

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 препарата 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 ендогенного 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,

ізолюваних 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 H₂S та активність sNOS залишаються на рівні контрольних значень, а чутливість МП до індуктора та амплітуда набухання мітохондрій, ізолюваних 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 ізолюваних судинних препаратах аорти щурів після введення доксорубіцину продемонстрована значна дисфункція, що проявляється зменшенням у 1,8 рази ендотелійзалежної 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 мікрокатетера 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

систоличної 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 endothelium-dependent 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 H_2S 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; K_{ATP} channels; oxidative stress; mitochondria; permeability transition pore; calcium sensitivity; endothelium-dependent 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. **М.В. Denysova**, N.A. Strutynska, L.A. Mys, Y.P. Korkach, V.F. Sagach, R.B. Strutynskyi. 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. **М.В. 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. 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 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).