumor drugs. *Chem Res Toxicol.* 2008; 21:978-989.
- Meredith A, Thorneloe K, Werner M. Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large Ca²⁺-activated K⁺ channel. *JBC.* 2004; 279: 36746–36752.
- Mettler F, Young D, Ward J. Adriamycin-induced cardiotoxicity (cardiomyopathy and congestive heart failure) in rats. *Cancer Res.* 1977; 37(8 Pt 1):2705-13.
- Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978; 86(1):271-8.
- Millay P, Sargent A, Osinska H, Baines P, Barton R, Vuagniaux D, et al. Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nat Med.* 2008; 14:442-447.
- Minotti G, Recalcati S, Mordente A. The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium. *FASEB J.* 1998;12(7):541-552.
- Minotti G, Menna P, Ronchi R. Doxorubicin inactivates IRP in Cardiomyocytes: Pathways for Iron-Mediated Cardiotoxicity. *Cancer Res.* 2001; 61:8422-8428.
- Misteli, T. & Soutoglou, E. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10:243-254.

- Mitry A, Laurent D, Keith L, Sira E, Eisenberg C. Accelerated cardiomyocyte senescence contributes to late-onset doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2020; 318:C380–C391.
- Miura T, Muraoka S, Fujimoto Y. Inactivation of CK by Adriamycin during interaction with horseradish peroxidase. *Biochem Pharmacol*. 2000; 60:95-99.
- Moens A, Niu X, Yang R, Cingolani O, Arkenbout E. Adverse ventricular remodeling and exacerbated NOS uncoupling from pressure-overload in mice lacking the beta3-adrenoreceptor. *J Mol Cell Cardiol*. 2009; 47:576-85.
- Moibenko A, Dosenko V, Parkhomenko A. Endogenous mechanisms of cardioprotection as the basis of pathogenetic therapy of heart diseases. *N dum*. 2008; 3:511-518. [Ukrainian]
- Moïbenko O, Sahach V, Tkachenko M, Kul'chyts'kyï O. Mechanisms of NO activity in cardiovascular system as a basis of pathogenetic therapy. *Fiziol Zh*. 2004; 50(1):11-30.[Ukrainian]
- Montaigne D, Marechal X, Lancel S, Neviere R. Doxorubicin induces mPTP and contractile dysfunction in the human myocardium. *Mitochondrion*. 2011;11:22-26.
- Murabito A, Hirsch E, Ghigo A. Mechanisms of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Front Card Med*. 2020; 7:35-67.
- Murphy A, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev*. 2008; 88:581-609.
- Murphy A, Thompson W, Peng L. Regulation of the rat cardiac troponin I gene by the transcription factor GATA-4. *Biochem J*. 1997; 322:393-401.
- Myers C, Bonow R. A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by N-acetylcysteine. *Semin Oncol*. 1987; 10:53-55.
- Mys L, Strutynska N, Goshovska Y, Sagach V. Stimulation of the H₂S synthesis suppresses oxidative-nitrosative stress and restores endothelial-dependent vasorelaxation in old rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2020; 98(5):275-281.

- Mys L, Strutynska N, Sagach V. Activation synthesis of endogenous H₂S inhibits mPTP and restores the conjugation of cNOS. *Fiz Zh.* 2017;63(3):16-23.
- Nadziejko C, Fang K, Narciso S, Gordon T. Effect of pollutants on spontaneous arrhythmias in aged rats. *Inhal. Toxicol.* 2004; 16:373-380.
- Nagibin V, Egan Benova T, Tribulova N. Ageing related down-regulation of myocardial connexin-43 and up-regulation of MMP-2 may predict propensity to AF in animals. *Phys Res.* 2016; 65:91-100.
- Nakagawa T, Zhu H, Li E, Xu J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; 403:98-103.
- Nakahara T, Tanimoto T, Petrov A, Ishikawa K. Rat Model of Cardiotoxic Drug-Induced Cardiomyopathy. *Methods Mol Biol.* 2018; 1816:221-232.
- Neilan T, Blake S, Ichinose F, Jassal S. Disruption of NOS protects against the cardiac injury and mortality induced by doxorubicin. *Circ.* 2007; 116:506-14.
- Nelson M, Quayle J. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial muscle. *Amer J Physiol Cell Physiol.* 1995; 268:799–C822.
- Nichols G. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature.* 2006; 440(7083):470-6.
- Nicolay K, Aue W, Seelig J. Effects of the adriamycin on the energy metabolism of rat heart and implications for cardiotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1987; 929:5-13.
- Nitiss L. Targeting DNA Top II in cancer chemotherapy. *Rev Can.* 2009; 9:338-50.
- O'Connell, Campos P, Fernanda R. Short- and long-term models of dox-induced cardiomyopathy in rats. *Exp Tox Path.* 2017; 69:213-219.
- O'Malley FP, Chia S, Tu D, Bramwell H. TopII protein and responsiveness of cancer to adjuvant chemotherapy with CEF compare to CMF. *Can Treat.* 2011;128:401-9.
- Octavia Y, Tocchetti G, Moens L. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52(6):1213-25.

Oliveira G, Melo M, Carvalho J, Lavor M. Doxorubicin cardiotoxicity and cardiac function improvement after stem cell therapy diagnosed by strain echocardiography. *J Cancer Sci Ther.* 2013; 5(2):52-57.

Oliveira G, Qattan M, Al-Kindi S, Park J. Heart failure therapies for patients with chemotherapy-induced cardiomyopathy. *Circ Heart Fail.* 2014; 7:1050–1058.

Oliveira G, Wallace K. Depletion of ANT in heart mitochondria from doxorubicin-treated rats relevance for mitochondrial dysfunction. *Toxicol.* 2006; 220:160-168.

Olson R, Mushlin P. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of hypotheses. *FASEB J.* 1990; 4:3076-3086.

Olson R, Terzic A. Human KATP channelopathies: diseases of metabolic homeostasis. *Pflugers Arch.* 2010 Jul; 460(2):295-306.

Olukman M, Can C, Erol A, Cinar M. Reversal of doxorubicin-induced vascular dysfunction by resveratrol in rat thoracic aorta. *Anad Card Derg.* 2009;9(4):260-6.

Osborne B. The ECG of the rat. *Pharmacology and Toxicology.* 1981; 15:15–28.

Ostapchenko L, Kompanets I. *Biochemistry.* 2018(1):67-2. [Ukrainian]

Özbay B, Şimşek E, Kemal H, Çakar B. Anthracycline Chemotherapy: Echo with ECG to Predict Early Cardiotoxicity. *Turk KardDern Ars.* 2022; 50(7):478-484.

Pacher P, Nagayama T, Bátkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure-volume conduct catheter in mice and rats. *Nat Prot.* 2008; 3(9):1422-34.

Palmieri F. The mitochondrial transporter family: physiological and pathological implications. *Pflugers Arch.* 2004; 447:689-709.

Palty R, Silverman W, Nolte C, Fishman D. NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc Natl Acad Sci.* 2010; 107:436-441.

Pang B, Qiao X, Janssen L, Velds A, Nieuwland M. Drug-induced histone eviction from chromatin contributes to the effects of doxorubicin. *Nat Com.* 2013; 4:1908.

- Parker M, King V, Howard K. Nuclear magnetic resonance study of doxorubicin binding to cardiolipin containing magnetically oriented phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1514:206-216.
- Parsaeifar A, Mazaheri Z. Cardioprotective effect of physical activity on changes of doxorubicin-induced cardiac myosin expression in rats. *J Sp Biosc*. 2016; 9:489-99.
- Pecoraro M, Marzocco S, Ciccarelli M. Cardiotoxic effects of short-term doxorubicin administration: involvement of connexin 43. *Int J Mol Sci*. 2017; 18:21.
- Pecoraro M, Del Pizzo, Iaccarino G, Pinto A. Inflammatory mediators in a short-time mouse model of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Tox Ph*. 2016; 293:44-52.
- Pelikan P, Weisfeldt M, Jacobus W. Acute doxorubicin cardiotoxicity: functional, metabolic, and morphologic alterations in the rat heart. *J Card Ph*. 1986; 8:1058–66.
- Pereira C, Ascensao A, Santos S, Oliveira J. Mitochondrionopathy in doxorubicin-treated rats depends on protocol and is cardiac-specific. *PLoS One*. 2012; 7:e38867.
- Pereira C, Bjork J, Wallace K. Cardiac cyt-c and cardiolipin depletion during anthracycline depression of mitochondrial function. *Mitoch*. 2016; 30:95-104.
- Periasamy M. Calcineurin and the heartbeat. *J Mol Cell Cardiol*. 2002; 34:259-262.
- Peshkova V, Sayapina O, Soldatkin O, Dzyadevych S. Traditional and biosensor methods determination of mono and disaccharides. *Biotech*. 2010; 3(3): 12-57[Ukr]
- Peters A, Liu E, Verrier L, Schwartz J. Air pollution and cardiac arrhythmia. *Epid*. 2000; 11:11-17.
- Picard P, Smith P, Monge J, Rouleau J. Coordinated upregulation of the cardiac endothelin system in a rat model of heart failure. *J Card Pharm*. 1998; 31:294-7.
- Pieske B, Beyermann B, Breu V, Loffler B. Functional effects of endothelin and endothelin receptors in isolated human myocardium. *Circ*. 1999; 99:1802-9.
- Press M, Sauter G, Buyse M, Bernstein L. Alteration of Top II-alpha gene in human cancer: responsiveness to anthracycline chemotherapy. *J Cl Onc*. 2011; 29:859-67.

- Puri A, Maulik K, Ray R, Bhatnagar V. ECG and biochemical evidence for the cardioprotective effect of vit E in doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats. *Eur J Pediatr Surg*. 2005; 15:387-391.
- Pyvovar S, Strutyns'kyi R, Iagupol's'kyi L, Moïbenko O. Mechanism of action of fluoro-containing analogs of diazoxide on the vessels. *Fiz Zh*. 2004; 50(2):27-33
- Quayle J, Nelson M, Standen N. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev*. 1997; 77(4):1165-1232.
- Quinn K, Giblin J, Tinker A. Multisite phosphorylation mechanism for protein kinase A activation of smooth muscle KATP-channel. *Circ Res*. 2004; 94:1359-66.
- Ramachandran A, Lebofsky M, Jaeschke, H. CyclD deficiency protects against acetaminophen-induced oxidant stress and injury. *Free Rad Res*. 2011; 45:156-164.
- Ramalingayya G, Cheruku S, Nayak P. Protects against neuronal damage and doxorubicin-induced memory deficits in rats. *DDDT* 2017;11:1011-26.
- Rasola A, Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*. 2011; 50(3):222-33
- Razmaraii N, Babaei H, Mohajjel A, Asadna G. Cardioprotective effect of phenytoin on dox-induced cardiac toxicity in a rat model. *J Car Ph*. 2016; 67(3):237-245.
- Reichart D, Magnussen C, Zeller T, Blankenberg S. Dilated cardiomyopathy: From epidemiologic to genetic phenotypes. *J Intern Med*. 2019; 286:362–372.
- Ribalet B, John A, Xie L, Weiss J. Regulation of the KATP-channel Kir6.2 by ATP and PIP(2). *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 39:71-77.
- Roden M. A current understanding of drug-induced QT prolongation and its implications for anticancer therapy. *Cardiovasc Res*. 2019; 115:895-903.
- Rozova K. Structurally determined mitochondrial response to hypoxia and neurodegeneration. *Znannia Ukrainy*. 2019. – 159. [Ukrainian]

- Sabatine M, Liu E, Morrow D, Heller E, McCarroll R. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. *Circulation*. 2005; 112:3868–3875.
- Sagach V, Vavilova G, Strutynska N, Rudyk O. The aging increase in the sensitivity of the mPTP opening to inductors in rat heart. *Fiziol Zh*. 2004; 50(2):49-63.
- Saks V, Dzeja P, Schlattner U, Vendelin M, Terzic , Walliman T et al. Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of Frank-Starling law. *J Phys*. 2006; 571:253-73.
- Saleh Y, Herzallah K, Abela GS. Anthracycline-induced cardiotoxicity: mechanisms of action, incidence, prevention, and treatment. *Heart Fail Rev*. 2020; 6:89-100.
- Sanada S, Asanuma H, Hori M. Role of mitochondrial and sarcolem KATP channels in ischemic preconditioning of the canine heart. *Am J Circ Phys*. 2001;280:256-63.
- Sawyer D, Siwik D, Xiao L, Pimentel D, Colucci S. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2002; 34:379-88.
- Sayed-Ahmed M, Khattab M, Gad M. Increased endothelin-1 and cardiac nitric oxide during doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Ph Tox*. 2001; 89:140–4.
- Sayed-Ahmed M, Sharawy S, Osman A. Propionyl-L-carnitine as potential protective agent against adriamycin-induced impairment of fatty acid beta-oxidation in isolated heart mitochondria. *Pharmacol. Res*. 1997; 39:289-295.
- Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T. Mitochondrial CK in human health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1762:164-80.
- Segredo M, Salvadori D, Rocha N. Oxidative stress on cardiotoxicity after treatment with single and multiple doses of doxorubicin. *Hum Exp Toxicol*. 2014; 33:748-760.
- Shi Y, Moon, Dawood S, McManus B, Liu P. Mechanisms and Management of Doxorubicin Cardiotoxicity. *Herz* 2011; 36:296-305.
- Shi Y, Wu Z, Cui N. cAMP-dependent PK phosphorylation produces changes in SUR leading to activation of the KATP channel. *Am J Phys*. 2007; 293:1205-1214.

- Shuba Y. Fundamentals of molecular physiology of ion channels. Nauk Dumka, 2010; 4:440-446. [Ukrainian]
- Singh G, Singh T, Abraham A, Burman C. Protective effects of Term arjuna against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Eth.* 2008; 117:123-129.
- Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow D. Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circ.* 1995; 91:10-15.
- Solem E, Heller J, Wallace B. Dose-dependent sensitivity to calcium mitochondrial dysfunction and cell injury by doxorubicin. *J Mol Cell Cardiol.* 1996; 28:1023-1032.
- Solem E, Henry T, Wallace B. Disruption of mitochondrial calcium homeostasis following chronic doxorubicin administration. *Tox Appl Pharm.* 1994; 129:214-222.
- Spinelli W, Sorota S, Siegal M. Antiarrhythmic actions of the ATP-regulate K⁺ current activated by pinacidil. *Circulation* 1991; 34(8):78-89.
- Steinberg J, Cohen A, Wasserman A, Cohen P, Ross A. Acute arrhythmogenicity of doxorubicin administration. *Cancer.* 1987; 60:1213-1218.
- Steinherz L, Steinherz P, Tan C, Heller G, Murphy L. Cardiac toxicity 4-20 years after completing anthracycline therapy. *JAMA.* 1991; 266:1672-1677.
- Strutynska N, Strutynskiy R, Mys L, Korkach Y, Goshovska Y, Sagach V et al. Exercise restores endogenous H₂S synthesis and mitochondrial function in the heart of old rats. *Eur J Cl Invest.* 2022; 412:1-24.
- Strutyns'ka N, Strutyns'kyi R, Mys' L, Moïbenko O, Sahach V. New fluorine-containing openers of KATP-channels flocalin and tioflocalin inhibit mPTP in rat hearts. *Fiziol Zh.* 2013; 59(6):3-11.
- Strutynskiy R, Korkach Y, Rovets R. Effect of activator of KATP-channels Flocalin on oxidative metabolism, NO-synthase and oxygenation. *Fiz Zh.* 2018; 64(3):3-13.
- Strutynskiy R, Moibenko O, Shysh A. Study of the cardioprotective effects of a new activator of ATP-dependent potassium channels. *Fiz. Zh.* 2001; 47(2):16-230.

Strutynskiy R, Moybenko O, Chebanov V, Horobets M. Modeling of the industrial production process of the drug "Flokalin" and determination of its optimal effective dose for the treatment of heart diseases. *Sci and innov.* 2013; 9(1):55-63. [Ukrainian]

Strutynskiy R, Nescheret O, Tumanovska L, Rovenets R, Moibenko O. Cardioprotective effects of Flocalin in in vivo: influence on hemodynamics and myocardial injury under conditions of its ischemia-reperfusion *Fiz Zh.* 2009; 55(5):5-10 [Ukrainian].

Strutynskiy R, Strutynska N, Mys L, Goshovska Y, Dosenko V, Sagach V. Upregulation of KATP-channels as the mechanism of protection and vasorelaxation under the action of pyridoxal-5-phosphate in old rats. *J Card Ph Ther.* 2023; 2:9742.

Suga H. Ventricular energetics. *Physiol Rev.* 1990; 70(2):247-77.

Sunagawa K, Maugham W, Sagawa K. Optimal arterial resistance for the maximal stroke work studied in isolated canine left ventricle. *Cir Res.* 1985; 56(4):586-595.

Suzuki M, Ronald A, Miki T. Functional roles of cardiac and vascular KATP-channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res.* 2001; 88:570–577.

Szabadkai G, Duchen MR. Mitochondria: The Hub of Cellular Ca²⁺ Signaling. *Physiol.* 2008; 23(2):84-94.

Szabo I, Zoratti M. The mPTP may comprise VDAC molecules. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS Lett.* 1993; 330:201-205.

Tajeddine N. How do reactive oxygen species and calcium trigger mitochondrial membrane permeabilisation? *Biochim. Biophys. Acta* 2016; 1860:1079-1088.

Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2007; 49:330-352.

Tan G, Lou Z, Zhu S, Zhang W, Li W, Chai Y. Potential biomarkers in mouse myocardium of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *PLoS One.* 2011; 6:e27683.

- Tarr M, Helden P. Inhibition of transcription by adriamycin is a consequence of the loss of superhelicity in DNA mediated by Top II. *Mol Cell B*. 1990; 93:141-146.
- Tatuch Y, Robinson B. The mitochondrial DNA mutation associated with NARP slows the rate of ATP synthesis in isolated lymphoblast mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 192:124-128.
- Terzic A, Findlay I, Hosoya Y, Kurachi Y. *Neuron*. 1994; 12:1049-1058.
- Thimm J, Mechler A, Lin H, Lal R. Calcium-dependent conformations and interfacial energy maps of hemichannels. *J Biol Chem*. 2005; 280:10646-54.
- Thomas X, Le Q, Fiere D. Anthracycline toxicity requiring cardiac transplantation in long-term disease-free survivors with leukemia. *Ann Hematol*. 2002; 81:504-507.
- Tocchi A, Quarles K, Basisty N, Rabinovitch P. Mitochondrial dysfunction in cardiac aging. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1847(11):1424-33.
- Tokarska-Schlattner M, Wallimann T, Schlattner U. Alterations in myocardial energy metabolism induced by the doxorubicin. *C R Biol*. 2006; 329: 657-668.
- Tokarska-Schlattner M, Wallimann T, Schlattner U. Multiple interference of anthracyclines with mtCK: preferential damage of the cardiac isoenzyme and its implications for drug cardiotoxicity. *Mol Pharmacol*. 2002; 61:516-523.
- Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Wallimann T. Acute toxicity of doxorubicin: response of kinases regulating energy supply. *Am J Heart Physiol* 2005; 289:37-47.
- Tsai F, Jiang D, Zhao L, Clapham D. Functional reconstitution of the mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter. *J Gen Physiol*. 2014; 143:67-73.
- Tucker S, Gribble F, Zhao C, Trapp S. Truncation of Kir6.2 produces K_{ATP}-channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature*. 1997; 387(6629):179-183.
- Upadhyay S, Bihari K, Kumar A. Doxorubicin and its effect on cardiac proteins. *J Cell Biochem*. 2021 Feb;122(2):153-165.

- Vadzyuk O. KATP-channels of muscle cells: properties and physiological role. *Bioch J.* 2014; 86(3):3-8. [Ukrainian]
- Vandenberg I, Perry D, Hill A. hERG K(+) channels: structure, function, and clinical significance. *Physiol Rev.* 2012; 92:1393-478.
- VanSchouwen B, Melacini G. Regulation of HCN Ion Channels by Non-canonical Cyclic Nucleotides. *Exp Pharmacol.* 2017; 238:123-133.
- Vasquez-Vivar, Hogg N, Masters B. eNOS-depend superoxide generation from adriamycin. *Bioch.* 1997; 36: 11293-7.
- Vela D. Keeping Heart Homeostasis in Check through the Balance of Iron Metabolism. *Acta Physiol.* 2020; 228:e13324.
- Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Energy metabolism in heart failure *J Phys.* 2003; 555 (1):1-13.
- Villani F, Meazza R, Materazzo C. Monitoring of cardiohemodynamic parameters in doxorubicin-treated patients. *Anticancer Res.* 2006;26:797-801.
- Voitychuk O, Strutynskyi R, Moibenko O, Shuba Y. KATP channels as a target for the cardioprotective effects of the flocalin. *Br J Pharmacol.* 2011; 162(3):701-711.
- Volkova M, Russell R. Anthracycline cardiotoxicity. *C Card Rev.* 2011; 7:214-20.
- Wallace K, Sardão V, Oliveira P. Mitochondrial Mechanisms of Doxorubicin Cardiotoxicity. *Circ Res.* 2020; 126(7):926-941.
- Wallace K. Dox-induced cardiac mitochondrionopathy. *Ph Tox.* 2003; 93:105-115.
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K. Intracellular compartmentation, structure and function of CK in tissues with energy demand. *Bio J.* 1992;281:21-40.
- Wang W, Fang H, Groom L, Cheng A, Li K, Zheng, M, et al. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell.* 2008; 134:279-290.
- Wei M, Zong W, Cheng E, Lindsten T. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292:727-730.

- Weibel ER. Morphometry of human lungs. *Medicine*. 1970;170-2
- Weinstein D, Mihm M, Bauer J. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction after doxorubicin treatment in mice. *J Ph Exp Ther*2000; 294:396-401.
- Weiss L, Frederiksen J, Weisfeldt M. Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure. *J Clin Invest*. 1976; 58(3):751-60.
- Weiss RB. Will we ever find a better doxorubicin? *Sem Oncol*. 1992;19:670-686.
- Wellenius G, Batalh J, Diaz E, Verrier L. Cardiac effects of carbon monoxide and ambient particles in a rat model of myocardial infarction. *Tox Sci*. 2004; 80:367-76.
- Whelan R, Wei C, Chen C. Bax regulates primary necrosis through mitochondrial dynamics. *Pr Acad Sci*. 2012; 109:6566-71.
- Wilde A, Escande D, Schumacher C. Potassium accumulation in the globally ischemic mammalian heart: a role for the KATP-channel. *Circ Res*. 1991; 67:83543.
- Wolf M, Baynes W. The anti-cancer drug, doxorubicin, causes oxidant stress-induced endothelial dysfunction. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1760:267-271.
- Woodfield K, Ruck A, Halestrap P. Direct demonstration of a interaction between Cyp-D and the ANT confirms their role in the mPTP. *Bioch J*.1998; 336:287-290.
- Wu D, Hu Q, Xiong Y, Zhu Y. Novel H₂S-NO hybrid molecule (ZYZ-803) promoted synergistic effects against heart failure. *Redox Biol*. 2018; 15:243-252.
- Wu Y, Anderson M. CaMKII in sinoatrial node physiology and dysfunction. *Front Pharmacol*. 2014; 5:48.
- Xia J, Accili E. Regulation of sinoatrial funny channels by cyclic nucleotides. *BioMol Biol*. 2021; 166:12-21.
- Xu H, Wu J, Cui N, Abdulkadir L. Requirement of multiple protein domains for gating KATP-channels by intracellular pH. *JBC*.2001; 276:38690-96.
- Yamanaka S, Tatsumi T, Keira N. Amlodipine Inhibits Doxorubicin-Induced Apoptosis in Neonatal Rat Cardiac Myocytes. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41:870-878.

- Yang Y, Teves SS, Kemp C, Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1845(1):84-89.
- Yang Y, Zhang H, Li X, Yang T, Jiang Q, Zhou S, et al. Effects of PPAR α /PGC-1 α on the energy metabolism and apoptosis in the doxorubicin induced mice cardiomyocytes. *Int J Clin Exp Path*. 2015; 8:12216-24.
- Yellon D, Downey J. Preconditioning the myocardium. *Ph Rev*. 2003; 83:1113-51.
- Yoda Y, Nakazawa M, Abe T. Prevention of doxorubicin myocardial toxicity in mice by reduced glutathione. *Can Res*. 1986; 46:2551-56.
- Yoshida K. ER stress response, peroxisome proliferation, mitochondrial unfolded protein response and Golgi stress response *IUBMB Life*. 2009; 61(9):871-9.
- Yu X, Ruan Y, Huang X, Chen B. Dexrazoxane ameliorates doxorubicin cardio toxicity by inhibiting apoptosis and necroptosis. *BiochRes Com*. 2020; 523:140-146.
- Yu X, Yang R, Tao S, Qiu Q. Dexrazoxane Protects Myocyte from Doxorubicin-Induced Apoptosis by Modulating miR-17-5p. *Biomed Res Int*. 2020; 1:5107193.
- Zajko K, Bron P, Orons K. Phase II study of Spherex in conjunction with doxorubicin and cisplatin in the treatment of carcinoma. *Sem Onc*. 1997; 24: 96-99.
- Zare M, Rakhshan K, Naderi N. Apigenin attenuates doxorubicin induced cardiotoxicity, reducing oxidative stress and apoptosis in rats. *L Sci*. 2019; 232:23.
- Zareba W, Nomura A, Couderc P. Cardiovascular effects of air pollution: What to measure in ECG? *Environ Health Perspect*. 2001; 109:533–538.
- Zhang S, Chen Z, Lu D, Ge J. Overexpression of COX5A Protects H9c2 Cells against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Bioch Bioph Res Com*. 2020; 524:43-49.
- Zhang S, Ma C, Liu C, Wei F. Luteolin attenuates doxorubicin-induced cardio toxicity by modulating the PHLPP1/AKT/Bcl-2 pathway. *Peerj*. 2020; 8:e8845.
- Zhang S, Meng T, Zhang J. Cardioprotective effects of dexrazoxane on cardio toxicity induced by anthracycline associated with calpain-2. *Med*. 2015; 94(4):e445.

- Zhang X, Liu X, Lu L, Lyu X. Identification of the Molecular Basis of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Nat Med*. 2012; 18:1639-1642.
- Zhang Y, Shi J, Li Y, Wei L. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2009; 57: 435-45.
- Zhao X, Alexander J, Zhang S, Zhu Y, Aw T. Redox regulation of endothelial barrier integrity. *Cell Mol Physiol*. 2001; 281: 879-86.
- Zhao X, Ding X, Zhang X, Xu B. Use of liposomal doxorubicin for adjuvant chemotherapy of breast cancer in clinic. *Univ Sci B*. 2017; 18(1):15-26.
- Zheng F, Chen W, Qin T, Lv L. ACOX1 destabilizes p73 to suppress apoptosis and regulates sensitivity to doxorubicin in lymphoma. *BMB Rep*. 2019; 52(9):566-571.
- Zhou S, He H, Tanaka O, Kawahara K. Different localization of ATP sensitive K⁺ channel subunits in rat testis. *Anat Rec*. 2011 Apr; 294(4):729-37.
- Zhou S, Heller L, Wallace K. Interference with Ca-dependent mitochondrial bioenergetics in myocytes from doxorubicintreated rats. *ToxPh*. 2001;175:60-67.
- Zhou S, Starkov A, Froberg K, Wallace K. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Can Res*. 2001; 61:771-777.
- Zhu H, Sun A. Programmed necrosis in heart disease: molecular mechanisms and clinical implications. *J Mol Cell Cardiol*. 2018; 116:125-134.
- Zingman L, Hodgson D, Alekseev A, Terzic A. Stress without distress: homeostatic role for KATP channels. *Mol Psychiatry*. 2003; 8(3):253-4.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014; 94(3):909-50.
- Zupanets, Cherniha. Handbook of drug equivalence. *Ph Prakt*. 2020; 1:134-156 [Ukrainian]

ДОДАТОК 1

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ
НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. **М.В. Денисова**, Н.А. Струтинська, Л.А. Мись, Ю.П. Коркач, К.В. Розова, В.Ф. Сагач. Розвиток мітохондріальної дисфункції при гострій кардіотоксичній дії доксорубіцину у дорослих щурів. *Фізіол журн.* 2023; 69(6):3-14. *(особистий внесок здобувача: інформаційний пошук, експериментальні дослідження, опис та статистичне опрацювання результатів, графічна підготовка результатів та написання статті)*
DOI: <https://doi.org/10.15407/fz69.06.003>
2. **М.В. Денисова**, Н.А. Струтинська, Л.А. Мись, Ю.П. Коркач, О.М. Магомедов, Р.Б. Струтинський, В.Ф. Сагач. Ранні маркери гострої доксорубіциніндукованої кардіотоксичності та деякі механізми її розвитку. *Фізіол журн.* 2024; 70(1): 3-13. *(особистий внесок здобувача: інформаційний пошук, експериментальні дослідження, опис та статистичне опрацювання результатів, графічна підготовка результатів та написання статті)*
DOI: <https://doi.org/10.15407/fz70.01.003>
3. **M.V. Denysova**, N.A. Strutynska, L.A. Mys, Y.P. Korkach, V.F. Sagach, R.B. Strutynskiy. Activation of ATP-sensitive potassium channels prevents doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction in the heart and impaired vascular responses in rats. *Fiziol Zh.* 2024; 70(2): 3-11. *(особистий внесок здобувача: інформаційний пошук, експериментальні дослідження, опис та статистичне опрацювання результатів, графічна підготовка результатів та написання статті)*
DOI: <https://doi.org/10.15407/fz70.02.003>

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ:

Тези доповідей:

1. **M.V. Denysova**, N.A. Strutynska, V.F. Sagach. Administration of doxorubicin increases the sensitivity of the mPTP to calcium and causes pathological changes in the ECG. Heart Failure 2023 & 10th World Congress on Acute Heart Failure, 20-23 May, 2023, Prague, Czechia, European Journal of Heart Failure. 2023;25(Suppl. S2).
2. **Денисова М.В.**, Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. ЕКГ як метод ранньої діагностики гострої доксорубіциніндукованої кардіотоксичності у щурів. XI науково-практична конференція «European Scientific Congress», 27-29.11.2023, Харків, Україна, Збірник наукових матеріалів конференції ISBN 978-84-15927-34-1 (С. 59).
3. **Денисова М.В.**, Розова К.В., Сагач В.Ф. Порівняльне ультраструктурне дослідження тканини міокарда щурів після введення різних доз доксорубіцину. X Міжнародна науково-практична конференція «Modern Problems of Science, Education and Society», 4-6.12.2023, Київ, Україна, Збірник наукових матеріалів ISBN 978-966-8219-87-0 (С. 201).
4. **Денисова М.В.**, Магомедов О.М., Сагач В.Ф. Вплив доксорубіцину на активність внутрішньоклітинних ензимів кардіоміоцитів та вміст глюкози у плазмі щурів. СXXXVI Міжнародна науково-практична конференція «Зимові наукові читання – 2023», 22.12.2023, Київ, Україна, Збірник наукових матеріалів конференції «Наука і практика» ISBN 978-1-6497-6221-4 (С. 72).
5. **Денисова М.В.**, Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Оксидативно-нітрозативний стрес як основний механізм розвитку доксорубіциніндукованої кардіотоксичності. XI Міжнародна науково-практична конференція «Modern Problems of Science, Education and Society», 8-10.01.2024, Київ,

Україна, Збірник наукових матеріалів конференції ISBN 978-966-8219-87-0 (С. 152).

6. **Денисова М.В.**, Струтинський Р.Б., Сагач В.Ф. Вплив активації K_{ATP} -каналів на електрокардіографічні та біохімічні маркери гострої доксорубіциніндукованої кардіотоксичності. Науково-практична конференція «Актуальні питання сучасної науки: історія, теорія, практика», 19.01.2024, Харків, Україна, Мультидисциплінарний науковий часопис «Нотатки сучасної науки» ISSN 2786-6777. 2024; 11(1):109-112.
7. **Денисова М.В.**, Коркач Ю.П., Струтинська Н.А., Струтинський Р.Б., Сагач В.Ф. Мітопротекторні ефекти активатора K_{ATP} -каналів при доксорубіциніндукованому пошкодженні серця. СХХХVII Міжнародна науково-практична конференція «Розвиток науки та техніки: виклики 2024 року», 19.01.2024, Чернівці, Україна, Збірник наукових матеріалів конференції «Наука і практика» ISBN 978-1-6497-6221-4 (С.91).
8. **Денисова М.В.**, Розова К.В., Сагач В.Ф. Вплив активації ATP -чутливих калієвих каналів на ультраструктуру кардіоміоцитів та кардіогемодинаміку щурів, ушкоджених доксорубіцином. Науково-практична конференція «Актуальні питання сучасної науки: історія, теорія, практика», 20.02.2024, Харків, Україна, Мультидисциплінарний науковий часопис «Нотатки сучасної науки» ISSN 2786-6777. 2024; 13(3):74-76.
9. **M.V. Denysova**, Y.P. Korkach, N.A. Strutynska, V.F. Sagach. Doxorubicin leads to increased oxidative stress and opening of the calcium-induced mPTP. Heart Failure 2024 & 11th World Congress on Acute Heart Failure (11-14 May, 2024, Lisbon, Portugal, European Journal of Heart Failure).