

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Marko S. Vasić

**VARIJABILITET SRČANE
FREKVENCije I EKSPRESIJA
β-ADRENERGIČKIH RECEPTORA U
KARDIOMIOPATIJI IZAZVANOJ
DOKSORUBICINOM**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
BELGRADE SCHOOL OF MEDICINE**

Marko S. Vasić

**HEART RATE VARIABILITY AND
β-ADRENERGIC RECEPTOR GENE
EXPRESSION IN DOXORUBICIN-
INDUCED CARDIOMYOPATHY**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019.

Mentor:

Prof. dr Nina Japundžić Žigon, Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

1. Prof. dr Vera Pravica, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Silvio De Luka, vanredni profesor, Institut za patološku fiziologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dragana Bajić, Katedra za telekomunikacije i obradu signala, Fakultet tehničkih nauka, Univerziteta u Novom Sadu

Datum odbrane: _____

*Mojim roditeljima, Ljiljani i Slobodanu Vasiću,
dvama postojanim bastionima podrške i trpnje,
posvećujem ovaj trud.*

VARIJABILITET SRČANE FREKVENCije I EKSPRESIJA β -ADRENERGIČKIH RECEPTORA U KARDIOMIOPATIJI IZAZVANOJ DOKSORUBICINOM

Rezime

Antraciklinski antibiotik doksorubicin pokazao se u višedecenijskoj kliničkoj praksi kao efikasan lek u terapiji brojnih maligniteta. Međutim, njegovu primenu ozbiljno sprečava pojava organske, a posebno srčane toksičnosti. Doksorubicinska kardiomiopatija razvija se najranije 30 dana, a nekada i nakon više godina od terapije doksorubicinom, rezistentna je na postojeću terapiju i ima veliku stopu smrtnosti. Premda su mehanizmi doksorubicinske kardiomiopatije dobro izučeni, još uvek ne postoje efikasna prevencija ni terapija. Zato je primena doksorubicina u kliničkoj praksi prihvatljiva samo uz stalni monitoring rada srca. U kardiološkoj praksi, varijabilitet srčane frekvencije (HRV) i senzitivnost arterijskog baroreceptorskog refleksa (sBRS) koriste se u prognostičke svrhe kod hipertenzije i ishemijske bolesti srca. U ovom radu ispitivani su dijagnostički i prognostički značaj HRV i sBRS za ranō otkrivanje kardiomiopatije prouzrokovane doksorubicinom i upoređivanje sa standardnim metodama – ehokardiografijom i serumskim markerima oštećenja kardiomiocita – srčanim troponinima. S obzirom na to da je uloga β -adrenergičkih receptora (β -AR) u nastanku srčane slabosti dobro poznata, pratili smo i ekspresiju srčanih β 1- i β 2-AR kod pacova tretiranih doksorubicinom, i poredili sa promenama HRV. Eksperimenti su izvedeni na odraslim mužjacima pacova Wistar soja, kojima je u femoralnu arteriju plasiran polietilenski kateter za registrovanje hemodinamskih parametara i uzorkovanje krvi. Eksperimentalnoj (DOX, n = 50) grupi, aplikovan je doksorubicin u kumulativnoj dozi od 15 mg/kg. Kontrolnoj grupi (CONT, n = 18) aplikovan je fiziološki rastvor u istoj zapremini. Procenjivana je opšta toksičnost doksorubicina i praćeni su hemodinamski ehokardiografski parametri: pre tretmana, 35. dana (DOX35) i 70. dana (DOX70) nakon aplikacije doksorubicina. HRV analiziran je upotrebom nekoliko metoda: spektralne analize (Hilbert-Huangova transformacija), Poenkareovih dijagrama, aproksimativne entropije i entropije

uzorka. Evaluacija sBRS vršena je metodom sekvenci. Serumske koncentracije srčanog troponina T i I merene su ECLIA metodom. Relativna ekspresija iRNK β 1- i β 2-AR evaluirana je RT-qPCR metodom. Pacovi tretirani doksorubicinom bili su teškog opšteg stanja: kahektični, adinamični, nakostrešene dlake, sa crvenim krugovima oko očiju, i imali veliku stopu smrtnosti. U DOX35 grupi nije bilo ehokardiografskih znakova dekompenzacije, niti povećanja serumske koncentracije srčanih troponina, ali su zabeleženi: porast HRV (posebno niskofrekventne komponente), smanjenje entropije HR i povećanje sBRS. Patohistološki nalaz u srcu pacova u DOX35 grupi bio je karakterističan: vakuolarna degeneracija kardiomiocita, nekroza kontraktilnih vlakana i intersticijska infiltracija polimorfonuklearima. U ovoj grupi, ekspresija β 1-AR bila je značajno povećana u odnosu na kontrolu. U DOX70 grupi pacova, ehokardiografski pregled otkrio je znake srčane dekompenzacije, serumski nivo toponina T bio je povišen, HRV je bio nepromenjen, sBRS je i dalje bila povećana a varijabilitet krvnog pritiska (BPV) bio je smanjen. Kod ovih pacova nisu detektovane promene ekspresije gena za β 1- i β 2-AR. Rezultati studije ukazuju da su HRV i sBRS, u odnosu na ehokardiografiju i serumske troponine, osetljivije metode za ranō otkrivanje doksorubicinske kardiomiopatije. Nakon razvoja srčane dekompenzacije, promene BPV imaju loš prognostički značaj.

Ključne reči: doksorubicin, varijabilitet srčane frekvence, senzitivnost barorefleksa, ekspresija β -adrenergičkih receptora

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

HEART RATE VARIABILITY AND β -ADRENERGIC RECEPTOR GENE EXPRESSION IN DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOMYOPATHY

Abstract

Anthracycline antibiotic doxorubicin, used in clinical practice for several decades, has been shown as effective antineoplastic drug. Unfortunately, its usage is hindered due to multiple organotoxicity and especially cardiac toxicity. Doxorubicin-induced cardiomyopathy may develop 30 days, or even several years after following treatment. It is resistant to treatment, and has very high mortality rate. Although the mechanisms of doxorubicin-induced cardiomyopathy are well studied, there are still no effective treatment and prevention. Hence, the usage of doxorubicin in clinical practice is acceptable merely under close monitoring of cardiac function. In cardiology practice, heart rate variability (HRV) and baroreflex sensitivity (sBRS) are used as prognostic markers in hypertension and ischemic heart disease. Herein, we evaluated and compared diagnostic and prognostic values of HRV and sBRS in doxorubicin-induced cardiomyopathy to standard echocardiographic and serum cardiac troponin T and I methods. In addition, considering the pathophysiological role of β -adrenergic receptors (β -AR) in heart failure, we scrutinised the expression of β 1- and β 2-AR in doxorubicin-induced cardiomyopathy and its association to HRV changes. Experiments were performed on adult male Wistar rats, replete with femoral arterial catheter for blood pressure recording and blood sampling. Doxorubicin (DOX, n = 50) or saline (CONT, n = 18) were applied to rats in cumulative dose of 15 mg/kg (i.p.). General toxicity, cardiovascular hemodynamics and echocardiography were assessed before treatment, 35 days and 70 days after treatment. HRV and blood pressure variability (BPV) were evaluated by several methods (Hilbert-Huang frequency analysis, Poincaré plots, approximate entropy and sample entropy). The sequence method was used to evaluate sBRS. Levels of cardiac troponin T and I were measured by ECLIA method. β 1-AR and β 2-AR gene expression was measured by RT-qPCR. Doxorubicin-treated rats exhibited poor

general condition (cachexia, adynamia, ruffled fur and chromodacryorrhea) and high mortality rate. In DOX35 rats, no echocardiographic signs of cardiac decompensation were noted, and cardiac troponins were not detected in the serum. However, HRV and sBRS were increased, while HR complexity was decreased. Pathohistology revealed vacuolar degeneration of cardiomyocytes, contraction-band necrosis, and polymorphonuclear infiltration. In these rats, increased β 1-AR gene expression was detected. In DOX70 rats, there were clear signs of cardiac decompensation at echocardiography, and cardiac troponin T was detected in the blood sera. In these rats, HRV was unchanged, sBRS increased, and β 1-AR and β 2-AR gene expression unaffected. It follows that HRV and sBRS are more sensitive tools in detection of cardiovascular toxicity in compensate forms of doxorubicin-induced cardiomyopathy, than conventional echocardiography and serum cardiac troponins. In decompensated forms of doxorubicin-induced cardiomyopathy, reduction of BPV predicted lethal outcome.

Keywords: doxorubicin, heart rate variability, baroreflex sensitivity, β -adrenergic receptor expression

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Molecular medicine

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. DOKSORUBICIN: POREKLO, HEMIJSKA STRUKTURA I MEHANIZAM CITOTOKSIČNOG DEJSTVA.....	1
1.2. MOLEKULARNI MEHANIZMI NASTANKA DOKSORUBICINSKE KARDIOMIOPATIJE.....	4
1.2.1. Oksidativni stres	4
1.2.1.1. Formiranje reaktivnih kiseoničnih jedinjenja u mitohondrijama	4
1.2.1.2. Formiranje reaktivnih azotnih jedinjenja u mitohondrijama	6
1.2.1.3. Interakcija doksorubicina i jona gvožđa.....	6
1.2.2. Poremećaj prometa unutarćelijskog kalcijuma	8
1.2.3. Ćelijska smrt.....	9
1.2.4. Preoblikovanje vanćelijskog matriksa i fibroza izazvana doksorubicinom.....	11
1.3. KARDIOTOKSIČNOST LIPOZOMALNOG DOKSORUBICINA.....	12
1.4. ULOGA β -ADRENERGIČKIH RECEPTORA U NASTANKU SRČANE INSUFICIJENCIJE.....	13
1.4.1. Beta-adrenergička signalizacija u zdravom srcu	13
1.4.2. Beta-adrenergička signalizacija u insuficijentnom srcu.....	16
1.5. TERAPIJA I PREVENCIJA KARDIOTOKSIČNOSTI	18
1.6. RANO OTKRIVANJE TOKSIČNIH PROMENA NA MIOKARDU	20
1.6.1. Ehokardiografski parametri.....	20
1.6.2. Serumski markeri – srčani troponini i natriuretički peptidi	22

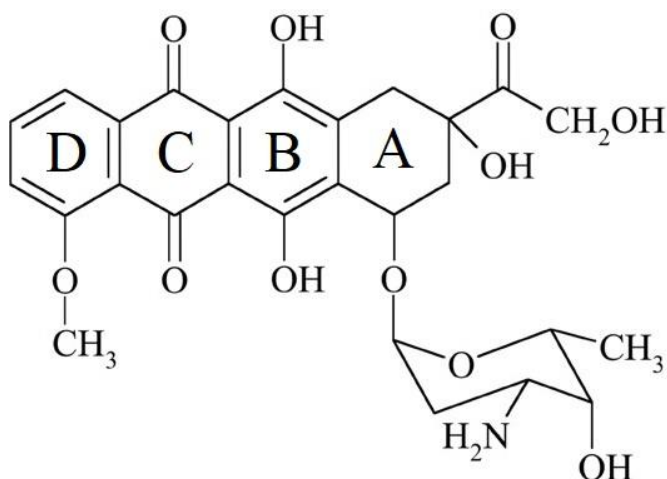
1.6.3. Ostale kliničke metode za otkrivanje toksičnih promena na miokardu	23
1.7. PROGNOŠTIČKI I DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJ VARIJABILITETA SRČANE FREKVENCije I SENZITIVNOSTI BAROREFLEKSA U SRČANOJ INSUFICIJENCIJI.....	24
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	26
3. MATERIJAL I METODE	27
3.1. Eksperimentalne životinje	27
3.2. Razvijanje modela kardiomiopatije izazvane doksorubicinom.....	28
3.3. Procena opšte toksičnosti	28
3.4. Ehokardiografija	29
3.5. Hirurška procedura implantacije arterijskog katetera za registrovanje hemodinamskih parametara.....	31
3.6. Registrovanje i obrada hemodinamskih parametara.....	33
3.6.1. Linearne metode obrade hemodinamskih parametara u vremenskom i frekvencijalnom domenu	34
3.6.1.1. Raspodela frekvencija u vremenskoj skali – Hilbert-Huangova transformacija.....	34
3.6.2. Nelinearne metode obrade hemodinamskih parametara	36
3.6.2.1. Poenkareovi dijagrami	36
3.6.2.2. Aproksimativna entropija i entropija uzorka	38
3.6.3. Evaluacija senzitivnosti spontanog barorefleksa metodom sekvenci....	40
3.7. Biohemijski markeri oštećenja kardiomiocita pod uticajem doksorubicina ...	41
3.8. Patohistološka analiza	41
3.9. Genska ekspresija srčanih $\beta 1$ i $\beta 2$ adrenergičkih receptora	41
3.10. Korišćene supstance	42
3.11. Statistička analiza	43

4. REZULTATI	44
4.1. Opšta toksičnost doksorubicina	44
4.2. Morfološke i funkcionalne promene srca izazvane doksorubicinom	45
4.3. Promene sistolnog i dijastolnog pritiska, srčane frekvence i varijabiliteta srčane frekvence izazvane doksorubicinom	48
4.4. Dejstvo doksorubicina na spontani barorefleks	52
4.5. Biohemijski markeri oštećenja kardiomiocita pod uticajem doksorubicina ...	53
4.6. Patohistološka analiza	54
4.7. Genska ekspresija srčanih β 1 i β 2 adrenergičkih receptora	57
5. DISKUSIJA	58
6. ZAKLJUČCI	66
7. LITERATURA	68

1. UVOD

1.1. DOKSORUBICIN: POREKLO, HEMIJSKA STRUKTURA I MEHANIZAM CITOTOKSIČNOG DEJSTVA

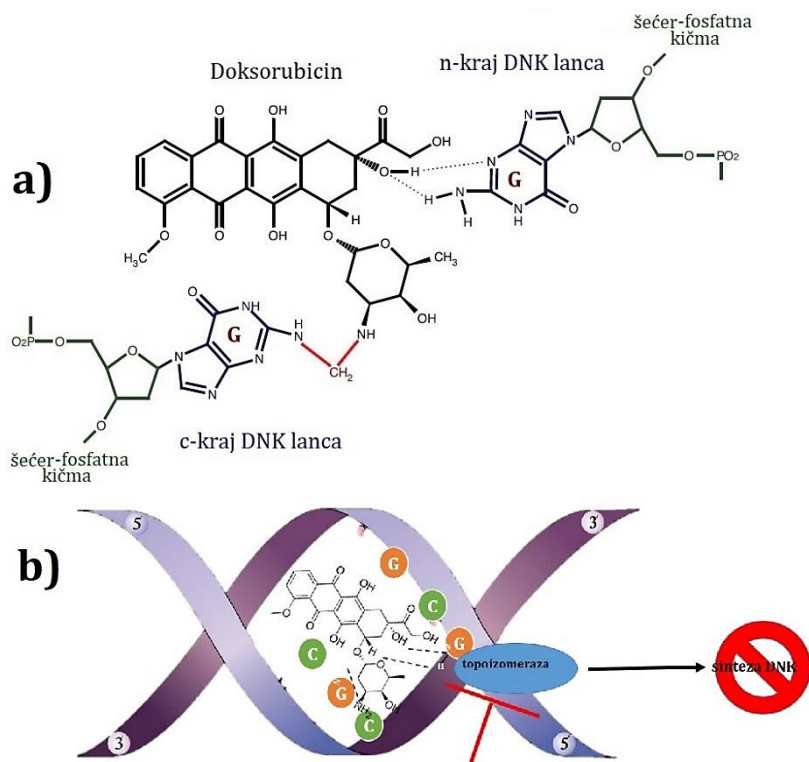
Doksorubicin (DOX) je antibiotik iz grupe antraciklina, sintetisan šezdesetih godina XX veka aerobnom fermentacijom mutiranog soja bakterije *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (Dimarco et al. 1964). Izolovala ga je farmaceutska kuća "Farmitalia Research Laboratories" i prvi put registrovala pod marketinškim nazivom *Adriamicin*[®], prema mestu otkrića (Jadransko more – engl. *Adriatic sea*). Molekul doksorubicina sačinjavaju aglikonski i ugljenohidratni segment (slika 1). Aglikonski deo čine: četiri prstena (sa hinonskim i hidrahinonskim grupama na C i B prstenovima); metoksi supstituent (na C4 atomu D prstena) i kratak lanac sa karbonilnom grupom (na C9 atomu A prstena). Ugljenohidratnu komponentu predstavlja dezoksi-amino-heksozni šećer daunozamin, koji je za C7 atom A prstena doksorubicina vezan glikozidnom vezom.



Slika 1: Strukturna formula doksorubicina

Spada u grupu citotoksičnih lekova koji nespecifično utiču na ćelijski ciklus (engl. *cell cycle-nonspecific agents* – CCNS). Njegov molekul interaguje sa: jedrom, mitohondrijama i biološkim membranama tumorskih i zdravih ćelija. Posедуje i hidrofilne i hidrofobne regione, što mu omogućava da se vezuje za proteine plazme i pasivnom difuzijom prođe kroz plazma-membranu. U citoplazmi se vezuje za proteazom 20S, nakon čega se, kroz jedarne pore, translocira u jedro, odvoji od proteazoma i veže za DNK (Hilmer et al. 2004). Amfoteran je molekul, te lako prodire u različite ćelijske odeljke (Goldžijev kompleks, lizosome i mitohondrije) (Lal et al. 2010). Njegovi antineoplastični mehanizmi dejstva su: inhibicija topoizomeraza, interkalacija sa molekulom DNK (i inhibicija replikacije i transkripcije), geneza semihinonskih slobodnih kiseoničnih i azotnih radikala, vezivanje za ćelijske membrane i menjanje jonskog transporta (Hortobágyi 1997). Ovi efekti dovode do zastoja u ćelijskom ciklusu, uvode tumorske ćelije u apoptozu i smanjuju obim tumorskog tkiva.

Doksorubicin se sa podjednakim afinitetom vezuje za II α i II β izoformu topoizomeraze u jedru i mitohondrijama (Swift et al. 2008). Topoizomeraza se vezuje za molekul DNK i oslobađa *replikativnu viljušku* od tenzije uvrtnanja navoja heliksa. Nakon otvaranja petlje DNK, daunozaminska komponenta doksorubicina formira kovalentnu vezu sa 2-NH₂ grupom na guaninu u okviru C-kraja jednog lanca (crveno obojena CH₂- grupa na slici 2a), a čitav kompleks se stabilizuje vodoničnim vezama oformljenim između prstena A doksorubicina i guanina na N-kraju komplementarnog lanca DNK (Cutts & Phillips 1995). Stabilan kompleks između doksorubicina i guanina blokira dalju aktivnost topoizomeraza, šireći prostor između dva lanca DNK i, sledstveno, onemogućavajući dalji tok replikacije DNK (slika 2b) (Nitiss 2009). Na taj način, doksorubicin ostvaruje svoj citotoksični efekat.



Slika 2: a) Formiranje kovalentnih i vodoničnih veza doksorubicina sa guaninom (G)
 b) inhibicija topolizomeraza i dalje replikacije i transkripcije DNK

Efikasnost doksorubicina u terapiji: mekotkivnih sarkoma, rabdiosarkoma, tumora jajnika, mlečne žlezde, testisa, štitne žlezde, pluća i jetre, Hodgkin i non-Hodgkin limfoma i leukemije (Bonadonna et al. 1969) ograničava njegova organotoksičnost (Singal & Iliskovic 1998; Carvalho et al. 2009). Najletalnija je kardiotoksičnost. Akutna kardiotoksičnost se u incidenci od 11% (Takemura & Fujiwara 2007) javlja neposredno po aplikaciji doksorubicina. Karakterišu je tipične ishemijske promene na EKG-u. Reverzibilne je prirode i prognoza je dobra (Torti et al. 1986). Retko može da poprimi subakutni tok, kada se manifestuje miokarditisom (Bristow 1982). Najteži oblik oštećenja je kasna kardiotoksičnost, koja prelazi u hroničnu srčanu slabost. Incidenca hronične kardiotoksičnosti iznosi 1,7% (Von Hoff 1979). Može nastati najranije 30 dana nakon terapije, ali i mnogo godina kasnije. Prognoza kod pacijenata koji razviju zastoju srčanu slabost je loša, jer nema efikasne terapije, a stopa smrtnosti je veća od 50% već u prvoj godini (Von Hoff 1979).

1.2. MOLEKULARNI MEHANIZMI NASTANKA DOKSORUBICINSKE KARDIOMIOPATIJE

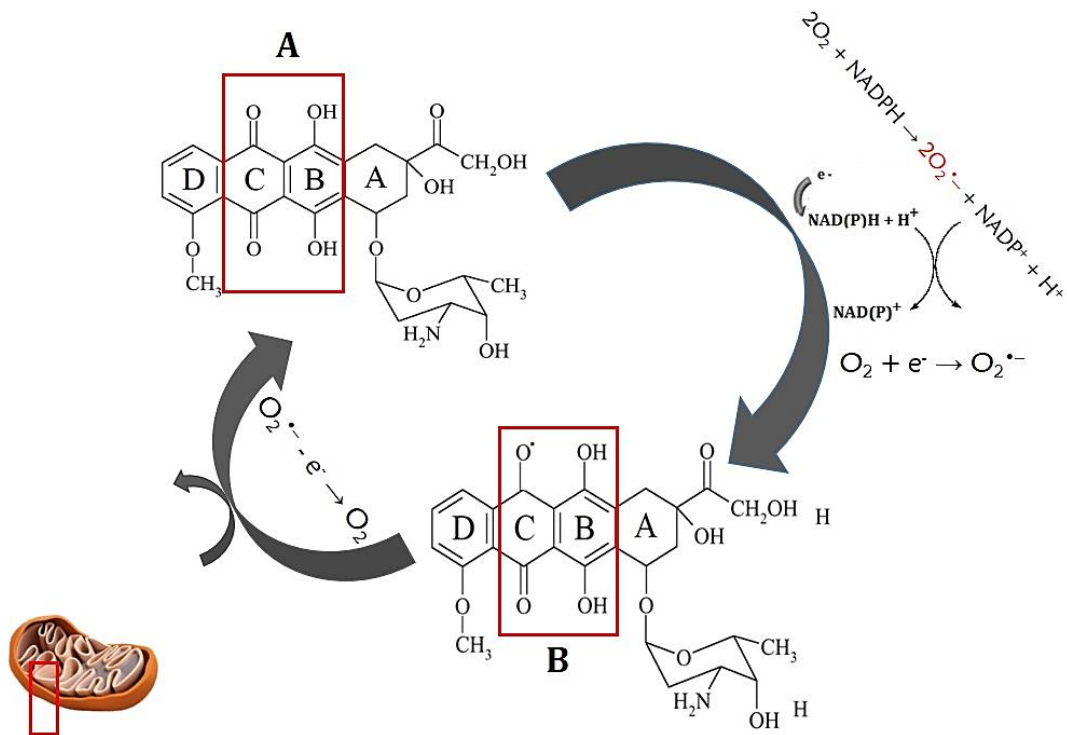
Doksorubicin oštećuje kardiomiocite na više načina, uključujući: genezu slobodnih kiseoničnih i azotnih radikala (oksidativni stres), poremećaj metabolizma kalcijuma, formiranje kompleksa sa gvožđem i oštećenjem mitohondrija. U zavisnosti od dominirajućeg mehanizma u određenoj ćeliji, može izazvati različite forme ćelijske smrti: apoptozu, nekrozu i autofagiju (Damiani et al. 2016).

1.2.1. Oksidativni stres

Povišeni nivo reaktivnih kiseoničnih (engl. *Reactive Oxygen Species* – ROS) i azotnih jedinjenja (engl. *Reactive Nitrogen Species* – RNS) koji dovodi do oštećenja ćelije i menja njenu osetljivost označava se kao *oksidativni stres*. Nastaje kada se u ćeliji poremeti ravnoteža između sinteze ROS/RNS i koncentracije antioksidanasa u korist prve komponente. ROS, dalje, aktiviraju enzime metaloproteinaze matriksa (MMP) i preko NF- κ B utiču na razgradnju i preoblikovanje vanćelijskog matriksa (Mann & Spinale 1998a).

1.2.1.1. Formiranje reaktivnih kiseoničnih jedinjenja u mitohondrijama

Kao jedan od glavnih mehanizama za genezu ROS pod uticajem doksorubicina, Carvalho i sar. (Carvalho et al. 2014) navode formiranje semihinonskih derivata u toku metabolizma antraciklina. Enzimi iz mitohondrija, a pre svih NADPH oksidaza (Zhao et al. 2010), redukuju jedan od elektrona iz hinonske grupe na C prstenu doksorubicina, prevodeći ga u semihinon (slika 3) (Berlin & Haseltine 1981). Semihinon može da se veže za kiseonik i tako formira superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$). Od ovog reaktivnog jedinjenja kiseonika moguće je da se sintetišu ostala reaktivna jedinjenja kiseonika, kao što su vodonik-peroksid (H_2O_2) i hidroksil-radikal (OH^{\cdot}) (Ide et al. 2000).



Slika 3: Oksido-redukциони (redoks) ciklus prevođenja hinona (A) u semihinon (B) na C-prstenu doksorubicina na unutrašnjoj membrani mitohondrija

Srčani mišić (u odnosu na jetru i bubrege) ima smanjenu ekspresiju antioksidantnih enzima (Halliwell & Gutteridge 1984) (kao što su superoksid dizmutaza – SOD, katalaza i glutation peroksidaza – GPx). Usled ovog nedostatka, ali i zbog povećane potrebe srčanog mišića za energijom, u kardiomiocitima je pojačana sekvestracija ROS ali i RNS (Costa et al. 2013). Kod kardiotoksičnosti izazvane doksorubicinom, mitohondrije bivaju oštećene među prvim ćelijskim komponentama (Wallace 2007; Berthiaume & Wallace 2007), jer doksorubicin interaguje sa cirkularnom mitohondrijskom DNK (mtDNK) (Ashley & Poulton 2009) ali i sa kardiolipinom (fosfolipidnom komponentom unutrašnje membrane mitohondrija), indukujući oštećenje komponenata respiratornog lanca i poremećaj ćelijskog disanja (Patterson & Willis 2012; Palmeira et al. 1997).

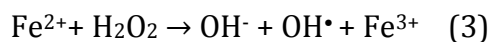
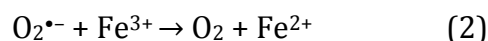
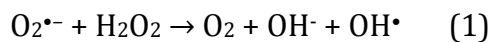
1.2.1.2. Formiranje reaktivnih azotnih jedinjenja u mitohondrijama

Kardiomiociti i endotelne ćelije konstitutivno eksprimiraju dve različite izoforme enzima azot-oksida sintaze: neuronalnu NO sintazu (nNOS) i endotelijalnu NO sintazu (eNOS). Treća izoforma – inducibilna NO sintaza (iNOS), čija se aktivnost povećava putem različitih supstrata, dovodi se u vezu sa razvojem različitih patoloških procesa na srcu (Cotton et al. 2002). Vásquez-Vivar i sar. (Vásquez-Vivar et al. 1997) dokazali su da se molekul doksorubicina vezuje direktno za domen eNOS reduktaze, inicirajući sintezu $O_2^{\bullet-}$. U toku terapije doksorubicinom, povećana je ekspresija iNOS u kardiomiocitima i eNOS u endotelnim ćelijama, što izaziva nekontrolisanu sintezu NO i posledične negativne efekte. U toku nekontrolisane sinteze, NO i $O_2^{\bullet-}$ se nagomilavaju unutar ćelije, dovodeći do sinteze izrazito reaktivnog molekula peroksinitrita ($ONOO^-$) (Fogli et al. 2004). Endotelijalna azot-oksida sintaza može da poveća sintezu ROS, jer se njena ekspresija i transkripcija povećavaju u prisustvu molekula doksorubicina (Vásquez-Vivar et al. 1997; Liu et al. 2006). Vezivanje doksorubicina za domen eNOS reduktaze usmerava njenu aktivnost ka izraženijoj sekvenciji $O_2^{\bullet-}$, umesto ka NO.

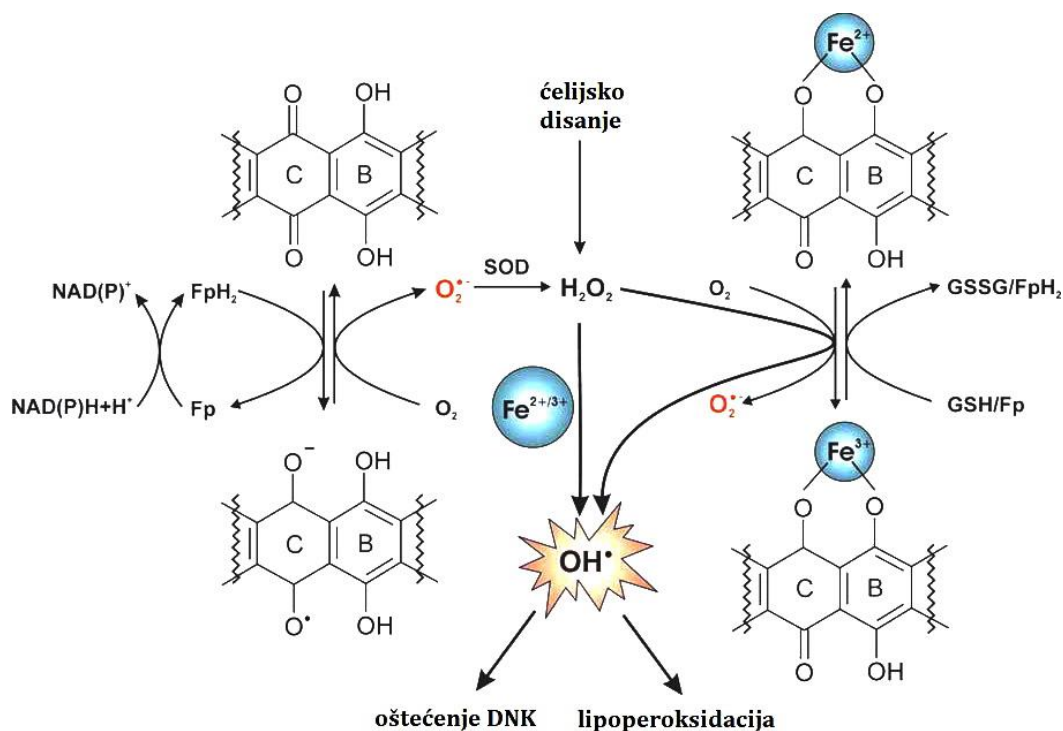
1.2.1.3. Interakcija doksorubicina i jona gvožđa

U fiziološkim uslovima, nivo slobodnih jona gvožđa u citosolu je vrlo nizak, budući da se, zbog velikog redoks potencijala, ono odlaže u vidu depoa feritina u vanćelijskim odeljcima. Thomas i Aust (Thomas & Aust 1986) pokazali su da $O_2^{\bullet-}$, koji nastaje pod uticajem doksorubicina, može da indukuje sporo oslobađanje redoks-aktivnih jona gvožđa iz feritinskih depoa. Dalja dismutacija $O_2^{\bullet-}$ u H_2O_2 može se odvijati spontano, ili uz pomoć katalizatora – enzima SOD (slika 4). U fiziološkim uslovima, vodonik peroksid je stabilan molekul, i u višku ga eliminišu enzimi katalaza i glutation peroksidaza. Međutim, u reakciji sa $O_2^{\bullet-}$ (Haber-Vajsova reakcija, jednačina br. 1), sintetiše se izuzetno reaktivan OH^{\bullet} . Haber-Vajsova reakcija se odvija vrlo sporo, osim u prisustvu metala katalizatora (naročito gvožđa) (Halliwell & Gutteridge 2007). Teče u dve faze: u prvom stupnju $O_2^{\bullet-}$ redukuje feri-jon gvožđa

(Fe^{3+}) u fero-jon (Fe^{2+}) (jednačina br. 2); u drugoj fazi se odvija Fentonova reakcija između Fe^{2+} i H_2O_2 , kada nastaje OH^\bullet (jednačina br. 3):



Hidroksil-radikal sintetisan u ovim reakcijama ima veoma kratak polu-život, izuzetno je reaktivan, opasan po ćeliju i, za razliku od $\text{O}_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 , enzimski sistem ćelije ga ne može neutralisati. Zbog toga, OH^\bullet stupa u reakciju sa svim jedinjenjima unutar ćelije koja su podložna oksidaciji, oštećujući mnoge makromolekule, uključujući: lipide (peroksidacijom), nukleinske kiseline (mutacijom) i proteine (Halliwell & Gutteridge 2007).



Slika 4: Mehanizmi formiranja ROS pod uticajem doksorubicina i gvožđa. Fe – gvožđe; $\text{O}_2^{\bullet-}$ – superoksidni radikal; SOD – superoksid dizmutaza; i H_2O_2 – vodonik peroksid; OH^\bullet – hidroksil radikal; Fp – flavoprotein, GSH/GSSH – redukovano/oksidovan glutation; Modifikovano prema Šimunek i sar. *Pharmacol Rep.* 2009

Drugi mehanizam preko kojeg gvožđe doprinosi oksidativnom stresu jeste formiranje DOX-Fe kompleksa, koje se može odigrati u prisustvu nekog redukcionog sistema ili spontano. U prisustvu redukcionog sistema, kao što su NADH-citohrom-P450 reduktaza, tiol grupe cisteina ili glutationa, DOX-Fe³⁺ se redukuje u DOX-Fe²⁺, koji reaguje sa O₂ i formira O₂^{•-} (slika 4). Superoksidni anjon se dismutira u H₂O₂ i/ili se uključuje u Haber-Vajsovu reakciju formirajući OH[•] (jednačine br. 1 i 2). Alternativnim putem, DOX-Fe²⁺ može direktno da reaguje sa H₂O₂ i sintetiše OH[•].

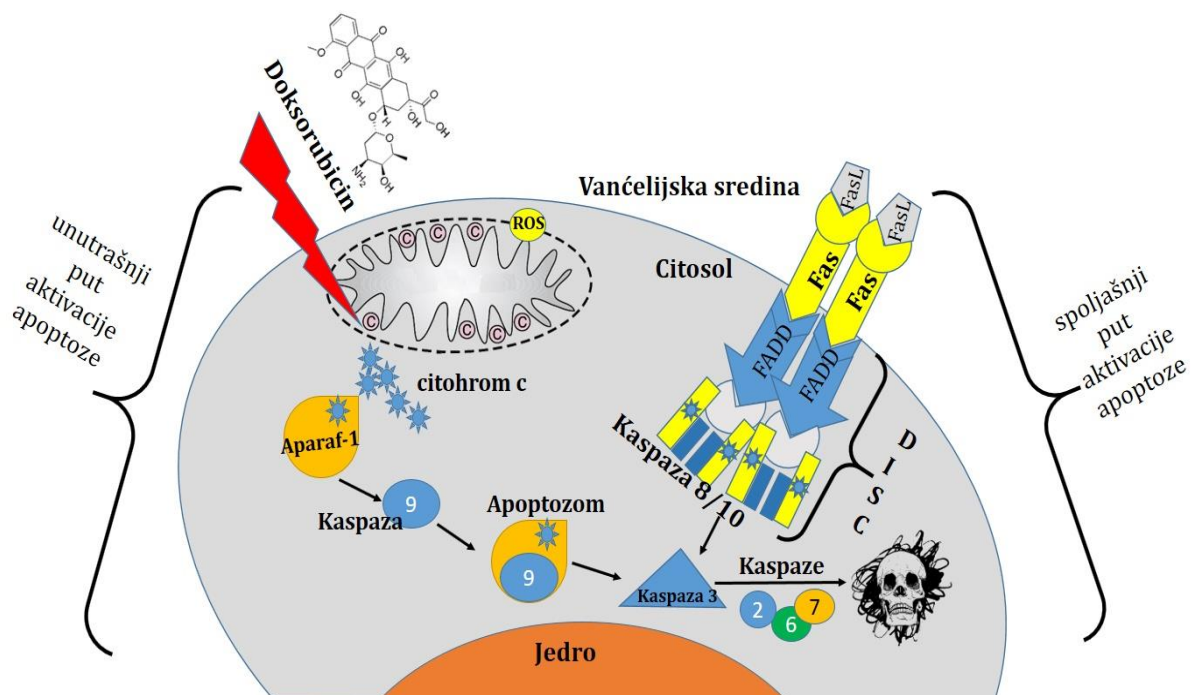
1.2.2. Poremećaj prometa unutarćelijskog kalcijuma

Koncentracija kalcijuma unutar mitohondrija ključan je regulatorni faktor sinteze ATP-a i funkcije ovih organela (Javadov et al. 2009). Poremećaj prometa unutarćelijskog kalcijuma, koji se javlja u kardiomiopatiji indukovanoj doksorubicinom, rezultat je, ali i uzrok, sinteze ROS (Kalivendi et al. 2005). ROS i H₂O₂ smanjuju nivo ekspresije iRNK SERCA2 gena (2-Ca²⁺-ATP-aza sarko(endo)plazmatičnog retikuluma – SERCA2) i RYR2 gena za rijanodinske receptore (engl. *ryanodine receptor* – RYR), što remeti promet kalcijuma, oštećuje endoplazmatski retikulum i membranu ćelije (Kourie 1998; Arai et al. 2000). Saeki i sar. (Saeki et al. 2002) su pokazali da rijanodinski receptor poseduje nekoliko mesta za koja se vezuje doksorubicin, i da se spajanje odvija bez obzira na to da li je kanal otvoren ili zatvoren. Doksorubicin modifikuje tiolne grupe (-SH) RYR2 (Zima & Blatter 2006), nakon čega kanali ovog receptora ostaju trajno otvoreni (Saeki et al. 2002), što dovodi do prezasićenja citosola jonima kalcijuma. U stanju prezasićenosti citoplazme Ca²⁺, faza mirovanja nakon kontrakcije kardiomiocita se produžava, remeteći fiziološki ciklus mišićnih ćelija srca i uvodeći ih u nekrozu (engl. *contraction band necrosis*).

1.2.3. Čelijska smrt

Geneza ROS, poremećaj ekspresije gena, oštećenje mitohondrija i promenen metabolizam Ca^{2+} dovode do smrti kardiomiocita, što predstavlja završni mehanizam kardiotoksičnosti izazvane doksorubicinom. Čelijska smrt se, u odnosu na morfologiju izmenjenih ćelija, klasifikuje na: apoptozu, nekrozu i autofagiju. Kod srčane insuficijencije izazvane doksorubicinom, sva tri tipa čelijske smrti mogu da zahvate kardiomiocite u različitim delovima miokarda.

Apoptoza je strogo kontrolisan, regulisan i energetski-zavisan tip čelijske smrti. Može se aktivirati preko spoljašnjeg ili unutrašnjeg signalnog puta (slika 5). *Spoljašnji put* apoptoze posredovan je tzv. *letalnim receptorima* (engl. *death receptors* – DR, gde spadaju TNFR1, Fas, DR4, DR5 i dr.) i aktivira se vezivanjem odgovarajućeg liganda za njihov spoljašnji domen. Dokazano je da doksorubicin indukuje ekspresiju DR4 i DR5 Fas receptora i propagira apoptozu preko TRAIL ligandada (engl. *TNF-related apoptosis-induced ligand* – TRAIL) (Wang et al. 2010; Wu et al. 2003). Takođe, doksorubicin ushodno reguliše ekspresiju Fas receptora i aktivaciju spoljašnjeg puta apoptoze preko Fas ligandada (Massart et al. 2004). Vezivanje Fas ligandada za Fas receptor predstavlja aktivatorski signal za adaptorske proteine da grupišu, i oko unutarćelijskog domena Fas receptora (engl. *Fas-Associated Protein With Death Domain* – FADD) aktiviraju kaspaze 8 i 10, formirajući tzv. *letalni signalni kompleks* (engl. *Death-Inducing Signaling Complex* – DISC) (slika 5). Kada se oformi, DISC nishodno aktivira izvršilačke kaspaze 2, 7 ili 6 koje uvode ćeliju u apoptozu.



Slika 5: Spoljašnji i unutrašnji put aktivacije apoptoze; FasL – Fas ligandi, FADD – *Fas-associated protein with death domain*; DISC – *death-inducing signaling complex*; ROS – *reactive oxygen species*

Unutrašnji put aktivacije apoptoze zavisan je od mitohondrija. Pokreće se kao odgovor ćelije na nedostatak kiseonika ili oštećenje i nemogućnost reparacije DNK. Doksorubicin aktivira unutrašnji put apoptoze na nekoliko načina: interkalacijom sa molekulom DNK, genozom slobodnih kiseoničnih radikala i menjanjem prometa unutarćelijskog kalcijuma. Kada se joni kalcijuma nagomilaju u višku unutar mitohondrija, zbog pozitivne povratne sprege između geneze ROS i Ca^{2+} , narušava se propustljivost membrana ovih organela, one gube svoj potencijal, bubre, spoljašnja membrana puca i *citohrom c* se oslobađa u citosol (slika 5) zajedno sa faktorom aktivacije apoptoze (engl. *apoptosis inducing factor* – AIF) (Childs et al. 2002; Camello-Almaraz et al. 2006; Deniaud et al. 2008). U citoplazmi, *citohrom c* formira kompleks sa Apaf-1 (engl. *adaptor protein apoptosis protease activator protein-1* – Apaf-1) i kaspazom 9. Ova struktura se označava kao *apoptozom*. Apoptozom aktivira izvršilačke kaspaze 2, 7 i 6 i ćelija se uvodi u apoptozu. U procesu apoptoze, ćelija smanjuje svoj obim, DNK se rasparčava, hromatin

kondenzuje i krajnji ishod jeste formiranje strukture označene kao *apoptotsko telo*, koje uklanjaju fagociti.

Nekroza je proces koji ne zavisi od ćelijske energije. Doksorubicin uvodi kardiomiocite u nekrozu putem slobodnih kiseoničnih radikala, koji remete promet jona kalcijuma unutar mitohondrija, dovode do njihovog nagomilavanja unutar organele, posledičnog otvaranja mitohondrijalnih pora i otpuštanja sadržaja mitohondrija u citosol. Doksorubicin oštećuje mtDNK, remeti funkcionisanje respiratornog lanca i sintezu ATP-a, što, takođe, predstavlja signal za ulazak ćelije u nekrozu (Lebrecht & Walker 2007; Wallace 2007). Pod uticajem doksorubicina, aktiviraju se kalcijum-zavisne proteaze – *kalpaini*, koje degradiraju titin. Titin reguliše kontraktilnu funkciju, menjajući prijemčivost aktina i miozina za jone kalcijuma (Helmes et al. 2003). Narušena struktura titina dovodi do raščijavanja vlakana unutar sarkomere, prekida kontinuiteta ćelijske membrane i nekroze kardiomiocita, koja se manifestuje *izlivanjem* sadržaja ćelije u intersticijum i nagomilavanjem polimorfonukleara u afektiranom području (Lim et al. 2004).

Usled ubrzanog ulaska kardiomiocita u apoptozu ili nekrozu pod uticajem doksorubicina, povećana je i *autofagna* aktivnost u oštećenom miokardu. Autofagija je regulisan, dinamičan proces, gde citosolni proteini i oštećene organele bivaju ograničeni dvostrukom membranom, koja ih zatvara u vezikulu označenu kao *autofagozom*, u kojoj će se, nakon spajanja sa lizozomom u strukturu *fagolizozom*, potpuno razložiti (De Meyer & Martinet 2009; Zhu et al. 2009; Shimomura et al. 2001).

1.2.4. Preoblikovanje vanćelijskog matriksa i fibroza izazvana doksorubicinom

U tumorskim ćelijama, doksorubicin inhibira transkripciju i translaciju kolagenaze i metaloproteinaze matriksa 1 (MMP-1). Suprotan efekat ostvaruje u miokardu, gde povećava sintezu MMP-2 i MMP-9 (Goetzenich et al. 2009; Spallarossa et al. 2006). Tkivna aktivnost MMP je strogo kontrolisana specifičnim tkivnim inhibitorima (engl. *tissue inhibitors of metalloproteinases* – TIMPs) (Nagase & Frederick Woessner

1999), koji bivaju utišani pod uticajem doksorubicina (Goetzenich et al. 2009). Povećana aktivnost MMP pod uticajem ROS indukovanih doksorubicinom utiče na razgradnju kolagenih vlakana unutar tkiva srčanog mišića i njihovu zamenu fibroznim vlaknima. Nagomilavanje fibroznih vlakana odraz je završnog stadijuma destrukcije kolagenih vlakana koja okružuju kardiomiocite (Mann & Spinale 1998b).

1.3. KARDIOTOKSIČNOST LIPOZOMALNOG DOKSORUBICINA

U poslednjih nekoliko decenija, razvijane su strukture nano-nosača (od 1 do 100 nm u prečniku), biokompatibilnih makromolekula sa slabim imunološkim odgovorom, koji lek ciljano dopremaju do tumorskog tkiva i tako smanjuju sistemska toksičnost (Yokoyama 2014). U nano-nosače ubrajaju se: nanokonjugati leka i polimera, polimerizovane nanočestice i nanočestice na bazi lipida (lipozomi, micelle, dendrimeri, nano-ljuske i nano-kavezi) (Peer et al. 2007). Bangham i sar. (Bangham et al. 1965) sintetisali su 1965. godine prvi oblik nano-nosača na bazi lipida (lipidnu vezikulu), danas poznat kao lipozom. Dizajn lipozoma, u kome je jezgro nano-transportera sa doksorubicinom obloženo polipropilen-glikolom (PEG), omogućava da se citostatik u željenoj koncentraciji oslobodi u tumorskom tkivu, dok je njegova ekstrapozacija u zdravom tkivu minimalna (Tardi et al. 1996). Retrospektivna studija koju su Batist i sar. (Batist et al. 2006) sproveli 2006. godine, pokazala je da je lipozomalna forma doksorubicina manje kardiotoksična od uobičajenog oblika leka. Rivankar i sar. (Rivankar 2014) potvrdili da je nePEGilovana lipozomalna formulacija doksorubicina stabilnija u odnosu na PEGilovanu, ima slabiji kardiotoksični efekat i ne izaziva neželjeno dejstvo u vidu palmarno-plantarne eritrodisezije. U lek-polimer formulaciji, doksorubicin je kopolimerizovan sa N-(2-hidroksipropil) metakrilamidom (HPMA) u konjugat čija je primena u nekoliko prekliničkih (Hopewel et al. 2001; Yeung et al. 1991) i kliničkih studija (Vasey et al. 1999; Seymour et al. 2009) pokazala da je kardiotoksičnost takvog polimera smanjena u *in vivo* uslovima.

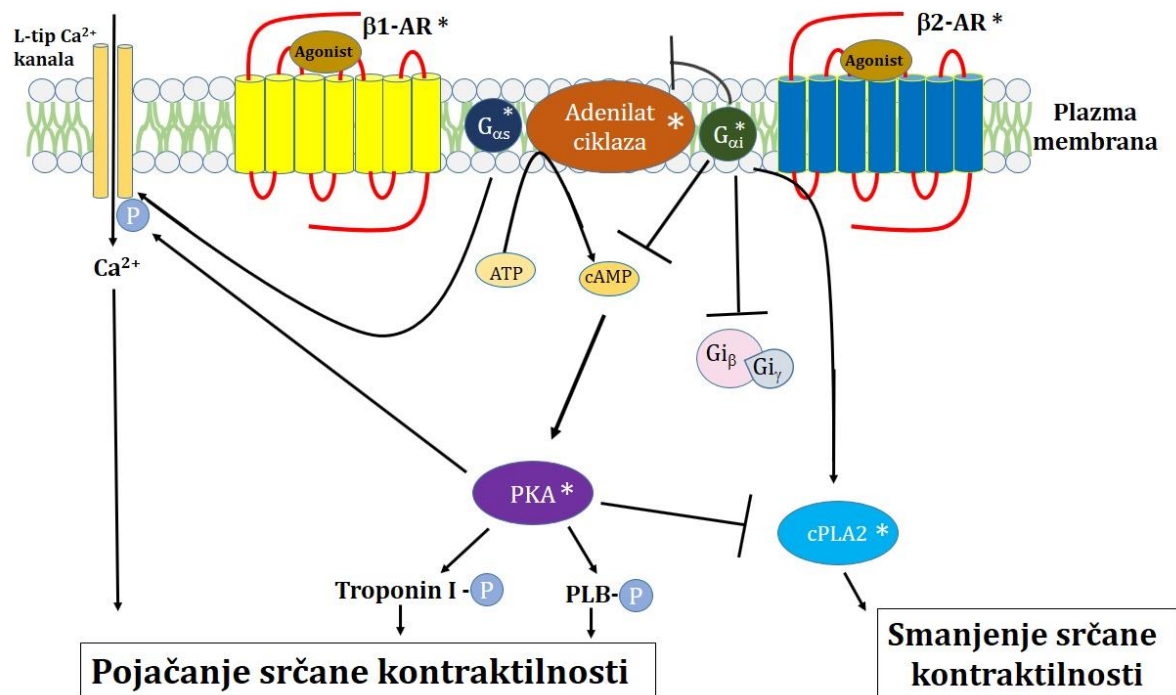
1.4. ULOGA β -ADRENERGIČKIH RECEPTORA U NASTANKU SRČANE INSUFICIJENCIJE

Kateholamini (adrenalin i noradrenalin) su prirodni ligandi β -adrenergičkih receptora (β -AR), preko kojih ostvaruju pozitivno: inotropno, hronotropno batmotropno, dromotropno i lusitropno dejstvo na srce. Beta-adrenergički receptori pripadaju superfamiliji receptora spregnutih sa G-proteinom (engl. *G-protein coupled receptors* – GPCRs). GPCR su integralni membranski proteini, sačinjeni od sedam transmembranskih α -spiralnih domena koje povezuju tri vanćelijske i tri unutarćelijske petlje. Amino (N) krajevi postavljeni su ekstracelularno a karboksilni (C) su smešteni unutar ćelije (Vassilatis et al. 2003). U srcu su prisutna tri suptipa β -AR. β 1-AR su dominantni tip u miokardu (75-80% od svih β -AR). β 2-AR su zastupljeni 15-18%, dok su β 3-AR u fiziološkim uslovima u srcu prisutni u 2-3% (Brodde 1993). Promena gustine i afiniteta β -AR imaju ključnu ulogu u srčanoj dekompenzaciji, nezavisno od etiološkog faktora.

1.4.1. Beta-adrenergička signalizacija u zdravom srcu

Signalni put GPCR pokreće se nakon vezivanja odgovarajućeg liganda za njihov vanćelijski domen, uslovljavajući time konformacionu promenu, koja omogućava da se za unutarćelijske domene receptora vežu heterotrimerni G-proteini (Wess 1997). G-proteini sastavljeni su od α , β i γ subjedinice. U odnosu na svoje amino sekvence, G_{α} subjedinica poseduje četiri izoforme: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$ i $G_{\alpha 12}$ (Xiao & -P. Xiao 2001). Aktiviraju se razmenom molekula GTP za GDP, nakon čega dolazi do disocijacije G-proteina na aktiviranu α subjedinicu i $\beta\gamma$ dimer. Za stimulisani β 1-AR na membrani kardiomiocita primarno se vezuje $G_{s\alpha}$ subjedinica, što aktivira enzim adenilat-ciklazu (AC), nakon čega se sintetiše sekundarni glasnik ciklični adenzin mono fosfat (cAMP) (slika 6). Povišeni nivo cAMP aktivira cAMP-zavisnu proteinsku kinazu A (PKA) koja fosforiliše troponin I, L-tip Ca^{2+} kanala i fosfolamban (PLB). Pokretanje ove kaskade rezultira pojačanom kontraktilnošću srčanog mišića (Patrick 2002; Freedman & Lefkowitz 2004). β 2-AR vezuju se za pertuzis toksin-inhibitorni G-protein (G_i), nakon čega se aktivirana $G_i\alpha$ subjedinica disocira,

inhibirajući aktivnost AC i $G_i\beta\gamma$ subjedinice, što podstiče nishodnu aktivaciju MAPK. Kuplovana $G_i\alpha$ subjedinica, takođe, aktivira citoplazmatski efektorni molekul fosfolipazu A2 (cPLA2), koja podstiče pojačanje kalcijumskog signalnog puta nezavisno od cAMP i smanjuje srčanu kontrakciju (slika 6).

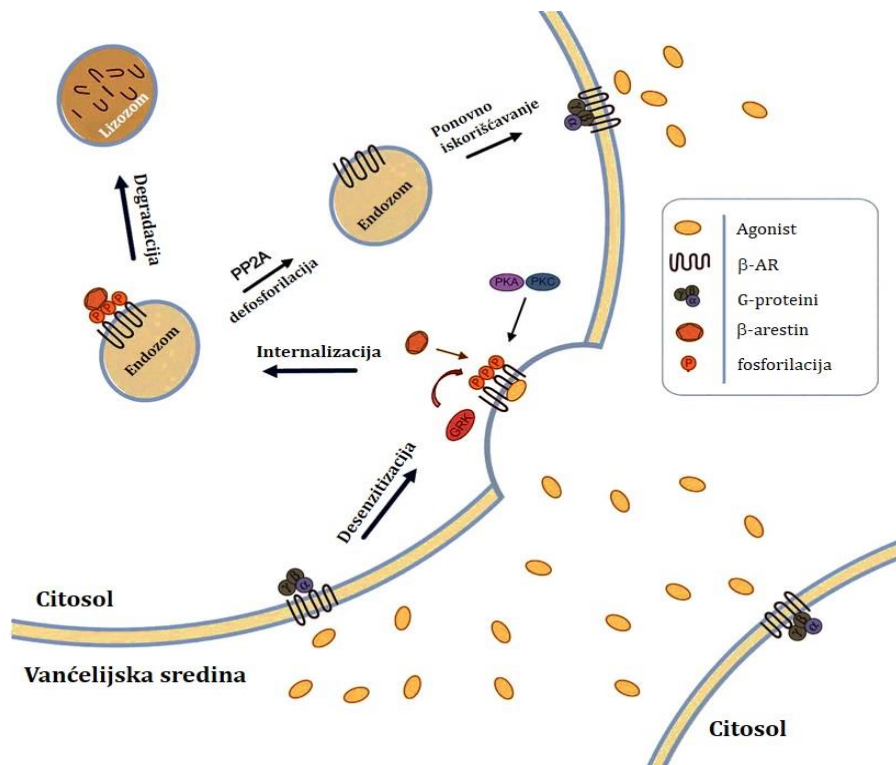


Slika 6: Signalni putevi β_1 - i β_2 -AR u zdravom srcu; PKA – proteinska kinaza A, cPLA2 – citoplazmatska fosfolipaza A2; PLB – fosfolamban; asterisk ukazuje da je protein aktiviran; znak \dashv označava inhibiciju

U kardiomiocitima pacova, stimulacija β_1 -AR uvodi ćeliju u apoptozu preko cAMP-zavisnog mehanizma (M. Zaugg et al. 2000), dok stimulisani β_2 -AR inhibiraju apoptozu preko G_i - $G\beta\gamma$ -PI3K signalnog puta (C. Communal et al. 1999). Priroda β_2 -AR je dualna: kratkotrajna stimulacija β_2 -AR aktivira anti-apoptotski put preko G_i - $G\beta\gamma$ -PI3K. Međutim, inhibicija G_i pertusis toksinom menja signalizaciju β_2 -AR od anti-ka pro-apoptotskoj (Zhu et al. 2001).

Fiziološki regulator ekspresije gena β -AR i njihove gustine u membrani jeste izlaganje kateholaminima. Porast koncentracije kateholamina dovodi do smanjenja

gustine β 1-AR (nishedna regulacija) i odvajanja preostalih β 1- i β 2-AR od G proteina (desenzitizacija) (slika 7) (Bristow et al. 1986). Desenzitizacija β 1- i β 2-AR na plazma membrani kardiomiocita odvija se njihovom fosforilacijom od strane PKA, proteinske kinaze C (PKC) i kinaza receptora spregnutih sa G proteinom (engl. *G-protein coupled receptor kinases* – GRKs). Fosforilacija β -AR preko PKA (aktivirana preko $G_s\alpha$) i PKC (aktivirana preko $G\beta\gamma$) direktno menja konformaciju receptora, što ometa njegovu dalju interakciju sa G-proteinom i prenos signala (Lefkowitz 1998). Ovaj proces naziva se *heterologa desenzitizacija*, jer se neselektivno fosforilišu i stimulisani i nestimulisani receptori (Penn et al. 1998). Po translokaciji GRK iz citosola na unutarćelijski odeljak plazma-membrane, ova kinaza fosforiliše C-kraj β -AR, nakon čega se za njega veže još jedan citosolni protein – β -arestin, kada dolazi do odvajanja G-proteina od β -AR i inhibicije dalje aktivacije $G_s\alpha$ (Madamanchi 2007) (slika 7). Osim ove uloge u desenzitizaciji GPCR, β -arestin, kao adapterski protein, pripaja odvojene GPCR za klatrinske vezikule, nakon čega se odvija *internalizacija* receptora.



Slika 7: Sudbina receptora nakon internalizacije je dvojaka: 1. razgradnja receptora nakon spajanja sa lizozomima i 2. recikliranje receptora na površinu membrane bez razgradnje.

1.4.2. Beta-adrenergička signalizacija u insuficijentnom srcu

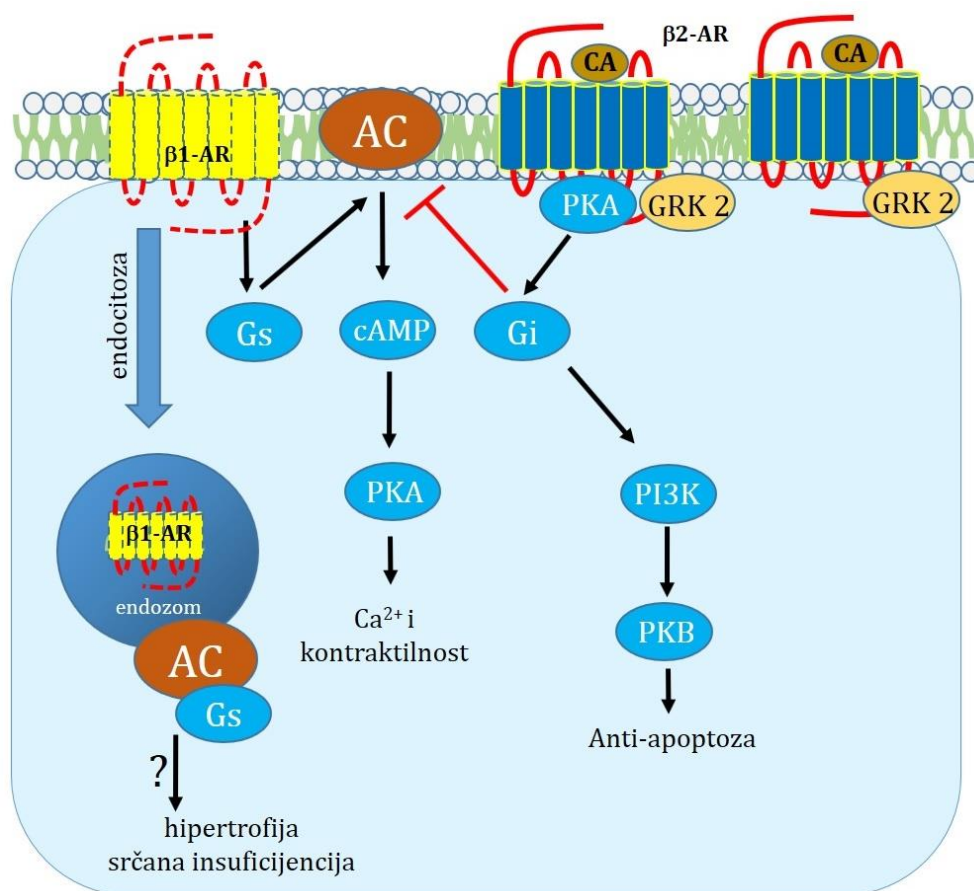
Slabljenje srčane snage dovodi smanjenja minutnog volumena srca, poremećaja cirkulacije i smanjenja perfuzije perifernih organa. Da bi se poboljšala cirkulacija i perfuzija perifernih organa, pokreću se refleksni odbrambeni mehanizmi, a pre svih – baroreceptorski refleks. Barorefleks povećava tonus simpatikusa prema srcu i krvnim sudovima, stimuliše sintezu renina a potom angiotenzina II i aldosterona i izaziva lučenje antidiuretskog hormona vazopresina iz hipotalamusa preko neurohipofize. Ovi odbrambeni mehanizmi, da bi očuvali cirkulaciju, vrše snažnu perifernu vazokonstrikciju, ubrzavaju rad srca i retenciju vode, što srce dodatno opterećuje i ubrzava njegovo propadanje (slika 8).



Slika 8: Neuroendokrino preoblikovanje u srčanoj insuficijenciji; RAAS – renin-angiotenzin-aldosteron; ADH – antidiuretični hormon

Pad minutnog volumena u insuficijentnom srcu indukuje kompenzatorno povećanje aktivnosti simpatičkog nervnog sistema koji stimuliše β -AR, dovodeći do pojačanja srčane kontraktilnosti. Međutim, dugotrajna i prekomerna kateholaminska stimulacija kardiomiocita dovodi do ushodne regulacije GRK2, G_i i fosforilacije β -AR od strane PKA i GRK, dovodeći do njihove desenzitizacije i endocitoze. U insuficijentnom srcu su, zapravo, samo β_1 -AR nishodno regulisani (slika 9), što je udruženo sa ushodnom regulacijom GRK2 i G_i . Posledično se odnos β_1 - i β_2 -AR u

srcu menja na 50:50 (Torti et al. 1986). Mehanizam selektivne nishodne regulacije β 1-AR u srčanoj insuficijenciji nije sasvim rasvetljen, ali se smatra da on ima zaštitnu ulogu jer se njime smanjuje dugotrajna pro-apoptotska signalizacija β 1-AR (Zhu et al. 2016). Irannejad i sar. (Irannejad et al. 2013) su ukazali da GPCR, i nakon internalizacije u endozomima, mogu da nastave sa signalizacijom, a Morisco i sar. (Morisco et al. 2008) da čak i internalizovani β 1-AR mogu da podstiču nastanak hipertrofije kardiomiocita.



Slika 9: Signalni putevi β 1- i β 2-AR u insuficijentnom srcu; PKA – proteinska kinaza A, AC – adenilat ciklaza; cAMP – ciklični adenozin mono fosfat; CA – kateholamini; PKB – proteinska kinaza B; PI3K – fosfoinozitol kinaza; PLB – fosfolamban; znak -označava inhibiciju

Stimulacija β 2-AR kardiomiocita u srčanoj insuficijenciji inhibira cAMP-PKA osovinu signalnog puta (slika 9) koja podstiče njihovu kontraktilnost (Nikolaev et al. 2010; Xiang 2011). S druge strane, ushodna regulacija G_i i pojačana β 2-AR- G_i

signalizacija dovode do aktivacije proteinske kinaze B (PKB), koja ima anti-apoptotsko dejstvo na kardiomiocite, čime se usporava propadanje srca (Wu et al. 2016). Nasuprot povoljnim efektima na miokard, β 2-AR- G_i sprega može da smanji stimulaciju kontrakcije posredovanu G_s komponentom (Woo et al. 2015). Stoga, β 2-AR- G_i osovina može uticati na krajnji ishod srčane β -AR signalizacije u patološkim uslovima.

Liggett i sar. (Liggett et al. 1998) pokazali su da je kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom i polimorfizmom gena za β 2-AR povećan rizik za nastanak nepovoljnog ishoda. Perez i sar. (Perez et al. 2003) dokazali su da je i polimorfizam gena za β 1-AR udružen sa nastankom srčane slabosti. Povišena aktivnost GRK2 u miokardu kod srčane ishemije (Ungerer et al. 1996), hipertrofije (Ungerer et al. 1996; Choi et al. 1997) i hipertenzije (Gros et al. 1997) ukazuje na važnost uloge β 1-AR u patogenezi srčane slabosti i, obično, prethodi klinički vidljivim znacima srčane insuficijencije (Anderson et al. 1999; Cho et al. 1999; Iaccarino et al. 2001). Hata i sar. (Hata 2004) dokazali su da nivo GRK2 u srcu korelira sa nivoom u limfocitima iz periferne krvi, i da se povećanje ekspresije ovih kinaza u srcu reflektuje ekvivalentnim povećanjem njihove ekspresije u perifernim limfocitima, te se nivo GRK2 u limfocitima može koristiti kao potencijalni novi biomarker u detekciji promena u srčanoj ekspresiji GRK2.

1.5. TERAPIJA I PREVENCIJA KARDIOTOKSIČNOSTI

Uprkos opsežnom proučavanju mehanizama kardiotoksičnosti izazvane doksorubicinom u poslednjih nekoliko decenija, i dalje nisu ustanovljene efikasna terapija i prevencija (Ponikowski et al. 2016). Pokazalo se da kombinovana terapija inhibitorima angiotenzin-konvertaze (ACEI) i blokatorima β -AR snižava stopu morbiditeta i mortaliteta kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom kod kojih je ejectiona frakcija snižena (engl. *heart failure with reduced ejectional fraction* – HFrEF) (Hjalmarson et al. 2000; Packer et al. 2002; Flather et al. 2005). Cilj uključivanja selektivnih β 1-AR blokatora, kao što je metoprolol, u terapiju je da se spreči nishodna regulacija β 1-AR i podstakne inotropni odgovor srca na

kateholamine (Fu et al. 2017). Karvedilol neselektivno blokira β_1 -, β_2 - i α -adrenergičke receptore (Eggertsen et al. 1984) i na različitim životinjskim modelima pokazano je da sprečava razvoj disfunkcije leve komore (Acker et al. 1995; Santos 2002), apoptozu kardiomiocita (Spallarossa et al. 2004) i smanjuje oštećenje mitohondrija u suphroničnom modelu srčane insuficijencije izazvane doksorubicinom (Matsui et al. 1999; Oliveira et al. 2004). Karvedilol je zlatni standard u terapiji doksorubicinske miokardiopatije kod ljudi, jer, pored toga što blokira β -AR u srcu, on smanjuje periferni otpor i olakšava rad srca blokadom α -AR. Takođe, karvedilol je i antioksidans. Antagonisti aldosterona – spironolakton i eplerenon, uključuju se u terapiju kod svih pacijenata sa HFrEF i ejectionom frakcijom leve komore manjom od 35% (Pitt et al. 1999; Zannad et al. 2011). Liu i sar. (Liu et al. 2016) su dokazali da spironolakton, u paralelnoj primeni sa doksorubicinom, smanjuje fibrozu miokarda, blokirajući signalni put glavnog profibrotičkog citokina TGF- β 1. Akpek i sar. (Akpek et al. 2015) pokazali su da spironolakton, kada se aplikuje zajedno sa doksorubicinom, snižava serumske nivoe srčanog troponina I i NT-proBNP, te ima protektivno dejstvo na srce.

Za prevenciju doksorubicinske kardiomiopatije propisuje se deksrazoksan, ciklični analog EDTA. Nakon akumulacije u kardiomiocitima, deksrazoksan podleže hidrolizi do forme otvorenog prstena, koji ima snažno helirajuće dejstvo. Kardioprotektivno dejstvo ostvaruje helirajući slobodne jone gvožđa, gvožđe iz feritinskih depoa ili DOX-Fe kompleksa, te na taj način sprečava oštećenje mitohondrija ROS indukovanim jonima gvožđa (Hasinoff & Herman 2007; Hasinoff et al. 1998; Wiseman & Spencer 1998). Snažan je inhibitor katalitičke aktivnosti topoizomeraze II i za nju se vezuje gradeći tzv. *konformaciju krila šišmiša* u kojoj imidna grupa (NH) iz deksrazoksana formira vodoničnu vezu sa glutaminom iz aminokiselinskog lanca topoizomeraze (Classen et al. 2003). Deksrazoksan sprečava oštećenje DNK izazvano doksorubicinom interferirajući sa prelaznom formom topoizomeraze II (Lyu et al. 2007), koja treba da izvrši kratkotrajno otvaranje DNK petlje. Ova forma enzima se eksprimira u G₂/M fazi ćelijskog ciklusa kada se ćelija deli, a deksrazoksan stabilizuje kovalentne veze između DNK i topoizomeraze, što sprečava zatvaranje DNK petlje i onemogućava deobu ćelije

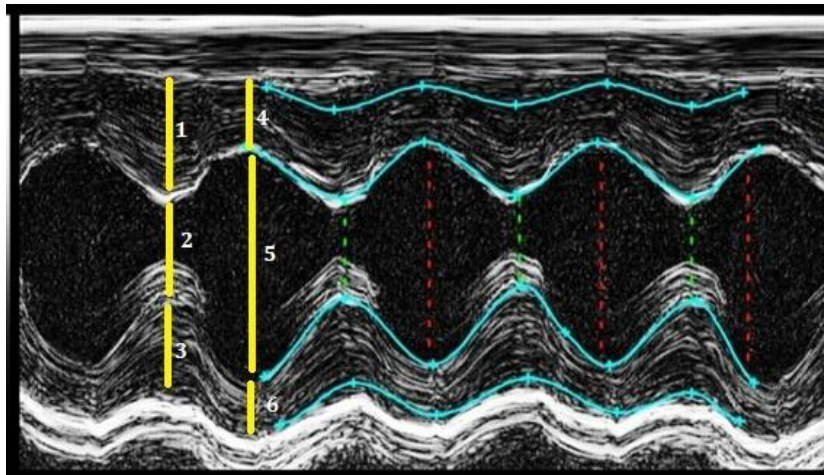
(Fortune & Osheroff 2000). Budući da se doksorubicin i deksrazoksan vezuju za topoizomerazu, važno je naglasiti da deksrazoksan ne smanjuje antineoplastičnu efikasnost doksorubicina (Pouillart 2004).

1.6. RÀNŌ OTKRIVANJE TOKSIČNIH PROMENA NA MIOKARDU

S obzirom na to da nema efikasne terapije i prevencije kardiomiopaije izazvane doksorubicinom, a zbog njegove velike terapijske efikasnosti, postignut je konsenzus da se doksorubicin primenjuje u terapiji, ali samo uz čest monitoring srčane funkcije i da se sa terapijom prekine kada se pojave prvi znaci kardiotoksičnosti. Zbog neinvazivnosti i široke dostupnosti, ehokardiografija je standardna metoda za otkrivanje toksičnih promena na srcu izazvanih doksorubicinom. U kliničkoj praksi se, za otkrivanje promena na miokardu, koriste i: magnetna rezonanca, angiografija radionuklidima i biopsija miokarda. Preciznost râne dijagnostike dodatno se postiže i merenjem serumskih nivoa srčanih troponina T i I i natriuretičkih peptida.

1.6.1. Ehokardiografski parametri

Dvodimenzionalna (2D) ehokardiografska metoda je zlatni standard u svakodnevnoj kliničkoj praksi za procenu promena dijametara i funkcije srčanih komora. Dvodimenzionalnom metodom moguće je izmeriti promere: zadnjeg zida leve komore u sistoli i dijastoli (engl. *posterior wall* – PW_s i PW_a), leve komore u sistoli i dijastoli (engl. *left ventricular internal diameter* – LVID_s i LVID_a), desne komore (engl. *right ventricular internal diameter* – RVID), aorte i pulmonalne arterije, kao i funkcionalnost zalistaka i debljinu međukomornog septuma u sistoli i dijastoli (engl. *interventricular septum* - IVS_s i IVS_a) (slika 10)



Slika 10: Ehokardiogram, M-mod. 1. IVS_s; 2. LVID_s; 3. PW_s; 4. IVS_d; 5. LVID_d; 6. PW_d

Na osnovu izmerenih parametara, moguće je uz pomoć Teicholzovih formula (Brown et al. 2002) izračunati:

- frakciono skraćenje leve komore: $FS(\%) = \frac{(LVID_d - LVID_s)}{LVID_d} \cdot 100$;
- volumen krvi na kraju dijastole (engl. *end-diastolic volume* – EDV):
EDV (ml) = $1.047 \cdot (LVID_d)^3$;
- volumen krvi na kraju sistole (engl. *end systolic volume*):
ESV (ml) = $1.047 \cdot (LVID_s)^3$;
- udarni volumen (engl. *stroke volume* – SV):
SV (ml) = EDV – ESV i
- ejectionu frakciju leve komore (engl. *left ventricular ejection fraction* – LVEF):
 $LVEF(\%) = \frac{SV}{EDV} \cdot 100$.

Tehnološka unapređenja u vidu: doplera, *strain* metode (engl. *strain* – rastegljivost) i trodimenzionalne (3D) ehokardiografije, doprinela su da ova klinička metoda dobije na preciznosti i reproducibilnosti, budući da je subjektivna. Ovim novim tehnikama moguće je preciznije utvrditi morfološke i funkcionalne promene u sistoli i dijastoli na srčanim komorama i rane promene u smanjenju rastegljivosti miokarda koje jesu specifične za kardiotoksičnost (Negishi et al. 2013).

1.6.2. Serumski markeri – srčani troponini i natriuretički peptidi

Ranija istraživanja u vezi sa nastankom srčane insuficijencije prouzrokovane doksorubicinom bila su, uglavnom, bazirana na praćenju kliničkih simptoma karakterističnih za ovo oboljenje. Danas se u kliničkoj praksi prate promene različitih funkcionalnih i biohemijskih parametara, kao što su smanjenje ejskione frakcije ili nivoi *srčanog troponina T i I* (Pein et al. 2004). Troponini su proteini rasprostranjeni u srčanoj i skeletnoj muskulaturi. Regulatori su snage i brzine mišićne kontrakcije i sačinjeni su od tri subjednice – I, T i C. Srčani troponin I (cTnI) i T (cTnT) su visoko senzitivni i specifični markeri oštećenja miokarda (Adams et al. 1993; Katus et al. 1992). Nekoliko studija poredilo je značajnost porasta cTnI i cTnT kod čoveka u odnosu na životinjski model (Herman et al. 1998; Adamcová et al. 1999). Međutim, malo je podataka u literaturi o korelaciji između koncentracija cTnI/cTnT i ehokardiografskih i patohistoloških promena na srcu kod pacova, kao animalnog modela.

Poznavanje patofiziologije *natriuretičkog peptida*, doprinelo je da se ovaj molekul uvrsti u dijagnostičke i prognostičke biomarkere za rano otkrivanje kardiovaskularnih bolesti, pre svega kongestivne srčane slabosti (Dolci et al. 2008). Atrijalni natriuretički peptid (ANP), moždani natriuretički peptid (engl. *brain natriuretic peptide* – BNP) i fragment N-terminusa prekursora BNP (NT-proBNP) pripadaju klasi strukturnih peptida koji se sintetišu, skladište i izlučuju iz srca kao odgovor na rastezanje i prepunjenost pretkomora i komora. Pokazano je da nivoi natriuretičkih peptida u plazmi rastu kod pacijenata sa izraženom kongestivnom srčanom slabošću, ali i kod asimptomatske disfunkcije leve komore, te ovi molekuli predstavljaju efikasne biomarkere za procenu ventrikularne disfunkcije (Lerman et al. 1993; Mukoyama et al. 1991).

1.6.3. Ostale kliničke metode za otkrivanje toksičnih promena na miokardu

Magnetnom rezonancom moguće je otkriti suptilne promene na komorama kod oštećenja srčanog mišića, kao i promene u srčanoj masi i sistolnoj funkciji (Swain et al. 2003; Thavendiranathan et al. 2013). Ove promene često nisu specifične u kriterijumima za procenu kardiotoksičnog oštećenja (Drafts et al. 2013). Pored ultrazvučne metode, *angiografija* se, kao neinvanzivna metoda, primenjuje u kliničkoj praksi za procenu ejeckione frakcije leve komore. Angiografija sa monoklonskim antimiozinskim antitelom obeleženim indijumom (^{111}In) koristi se za detekciju nekrotičnih ćelija u miokardu nakon terapije doksorubicinom (Bhattacharya & Lahiri 1991), za merenje ejeckione frakcije leve komore i regionalnih promena u pokretljivosti zida leve komore. Kod pacijenata sa kardiomiopatijom izazvanom doksorubicinom, preuzimanje radio-obeleženog antitela proporcionalno je kumulativnoj dozi doksorubicina (Bhattacharya & Lahiri 1991). Senzitivnost ovog testa je visoka, ali je on niskospecifičan, jer detektuje sve nekrotične ćelije, bez obzira na uzrok nekroze. Premda invanzivna, *biopsija endomiokarda* ima veću senzitivnost i specifičnost u odnosu na sve do sada pobrojane metode za rano dijagnostikovanje kardiomiopatije izazvane doksorubicinom (Mason et al. 1978; Billingham et al. 1978). Histopatološki markeri koriste se za procenu stepena oštećenja srčanog mišića (degradacija miofibrila, narušavanje strukture sarkoplazmatskog retikuluma, vakuolizacija citoplazme itd.). Stepem promena označava se brojevima od 1 do 3: Nultom vrednošću označavaju se uzorci zdravog tkiva; uzorci kod kojih je manje od 5% ćelija podleglo promenama koje su karakteristične za kardiotoksičnost izazvanu doksorubicinom označavaju se brojem 1; uzorci sa 5%-15% brojem 1.5; uzorci sa promenama od 16%-25% brojem 2; sa 25%-35% promena brojem 2.5 a preko 35% promena brojem 3 (Schwartz et al. 1987; Bristow et al. 1981). Ovakav način stepenovanja promena predstavlja linearnu korelaciju sa funkcijom leve komore određenu angiografijom radionuklidima, i pomaže u proceni da li treba nastaviti sa terapijom doksorubicinom kod datog pacijenta.

1.7. PROGNOŠTIČKI I DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJ VARIJABILITETA SRČANE FREKVENCije I SENZITIVNOSTI BAROREFLEKSA U SRČANOJ INSUFICIJENCIJI

Sve gorepomenute metode su nespecifične i nemaju prognošički, već samo dijagnostički značaj. Za razliku od njih, kod kardiovaskularnih oboljenja, pokazano je da promene varijabiliteta srčane frekvencije (engl. *heart rate variability* – HRV) imaju prognošički značaj. Varijabilitet srčane frekvencije odražava trenutne promene nastale između dva uzastopna otkucaja srca u RR intervalu, koje su rezultat kontinuirane interakcije između simpatikusne i parasimpatikusne grane autonomnog nervnog sistema (ANS) (Kleiger et al. 2005; Anon 1996; Wolf et al. 1978). Različiti stimuli mogu da naruše simpato-vagalnu ravnotežu, a time i HRV. Pokazano je u brojnim studijama da je narušavanje ravnoteže autonomnog nervnog sistema u smeru povećanja tonusa simpatikusnog, a smanjenja vagalnog tonusa u sprezi sa povećanim rizikom od naprasne smrti (Japundzic-Zigon et al. 2017). Zbog toga je HRV prepoznat kao važan marker rane detekcije promena na srcu kod obolelih od koronarne bolesti i srčane insuficijencije (Perkiömäki et al. 2000; Lombardi et al. 1987; Anon 1996). Pokazano je da promene na ANS nastaju u ranoj fazi razvoja disfunkcije leve komore i da se povećavaju kako bolest napreduje (Ishise et al. 1998; Brouwer et al. 1996).

U napredovaloj fazi primarne hipertenzije i srčane insuficijencije, opisano je i smanjenje senzitivnosti barorefleksa (May et al. 2013). Arterijski baroreceptorski refleks glavni je regulator krvnog pritiska, koji radi na principu negativne povratne sprege. Preko mehanoreceptora, smeštenih u luku aorte i karotidnom sinusu, barorefleks eferentnim vlaknima vagusa šalje informacije o promeni krvnog pritiska do produžene moždine i vagalnog nuklearnog kompleksa (lat. *nucleus tractus solitarius* – NTS) (Kirchheim 1976). NTS, istovremeno, prima nadražaje i iz limbičkog sistema i hipotalamusa, obrađuje ih, i na osnovu toga određuje konačni tonus vagusa na periferiji. Njegovi aksoni (lat. *nucleus ambiguus*) direktno inervišu srce i utiču na njegov rad preko holinergičkih receptora i kalijumovih kanala. Nakon obrade informacija pristiglih sa baroreceptora, NTS ih šalje u *ventrolateralnu medulu* (VLM) a odatle u *rostralnu ventrolateralnu medulu* (RVLM). Eferentna vlakna iz

RVLM obrazuju sinapse sa postganglijskim vlaknima simpatikusa u paravertebralnim ganglijama, odakle aksoni postganglijskih vlakana inervišu srce i krvne sudove putem β - i α -AR (Dampney 1994). Budući da barorefleks deluje na principu negativne povratne sprege, njegov odgovor na stimulaciju je dvojak: ako arterijski pritisak raste, tada dolazi do upliva vagusa i smanjenja simpatičkog uticaja na srce i periferne krvne sudove, što rezultira normalizacijom krvnog pritiska; kada krvni pritisak opada, tonus simpatikusa će porasti a tonus vagusa biće inhibiran, dovodeći do vazokonstrikcije perifernih krvnih sudova i tahikardije.

U esencijalnoj hipertenziji, oštećena je *tunica muscularis*, pre svega, malih krvnih sudova, ali se i usled zadebljanja *tunicae intimae* i *tunicae mediae* kod velikih sprovodnih krvnih sudova – aorte i karotida (Marfella et al. 2005), smanjuje njihova elastičnost. Smanjenje rastegljivosti zida karotidnih arterija utiče na smanjenje senzitivnosti baroreceptorskog refleksa, naročito za vreme jutarnjeg skoka krvnog pritiska (Taylor et al. 2011; Okada et al. 2012). U hroničnoj srčanoj insuficijenciji simpatikus dominira nad vagusom, a senzitivnost barorefleksa je smanjena (Eckberg, Drabinsky, and Braunwald 1971; Grassi et al. 1995). Sa progresijom bolesti, usled nishodne regulacije srčanih β 1-AR (May et al. 2013), u momentu gubitka ukupnog kratkoročnog HRV, smanjuje se i odgovor srca na simpatičku stimulaciju.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ove studije bili su:

1. Da razvijemo eksperimentalni model doksorubicinske kardiotoksičnosti kod pacova koji je prihvatljivi ekvivalent ljudskoj patologiji.
2. Da utvrdimo dijagnostički i prognostički značaj varijabiliteta srčane frekvencije i krvnog pritiska kod pacova tretiranih toksičnim dozama doksorubicina.
3. Da utvrdimo dijagnostički i prognostički značaj spontanog arterijskog barorefleksa kod pacova tretiranih toksičnim dozama doksorubicina.
4. Da uporedimo HRV i sBRS sa standardnim metodama za dijagnostiku kardiotoksičnosti: ehokardiografijom i koncentracijom srčanih troponina T i I.
5. Da otkrijemo molekularne mehanizme odgovorne za promenu varijabiliteta srčane frekvencije kod oštećenog miokarda, odnosno promenu ekspresije β -AR receptora u srcu.

3. MATERIJAL I METODE

Sve eksperimentalne procedure izvedene su u skladu sa preporukama dobre laboratorijske prakse o etičkom radu na eksperimentalnim životinjama Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Vodič za eksperimentalni rad sa životinjama Medicinskog fakulteta u Beogradu) i u skladu sa preporukama EU Direktive 2010/63/EU za rad sa eksperimentalnim životinjama. Eksperimentalni protokol odobrio je Etički komitet Univerziteta u Beogradu (broj licence: 323-07-10519/2013-05/2).

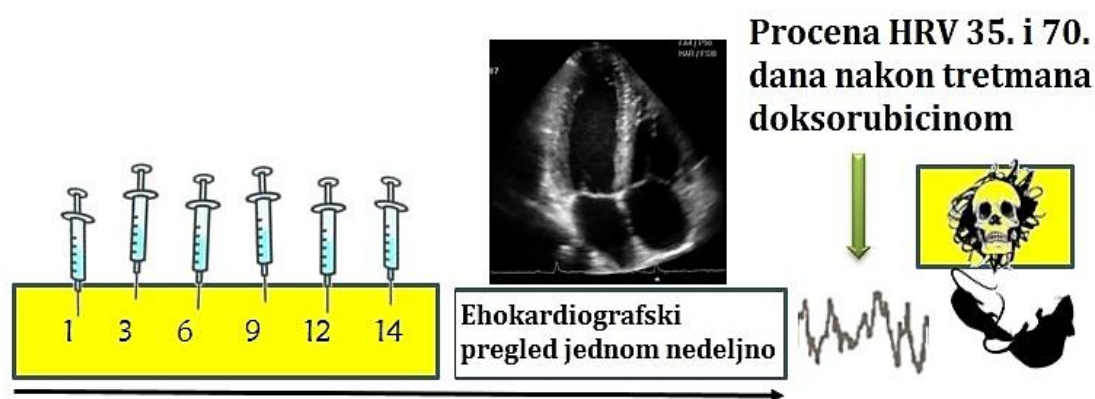
3.1. Eksperimentalne životinje

Svi eksperimenti vršeni su na mužjacima Wistar nesrodničkog (engl. *out-bred*) soja, starosti oko deset nedelja, telesne mase 330 ± 10 g. Broj eksperimentalnih životinja (n) određen je pomoću softvera Power Sample Size Calculations¹, uzimajući u obzir unutargrupnu varijabilnost parametara. Pacovi su nasumično podeljeni u dve eksperimentalne grupe: CONT (n = 18), kojoj je aplikovan fiziološki rastvor i DOX (n = 50) kojoj je aplikovan doksorubicin, a praćenje je vršeno u tri vremenska perioda: pre aplikacije doksorubicina (BASELINE), 35. dana (DOX35) od aplikacije i 70. dana (DOX70) nakon tretmana. Životinje su smeštane u individualne kaveze od pleksiglasa (dimenzija 25·25·25 cm) u kontrolisanim laboratorijskim uslovima (temperatura $22^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, vlažnost vazduha $60 \pm 5\%$, smenjivanje svetla i tame na 12 sati), a hrana i voda su im bili dostupni neograničeno.

¹ koji je dostupan na internet adresi
<http://biostat.mc.vanderbilt.edu/twiki/bin/view/Main/PowerSampleSize>

3.2. Razvijanje modela kardiomiopatije izazvane doksorubicinom

Protokol aplikacije doksorubicina ponovljen je prema prethodnom opisu Silveski-Ilišković i sar. (Siveski-Iliskovic et al. 1994), kako bi se razvio model doksorubicinske kardiomiopatije. Pacovima iz DOX grupe intraperitonealno je, u periodu od dve nedelje, aplikovano šest injekcija doksorubicina (2.5mg/0.5 ml/kg svakog drugog dana), do postizanja kumulativne doze od 15 mg/kg. Kontrolnoj grupi aplikovan je nosač (0.5 ml/kg fiziološkog rastvora) u šest injekcija, svakog drugog dana (slika 11).



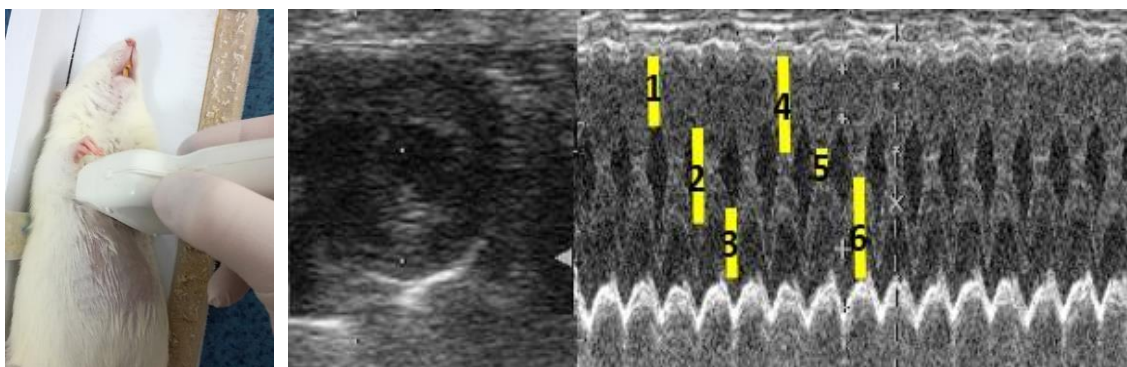
Slika 11: Vremenska linija eksperimenata

3.3. Procena opšte toksičnosti

Sve vreme trajanja eksperimentalnog protokola, beležene su vrednosti telesne mase životinja, praćeno njihovo svakodnevno ponašanje, habitus i opšte stanje. Takođe, notirana su i sva uginuća unutar opsega trajanja eksperimenata i na svakoj životinji (uginuloj ili žrtvovanoj) obavljena je autopsija. Nakon završetka eksperimentalnog protokola, na osnovu prikupljenih podataka, konstruisana je Kaplan-Majerova (Kaplan-Meier) kriva preživljavanja i grafik promena telesnih masa životinja.

3.4. Ehokardiografija

Srčani volumen i funkcija procenjivani su 35. dana (DOX35) i 70. dana (DOX70) od poslednje injekcije doksorubicina/fiziološkog rastvora, ali su ehokardiografski pregledi vršeni svake nedelje nakon aplikacije poslednje doze. Merenja su izvođena po protokolu Browna i sar. (Brown et al. 2002), modifikovanom prema uslovima Laboratorije za kardiovaskularnu farmakologiju, na blago-sediranim pacovima (acepromazin, 0.5 mg/kg i.m. 15 minuta pre pregleda) ultrazvučnim aparatom ALOKA ProSound2, linearnom sondom podešenom na frekvencu od 13 MHz, u desnoj parasternalnoj kratkoj osi u M-modu, sa eho-presekom na nivou papilarnih mišića (slika 12, levo)



Slika 12: Levo – Položaj ultrazvučne sonde pri pregledu srca pacova u kratkoj osi; Desno – ehokardiogram srca pacova u B-modu (presek na nivou papilarnih mišića) i M-modu kratke ose; 1: IVS_d; 2: LVID_d; 3: PW_d; 4: IVS_s; 5: LVID_s; 6: PW_s

Mereni su dijametri (slika 12, desno):

- ◆ međukomorne pregrade u dijastoli (engl. *interventricular septum in diastole* – IVS_d),
- ◆ međukomorne pregrade u sistoli (engl. *interventricular septum in systole* – IVS_s),
- ◆ unutrašnjeg prečnika leve komore u dijastoli (engl. *left ventricular diastolic internal diameter* – LVID_d),

- ◆ unutrašnjeg prečnika leve komore u sistoli (engl. *left ventricular systolic internal diameter* – LVID_s),
- ◆ debljine zadnjeg zida u dijastoli (engl. *posterior wall thickness at diastole* – PWD_d) i
- ◆ debljine zadnjeg zida u sistoli (engl. *posterior wall thickness at systole* – PWD_s).

Ostali parametri izračunati su na osnovu Teicholzovih formula (Brown et al. 2002),

i to:

- frakciono skraćenje leve komore: $FS (\%) = \frac{(LVID_d - LVID_s)}{LVID_d} \cdot 100$,
- volumen krvi na kraju dijastole (engl. *end diastolic volume* – EDV):
EDV (ml) = 1.047 · (LVID_d)³,
- volumen krvi na kraju sistole (engl. *end systolic volume*):
ESV (ml) = 1.047 · (LVID_s)³,
- udarni volumen (engl. *stroke volume* – SV): SV (ml) = EDV – ESV
- ejekciona frakcija leve komore (engl. *left ventricular ejection fraction* – LVEF):
 $LVEF (\%) = \frac{SV}{EDV} \cdot 100$

3.5. Hirurška procedura implantacije arterijskog katetera za registrovanje hemodinamskih parametara

Dan nakon ultrazvučnog pregleda, životinjama u opštoj anesteziji (2% ksilazin 10 mg/kg i.p. + 10% ketamin 90 mg/kg i.p.) u desnu femoralnu arteriju plasiran je polietilenski kateter radi merenja kardiovaskularnih parametara. Protokol kateterizacije sproveden je na sledeći način: u predelu desne ingvinalne regije u potpunosti je uklanjana dlaka i polje je dezinfikovano 96% etanolom. Životinja je postavljena da leži na leđima na ploči od pleksiglasa. Prednji i zadnji ekstremiteti su joj fiksirani radi uklanjanja neravnina na koži u zoni operacionog polja. U predelu *spatium femorale* pravljen je uzdužni rez, paralelan sa topografijom pružanja krvnih sudova u ovoj regiji. Potkožje je, zatim, preparisano pamučnim štapićima do ukazivanja krvnih sudova i nerva, koji su raspoređeni sledećim redom, gledano s leva na desno iz vizure istraživača: *n. femoralis*, *a. femoralis*, *v. femoralis*. Nakon toga, *a. femoralis* je malom anatomskom pincetom demarkirana iz okruženja vene i nerva. Deo arterije okrenut ka istraživaču podvezivan je hirurškim koncem debljine 4-0, a deo koji je okrenut na suprotnoj strani ligiran i pričvršćivan *mosquito*-peanom. Kada se arterija maksimalno istegne, na donjoj ili srednjoj trećini se makazama napravi mali rez pod uglom od 45 stepeni, nakon čega se forcepsom ulazi u arteriju (slika 13). Ispod forcepsa se, potom, lagano uvlači polietilenski kateter (OD-0.90 ID-0.58) ispunjen heparinom u fiziološkom rastvoru (50 IU/ml). Nakon inicijalnog uvlačenja katetera, potrebno ga je forcepsom lagano pogurati, obuhvatajući ga sa spoljašnje strane, preko zida krvnog suda. Kada je kateter dovoljno uvučen u arteriju (pozitivni znaci su ulazak krvi u kateter i pulsacije sinhronne sa otkucajima srca životinje), njegov slobodni kraj se fiksira koncem koji je bio pričvršćen peanom. Nakon toga, ekstremiteti pacova se oslobode na ploči i životinja se okrene da leži na stomaku. U predeo između lopatica pravi se mali rez kroz koji se uvlači spatula i laganim pokretima se prepariše supkutis, navodeći vrh spatule ka ingvinalnom kanalu životinje. Kada vrh spatule probije supkutis u ingvinalnoj regiji, arterijski kateter se ukotvi u središnji žleb spatule i lagano sprovodi do između lopatica. Inciziono mesto u ingvinalnoj regiji zašivano je hirurškim koncem debljine 4-0, kao i rez između lopatica. Životinja je, potom, postavljena na grejno jastuče, kako bi se uspostavila

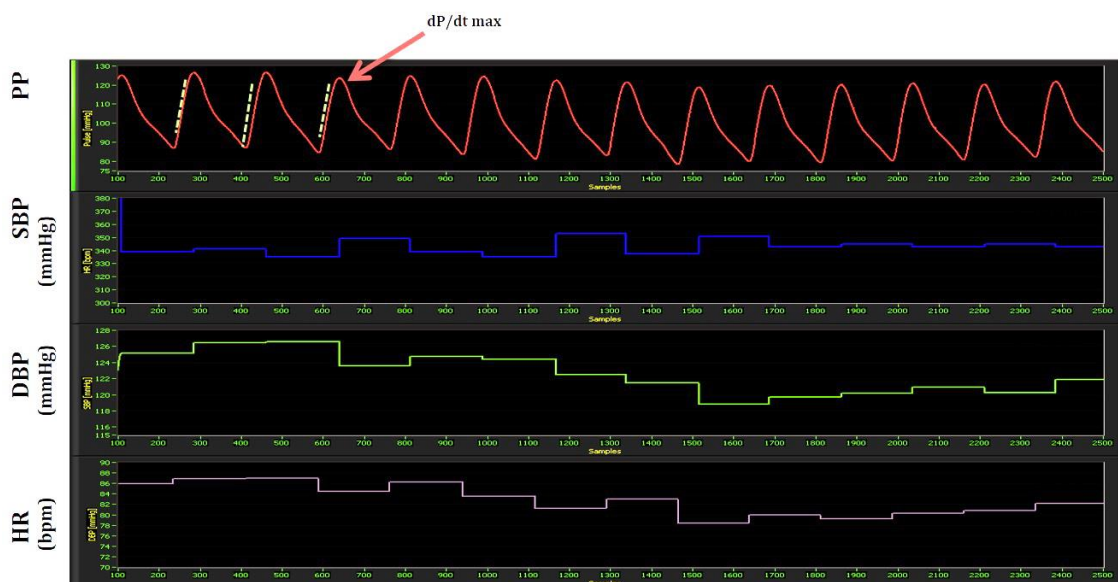
normotermija nakon ketaminskog efekta na termoregulaciju. Dva dana pre, i na dan operacije pacovi su bili tretirani gentamicinom (25 mg/kg/dan, i.m.). Protiv bola, životinje su pre uvođenja u anesteziju dobijale jednu dozu karprofena (5 mg/kg, s.c.). Oporavak je procenjivan na osnovu stepena zarastanja rane i opšteg stanja. Nakon, otprilike, 48 sati oporavka, svim životinjama su sfigmogramom Hugo SACHS Elektronik D79232 PlugSys MiniCase registrovane vrednosti hemodinamskih parametara (sistolni arterijski pritisak, dijastolni arterijski pritisak i srčana frekvencija) u vremenskom opsegu od 30 minuta.



Slika 13: Implantacija polietilenskog katetera u *a. femoralis dexter* pacova

3.6. Registrovanje i obrada hemodinamskih parametara

Vrednosti zabeleženog arterijskog krvnog pritiska pacova digitalizovane su na 1000 Hz u softveru baziranom na LabVIEW-u (National Instruments, Texas, SAD), koji je modifikovan u Laboratoriji za kardiovaskularnu farmakologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Sistolni krvni pritisak (engl. *systolic blood pressure*, SBP), dijastolni krvni pritisak (engl. *diastolic blood pressure*, DBP), pulsni interval (pulse interval, PI) i srčana frekvencija (engl. *heart rate*, HR) izdvojeni su iz talasa arterijskog pritiska kao maksimum (SBP), minimum (DBP), rastojanje između dva maksimuma (PI) i $60/PI[s]$ (HR) (slika 14).



Slika 14: Digitalni zapisi arterijskog krvnog pritiska (PP); SBP – sistolni krvni pritisak; DBP – dijastolni krvni pritisak; HR – srčana frekvencija; dP/dt max – brzina promene arterijskog krvnog pritiska u vremenu

3.6.1. Linearne metode obrade hemodinamskih parametara u vremenskom i frekvencijalnom domenu

3.6.1.1. Raspodela frekvencija u vremenskoj skali – Hilbert-Huangova transformacija

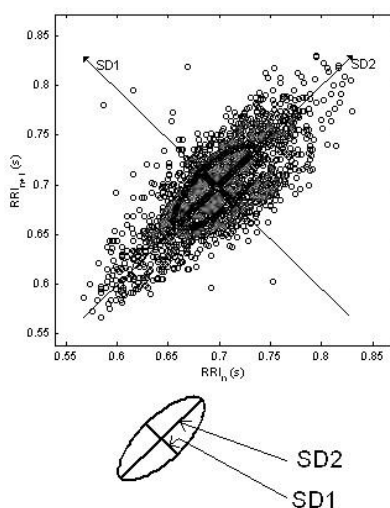
Hilbert-Huangova transformacija (HHT) je neparametarska metoda kojom se analiziraju nelinearni i nestacionarni podaci (Huang et al. 1998). Osnov HHT su: tzv. *mehanizam empirijskog razlaganja* (engl. *empirical mode decomposition* – EMD) i Hilbertova spektralna analiza. EMD je algoritam koji složene i beskonačne nizove nelinearnih i nestacionarnih podataka razlaže na konačne, malobrojne komponente, označene kao *jednostavne svojstvene funkcije* (engl. *intrinsic mode function* – IMF). IMF predstavlja jednostavnu harmonijsku funkciju, čija su amplituda i frekvencija u funkciji vremena. Broj ekstrema (max i min) i nula IMF treba da bude jednak, ili da se razlikuje maksimalno za jedan, a srednja vrednost osnovice lokalnog maksimuma i lokalnog minimuma treba biti nula (Huang et al. 1998). IMF je monokomponentni signal, što je u suprotnosti sa osobinama signala koji se dobijaju registrovanjem kardiovaskularnih parametara. Stoga je na signale kardiovaskularnih parametara neophodno primeniti EMD, kako bi se razdvojili i ograničili na više komponentata, koje se, potom, posmatraju kao monokomponentni modulosi (Li et al. 2011). U poređenju sa standardnim metodama spektralne analize (kao što je Furijeova transformacija), EMD ne poseduje ukalupljenu *osnovicu*, već se njegova *osnovica* generiše specifično prema signalu koji se analizira. Ovakav način doprinosi ne samo boljem razlaganju složenih signala, već i preciznijoj lokalizaciji vremena i frekvence. Uz pomoć HHT, IMF iz datog signala trenutno i jasno definisano izdvajaju frekvence u funkciji vremena. IMF predstavljaju adaptaciju nelinearnog i nestacionarnog podatka, koji je “očišćen” od artefakata (šuma) i na taj način pripremljen za analizu varijabiliteta srčane frekvence (de Souza Neto et al. 2007). Rezultat analize se prikazuje u formi trodimenzionalnog Hilbertovog spektra distribucije vremena, frekvencije i energije. Zbog ovakvih karakteristika, HHT su široko našle primenu u analizama fizioloških sistema (Salisbury & Sun 2004; Souza Neto et al. 2004) i EKG signala (Hadjileontiadis 2007; Zhang et al. 2007).

S obzirom na to da je kod pacova koji se slobodno kreću u kavezu PI za vreme snimanja nestacionaran na segmentima dužim od 30 minuta, u našim eksperimentima korišćena je analiza koja je prilagođena za nestacionarne objekte, i daje validne informacije o dinamičkim promenama trenutne energije i distribucijama frekvencija u vremenskoj skali. Primenjena je distribucija energije PI u vremenu kroz opseg frekvencije koja je odabrana uz pomoć Hilbert-Huangove transformacije (Huang et al. 1998). PI snimak interpoliran je na 10 Hz. Snimak krvnog pritiska od 30 minuta daje dovoljno digitalnih podataka da se formira opseg frekvencija (0.02-2,5 Hz), uključujući i HF, LF i VLF.

3.6.2. Nelinearne metode obrade hemodinamskih parametara

3.6.2.1. Poenkareovi dijagrami

Poenkareov dijagram (engl. *Poincaré plot* – PP) je grafik rasutih tačkaka (engl. *scattergram*) koji opisuje trenutnu dužinu trajanja srčanog ciklusa (R-R interval na EKG-u) u odnosu na dužinu prethodnog RR intervala (Woo et al. 1992). Konstruiše se u pravougaonom Dekartovom koordinatnom sistemu nanošenjem tačkaka koje predstavljaju dva uzastopna otkucaja srca (RR intervali – RR_i i RR_{i+1}). Nanesene tačke imaju tendenciju grupisanja u formi elipse oko centralne zone označene kao *linija identiteta*. Centar elipse određen je prosečnim RR intervalom. Gustina tačkaka oko linije identiteta ima svoju dužinu (SD_2) i širinu (SD_1) (slika 15). Brennan i sar. (Brennan et al. 2001) su meru rasutosti tačkaka koja je perpendikularna liniji identiteta označili kao meru kratkoročne varijabilnosti RR intervala (SD_1), a meru rasutosti račkaka duž linije identiteta kao meru dugoročne varijabilnosti RR intervala (SD_2). SD_1 i SD_2 se još označavaju i kao *deskriptori Poenkarevog dijagrama* (engl. *plot descriptors*).



Slika 15: Poenkareov dijagram; SD_1 – mera kratkoročnog varijabiliteta; SD_2 – mera dugoročnog varijabiliteta

Tačke grupisane iznad linije identiteta predstavljaju svako usporenje srčanog ritma (SD_{1up}), a tačke ispod linije identiteta svako ubrzanje rada srca (SD_{1down}). Kod zdravih jedinki, opseg RR intervala je veliki, te je disperzija tačaka na grafiku karakteristična, i podseća na elipsu ili kometu. Oblik PP kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom varira, i može biti: u formi torpeda, lepezastog oblika ili nepravilnog, sa nekoliko razdvojenih odeljaka (Woo et al. 1994).

Budući da Poenkareovi dijagrami omogućavaju šematski prikaz perioda između dva otkucaja srca, ovom se nelinearnom metodom mogu otkriti promene koje nastaju kao rezultat neperiodičnih fluktuacija srčane frekvence (Abraham & Shaw 1992). Ova metoda ne zahteva normalnu distribuciju RR intervala, a omogućava praćenje promena u srčanoj frekvenci od momenta do momenta, nezavisno od standardne devijacije RR intervala (Woo et al. 1992). Analiza oblika grupisanih tačaka na PP dijagramu se koristi u kliničkoj praksi za interpretaciju EKG signala (Sosnowski et al. 2005). Ovom metodom se, takođe, opisuju i efekti simpatikusa i parasimpatikusa na rad srca (Toichi et al. 1997; Kamen et al. 1996). PP dijagram je metoda pogodna za prognostiku mortaliteta kod pacijenata nakon infarkta miokarda, hronične srčane insuficijencije i drugih oboljenja kardiovaskularnog sistema (Mäkikallio et al. 1997; Hnatkova et al. 1995; Stein et al. 2005). Premda je uobičajeno da se standardni parametri Poenkareovih dijagrama smatraju nelinearnim, to nije u potpunosti korektno, jer je analitički dokazana veza tih parametara sa linearnim parametrima srčanog varijabiliteta (Brennan et al. 2002).

U našim eksperimentima, geometrijsko predstavljanje $PI_{(n)}$ i $PI_{(n+1)}$ prikazivano je za kompletnu dužinu snimka kardiovaskularnih parametara od 30 minuta. Za opise standardnih PP, SD_1 i SD_2 korišćene su formule prema Piskorskom i Guziku (Piskorski & Guzik 2007). Širina PP (SD_1) kao mera kratkoročnog varijabiliteta određena je standardnom devijacijom udaljenosti tačaka na grafikonu od središnje linije identiteta. Dužina PP (SD_2) kao mera dugoročnog varijabiliteta, određivana je kao standardna devijacija PI intervala udaljenosti tačaka duž središnje linije identiteta. Dinamička redistribucija $PI_{(n)}$ i $PI_{(n+1)}$ parova praćena je u dužini PI

segmenta od 5 minuta i posmatrala se promena gustine grupisanih tačaka na dijagramu.

3.6.2.2. Aproksimativna entropija i entropija uzorka

Nelinearne dinamičke analize omogućavaju pristup razumevanju bioloških sistema i njihovog funkcionisanja. Međutim, precizniji proračuni obično zahtevaju sakupljanje većeg broja podataka, što je nekada nemoguće izvesti. Pincus (Pincus 1991) je, na osnovu Kolmogorove entropije, razvio teoriju i metodu za određivanje stepena (ne)uređenosti sistema, koje mogu da daju precizne proračune i nakon analize kratkih i artefaktima obilnih skupina podataka iz kliničke prakse. Tu statističku metodu je nazvao *aproksimativna entropija* (engl. *approximate entropy* – ApEn), jer, iako po formulaciji veoma podseća na entropiju Kolmogorova, ne može se strogim matematičkim putem iz nje izvesti.

Metoda analizira vremenske nizove, tražeći sličnost između parova sekvenci dužine m : što je učestalost i sličnost parova izraženija, to su vrednosti ApEn niže. Za zadatu vrednost dužine niza N , vrednosti ApEn (m, r, N) se izražavaju kao razlika prosečne vrednosti negativnog prirodnog logaritma uslovne verovatnoće da su dve sekvence u okviru tolerancije r , u slučaju da su parovi dužine m i u slučaju da su parovi dužine $m+1$. Odnosno, pokazuje u kolikoj meri se menjaju osobine niza kada dužina sekvenci u parovima poraste za jedan. Stoga, niske vrednosti ApEn odražavaju visok stepen pravilnosti. Algoritam ApEn svaku sekvencu uparuje i sa samom sobom, što u proračune, obavezno, uključuje i nepoželjnu samosličnost. Ova karakteristika čini ApEn pristrasnom metodom iz dva razloga: prvi razlog je što je ApEn zavisna od dužine/veličine snimljenih podataka, te kod analize kratkih serija daje uniformno niske vrednosti; drugi razlog je nekonzistentnost (ukoliko je, na primer, vrednost ApEn jedne serije podataka viša u odnosu na drugu, trebalo bi da ostane viša i nakon testiranja u različitim uslovima, što nije slučaj (Pincus 1995). Kako bi se ublažila ova pristrasnost, Richman i Moorman (Richman & Moorman 2000) su razvili novu statističku metodu nazvanu *entropija uzorka* (engl. *sample entropy* – SampEn). Razlika između ApEn (m, r, N) i SampEn (m, r, N) je u tome što se u prvoj

usrednjavaju logaritmi verovatnoća, a u drugoj se usrednjavaju verovatnoće, pa se tek nakon toga logaritmuju. Pored toga, SampEn ne uzima u obzir samouparivanje kod računanja verovatnoće. Entropija uzorka ne zavisi u tolikoj meri od dužine/veličine podataka kao ApEn, i pod različitim uslovima pokazuje povećanu relativnu konzistentnost, u odnosu na ApEn. Takođe, algoritam SampEn je jednostavniji nego ApEn algoritam i zahteva dvostruko manje vremena da se njime odrade proračuni, jer logaritmuje samo jednom, a ne N puta.

Parametri N , m i r moraju biti konstantni pri svakom proračunu. N označava dužinu vremenskog ciklusa, m – dužinu sekvenci koje se porede a r – prag tolerancije za izabrane parnjake. Uobičajeno je da se tolerancija podesi kao $r \cdot SD$, gde je SD standardna devijacija grupe podataka, što omogućava merenje i upoređivanje vrednosti između različitih grupa sa različitim amplitudama. Parametar m je u tesnoj vezi sa dužinom N i pragom tolerancije r . Kao validan izbor parametra m , Lu i saradnici (Lu et al. 2008) predlažu pristup tzv. *lažnog najbližeg suseda* (engl. *false nearest neighbours* – FNN) koji su definisali Kennel i saradnici (Kennel et al. 1992). Koncept FNN zasniva se na testiranju ponašanja parova tačaka koji su smešteni vrlo blizu jedan drugome, nakon što se promeni širina prostora između njih. Kada je prostor između parova mali, mnogi od tih parova biće lažni. Kako se prostor povećava, parovi postaju stvarni i prestaju da budu susedni. Na taj način se može odrediti dovoljna veličina parametra m . Validna procena zahteva veliki broj perioda N .

Kod računanja ApEn treba pažljivo proračunati verovatnoću individualno za svaki uzorak. ApEn algoritam svaki od $N-m+1$ uzoraka dužine m upoređuje ga sa izabranim uzorkom, pa se zato i dešava da se uzorak preklapa sam sa sobom. Pincus i Goldberger (Pincus & Goldberger 1994) su primetili da ova osobina čini ApEn pristrasnom metodom, što u statističkoj terminologiji znači da se očekivane vrednosti ne poklapaju sa parametrima koje procenjuju. Kod SampEn, pristrasnost je smanjena, jer je izbegnuto upoređivanje vrednosti sa samima sobom. Entropija uzorka podrazumeva da je vremenski ciklus koji se analizira uzorkovan iz nekog kontinuiranog procesa.

Očekivano je da statistika ApEn ima dve osobine: prva osobina je da se uslovna verovatnoća sekvenci u okviru r smanjuje srazmerno smanjivanju vrednosti r (vrednosti ApEn (m, r, N) treba da rastu kako vrednosti r opadaju); druga osobina ApEn je njena nezavisnost od dužine/veličine uzorka koji se analizira.

Procena entropije u našim eksperimentima vršena je na osnovu: dužine trajanja vremenske serije (N), dužine segmenta (obrasca) (m) i normalizovanih vrednosti praga (tolerancije) (r). U ovom radu odabrano je da dužina segmenta bude $m = 3$, koristeći FNN pristup za dužinu trajanja vremenske serije $N = 1024$ uzorka (kratki stacionarni segmenti). Na osnovu tih parametara, izračunata je entropija $ApEn_{m,N}(r)$ za $r = (0-0.5)$.

3.6.3. Evaluacija senzitivnosti spontanog barorefleksa metodom sekvenci

Barorefleksne sekvence SBP i PI identifikovane su kompjuterski. Najmanje 4 uzastopno rastuća ili opadajuća para SBP i PI sa PI zakašnjenjem od 3, 4 i 5 otkucaja uzimano je u obzir (Bajić et al. 2010). Funkcija barorefleksa procenjivana je na osnovu sledećih parametara:

1. Senzitivnosti barorefleksa BRS [ms/mmHg] (srednji linearni regresioni koeficijent od svih identifikovanih sekvenci. Analizirane su odvojeno i padajuće i rastuće sekvence).
2. Opsega delovanja OP [ms·mmHg] (pravougaona površina na grafiku koja obuhvata 95% SBP PI parova u obe dimenzije pravougaonika);
3. Težišta rada barorefleksa (SP) za PI [ms] i za SBP [mmHg] (računa se kao medijana svih identifikovanih SBP i PI parova).

3.7. Biohemijski markeri oštećenja kardiomiocita pod uticajem doksorubicina

Po završetku registracije hemodinamskih parametara, pacovima je preko polietilenskog katetera iz femoralne arterije uzorkovan 1 ml krvi u plastične epruvete bez dodatka antikoagulansa. Krv je centrifugirana 10 minuta na 4000 o/m. Serum je alikvotiran i zamrznut na -20°C. Nivoi cTnI i cTnT mereni su metodom elektrohemiluminiscencije – *ECLIA* (Roch Diagnostic). Donji prag detekcije za cTnI bio je 0.2 ng/ml (u opsegu od 0.2 ng/ml do 25 ng/ml) a za cTnT 0.01 ng/ml (u opsegu od 0.01 ng/ml do 25 ng/ml).

3.8. Patohistološka analiza

Nakon merenja kardiovaskularnih parametara, pacovi u opštoj anesteziji eutanazirani su injekcijom T61™ preparata (150 mg/kg, i.p.). Srce, bubrezi, jetra, slezina i mozak bili su sakupljeni i fiksirani 48 sati u 4% formaldehidu. Nakon toga, tkiva su ukalupljena u parafinu, iz koga su mikrotomom odsecani histološki tkivni preparati debljine 3 µm, koji su bojeni hematoksilin-eozinom (HE), Masson's trichrome (MT) i Elastica-Masson (EM) tehnikom.

3.9. Genska ekspresija srčanih β1 i β2 adrenergičkih receptora

Tkivo uzorkovanog 50 mg vrha srčanog mišića mehanički je i ultrazvučno homogenizovano ultrazvučnim homogenizerom (BandelinSnopuls, Berlin, Nemačka) u 500 µl trizola (Life Technologies, Carlsbad, SAD). Nakon denaturacije proteina u trizolu, ukupna RNK je ekstrahovana iz vodene faze dodavanjem 100 µl hloroforma (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemačka) a zatim nataložena sa 250 µl 2-propranola. Kvalitet i prinos RNK iz uzorka evaluirani su uz pomoć BioSpec-nano (Shimadzu, Kyoto, Japan). Nakon toga, reverznom transkripcijom iz 500 ng/µl ukupne RNK, po protokolu proizvođača QuantiTech Reverse Transcription komercijalnog kita (Qiagenm Hiden, Nemačka), sintetisana je komplementarna DNK (cDNK).

RT-qPCR je izveden uz pomoć Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied biosystems, Warrington, UK) u Applied Biosystems ViiATM 7 (Foster City, CA, SAD) koristeći mikroploče sa 96 raspoloživih bunara (Foster City, CA, SAD). Primenjeni prajmeri (Invitrogen, Pacle, UK) dizajnirani su korišćenjem ili NCBI Primer Blast (NCBI Resource Coordinators, 2015) ili Primer Express programskih softvera (verzija 3.0.1, Thermo Fisher Scientific, Foster City, SAD) kako bi se specifično amplifikovao gen za β 1-AR (forward: 5'-AGA CGT GCT ATG TGT GAC GG-3'; reverse: 5'-AGC ACT TGG GGT CGT TGT AG-3'), gen za β 2-AR (forward: 5'-TGG ATT GTG TCG GGC CTT A-3'; reverse: 5'-TGG CAC GGT ACC AGT GCA T-3') i GAPDH (forward: 5'-CAG GGC TGC CTT CTC TTG TG-3'; reverse: 5'-GAT CTC GCT CCT GGA AGA TGG-3') koji je odabran kao domaćićki (engl. *housekeeping*), konstitutivno eksprimiran gen. Svi uzorci su umnoženi u triplikatu na mikropločama sa 96 raspoloživih bunara (Foster City, CA, SAD) u 12 μ l zapremine rastvora koji je sadržao: 1 μ l cDNK predložka, 0.5 μ l/100 nM prajmera, 6 μ l SYBR Green PCR Master Mix i 4 μ l vode slobodne od RNaza. Temperaturni protokol reakcije lančanog umnožavanja DNK je obuhvatao je: denaturaciju cDNK (50°C – 2min, 95°C – 10min), 40 ciklusa umnožavanja cDNK (95°C - 15 sec, 60°C - 1 min) i analizu krive topljenja (95°C - 15 sec, 60°C – 1 min, 95°C – 15 sec). Relativna genska ekspresija je određena metodom $2^{-\Delta\Delta C_t}$ koristeći ViiATM7 softverski program (verzija 1.2, Foster City, CA, SAD).

3.10. Korišćene supstance

Doksorubicin hidrohlorid (Adriblastina[®] RD, prašak za injekcije) je kupljen od Pfishera (Beograd). Ketamin hidrohlorid (Ketamidol 10%[®], rastvor za injekcije 100 mg/ml), ksilazin hidrohlorid (Xylased[®] rastvor za injekcije 20 mg/ml), karprofen (Rimadyl[®] rastvor za injekcije 50 mg/ml), acepromazin maleat (Neurotranq[®] rastvor za injekcije 10 mg/ml) i kombinacija embutiramid + tetrakain (T61[®] rastvor za injekcije) su nabavljeni od Marlo Farme (Beograd). Gentamicin[®] je kupljen od Hemofarma[®] (Vršac).

3.11. Statistička analiza

Rezultati u tabelama prikazani su kao srednja vrednost \pm standardna greška (s.e.m.). Za statistička poređenja kardiovaskularnih parametara između eksperimentalnih grupa korišćen je Man-Vitnijev (Man-Whitney) test u GraphPad Prism softveru, dok su vrednosti dobijene RT-qPCR analizom upoređivane i evaluirane jednosmernim ANOVA testom, praćenim post hoc Fišerovim (Fisher) LSD testom u SPSS statističkom softveru (verzija 10.0, Chicago, IL, SAD). Statistička značajnost prihvaćena je za vrednost $p < 0.05$.

4. REZULTATI

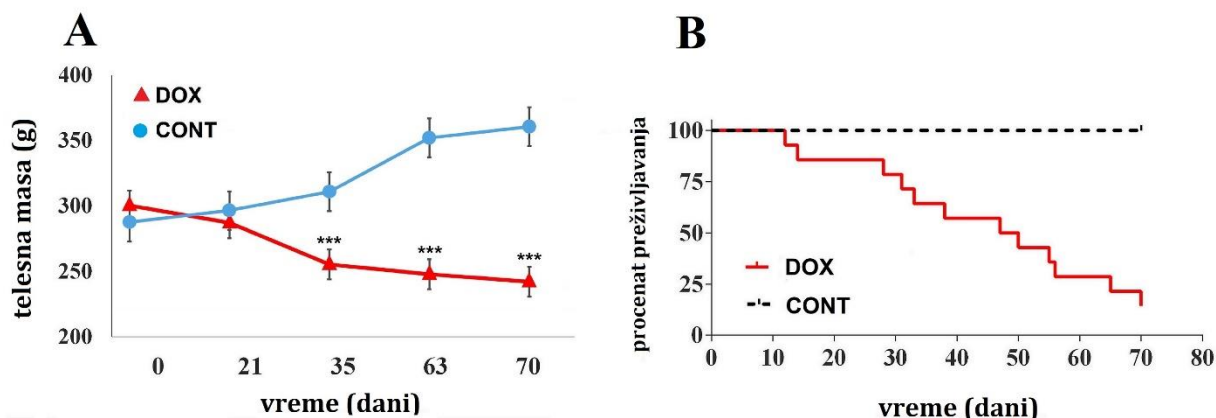
4.1. Opšta toksičnost doksorubicina

Kod svih pacova tretiranih doksorubicinom, zapažene su habitusne promene u vidu: nakostrešenog i proređenog krzna, smanjene spontane motorne aktivnosti, smanjenog uzimanja hrane i vode, izmršavelosti/kaheksije, izražene *chromodacryorrheae* (slika 16), profuzne dijareje a zatim opstipacije i slabog preživljavanja (dijagram 1, B).



Slika 16: Habitus pacova tretiranog doksorubicinom: nakostrešeno krzno, pogrbljen položaj tela, crveni krugovi oko očiju (*chromodacryorrhea*)

Telesna masa pacova u DOX grupi opadala je u funkciji vremena, dok je kod pacova u CONT grupi uzastopno rasla (dijagram 1, A).



Dijagram 1: Telesna masa (A) i Kaplan-Meierova kriva preživljavanja (B) pacova tretiranih doksorubicinom. Zapaža se pad telesne mase i stope preživljavanja kod pacova tretiranih doksorubicinom. *** $p < 0.001$ vs CONT; CONT: kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom; DOX: grupa tretirana doksorubicinom

4.2. Morfološke i funkcionalne promene srca izazvane doksorubicinom

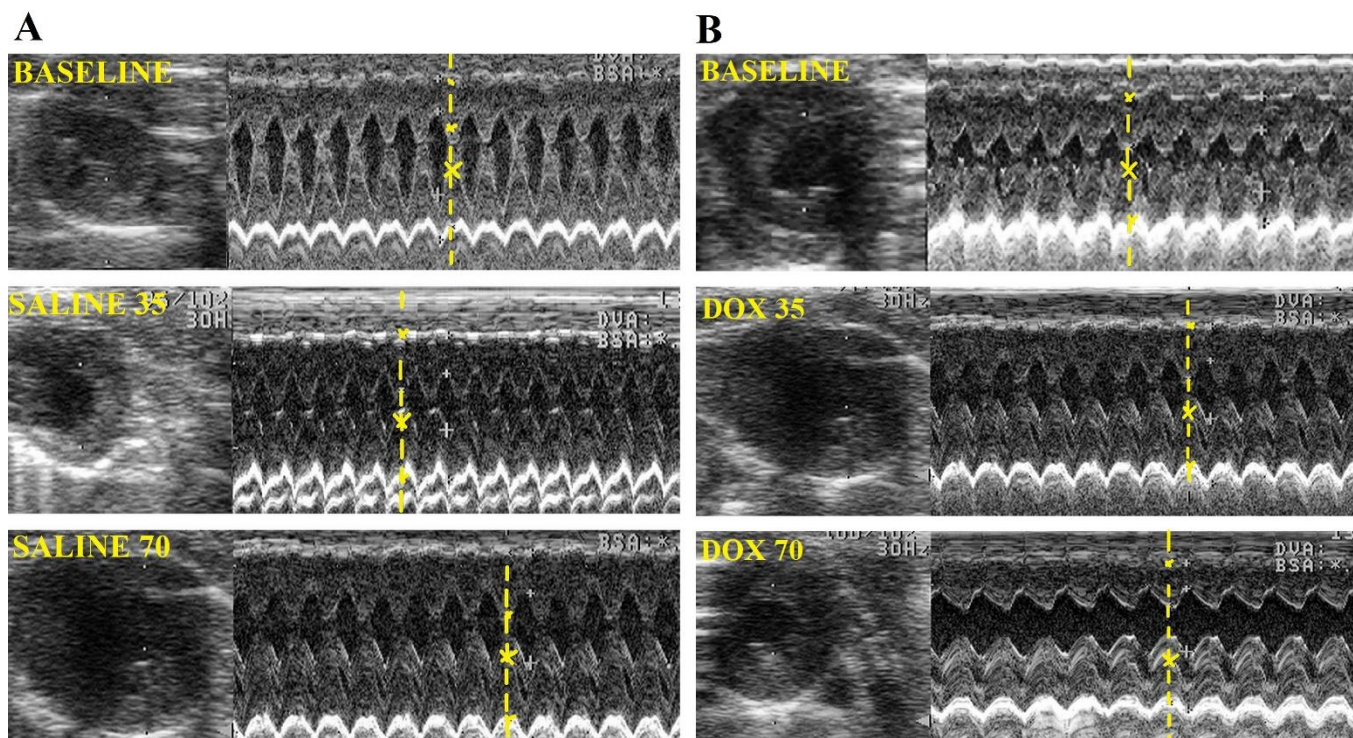
Evaluacijom srčane funkcije i volumena na nedeljnom nivou, kod pacova tretiranih doksorubicinom u periodu pre 35. dana i 35. dana nisu uočene razlike u odnosu na bazalne vrednosti (BASELINE) izmerene kod istih životinja pre tretmana doksorubicinom (DOX) i u odnosu na odgovarajuću grupu životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (CONT). Vidljivi znaci razvoja srčane slabosti pojavili su se tek kod DOX70 grupe (tabela 1): IVS_s parametar je bio statistički značajno snižen, dok su vrednosti $IVSD_d$ i $LVID_s$ parametara bile povišene u odnosu na BASELINE vrednosti i CONT grupu. Vrednosti izračunatog EDV i EF bile su dvostruko više u odnosu na BASELINE i CONT vrednosti.

Tabela 1. Ehokardiografski parametri pacova iz CONT i DOX grupe

Parametar	CONT			DOX 35		DOX 70	
	BASELINE	SALINE 35	SALINE 70	BASELINE	DOX 35	BASELINE	DOX 70
IVSd (cm)	0,22± 0,01	0,23± 0,01	0,25± 0,01	0,26 ± 0,01	0,21 ± 0,01*	0,25 ± 0,01	0,19 ± 0,01 * †
LVIDd (cm)	0,44 ± 0,04	0,44± 0,02	0,46± 0,04	0,49 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,57 ± 0,02 *** ††
LVIDs (cm)	0,24±0,04	0,25± 0,03	0,23± 0,01	0,25 ± 0,04	0,23 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,30 ± 0,03 *** ††
LVEF (%)	88,15 ± 1,82	88,68± 0,31	85,87 ± 2,63	88,33 ± 1,87	88 ± 0,02	91,00 ± 2,00	84,00 ± 4,00 *
LVEDV (ml)	0,22± 0,08	0,25± 0,03	0,28 ± 0,09	0,28 ± 0,07	0,38 ± 0,06	0,30 ± 0,04	0,45 ± 0,05 *

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost šest varijabli ± s.e.m. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 vs. BASELINE u okviru iste eksperimentalne grupe, †p<0.05; ††p<0.01; †††p<0.001 vs. CONT; IVS_d: interventricular septum in diastole; LVID_d: left ventricular internal diameter in diastole; LVID_s: left ventricular internal diameter in systole; LVEF: left ventricular ejection fraction; LVEDV: left ventricular end diastolic volume; CONT: kontrolna grupa, pacovi tretirani fiziološkim rastvorom; SALINE: eho-parametri pacova iz CONT grupe; BASELINE: vrednosti eho-parametara izmerenih neposredno pre aplikacije fiziološkog rastvora/doksorubicina; DOX35: vrednosti eho-parametara pacova tretiranih doksorubicinom izmerenih 35. dana od aplikacije; DOX70: vrednosti eho-parametara pacova tretiranih doksorubicinom izmerenih 70. dana od aplikacije.

Slika 17B prikazuje tipični ehokardiogram pacova pre tretmana, 35. i 70. dana od tretmana doksorubicinom.



Slika 17: Ehokardiogrami (B- i M-mod) pacova tretiranih fiziološkim rastvorom (A) i doksorubicinom (B); Zapaža se izrazita dilatacija leve komore kod pacova u DOX70 grupi; BASELINE: merenja neposredno pre aplikacije fiziološkog rastvora/doksorubicina; SALINE35: merenja izvršena 35. dana od aplikacije fiziološkog rastvora; SALINE70: merenja izvršena 70. dana od aplikacije fiziološkog rastvora; DOX35: merenja izvršena 35. dana od aplikacije doksorubicina; DOX70: merenja izvršena 70. dana od aplikacije doksorubicina

4.3. Promene sistolnog i dijastolnog pritiska, srčane frekvence i varijabiliteta srčane frekvence izazvane doksorubicinom

U DOX35 grupi, svi parametri HR varijabiliteta bili su povišeni u vremenskom i frekvencijskom domenu, kao i vrednosti SBP, DBP i HR (tabela 2). Analiza frekvencija ukazuje na povišenje HRV kod DOX35 grupe u odnosu na CONT grupu u okviru svih spektralnih domena, kao i povećanje LF/HF količnika.

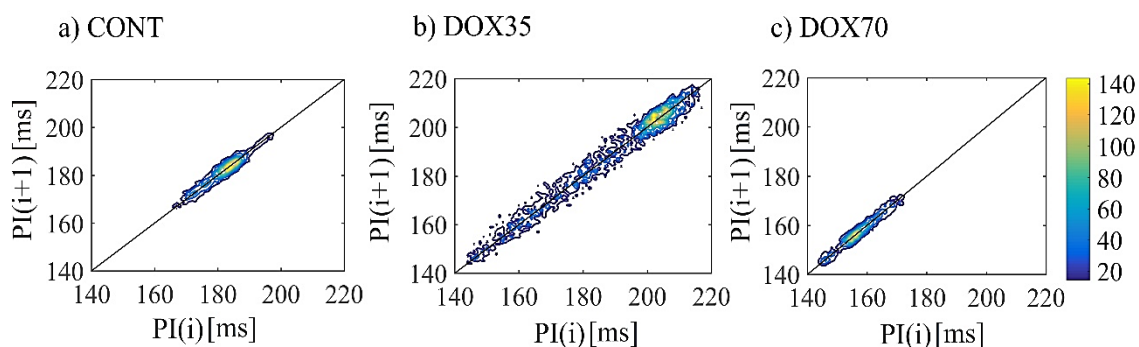
Tabela 2. SBP, DBP, i kratkoročni varijabilitet kod pacova tretiranih doksorubicinom

	CONT	DOX 35	DOX 70
HR [bpm]	344 ± 3	348 ± 3	331 ± 6
SBP [mmHg]	124 ± 1	130 ± 1 *	↑ 124 ± 1
DBP [mmHg]	79 ± 0.4	84 ± 1 **	↑ 98 ± 1 *** ↑
SD₁ [ms]	2,4 ± 0,2	4.1 ± 0,6 *	↑ 3.0 ± 0.7
SD₂ [ms]	12.5 ± 2,2	21.9 ± 2.1 *	↑ 12,3 ± 4,2
P_{PI_LF} [ms²]	17,3 ± 0,9	112,2 ± 9.6 ***	↑ 27.2 ± 2,9
P_{PI_HF} [ms²]	48,5 ± 2,2	106,7 ± 8,1 ***	↑ 89.2 ± 9.0
P_{PI_LF} / P_{PI_HF}	0,4 ± 0,02	1,2 ± 0,1 ***	↑ 0.3 ± 0,1
P_{SBP_LF} [mmHg]	59.9 ± 3.6	64.2 ± 6.1	18.2 ± 2 *** ↓
P_{SBP_HF} [mmHg]	25.2 ± 1.2	26.3 ± 1.9	19.0 ± 1.4 *** ↓

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost šest varijabli ± s.e.m.. SD₁: standardna devijacija upravna liniji identiteta; SD₂: standardna devijacija duž linije identiteta. P_{PI_LF}: prosečna snaga pulsog intervala niske frekvencije; P_{PI_HF}: prosečna snaga pulsog intervala visoke frekvencije; P_{PI_LF}/P_{PI_HF}: odnos između niske snaga niske i visoke frekvencije; P_{SBP_LF}: prosečna snaga niske frekvence sistolnog krvnog pritiska; P_{SBP_HF}: prosečna snaga visoke frekvence sistolnog krvnog pritiska. *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001 vs. CONT; CONT: kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom; DOX35: grupa koja je dobijala doksorubicin i promene na srcu su praćene u intervalu od 35 dana; DOX70: grupa koja je dobijala doksorubicin i promene na srcu su praćene u intervalu od 70 dana

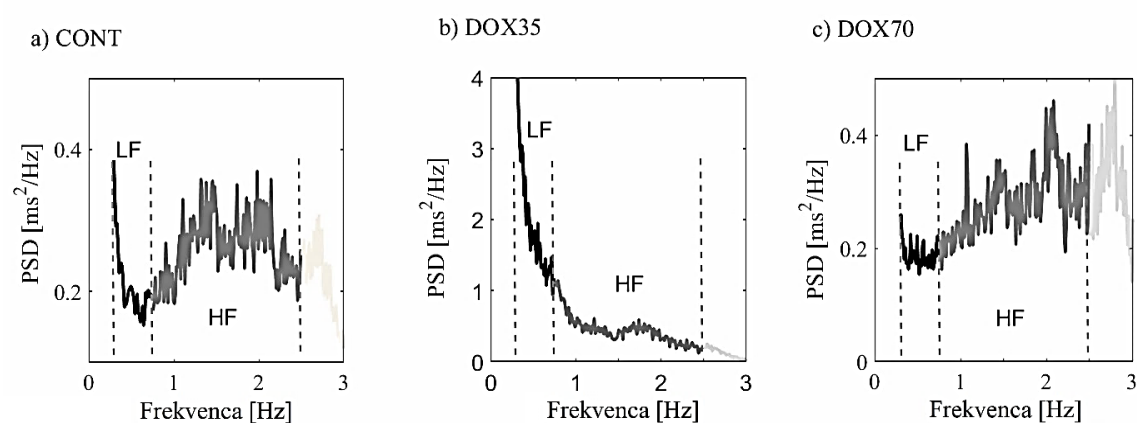
HR vrednosti kod DOX35 i DOX70 grupe bile su u fiziološkim granicama. Vrednosti SBP i DBP kod DOX35 grupe i DOX70 grupe bile su statistički značajno povišene u odnosu na CONT grupu.

Poenkareovi dijagrami pacova iz DOX35 grupe pokazuju povećanje standardne devijacije (tabela 2, dijagram 2), kako duž linije identiteta (SD_2), tako i perpendikularno (SD_1) i gubitak oblika komete, koji je karakterističan za CONT grupu. Srednje vrednosti parametara Poenkareovog dijagrama DOX70 grupe nisu se značajno razlikovale od kontrolnih vrednosti. Gustina tačaka na dijagramu potvrđuje povećanu varijabilnost oko zone grupisanja i sužava se oko područja na dijagramu koja obuhvataju više od 10 $PI_{(n)} / PI_{(n+1)}$ parova.



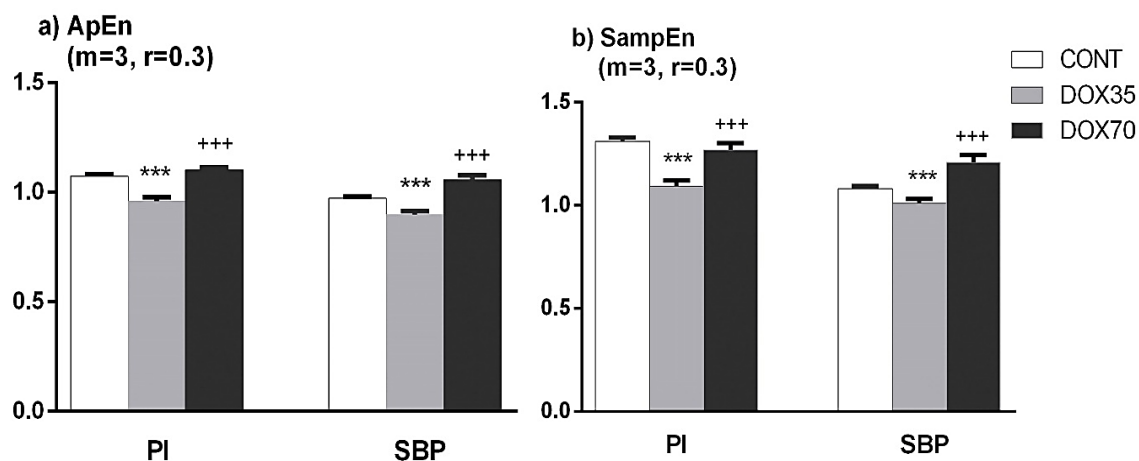
Dijagram 2: Poenkareovi dijagrami pacova tretiranih doksorubicinom. U DOX35 grupi zapaža se veća rasejanost tačaka na upravnoj i duž linije identiteta u odnosu na CONT grupu; CONT: kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom; DOX35: grupa koja je dobijala doksorubicin i promene na srcu su praćene u intervalu od 35 dana; DOX70: grupa koja je dobijala doksorubicin i promene na srcu su praćene u intervalu od 70 dana; PI: Pulsni interval

Pregrupisavanje spektralne gustine snage po različitim frekvencijskim opsezima i prosečni porast ukupne snage primećeni su u PI seriji kod DOX35 grupi (tabela 2). Prosečna snaga kod LF i HF opsega bila je, takođe, statistički značajno povišena kod DOX35 grupe, sa značajno promenjenim LF/HF količnikom, ukazujući na uticaj povišenog LF dela spektra u odnosu na CONT grupu. Vrednosti LF/HF količnika kao i LF kod DOX70 grupe vratile su se na bazalne, u poređenju sa CONT grupom (tabela 2, dijagram 3). Važno je naglasiti da su tri pacova iz DOX70 grupe imala snižene vrednosti snage PI kako u LF tako i u HF domenu, što je bilo udruženo sa hepato-renalnim promenama koje su kod ovih jediniki dovele do letalnog ishoda. Snaga SBP spektra kako u LF tako i u HF domenu bila je značajno snižena kod DOX70 grupe u odnosu na CONT grupu. Vrednosti DBP bile su uporedive sa SBP vrednostima spektra.



Dijagram 3: Gustina snage PI spektra kod pacova tretiranih fiziološkim rastvorom (CONT) ili doksorubicinom (DOX35 i DOX70). Zapaža se povećanje gustine LF i HF snage spektra kod DOX35 grupe (gde je Y koordinata gustine spektra podešena na maksimalni podeok 4) u odnosu na CONT grupu; CONT: kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom; DOX35: grupa koja je dobijala doksorubicin i promene na srcu su praćene u intervalu od 35 dana; DOX70: grupa koja je dobijala doksorubicin i promene na srcu su praćene u intervalu od 70 dana; PSD: Power spectral density

Vrednosti aproksimativne i entropije uzorka za PI i SBP za nepromenljivi prag standardne devijacije $r = 0.3$ i dužinu vremenske serije $N = 1024$, prikazane su na dijagramu 4. Kod DOX35 grupe, vrednosti kako aproksimativne tako i entropije uzorka bile su statistički značajno snižene u odnosu na CONT grupu (dijagram 4).



Dijagram 4: Aproksimativna i entropija uzorka PI i SBP vremenskih serija pacova tretiranih doksorubicinom. Uočava se da su ApEn i SampEn smanjene kod DOX35 grupe u odnosu na CONT grupu. *** $p < 0,001$ vs CONT; +++ $p < 0,001$ vs DOX35; ApEn: aproksimativna entropija; SampEn: entropija uzorka; PI: pulsni interval; SBP: systolic blood pressure.

4.4. Dejstvo doksorubicina na spontani barorefleks

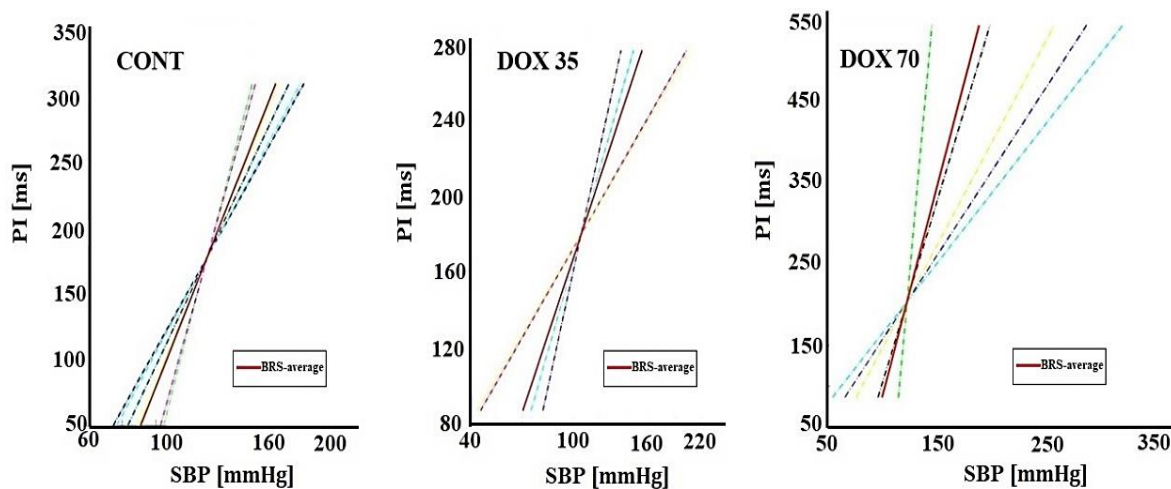
Srednje vrednosti spontanog baroreceptorskog refleksa (sBRS) kod pacova tretiranih doksorubicinom bile su statistički značajno povećane kod DOX35 grupe (tabela 3) u odnosu na CONT grupu. Nakon 70. dana od tretmana doksorubicinom, osetljivost barorefleksa je nastavila da statistički značajno raste kod DOX70 grupe u odnosu na CONT grupu.

Tabela 3. Osetljivost baroreceptorskog refleksa kod pacova tretiranih doksorubicinom

	CONT	DOX35	DOX70
BRS [ms/mmHg]	0,76 ± 0,11	1,61 ± 0,17***	2,02 ± 0,29***

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost šest varijabli ± s.e.m.. **p<0.01, ***p<0.001 vs. CONT; CONT: kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom; DOX35: grupa koja je dobijala doksorubicin i promene na srcu su praćene u intervalu od 35 dana; DOX70: grupa koja je dobijala doksorubicin i promene na srcu su praćene u intervalu od 70 dana

Porast i oscilacije pulsog intervala bili su uočljivi u DOX70 grupi, u odnosu na CONT grupu (dijagram 5).



Dijagram 5: Spontani barorefleks pacova tretiranih doksorubicinom; CONT: kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom; DOX35: grupa koja je dobijala doksorubicin i promene na srcu su praćene u intervalu od 35 dana; DOX70: grupa koja je dobijala doksorubicin i promene na srcu su praćene u intervalu od 70 dana; PI: Pulsni interval; SPB: systolic blood pressure

4.5. Biohemijski markeri oštećenja kardiomiocita pod uticajem doksorubicina

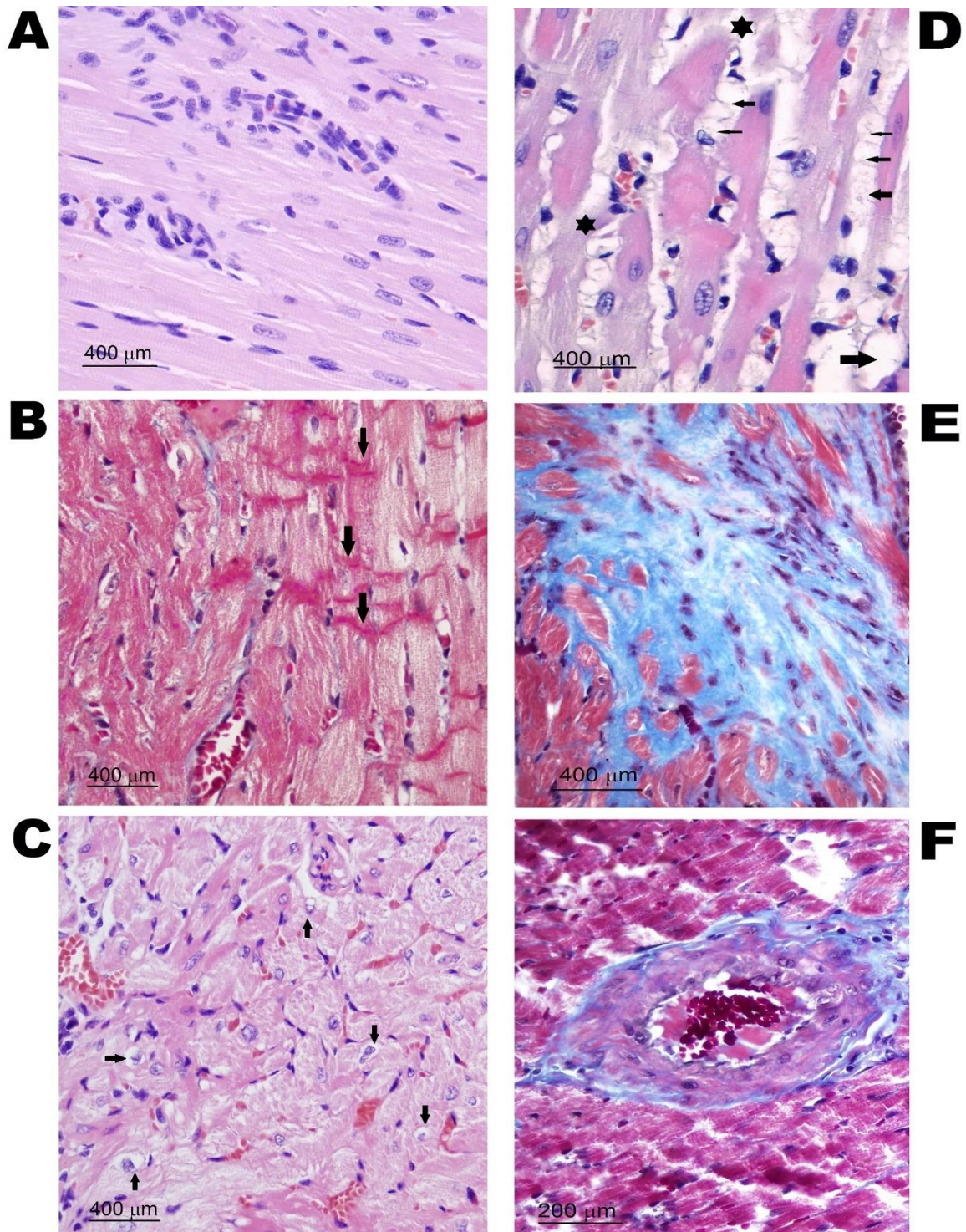
Nivoi cTnI u serumu pacova CONT, DOX35 i DOX70 grupe bili su ispod praga detekcije ($0,014 \pm 0,0005 \mu\text{g/L}$ za DOX35 i $0,013 \pm 0,0004 \mu\text{g/L}$ za CONT). Nivo cTnT je statistički bio povećan kod DOX70 grupe ($0,15 \pm 0,03 \mu\text{g/L}$).

4.6. Patohistološka analiza

Autopsijom pacova koji su preživeli 70 dana od tretmana doksorubicinom, spoljašnjim pregledom leša nalaženi su: znaci kaheksije, raščupanost i opala dlaka, krzno umrljano osušenim fecesom, crveni krugovi oko očiju i kod nekih žučkast iscedak iz nozdrva. Kod svih pacova, unutrašnjim pregledom kadavera, nalaženo je do 15 ml zamućene, sukrvičave tečnosti u trbušnoj duplji. Kod ovih životinja, uočavale su se promene na jetri u vidu atrofije ili edema, nehomogenosti u boji parenhima, pojave beličastih mrlja na parenhimu visceralne strane jetre i krtosti parenhima na pritisak. Bubrezi su bili uvećani i bleđi, kapsule teško odvojive od parenhima, na preseku se teško diferencirala kora od srži, a u predelu kore uočavana su petehijalna krvarenja. Tanka creva su bila meteoristična, debelo crevo i *coecum* ispunjeni kašastim sadržajem. U grudnoj duplji je nalažena mala količina prozirne tečnosti. Pluća su kod tri životinje bila infiltrirana belim, gnojnim žarištima i atelektatična. Srca su bila dilatirana ili atrofična.

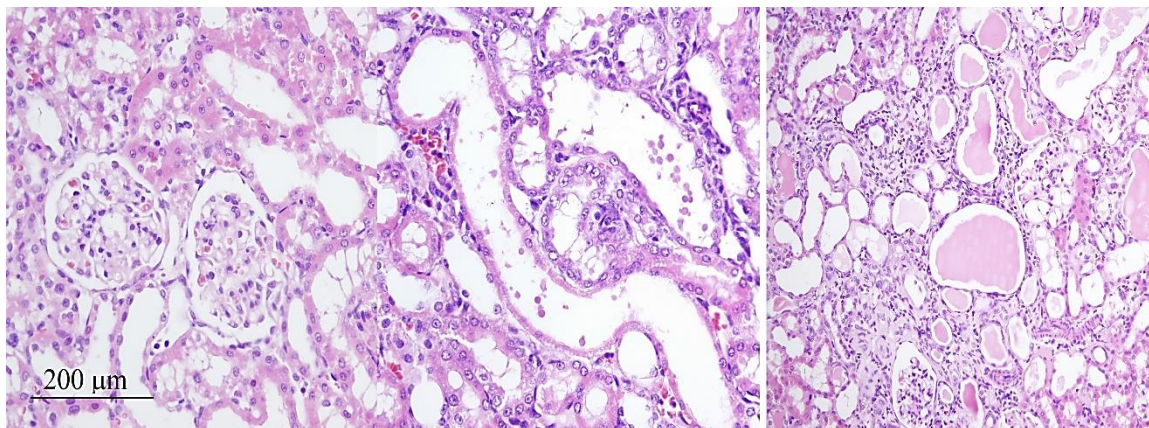
Patohistološki, na srčanom mišiću pacova iz DOX35 grupe u intersticijumu uočavalo se prisustvo mononuklearnog infiltrata (pretežno makrofagi i neutrofilni granulociti) (slika 18, A). U nekim segmentima tkiva zapažana su polja lakostepene fibroze (umnoženi fibroblasti oko kardiomiocita). Pojedine zone tkiva bile su zahvaćene lakostepenom vakuolarnom degeneracijom kardiomiocita (slika 18, C) i nekrozom kontraktilnih vlakana sa atenuacijom (slika 18, B).

U miokardu pacova iz DOX70 grupe bile su dominantne fibrozne promene, kako u intersticijumu (slika 18, E), tako i perivaskularno (slika 18, F). Difuzno su se uočavala velika polja nekrotičnih mišićnih vlakana (tzv. *frying phenomenon*, engl.): prekid kontinuiteta membrane kardiomiocita, njihova atrofija i proširenje međucelijskog prostora. Zbog izrazite vakuolarne degeneracije, kardiomiociti su, mahom, bez jedara, ili je jedro potisnuto na periferiju ćelije sa vidljivim znacima kariopiknoze i kariorekse, te tkivo miokarda izgleda "ispražnjeno" (slika 18, D).



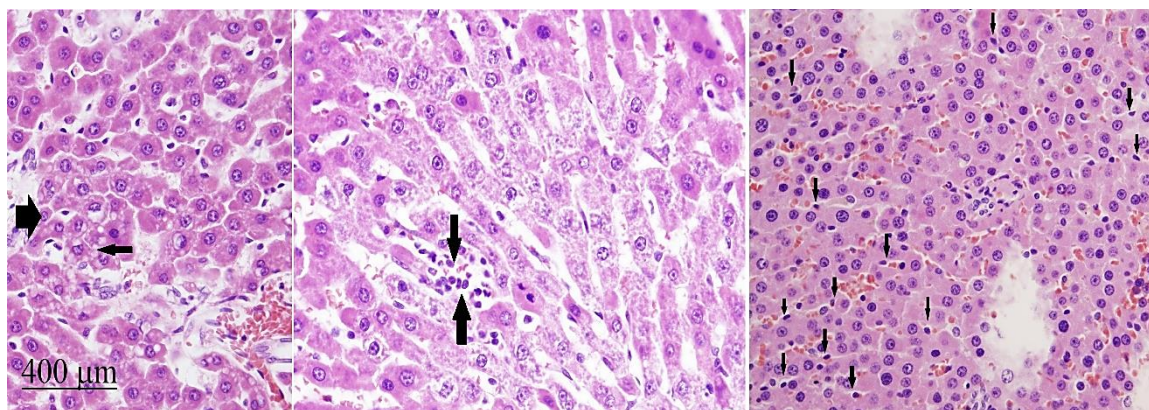
Slika 18: Patohistološki preseki srca pacova iz DOX35 i DOX70 grupe: migracija mononukleara iz krvnih sudova u intersticijum (A, HE); nekroza kontraktilnih vlakana (B, EM); lakostepena vakuolarna degeneracija kardiomiocita (C, HE); difuzna nekrotična polja vakuoliziranih, ispražnjenih kardiomiocita (asterisk) i prekid kontinuiteta membrane ćelija (strelice) (D, HE); polje izražene intersticijalne fibroze (E, MT); izražena perivaskularna fibroza (F, MT)

Na patohistološkim presecima tkiva bubrega pacova iz DOX70 grupe uočena je izrazita dilatacija proksimalnih bubrežnih tubula, infiltracija mononuklearima u dilatiranim glomerulima (slika 19, levo) i proteinski eozinofilni tubularni cilindri (slika 19, desno)



Slika 19: Patohistološki preseci bubrega pacova iz DOX70 grupe (HE): dilatacija tubula i infiltracija mononuklearima (levo); proteinski cilindri u tubulima (desno)

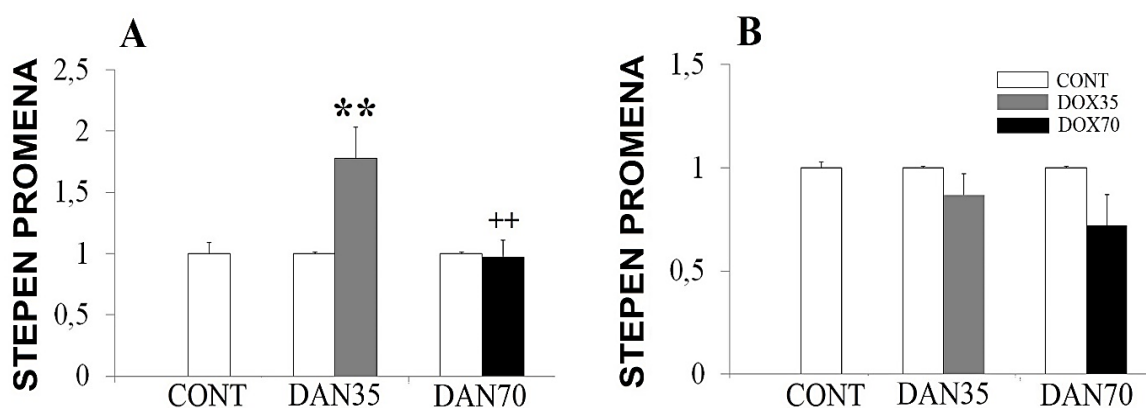
U tkivu jetre pacova iz DOX70 grupe, patohistološki su dominantni nalazi bila multipla polja fokalne nekroze parenhima (slika 20, sredina), umnožene Kupferove ćelije unutar kanalića (slika 20, desno) i masna infiltracija hepatocita (slika 20, levo).



Slika 20: Patohistološki preseci jetre pacova iz DOX70 grupe (HE): masna infiltracija u hepatocitima (levo, strelice); nekroza parenhima (strelice, sredina), umnožene Kupferove ćelije sa žučnim pigmentom u Disseovim prostorima (desno, strelice)

4.7. Genska ekspresija srčanih $\beta 1$ i $\beta 2$ adrenergičkih receptora

Relativna ekspresija iRNK srčanih $\beta 1$ -AR (dijagram 6, A) bila je statistički značajno povišena kod pacova iz DOX35 grupe u odnosu na CONT i DOX70 grupu. Relativna ekspresija iRNK $\beta 2$ -AR u tkivu srčanog mišića pacova tretiranih doksorubicinom nije bila statistički značajna (dijagram 6, B).



Dijagram 6: Relativna ekspresija iRNK srčanih $\beta 1$ -AR (A) i $\beta 2$ -AR (B) kod pacova tretiranih doksorubicinom. Uočava se da je ekspresija iRNK $\beta 1$ -AR kod pacova iz DOX35 grupe povišena (A). Grafik B prikazuje međugrupne promene u ekspresiji iRNK $\beta 2$ -AR. ** $p < 0,01$ vs kontrola, ++ $p < 0,01$ vs DOX35; CONT: kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom; DOX35: grupa koja je dobijala doksorubicin i promene na srcu su praćene u intervalu od 35 dana; DOX70: grupa koja je dobijala doksorubicin i promene na srcu su praćene u intervalu od 70 dana

5. DISKUSIJA

Ova studija pokazala je, po prvi put, da sveobuhvatna analiza kratkoročnog varijabiliteta srčane frekvencije kod pacova tretiranih doksorubicinom otkriva rane promene u dinamici srčane frekvencije. U kompenzatornoj fazi kardiomiopatije dolazi do povećanja tonusa simpatikusa koji prouzrokuje: povećanje LF varijabiliteta i LF/HF količnika, gubitak oblika komete na Poenkareovom dijagramu, smanjenje entropije i povećanje senzitivnosti barorefleksa. Ove promene prati i povećana ekspresija iRNK β 1-AR, koji su ključni medijatori kateholaminske kardiotoksičnosti.

Doksorubicin se u kliničkoj praksi, najčešće, aplikuje intravenski. Zbog velike molekulske mase (543.525 g/mol) i hidrofилnih osobina, peritonealni klirens doksorubicina je spor, a njegova koncentracija nakon intraperitonealne aplikacije znatno viša u tumorskom tkivu lokalizovanom u trbušnoj šupljini u odnosu na koncentraciju koju dostiže nakon intravenske aplikacije (Jacquet et al. 1997). Zbog toga se, za vreme hirurških zahvata i tokom tretmana peritonealnih karcinoma, češće aplikuje intraperitonealno (Spiliotis et al. 2016). Kod pacova intraperitonealno tretiranih doksorubicinom u ukupnoj kumulativnoj dozi od 15 mg/kg pojavili su se znaci pogoršanja opšteg stanja: nakostrešeno krzno, smanjena motorna aktivnost, pad telesne težine i povećana stopa smrtnosti. Post-mortalne analize pokazale su da je uzrok smrti bila srčana ili bubrežna toksičnost, budući da se kod pacova doksorubicin sporo ili uopšte ne metaboliše, brzo distribuira u srčanom, jetrinom a najviše bubrežnom tkivu i sporo izlučuje preko žuči i urina (Yesair et al. 1972). Kod ljudi, biotransformacija molekula doksorubicina odvija se u jetri u tri pravca, ka formiranju: 1. polarnog, hidrofилnog alkoholnog derivata doksorubicinola – redukcijom, 2. nepolarnog, hidrofobnog metabolita aglikona – enzimskom glikozidacijom i 3. polarnih hidrofилnih konjugata (Takanashi & Bachur 1976). Brojna naučna literatura opovrgava kardiotoksičnost metabolita doksorubicina, osim studije Mhatre i sar. (Mhatre et al. 1971) koji su u

istraživanjima na izolovanom srcu psa naslutili da aglikonski metaboliti, verovatno, utiču na nastanak kardiotoksičnosti. Kod pacova, molekul doksorubicina se u periodu od 48 sati nakon aplikacije u 80% detektuje nepromenjen u žuči (Wilkinson et al. 1979). Razlog za to jeste nizak afinitet aldo-keto reduktaza jetre pacova za molekul doksorubicina (Jacquet et al. 1997; Gewirtz & Yanovich 1987). Budući da se nepromenjen akumulira u bubrezima pacova, doksorubicin genezom ROS prouzrokuje istanjenje endotela glomerula i oštećenje podocita, što u periodu od sedam do deset dana nakon aplikacije doksorubicina rezultira narušavanjem glomerularne filtracije plazma-proteina, dovodeći do akumulacije proteinskih cilindara unutar tubula, tubulo-intersticijalne inflamacije i, na kraju, glomeruloskleroze. Ove promene se manifestuju povišenim nivoima serumskog kreatinina, padom serumskog albumina i proteinurijom (Jeansson et al. 2009). U našim eksperimentima, ehokardiografski pregledi ukazali su na vidljive znake srčane insuficijencije samo kod pacova koji su preživeli 70 dana od tretmana doksorubicinom: kod većine pregledanih životinja, dijametar leve komore u dijastoli i sistoli je statistički značajno bio povećan, srčani volumen na kraju dijastole bio je dva puta povišen a ejectiona frakcija leve komore snižena za oko 8%, što potkrepljuje postojeća saznanja u naučnoj i stručnoj literaturi (Teraoka et al. 2000; Merlet et al. 2013). Za otkrivanje antraciklinske kardiotoksičnosti, u kliničkoj praksi se, kao potencijalno uspešni biomarkeri, koriste srčani troponini (Cardinale et al. 2004; Dolci et al. 2008). Blago povišenje serumske koncentracije srčanog troponina T nakon prve doze doksorubicina kod dece ukazuje na postojanje rizika za razvoj dilatacije leve komore i istanjenje zida srčanog mišića (Lipshultz et al. 1997). Kod pacova su, takođe, nakon aplikacije doksorubicina pronađene povišene vrednosti srčanog troponina T, koje su u sprezi sa oštećenjem miokarda kod ovih jedinki. U našim eksperimentima, povišen nivo serumskog srčanog troponina T kod pacova tretiranih doksorubicinom podudara se sa ehokardiografski ustanovljenom srčanom dekompenzacijom, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima (Herman et al. 1999; Bertinchant et al. 2003). Patohistološke analize mikrotomskog preseka srčanog mišića pacova koji su žrtvovani 35. dana nakon tretmana doksorubicinom, potvrdile su postojanje fokalnog nekrotičnog oštećenja miokarda i intersticijumsku infiltraciju fibroblastima i polimorfonuklearima.

Izrazita perivaskularna fibroza (slika 18, F) zahvatila je miokard životinja koje su preživjele 70 dana od aplikacije doksorubicina. Naši rezultati su pokazali da je eksperimentalni model srčane insuficijencije izazvane doksorubicinom primenljiv, iskoristiv i u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima za proučavanje ove bolesti kod ljudi (Jensen et al. 1984; Teraoka et al. 2000; Cheah et al. 2017).

Pred kraj opservacionog perioda od 70 dana, vrednosti SBP se nisu značajno menjale kod pacova tretiranih doksorubicinom, dok je vrednost DBP bila statistički značajno povišena u odnosu na vrednosti pre aplikacije doksorubicina. Premda nismo istraživali uzrok koji je doveo povišenja vrednosti DBP kod pacova tretiranih doksorubicinom, pretpostavljamo da je to posledica doksorubicinskog oštećenja endotela, te posledičnog povećanja vaskularnog tonusa i perifernog otpora, koji se odražavaju na vrednosti DBP. Dobro je poznato i višestuko potvrđeno da antraciklini genezom ROS i NOS preko MAP signalnog puta i cAMP oštećuju endotelne ćelije i uvode ih u apoptozu (Yamada et al. 2012; Yamada et al. 2016). Oštećeni endotel slabije sintetizuje molekule koji snižavaju vaskularni tonus (naročito NO), tako da krvni sudovi postaju osetljiviji na uticaj vazoaktivnih molekula i jače se kontrahuju. Takođe, na kraju opservacionog perioda, primetili smo i sniženje ukupnih vrednosti svih činilaca kratkoročnog varijabiliteta krvnog pritiska, kao i svih njegovih komponenti. Istovremeno, smanjivala se i kompleksnost SBP i DBP signala. Gubitak kompleksnosti signala ukazuje da postoji poremećaj funkcionalnog integriteta i da je sposobnost adaptacije ograničena. Naime, varijabilitet krvnog pritiska u fiziološkim uslovima nastaje učešćem brojnih regulacionih mehanizama, uključujući: neuralne faktore (autonomni refleksi), hormonalne faktore (renin-angiotenzin sistem) i signalne molekule (NO). Aktivnost simpatikusne grane autonomnog nervnog sistema je brzodelujuća, da bi se krvni pritisak i srčana frekvencija održali u fiziološkom opsegu. Uloga autonomnog nervnog sistema u regulaciji kratkoročnog varijabiliteta srčane frekvencije potvrđena je farmakološkim (blokadom β -AR) i hirurškim (denervacijom) putem (Japundzic et al. 1990; Japundzic-Zigon 1998). Pretpostavili smo da je smanjenje varijabiliteta SBP i DBP u vezi sa smanjenom elastičnošću zida krvnih sudova, nastalih kao posledica endotelnog oštećenja izazvanog doksorubicinom. Pored toga, moguće je da

doksorubicinom narušene funkcije jetre i bubrega kod pacova u našim eksperimentima doprinose promeni varijabiliteta krvnog pritiska, remete sintezu vazoaktivnih supstanci i menjaju ekspresiju njihovih receptora unutar zida krvnog suda, što remeti vaskularni tonus i periferni otpor krvnih sudova (Dharmani et al. 2007; Grace et al. 2013). Egger i sar. (Egger et al. 2015) pokazali su da doksorubicin slobodnim radikalima oštećuje sitne krvne sudove srži bubrega pacova, uslovljavajući pojačanu ekspresiju hipoksijom-indukovanog faktora $1-\alpha$ (engl. *hypoxia-inducible factor* $1-\alpha$ – HIF $1-\alpha$) i smanjenje gustine peritubularnih krvnih sudova, dok u kori bubrega dovodi do smanjenja ekspresije vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor* – VEGF). U jetri pacova, doksorubicin prouzrokuje vakuolarnu degeneraciju hepatocita, fokalne nekroze parenhima i intersticijalnu inflamaciju (Ingawale et al. 2014; Jacevic et al. 2017). Stoga, ne možemo isključiti mogućnost da poremećaji funkcije jetre i bubrega, možda, imaju važan uticaj na smanjenje varijabiliteta krvnog pritiska kod pacova tretiranih doksorubicinom.

Važan nalaz ove studije jeste povećanje varijabiliteta srčane frekvencije u ranōj, kompenzovanoj, fazi nastanka kardiomiopatije izazvane doksorubicinom. Varijabilitet srčane frekvence odraz je brze (engl. *beat-to-beat*) neurogene kontrole srčanog rada, pre svega od strane parasimpatikusa i simpatikusa. Razvijene su mnoge linearne i nelinearne metode za analizu varijabiliteta srčane frekvence i ustanovljen veliki broj biomarkera. Neki od njih (LF/HF, N-N intervali i dr.) usvojeni su od kardioloških udruženja za određivanja stepena rizika kardiovaskularnih oboljenja, uključujući i srčanu slabost (Electrophysiology & Task Force of the European Society Electrophysiology 1996; Stein et al. 2005; Nicolini et al. 2012; Huikuri & Stein 2013). Spektralnom analizom varijabiliteta srčane frekvencije moguće je otkriti i izmeriti linearne komponente HRV, grupisane u LF i HF zonama spektra. Kod zdravih, mladih jedinki, visokofrekventne oscilacije (HF) su dominantna komponenta snage spektra i odraz su sinusne aritmije posredovane parasimpatikusom (Japundzic et al. 1990). Niskofrekventne oscilacije (LF) se pobuđuju u uslovima stresa, kao rezultat povećanja simpatičkog upliva na srčani rad (Stojičić et al. 2008; Japundzic-Zigon 1998). Tada LF/HF količnik odražava stepen

promena simpato-vagalne ravnoteže u srcu, a njegovo povećanje smatra se nezavisnim prognostičkim markerom za naprasnu srčanu smrt izazvanu aritmijama (Japundžić-Žigon et al. 2018). U studiji koju su Tjeerdsma i sar. (Tjeerdsma et al. 1999) sprovedi na 20 pacijentkinja sa tumorom dojke koje su dobijale doksorubicin, bile podvrgnute radioterapiji i imale nepromenjenju sistolnu funkciju leve komore, analizom HRV utvrđene su promene na ANS kod 85% ispitanica. Ovi nalazi ukazuju da je analiza HRV znatno osetljivija metoda za rano otkrivanje srčanih promena izazvanih doksorubicinom u odnosu na uporednu ehokardiografsku procenu sistolne funkcije kod ovih pacijenata. Nousiainen i sar. (Nousiainen et al. 2001) sprovedi su metodološki sličnu studiju na 30 pacijenata sa non-Hodgkinovim limfomom, koji su tretirani doksorubicinom u početnoj kumulativnoj dozi od 400 mg/m². Analizom HRV utvrđene su rane promene u vidu narušavanja simpato-vagalne ravnoteže u korist simpatikusa, udružene sa supkliničkim simptomima disfunkcije leve komore izazvane doksorubicinom. U početnoj fazi naše studije (Vasić et al. 2019; Lončar-Turukalo et al. 2015), pratili smo promene HRV na modelu srčane insuficijencije izazvane doksorubicinom na pacovu u intervalu od 35 dana nakon završene aplikacije. Rezultati su pokazali da je metoda procene HRV bila osetljivija i promene na srcu detektovala ranije u odnosu na ultrazvučnu metodu i patohistološku analizu. U ovoj studiji, LF i LF/HF bili su značajno statistički povećani u odnosu na vrednosti pre aplikovanja doksorubicina, ukazujući da je varijabilitet srčane frekvence pod dominantnim uticajem simpatikusa. Nalaz povišenog varijabiliteta srčane frekvence potvrđen je i Poenkareovim dijagramima. U bazalnim fiziološkim uslovima, kod pacova koji nisu tretirani doksorubicinom, Poenkareovi dijagrami formiraju oblik komete (Japundžić-Žigon et al. 2018; Brennan et al. 2002). Nakon tretmana doksorubicinom, oblik grafikona se menja ka formi torpeda ili klupka. Ove promene prati sniženje aproksimativne entropije, ukazujući na uprošćavanje dinamike srčane frekvence i povećanje njene regularnosti usled dominacije simpatikusne kontrole srca. Stoga, i linearne i neliearne analize varijabiliteta srčane frekvence ukazuju da je za vreme kompenzovane faze srčane insuficijencije prouzrokovane doksorubicinom srce pod pretežnim uticajem simpatikusa. Ovu tvrdnju potkrepljuje nalaz Tong i sar. (Tong et al. 1991) koji su primetili da su depoi noradrenalina u tkivu srčanog mišića povećani u ranoj fazi

kardiomiopatije izazvane doksorubicinom, dok se u kasnijoj fazi smanjuju. Na ovaj se način može objasniti prolazno povećanje varijabiliteta srčane frekvence u našim eksperimentima. Takođe, kod pacova tretiranih doksorubicinom, 70. dana nakon aplikacije potvrđena je dilatacija leve komore, za koju je dokazano da je udružena sa smanjenom osetljivošću miokarda na kateholamine usled desenzitizacije β -AR (Robinson & Giri 1986; Calderone et al. 1991). Stoga je logično očekivati izostanak povećanja varijabiliteta srčane frekvence u kasnijoj fazi srčane slabosti izazvane doksorubicinom, pa čak i smanjenje, kod jedinki koje su predisponirane za nastanak srčane insuficijencije (usled pratećeg poremećaja funkcije jetre i bubrega), u zavisnosti od stepena funkcionalne denervacije. Smanjenje varijabiliteta srčane frekvencije smatra se lošim prognostičkim znakom kod pacijenata koji boluju od srčane insuficijencije (Ponikowski et al. 1997; Malfatto et al. 2001; May et al. 2013) kao i kod pacijenata koji su podvrgnuti kombinovanoj hemo- i terapiji zračenjem (Tjeerdsma et al. 1999).

Poznato je da kod kardiovaskularnih oboljenja, kao što su hronična srčana insuficijencija (Mortara et al. 1997) ili infarkt miokarda (La Rovere et al. 2001), senzitivnost barorefleksa opada neposredno pre letalnog ishoda, te predstavlja loš prognostički znak. U našim eksperimentima nismo primetili smanjenje sBRS kod pacova tretiranih doksorubicinom. Međutim, 35. dana nakon aplikacije doksorubicina, kod pacova je došlo do statistički značajnog povećanja osetljivosti barorefleksa. Budući da su kod tih jedinki vrednosti SBP i DBP, takođe, bile povećane, najverovatnije je da je do povećanja osetljivosti BRS došlo zbog pojačane težnje organizma da se u patološkim uslovima, gde je došlo do oštećenja endotela krvnih sudova doksorubicinom, krvni pritisak održi u homeostatskim granicama. Kod ovih životinja nije došlo do smanjenja HR, ali se u spektru može uočiti značajno povećanje HF-HR varijabiliteta, koji je vagalnog porekla. Porast osetljivosti BRS nastavio se i 70. dana nakon aplikacije doksorubicina. Kod ovih životinja, srednje vrednosti SBP i DBP bile su značajno povišene, a vrednost SBP se vratila na bazalni nivo.

Dokazano je da u kardiomiopatiji indukovanoj doksorubicinom, β 1-AR doprinose kardiotoksičnim efektima, dok β 2-AR imaju protektivno dejstvo (Catherine Communal et al. 1999; Zhu et al. 2000). Aktivacija β 1-AR stimuliše ulazak kardiomiocita u apoptozu. β 2-AR imaju antiapoptotski efekat na srčani mišić (Catherine Communal et al. 1999; Chesley et al. 2000; Zhu et al. 2000). Razlike u signalnim osobinama ova dva dominantna tipa β -AR u srcu postaju evidentnije kod srčane insuficijencije, kada su β 1-AR selektivno nishodno regulisani a funkcija i signalizacija β 2-AR promenjena u smeru ka izrazito pro-apoptotskom signalnom delovanju (Nikolaev et al. 2010). Različite studije dale su oprečne rezultate u pogledu ekspresije β 1- i β 2-AR kod kardiomiopatije izazvane doksorubicinom. Razlog za nepodudarnost nalaza, najverovatnije je različitost među životinjskim modelima, te protokolima, doziranju i načinu aplikacije doksorubicina. Pre više od trideset godina, Robinson i sar. (Robinson & Giri 1986) otkrili su da dugotrajna administracija doksorubicina kod pacova smanjuje sposobnost miokarda da adekvatno odgovori na adrenergičku stimulaciju, te, iako nisu našli promene u gustini β -AR, otkrili su smanjenje njihovog afiniteta za vezivanje kateholamina. Calderone i sar. (Calderone et al. 1991) otkrili su sniženje bazalne sinteze cAMP, ukazujući da β -AR postaju refraktarni na stimulaciju ligandima. Merlet i sar. (Merlet et al. 2013) na pacovskom modelu srčane insuficijencije izazvane doksorubicinom pronašli su smanjenu ekspresiju β 2-AR. U našim eksperimentima, za vreme kompenzatorne faze kardiomiopatije (35. dana posle aplikacije doksorubicina), otkrili smo prolazno povišenje ekspresije mRNA β 1-AR ali ne i β 2-AR, što je, izgleda, ključno za nastanak progresivne hipertrofične kardiomiopatije (Milano et al. 1994; Engelhardt et al. 1999; Bernstein et al. 2005). Studije rađene na pacovima i *knock-out* miševima ukazuju da ravnoteža između preživljavanja i smrti kardiomiocita može biti posredovana aktivacijom različitih signalnih puteva, zavisnih od određenog suptipa β -AR. Stimulacija β 1-AR preko cAMP-zavisnog signalnog puta povećava ulazak kardiomiocita pacova u apoptozu, dok stimulacija β 2-AR može biti dualne prirode: proapoptotska (preko G_s) i antiapoptotska (preko G_i - $G\beta\gamma$ -PI3K) (Michael Zaugg et al. 2000; Catherine Communal et al. 1999; Zhu et al. 2000). Bernstein i sar. (Bernstein et al. 2005) dali su eksperimentalni dokaz na *knock-out* β 1^{-/-}, β 2^{-/-} i β 1/ β 2^{-/-} homozigotnim miševima da β 1-AR pospešuju nastanak

dokсорubicinske kardiотоксиčnosti, dok β 2-AR imaju protektivnu ulogu. Naši rezultati, такође, ukazuju da su β 1-AR медијатори kardiотоксиčnosti. Premda nismo ispitivali nivo β 1-AR na proteinskoj razini, pretpostavljamo da prekomerna ekspresija može biti odgovorna za povećanu osetljivost srčanог мишића na kateholamine i povećanje varijabiliteta srčane frekvencije, mnogo pre nego što je srce izloženo тоksičnoј koncentraciji kateholamina iz krvi, koja je udružena sa srčanом dekompenzацијом.

Naši rezultati, po prvi put, pokazuju da su povećanje varijabiliteta srčane frekvencije, smanjenje kompleksnosti dinamike srčanог rada i porast senzitivnosti baroreceptorskog рефлекsa rani znaci dokсорubicinske kardiomiopatije. Ove promene udružene su sa povećanom ekspresijom srčanih β 1-AR, koji su, najverovatnije, медијатори dokсорubicinske kardiотоксиčnosti. Rezultati otvaraju kliničke perspektive za primenu HRV i sBRS u ranoј dijagnostici dokсорubicinske kardiomiopatije, kao i BPV za prognozu lošeg ishoda. Pored toga, sugerišu da bi terapiju blokatorima β 1-AR trebalo započeti kada se javi povećanje srčanог varijabiliteta, a pre popuštanja srčanог мишића.

6. ZAKLJUČCI

1. Patohistološke promene koje su detektovane na srcu pacova nakon aplikacije doksorubicina ekvivalentne su promenama koje karakterišu doksorubicinsku miokardiopatiju kod ljudi. Ehokardiografija je potvrdila toksično dejstvo doksorubicina, slično kao kod ljudi, a detektovan je i serumski toponin T, koji karakteriše i doksorubicinsku kardiomiopatiju kod ljudi. Sveukupni nalazi potvrđuju da je eksperimentalni model srčane insuficijencije kod pacova, izazvan i.p. aplikacijom doksorubicina u kumulativnoj dozi od 15mg/kg, pouzdan za proučavanje doksorubicinske kardiotoksičnosti kod ljudi.
2. U ranoj, klinički kompenzovanoj, fazi doksorubicinske kardiomiopatije, došlo je do povećanja varijabiliteta srčane frekvencije i smanjenja kompleksnosti srčane dinamike. Ovi nalazi ukazuju da su analiza HRV i dinamike srčanog rada osetljive metode za rano otkrivanje oštećenja srčanog mišića doksorubicinom. Pored toga, promene varijabiliteta krvnog pritiska, koje su se desile u dekompenzovanoj fazi doksorubicinske kardiomiopatije, imaju i prognostički značaj, s obzirom na to da su prethodile letalnom ishodu.
3. Sa promenom HRV došlo je i do povećanja sBRS, najverovatnije kompenzatorno. Istovremeno oštećenje endotela krvnih sudova i srčanog mišića zahtevaju dodatan napor za održavanje kardiovaskularne homeostaze. Prema tome, i sBRS bi mogao da posluži kao marker za rano otkrivanje efekata doksorubicinske toksičnosti na kardiovaskularni sistem.

4. HRV i sBRS pokazale su se osjetljivijim metodama u odnosu na standardne metode za praćenje doksorubicinske kardiotoksičnosti – ehokardiografije i oštećenje kardiomiocita – troponina T, koje su ukazale na kardiotoksičnost tek 70. dana od prestanka aplikacije doksorubicina, kada se razvija dekompenzacija srca.

5. Naši rezultati, takođe, ukazuju da su β 1-AR, ali ne i β 2-AR, medijatori doksorubicinske kardiotoksičnosti kod pacova i da su promene ekspresije gena β 1-AR povezane sa promena HRV.

7. LITERATURA

- Abraham, Ralph, and Christopher D. Shaw. 1992. *Dynamics: The Geometry of Behavior*. Addison-Wesley, Advanced Book Program.
- Acker, Dsaskia A. B. E., Dsaskia A B, Klaas Kramer, Joop A. Grimbergen, Dirk-Jan Berg, Wim J. F. Vijgh, and Aalt Bast. 1995. "Monohydroxyethylrutoside as Protector against Chronic Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity." *British Journal of Pharmacology* 115 (7): 1260–64.
- Adamcová, M., V. Gersl, R. Hrdina, M. Melka, Y. Mazurová, J. Vávrová, V. Palicka, and Z. Kokstein. 1999. "Cardiac Troponin T as a Marker of Myocardial Damage Caused by Antineoplastic Drugs in Rabbits." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 125 (5): 268–74.
- Adams, J. E., G. S. Bodor, V. G. Davila-Roman, J. A. Delmez, F. S. Apple, J. H. Ladenson, and A. S. Jaffe. 1993. "Cardiac Troponin I. A Marker with High Specificity for Cardiac Injury." *Circulation* 88 (1): 101–6.
- Akpek, Mahmut, Ibrahim Ozdogru, Omer Sahin, Mevlude Inanc, Ali Dogan, Cevat Yazici, Veli Berk, et al. 2015. "Protective Effects of Spironolactone against Anthracycline-Induced Cardiomyopathy: Effects of Spironolactone on Anthracycline Cardiomyopathy." *European Journal of Heart Failure* 17 (1): 81–89.
- Anderson, Karen M., Andrea D. Eckhart, Robert N. Willette, and Walter J. Koch. 1999. "The Myocardial β -Adrenergic System in Spontaneously Hypertensive Heart Failure (SHHF) Rats." *Hypertension*. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.33.1.402>.
- Arai, Masashi, Akemi Yoguchi, Takako Takizawa, Tomoyuki Yokoyama, Tsugiyasu Kanda, Masahiko Kurabayashi, and Ryoza Nagai. 2000. "Mechanism of Doxorubicin-Induced Inhibition of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Gene Transcription." *Circulation Research* 86 (1): 8–14.
- Ashley, Neil, and Joanna Poulton. 2009. "Mitochondrial DNA Is a Direct Target of

- Anti-Cancer Anthracycline Drugs." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378 (3): 450–55.
- Bajić, Dragana, Tatjana Loncar-Turukalo, Sonja Stojčić, Olivera Sarenac, Tijana Bojić, David Murphy, Julian F. R. Paton, and Nina Japundzić-Zigon. 2010. "Temporal Analysis of the Spontaneous Baroreceptor Reflex during Mild Emotional Stress in the Rat." *Stress* 13 (2): 142–54.
- Bangham, A. D., M. M. Standish, and J. C. Watkins. 1965. "Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids." *Journal of Molecular Biology* 13 (1): 238–52.
- Batist, Gerald, Lyndsay Harris, Nozar Azarnia, Lily Waiyee Lee, and Pascual Daza-Ramirez. 2006. "Improved Anti-Tumor Response Rate with Decreased Cardiotoxicity of Non-Pegylated Liposomal Doxorubicin Compared with Conventional Doxorubicin in First-Line Treatment of Metastatic Breast Cancer in Patients Who Had Received Prior Adjuvant Doxorubicin: Results of a Retrospective Analysis." *Anti-Cancer Drugs* 17 (5): 587–95.
- Berlin, V., and W. A. Haseltine. 1981. "Reduction of Adriamycin to a Semiquinone-Free Radical by NADPH Cytochrome P-450 Reductase Produces DNA Cleavage in a Reaction Mediated by Molecular Oxygen." *The Journal of Biological Chemistry* 256 (10): 4747–56.
- Bernstein, Daniel, Giovanni Fajardo, Mingming Zhao, Takashi Urashima, Jennifer Powers, Gerald Berry, and Brian K. Kobilka. 2005. "Differential Cardioprotective/cardiotoxic Effects Mediated by β -Adrenergic Receptor Subtypes." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289 (6): H2441–49.
- Berthiaume, J. M., and K. B. Wallace. 2007. "Adriamycin-Induced Oxidative Mitochondrial Cardiotoxicity." *Cell Biology and Toxicology* 23 (1): 15–25.
- Bertinchant, J. P., A. Polge, J. M. Juan, M. C. Oliva-Lauraire, I. Giuliani, C. Marty-Double, J. Y. Burdy, et al. 2003. "Evaluation of Cardiac Troponin I and T Levels as Markers of Myocardial Damage in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy Rats, and Their Relationship with Echocardiographic and Histological Findings." *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 329 (1-2): 39–51.

- Bhattacharya, S., and A. Lahiri. 1991. "Clinical Role of Indium-111 Antimyosin Imaging." *European Journal of Nuclear Medicine* 18 (11): 889–95.
- Billingham, M. E., J. W. Mason, M. R. Bristow, and J. R. Daniels. 1978. "Anthracycline Cardiomyopathy Monitored by Morphologic Changes." *Cancer Treatment Reports* 62 (6): 865–72.
- Bonadonna, G., S. Monfardini, M. De Lena, and F. Fossati-Bellani. 1969. "Clinical Evaluation of Adriamycin, a New Antitumour Antibiotic." *British Medical Journal* 3 (5669): 503–6.
- Brennan, Michael, Marimuthu Palaniswami, and Peter Kamen. 2002. "Poincaré Plot Interpretation Using a Physiological Model of HRV Based on a Network of Oscillators." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 283 (5): H1873–86.
- Brennan, M., M. Palaniswami, and P. Kamen. 2001. "Do Existing Measures of Poincare Plot Geometry Reflect Nonlinear Features of Heart Rate Variability?" *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 48 (11): 1342–47.
- Bristow, Michael R. 1982. "Toxic Cardiomyopathy Due to Doxorubicin." *Hospital Practice* 17 (12): 101–11.
- Bristow, Michael R., Jay W. Mason, Margaret E. Billingham, and John R. Daniels. 1981. "Dose-Effect and Structure-Function Relationships in Doxorubicin Cardiomyopathy." *American Heart Journal* 102 (4): 709–18.
- Bristow, M. R., R. Ginsburg, V. Umans, M. Fowler, W. Minobe, R. Rasmussen, P. Zera, R. Menlove, P. Shah, and S. Jamieson. 1986. "Beta 1- and Beta 2-Adrenergic-Receptor Subpopulations in Nonfailing and Failing Human Ventricular Myocardium: Coupling of Both Receptor Subtypes to Muscle Contraction and Selective Beta 1-Receptor down-Regulation in Heart Failure." *Circulation Research* 59 (3): 297–309.
- Brodde, O. E. 1993. "Beta-Adrenoceptors in Cardiac Disease." *Pharmacology & Therapeutics* 60 (3): 405–30.
- Brouwer, J., D. J. van Veldhuisen, A. J. Man in 't Veld, J. Haaksma, W. A. Dijk, K. R. Visser, F. Boomsma, and P. H. Dunselman. 1996. "Prognostic Value of Heart Rate Variability during Long-Term Follow-up in Patients with Mild to Moderate Heart Failure. The Dutch Ibopamine Multicenter Trial Study Group." *Journal of*

the American College of Cardiology 28 (5): 1183–89.

- Brown, Lindsay, Andrew Fenning, Vincent Chan, David Loch, Kathleen Wilson, Bonita Anderson, and Darryl Burstow. 2002. "Echocardiographic Assessment of Cardiac Structure and Function in Rats." *Heart, Lung & Circulation* 11 (3): 167–73.
- Calderone, A., J. de Champlain, and J. L. Rouleau. 1991. "Adriamycin-Induced Changes to the Myocardial Beta-Adrenergic System in the Rabbit." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 23 (3): 333–42.
- Camello-Almaraz, C., P. J. Gomez-Pinilla, M. J. Pozo, and P. J. Camello. 2006. "Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Ca² Signaling." *AJP: Cell Physiology* 291 (5): C1082–88.
- Cardinale, Daniela, Maria T. Sandri, Alessandro Colombo, Nicola Colombo, Marina Boeri, Giuseppina Lamantia, Maurizio Civelli, et al. 2004. "Prognostic Value of Troponin I in Cardiac Risk Stratification of Cancer Patients Undergoing High-Dose Chemotherapy." *Circulation* 109 (22): 2749–54.
- Carvalho, Cristina, Renato X. Santos, Susana Cardoso, Sónia Correia, Paulo J. Oliveira, Maria S. Santos, and Paula I. Moreira. 2009. "Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect." *Current Medicinal Chemistry* 16 (25): 3267–85.
- Carvalho, Filipa S., Ana Burgeiro, Rita Garcia, António J. Moreno, Rui A. Carvalho, and Paulo J. Oliveira. 2014. "Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy." *Medicinal Research Reviews* 34 (1): 106–35.
- Cheah, Hoay Yan, Olivera Šarenac, Juan J. Arroyo, Marko Vasić, Maja Lozić, Sofija Glumac, See Ziau Hoe, et al. 2017. "Hemodynamic Effects of HEMA Copolymer Based Doxorubicin Conjugate: A Randomized Controlled and Comparative Spectral Study in Conscious Rats." *Nanotoxicology* 11 (2): 210–22.
- Chesley, Alan, Martha S. Lundberg, Toshinobu Asai, Rui-Ping Xiao, Seiji Ohtani, Edward G. Lakatta, and Michael T. Crow. 2000. "The β 2 -Adrenergic Receptor Delivers an Antiapoptotic Signal to Cardiac Myocytes Through G I -Dependent Coupling to Phosphatidylinositol 3'-Kinase." *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.12.1172>.
- Childs, April C., Sharon L. Phaneuf, Amie J. Dirks, Tracey Phillips, and Christiaan

- Leeuwenburgh. 2002. "Doxorubicin Treatment in Vivo Causes Cytochrome C Release and Cardiomyocyte Apoptosis, as Well as Increased Mitochondrial Efficiency, Superoxide Dismutase Activity, and Bcl-2:Bax Ratio." *Cancer Research* 62 (16): 4592–98.
- Choi, Dong-Ju, Walter J. Koch, John J. Hunter, and Howard A. Rockman. 1997. "Mechanism of β -Adrenergic Receptor Desensitization in Cardiac Hypertrophy Is Increased β -Adrenergic Receptor Kinase." *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.27.17223>.
- Cho, Myeong-Chan, Madhu Rao, Walter J. Koch, Steven A. Thomas, Richard D. Palmiter, and Howard A. Rockman. 1999. "Enhanced Contractility and Decreased β -Adrenergic Receptor Kinase-1 in Mice Lacking Endogenous Norepinephrine and Epinephrine." *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/01.cir.99.20.2702>.
- Classen, Scott, Stephane Olland, and James M. Berger. 2003. "Structure of the Topoisomerase II ATPase Region and Its Mechanism of Inhibition by the Chemotherapeutic Agent ICRF-187." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (19): 10629–34.
- Communal, Catherine, Krishna Singh, Douglas B. Sawyer, and Wilson S. Colucci. 1999. "Opposing Effects of β 1 - and β 2 -Adrenergic Receptors on Cardiac Myocyte Apoptosis." *Circulation* 100 (22): 2210–12.
- Communal, C., K. Singh, D. B. Sawyer, and W. S. Colucci. 1999. "Opposing Effects of beta(1)- and beta(2)-Adrenergic Receptors on Cardiac Myocyte Apoptosis : Role of a Pertussis Toxin-Sensitive G Protein." *Circulation* 100 (22): 2210–12.
- Costa, Vera Marisa, Félix Carvalho, José Alberto Duarte, Maria de Lourdes Bastos, and Fernando Remião. 2013. "The Heart as a Target for Xenobiotic Toxicity: The Cardiac Susceptibility to Oxidative Stress." *Chemical Research in Toxicology* 26 (9): 1285–1311.
- Cotton, J. M., M. T. Kearney, and A. M. Shah. 2002. "Nitric Oxide and Myocardial Function in Heart Failure: Friend or Foe?" *Heart* 88 (6): 564–66.
- Cutts, S. M., and D. R. Phillips. 1995. "Use of Oligonucleotides to Define the Site of Interstrand Cross-Links Induced by Adriamycin." *Nucleic Acids Research* 23 (13): 2450–56.

- Damiani, Roberto Marques, Dinara Jaqueline Moura, Cassiana Macagnan Viau, Rafael Andrade Caceres, João Antonio Pêgas Henriques, and Jenifer Saffi. 2016. "Pathways of Cardiac Toxicity: Comparison between Chemotherapeutic Drugs Doxorubicin and Mitoxantrone." *Archives of Toxicology* 90 (9): 2063–76.
- Dampney, R. A. 1994. "Functional Organization of Central Pathways Regulating the Cardiovascular System." *Physiological Reviews* 74 (2): 323–64.
- De Meyer, Guido R. Y., and Wim Martinet. 2009. "Autophagy in the Cardiovascular System." *Biochimica et Biophysica Acta* 1793 (9): 1485–95.
- Deniaud, A., O. Sharaf el dein, E. Maillier, D. Poncet, G. Kroemer, C. Lemaire, and C. Brenner. 2008. "Endoplasmic Reticulum Stress Induces Calcium-Dependent Permeability Transition, Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis." *Oncogene* 27 (3): 285–99.
- Dharmani, Murugan, Mohd Rais Mustafa, Francis I. Achike, and Meng-Kwoon Sim. 2007. "Effects of Angiotensin 1-7 on the Actions of Angiotensin II in the Renal and Mesenteric Vasculature of Hypertensive and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats." *European Journal of Pharmacology* 561 (1-3): 144–50.
- Dimarco, A., M. Gaetani, P. Orezzi, B. M. Scarpinato, R. Silvestrini, M. Soldati, T. Dasdia, and L. Valentini. 1964. "DAUNOMYCIN', A NEW ANTIBIOTIC OF THE RHODOMYCIN GROUP." *Nature* 201 (February): 706–7.
- Dolci, Alberto, Roberto Dominici, Daniela Cardinale, Maria T. Sandri, and Mauro Panteghini. 2008. "Biochemical Markers for Prediction of Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity: Systematic Review of the Literature and Recommendations for Use." *American Journal of Clinical Pathology* 130 (5): 688–95.
- Drafts, Brandon C., Katie M. Twomley, Ralph D'Agostino, Julia Lawrence, Nancy Avis, Leslie R. Ellis, Vinay Thohan, et al. 2013. "Low to Moderate Dose Anthracycline-Based Chemotherapy Is Associated With Early Noninvasive Imaging Evidence of Subclinical Cardiovascular Disease." *JACC. Cardiovascular Imaging* 6 (8): 877–85.
- Eckberg, D. L., M. Drabinsky, and E. Braunwald. 1971. "Defective Cardiac Parasympathetic Control in Patients with Heart Disease." *The New England Journal of Medicine* 285 (16): 877–83.

- Egger, Christine, Catherine Cannel, Christelle Gérard, Corinne Debon, Nadine Stohler, Andrew Dunbar, Bruno Tigani, Jianping Li, and Nicolau Beckmann. 2015. "Adriamycin-Induced Nephropathy in Rats: Functional and Cellular Effects Characterized by MRI." *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI* 41 (3): 829–40.
- Eggertsen, R., R. Sivertsson, L. Andrén, and L. Hansson. 1984. "Haemodynamic Effects of Carvedilol, a New Beta-Adrenoceptor Blocker and Precapillary Vasodilator in Essential Hypertension." *Journal of Hypertension* 2 (5): 529–34.
- Electrophysiology, Task Force of The European Society, and Task Force of the European Society Electrophysiology. 1996. "Heart Rate Variability." *Circulation* 93 (5): 1043–65.
- Engelhardt, S., L. Hein, F. Wiesmann, and M. J. Lohse. 1999. "Progressive Hypertrophy and Heart Failure in beta1-Adrenergic Receptor Transgenic Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (12): 7059–64.
- Flather, Marcus D., Marcelo C. Shibata, Andrew J. S. Coats, Dirk J. Van Veldhuisen, Aleksandr Parkhomenko, Jozsef Borbola, Alain Cohen-Solal, et al. 2005. "Randomized Trial to Determine the Effect of Nebivolol on Mortality and Cardiovascular Hospital Admission in Elderly Patients with Heart Failure (SENIORS)." *European Heart Journal* 26 (3): 215–25.
- Fogli, Stefano, Paola Nieri, and Maria Cristina Breschi. 2004. "The Role of Nitric Oxide in Anthracycline Toxicity and Prospects for Pharmacologic Prevention of Cardiac Damage." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (6): 664–75.
- Fortune, J. M., and N. Osheroff. 2000. "Topoisomerase II as a Target for Anticancer Drugs: When Enzymes Stop Being Nice." *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 64: 221–53.
- Freedman, Neil J., and Robert J. Lefkowitz. 2004. "Anti- β 1-Adrenergic Receptor Antibodies and Heart Failure: Causation, Not Just Correlation." *The Journal of Clinical Investigation* 113 (10): 1379–82.
- Fu, Qin, Qingtong Wang, and Yang K. Xiang. 2017. "Insulin and β Adrenergic Receptor Signaling: Crosstalk in Heart." *Trends in Endocrinology & Metabolism*.

<https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.02.002>.

- Gewirtz, D. A., and S. Yanovich. 1987. "Metabolism of Adriamycin in Hepatocytes Isolated from the Rat and the Rabbit." *Biochemical Pharmacology* 36 (11): 1793–98.
- Goetzenich, Andreas, Nima Hatam, Alma Zerneck, Christian Weber, Tanja Czarnotta, Rüdiger Autschbach, and Stefan Christiansen. 2009. "Alteration of Matrix Metalloproteinases in Selective Left Ventricular Adriamycin-Induced Cardiomyopathy in the Pig." *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 28 (10): 1087–93.
- Grace, Josephine A., Sabine Klein, Chandana B. Herath, Michaela Granzow, Robert Schierwagen, Noemi Masing, Thomas Walther, et al. 2013. "Activation of the MAS Receptor by Angiotensin-(1-7) in the Renin-Angiotensin System Mediates Mesenteric Vasodilatation in Cirrhosis." *Gastroenterology* 145 (4): 874–84.e5.
- Grassi, G., G. Seravalle, B. M. Cattaneo, A. Lanfranchi, S. Vailati, C. Giannattasio, A. Del Bo, C. Sala, G. B. Bolla, and M. Pozzi. 1995. "Sympathetic Activation and Loss of Reflex Sympathetic Control in Mild Congestive Heart Failure." *Circulation* 92 (11): 3206–11.
- Gros, R., J. L. Benovic, C. M. Tan, and R. D. Feldman. 1997. "G-Protein-Coupled Receptor Kinase Activity Is Increased in Hypertension." *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/jci119381>.
- Hadjileontiadis, Leontios J. 2007. "Empirical Mode Decomposition and Fractal Dimension Filter. A Novel Technique for Denoising Explosive Lung Sounds." *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine: The Quarterly Magazine of the Engineering in Medicine & Biology Society* 26 (1): 30–39.
- Halliwell, Barry, and John Gutteridge. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. OUP Oxford.
- Halliwell, B., and J. M. Gutteridge. 1984. "Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease." *Biochemical Journal* 219 (1): 1–14.
- Hasinoff, B. B., K. Hellmann, E. H. Herman, and V. J. Ferrans. 1998. "Chemical, Biological and Clinical Aspects of Dexrazoxane and Other Bisdioxopiperazines." *Current Medicinal Chemistry* 5 (1): 1–28.

- Hasinoff, Brian B., and Eugene H. Herman. 2007. "Dexrazoxane: How It Works in Cardiac and Tumor Cells. Is It a Prodrug or Is It a Drug?" *Cardiovascular Toxicology* 7 (2): 140–44.
- Hata, J. 2004. "Genetic Manipulation of Myocardial β -Adrenergic Receptor Activation and Desensitization." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(04\)00084-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(04)00084-7).
- "Heart Rate Variability. Standards of Measurement, Physiological Interpretation, and Clinical Use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology." 1996. *European Heart Journal* 17 (3): 354–81.
- Helmes, Michiel, Chee Chew Lim, Rongli Liao, Ajit Bharti, Lei Cui, and Douglas B. Sawyer. 2003. "Titin Determines the Frank-Starling Relation in Early Diastole." *The Journal of General Physiology* 121 (2): 97–110.
- Herman, E. H., S. E. Lipshultz, N. Rifai, J. Zhang, T. Papoian, Z. X. Yu, K. Takeda, and V. J. Ferrans. 1998. "Use of Cardiac Troponin T Levels as an Indicator of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity." *Cancer Research* 58 (2): 195–97.
- Herman, E. H., J. Zhang, S. E. Lipshultz, N. Rifai, D. Chadwick, K. Takeda, Z. X. Yu, and V. J. Ferrans. 1999. "Correlation between Serum Levels of Cardiac Troponin-T and the Severity of the Chronic Cardiomyopathy Induced by Doxorubicin." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 17 (7): 2237–43.
- Hilmer, Sarah N., Victoria C. Cogger, Michael Muller, and David G. Le Couteur. 2004. "The Hepatic Pharmacokinetics of Doxorubicin and Liposomal Doxorubicin." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 32 (8): 794–99.
- Hjalmarson, Åke, Sidney Goldstein, Björn Fagerberg, Hans Wedel, Finn Waagstein, John Kjekshus, John Wikstrand, et al. 2000. "Effects of Controlled-Release Metoprolol on Total Mortality, Hospitalizations, and Well-Being in Patients With Heart Failure." *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 283 (10): 1295.
- Hnatkova, Katerina, Xavier Copie, Anne Staunton, and Marek Malik. 1995. "Numeric Processing of Lorenz Plots of R-R Intervals from Long-Term ECGs." *Journal of*

Electrocardiology 28: 74–80.

- Hopewel, J. W., R. Duncan, D. Wilding, and K. Chakrabarti. 2001. "Preclinical Evaluation of the Cardiotoxicity of PK2: A Novel HPMa Copolymer-Doxorubicin-Galactosamine Conjugate Antitumour Agent." *Human & Experimental Toxicology* 20 (9): 461–70.
- Hortobágyi, G. N. 1997. "Anthracyclines in the Treatment of Cancer. An Overview." *Drugs* 54 Suppl 4: 1–7.
- Huang, N. E., Z. Shen, S. R. Long, M. C. Wu, H. H. Shih, Q. Zheng, N-C Yen, C. C. Tung, and H. H. Liu. 1998. "The Empirical Mode Decomposition and the Hilbert Spectrum for Nonlinear and Non-Stationary Time Series Analysis." *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 454 (1971): 903–95.
- Huikuri, Heikki V., and Phyllis K. Stein. 2013. "Heart Rate Variability in Risk Stratification of Cardiac Patients." *Progress in Cardiovascular Diseases* 56 (2): 153–59.
- Iaccarino, Guido, Janelle R. Keys, Antonio Rapacciuolo, Kyle F. Shotwell, Robert J. Lefkowitz, Howard A. Rockman, and Walter J. Koch. 2001. "Regulation of Myocardial β ARK1 Expression in Catecholamine-Induced Cardiac Hypertrophy in Transgenic Mice Overexpressing α 1B-Adrenergic Receptors." *Journal of the American College of Cardiology*. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(01\)01396-1](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(01)01396-1).
- Ide, T., H. Tsutsui, S. Kinugawa, N. Suematsu, S. Hayashidani, K. Ichikawa, H. Utsumi, Y. Machida, K. Egashira, and A. Takeshita. 2000. "Direct Evidence for Increased Hydroxyl Radicals Originating from Superoxide in the Failing Myocardium." *Circulation Research* 86 (2): 152–57.
- Ingawale, Deepa K., Satish K. Mandlik, and Suresh R. Naik. 2014. "Models of Hepatotoxicity and the Underlying Cellular, Biochemical and Immunological Mechanism(s): A Critical Discussion." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37 (1): 118–33.
- Irannejad, Roshanak, Jin C. Tomshine, Jon R. Tomshine, Michael Chevalier, Jacob P. Mahoney, Jan Steyaert, Søren G. F. Rasmussen, et al. 2013. "Conformational Biosensors Reveal GPCR Signalling from Endosomes." *Nature* 495 (7442): 534–

38.

- Ishise, H., H. Asanoi, S. Ishizaka, S. Joho, T. Kameyama, K. Umeno, and H. Inoue. 1998. "Time Course of Sympathovagal Imbalance and Left Ventricular Dysfunction in Conscious Dogs with Heart Failure." *Journal of Applied Physiology* 84 (4): 1234–41.
- Jacevic, Vesna, Aleksandar Djordjevic, Branislava Srdjenovic, Vukosava Milic-Tores, Zoran Segrt, Viktorija Dragojevic-Simic, and Kamil Kuca. 2017. "Fullerenol Nanoparticles Prevents Doxorubicin-Induced Acute Hepatotoxicity in Rats." *Experimental and Molecular Pathology* 102 (2): 360–69.
- Jacquet, Pierre, Andrew Averbach, O. Anthony Stuart, David Chang, and Paul H. Sugarbaker. 1997. "Hyperthermic Intraperitoneal Doxorubicin: Pharmacokinetics, Metabolism, and Tissue Distribution in a Rat Model." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s002800050721>.
- Japundzic, N., M. L. Grichois, P. Zitoun, D. Laude, and J. L. Elghozi. 1990. "Spectral Analysis of Blood Pressure and Heart Rate in Conscious Rats: Effects of Autonomic Blockers." *Journal of the Autonomic Nervous System* 30 (2): 91–100.
- Japundzic-Zigon, N. 1998. "Physiological Mechanisms in Regulation of Blood Pressure Fast Frequency Variations." *Clinical and Experimental Hypertension* 20 (4): 359–88.
- Japundžić-Žigon, Nina, Olivera Šarenac, Maja Lozić, Marko Vasić, Tatjana Tasić, Dragana Bajić, Vladimir Kanjuh, and David Murphy. 2018. "Sudden Death: Neurogenic Causes, Prediction and Prevention." *European Journal of Preventive Cardiology* 25 (1): 29–39.
- Javadov, S., M. Karmazyn, and N. Escobales. 2009. "Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening as a Promising Therapeutic Target in Cardiac Diseases." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 330 (3): 670–78.
- Jeansson, Marie, Karin Björck, Olav Tenstad, and Börje Haraldsson. 2009. "Adriamycin Alters Glomerular Endothelium to Induce Proteinuria." *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 20 (1): 114–22.
- Jensen, R. A., E. M. Acton, and J. H. Peters. 1984. "Doxorubicin Cardiotoxicity in the Rat: Comparison of Electrocardiogram, Transmembrane Potential, and

- Structural Effects." *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 6 (1): 186–200.
- Kalivendi, Shasi V., Eugene A. Konorev, Sonya Cunningham, Sravan K. Vanamala, Eugene H. Kaji, Joy Joseph, and B. Kalyanaraman. 2005. "Doxorubicin Activates Nuclear Factor of Activated T-Lymphocytes and Fas Ligand Transcription: Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Calcium." *Biochemical Journal* 389 (Pt 2): 527–39.
- Kamen, P. W., H. Krum, and A. M. Tonkin. 1996. "Poincaré Plot of Heart Rate Variability Allows Quantitative Display of Parasympathetic Nervous Activity in Humans." *Clinical Science* 91 (2): 201–8.
- Katus, H. A., S. Looser, K. Hallermayer, A. Remppis, T. Scheffold, A. Borgya, U. Essig, and U. Geuss. 1992. "Development and in Vitro Characterization of a New Immunoassay of Cardiac Troponin T." *Clinical Chemistry* 38 (3): 386–93.
- Kennel, M. B., R. Brown, and H. D. Abarbanel. 1992. "Determining Embedding Dimension for Phase-Space Reconstruction Using a Geometrical Construction." *Physical Review. A* 45 (6): 3403–11.
- Kirchheim, H. R. 1976. "Systemic Arterial Baroreceptor Reflexes." *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.1976.56.1.100>.
- Kleiger, Robert E., Phyllis K. Stein, and J. Thomas Bigger Jr. 2005. "Heart Rate Variability: Measurement and Clinical Utility." *Annals of Noninvasive Electrocardiology: The Official Journal of the International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology, Inc* 10 (1): 88–101.
- Kourie, J. I. 1998. "Interaction of Reactive Oxygen Species with Ion Transport Mechanisms." *The American Journal of Physiology* 275 (1 Pt 1): C1–24.
- Lal, Suman, Anupama Mahajan, Wei Ning Chen, and Balram Chowbay. 2010. "Pharmacogenetics of Target Genes across Doxorubicin Disposition Pathway: A Review." *Current Drug Metabolism* 11 (1): 115–28.
- La Rovere, M. T., G. D. Pinna, S. H. Hohnloser, F. I. Marcus, A. Mortara, R. Nohara, J. T. Bigger Jr, A. J. Camm, P. J. Schwartz, and ATRAMI Investigators. Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction. 2001. "Baroreflex Sensitivity and Heart Rate Variability in the Identification of Patients at Risk for Life-Threatening Arrhythmias: Implications for Clinical Trials." *Circulation* 103 (16): 2072–77.

- Lebrecht, Dirk, and Ulrich A. Walker. 2007. "Role of mtDNA Lesions in Anthracycline Cardiotoxicity." *Cardiovascular Toxicology* 7 (2): 108–13.
- Lefkowitz, R. J. 1998. "G Protein-Coupled Receptors. III. New Roles for Receptor Kinases and Beta-Arrestins in Receptor Signaling and Desensitization." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (30): 18677–80.
- Lerman, A., R. J. Gibbons, R. J. Rodeheffer, K. R. Bailey, L. J. McKinley, D. M. Heublein, and J. C. Burnett Jr. 1993. "Circulating N-Terminal Atrial Natriuretic Peptide as a Marker for Symptomless Left-Ventricular Dysfunction." *The Lancet* 341 (8853): 1105–9.
- Liggett, S. B., L. E. Wagoner, L. L. Craft, R. W. Hornung, B. D. Hoit, T. C. McIntosh, and R. A. Walsh. 1998. "The Ile164 beta2-Adrenergic Receptor Polymorphism Adversely Affects the Outcome of Congestive Heart Failure." *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/jci4059>.
- Li, Helong, Sam Kwong, Lihua Yang, Daren Huang, and Dongping Xiao. 2011. "Hilbert-Huang Transform for Analysis of Heart Rate Variability in Cardiac Health." *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics / IEEE, ACM* 8 (6): 1557–67.
- Lim, Chee Chew, Christian Zuppinger, Xinxin Guo, Gabriela M. Kuster, Michiel Helmes, Hans M. Eppenberger, Thomas M. Suter, Ronglih Liao, and Douglas B. Sawyer. 2004. "Anthracyclines Induce Calpain-Dependent Titin Proteolysis and Necrosis in Cardiomyocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (9): 8290–99.
- Lipshultz, S. E., N. Rifai, S. E. Sallan, S. R. Lipsitz, V. Dalton, D. B. Sacks, and M. E. Ottlinger. 1997. "Predictive Value of Cardiac Troponin T in Pediatric Patients at Risk for Myocardial Injury." *Circulation* 96 (8): 2641–48.
- Liu, Baogang, Hongli Li, Hongyan Qu, and Baogui Sun. 2006. "Nitric Oxide Synthase Expressions in ADR-Induced Cardiomyopathy in Rats." *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 39 (6): 759–65.
- Liu, Guangzhong, Yongwu Liu, Renjun Wang, Tingting Hou, Chaoyi Chen, Sijia Zheng, and Zengxiang Dong. 2016. "Spironolactone Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats." *Cardiovascular Therapeutics* 34 (4): 216–24.
- Lombardi, Federico, Giulia Sandrone, Silvia Pernpruner, Roberto Sala, Mario

- Garimoldi, Sergio Cerutti, Giuseppe Baselli, Massimo Pagani, and Alberto Malliani. 1987. "Heart Rate Variability as an Index of Sympathovagal Interaction after Acute Myocardial Infarction." *The American Journal of Cardiology* 60 (16): 1239–45.
- Lončar-Turukalo, T., M. Vasić, T. Tasić, G. Mijatović, S. Glumac, D. Bajić, and N. Japunžić-Žigon. 2015. "Heart Rate Dynamics in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy." *Physiological Measurement* 36 (4): 727–39.
- Lu, Sheng, Xinnian Chen, Jørgen K. Kanters, Irene C. Solomon, and Ki H. Chon. 2008. "Automatic Selection of the Threshold Value R for Approximate Entropy." *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering* 55 (8): 1966–72.
- Lyu, Y. L., J. E. Kerrigan, C. -P. Lin, A. M. Azarova, Y. -C. Tsai, Y. Ban, and L. F. Liu. 2007. "Topoisomerase II Mediated DNA Double-Strand Breaks: Implications in Doxorubicin Cardiotoxicity and Prevention by Dexrazoxane." *Cancer Research* 67 (18): 8839–46.
- Madamanchi, Aasakiran. 2007. "Beta-Adrenergic Receptor Signaling in Cardiac Function and Heart Failure." *McGill Journal of Medicine: MJM: An International Forum for the Advancement of Medical Sciences by Students* 10 (2): 99–104.
- Mäkikallio, T. H., T. Seppänen, K. E. Airaksinen, J. Koistinen, M. P. Tulppo, C. K. Peng, A. L. Goldberger, and H. V. Huikuri. 1997. "Dynamic Analysis of Heart Rate May Predict Subsequent Ventricular Tachycardia after Myocardial Infarction." *The American Journal of Cardiology* 80 (6): 779–83.
- Malfatto, G., G. Branzi, S. Gritti, L. Sala, R. Bragato, G. B. Perego, G. Leonetti, and M. Facchini. 2001. "Different Baseline Sympathovagal Balance and Cardiac Autonomic Responsiveness in Ischemic and Non-Ischemic Congestive Heart Failure." *European Journal of Heart Failure* 3 (2): 197–202.
- Mann, D. L., and F. G. Spinale. 1998a. "Activation of Matrix Metalloproteinases in the Failing Human Heart: Breaking the Tie That Binds." *Circulation* 98 (17): 1699–1702.
- . 1998b. "Activation of Matrix Metalloproteinases in the Failing Human Heart: Breaking the Tie That Binds." *Circulation* 98 (17): 1699–1702.
- Marfella, Raffaele, Mario Siniscalchi, Francesco Nappo, Pasquale Gualdiero, Katherine Esposito, Ferdinando Carlo Sasso, Federico Cacciapuoti, et al. 2005.

- “Regression of Carotid Atherosclerosis by Control of Morning Blood Pressure Peak in Newly Diagnosed Hypertensive Patients.” *American Journal of Hypertension* 18 (3): 308–18.
- Mason, J. W., M. R. Bristow, M. E. Billingham, and J. R. Daniels. 1978. “Invasive and Noninvasive Methods of Assessing Adriamycin Cardiotoxic Effects in Man: Superiority of Histopathologic Assessment Using Endomyocardial Biopsy.” *Cancer Treatment Reports* 62 (6): 857–64.
- Massart, C., R. Barbet, N. Genetet, and J. Gibassier. 2004. “Doxorubicin Induces Fas-Mediated Apoptosis in Human Thyroid Carcinoma Cells.” *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association* 14 (4): 263–70.
- Matsui, Hideo, Itsuro Morishima, Yasushi Numaguchi, Yukio Toki, Kenji Okumura, and Tetsuo Hayakawa. 1999. “Protective Effects of Carvedilol against Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rats.” *Life Sciences* 65 (12): 1265–74.
- May, Clive N., Song T. Yao, Lindsea C. Booth, and Rohit Ramchandra. 2013. “Cardiac Sympathoexcitation in Heart Failure.” *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* 175 (1-2): 76–84.
- Merlet, Nolwenn, Nicolas Piriou, Bertrand Rozec, Amandine Grabherr, Benjamin Lauzier, Jean-Noël Trochu, and Chantal Gauthier. 2013. “Increased beta2-Adrenoceptors in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rat.” *PloS One* 8 (5): e64711.
- Mhatre, R., E. Herman, A. Huidobro, and V. Waravdekar. 1971. “The Possible Relationship between Metabolism and Cardiac Toxicity of Duanomycin and Related Compounds.” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 178 (1): 216–22.
- Milano, C. A., L. F. Allen, H. A. Rockman, P. C. Dolber, T. R. McMinn, K. R. Chien, T. D. Johnson, R. A. Bond, and R. J. Lefkowitz. 1994. “Enhanced Myocardial Function in Transgenic Mice Overexpressing the Beta 2-Adrenergic Receptor.” *Science* 264 (5158): 582–86.
- Morisco, Carmine, Chiara Marrone, Jonathan Galeotti, Dan Shao, Dorothy E. Vatner, Stephen F. Vatner, and Junichi Sadoshima. 2008. “Endocytosis Machinery Is Required for beta1-Adrenergic Receptor-Induced Hypertrophy in Neonatal Rat Cardiac Myocytes.” *Cardiovascular Research* 78 (1): 36–44.

- Mortara, A., M. T. La Rovere, G. D. Pinna, A. Prpa, R. Maestri, O. Febo, M. Pozzoli, C. Opasich, and L. Tavazzi. 1997. "Arterial Baroreflex Modulation of Heart Rate in Chronic Heart Failure: Clinical and Hemodynamic Correlates and Prognostic Implications." *Circulation* 96 (10): 3450–58.
- Mukoyama, M., K. Nakao, K. Hosoda, S. Suga, Y. Saito, Y. Ogawa, G. Shirakami, M. Jougasaki, K. Obata, and H. Yasue. 1991. "Brain Natriuretic Peptide as a Novel Cardiac Hormone in Humans. Evidence for an Exquisite Dual Natriuretic Peptide System, Atrial Natriuretic Peptide and Brain Natriuretic Peptide." *The Journal of Clinical Investigation* 87 (4): 1402–12.
- Nagase, Hideaki, and J. Frederick Woessner. 1999. "Matrix Metalloproteinases." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (31): 21491–94.
- Negishi, Kazuaki, Tomoko Negishi, James L. Hare, Brian A. Haluska, Juan Carlos Plana, and Thomas H. Marwick. 2013. "Independent and Incremental Value of Deformation Indices for Prediction of Trastuzumab-Induced Cardiotoxicity." *Journal of the American Society of Echocardiography: Official Publication of the American Society of Echocardiography* 26 (5): 493–98.
- Nicolini, Paola, Michele M. Ciulla, Carlo De Asmundis, Fabio Magrini, and Pedro Brugada. 2012. "The Prognostic Value of Heart Rate Variability in the Elderly, Changing the Perspective: From Sympathovagal Balance to Chaos Theory." *Pacing and Clinical Electrophysiology: PACE* 35 (5): 622–38.
- Nikolaev, Viacheslav O., Alexey Moshkov, Alexander R. Lyon, Michele Miragoli, Pavel Novak, Helen Paur, Martin J. Lohse, Yuri E. Korchev, Sian E. Harding, and Julia Gorelik. 2010. "Beta2-Adrenergic Receptor Redistribution in Heart Failure Changes cAMP Compartmentation." *Science* 327 (5973): 1653–57.
- Nitiss, John L. 2009. "Targeting DNA Topoisomerase II in Cancer Chemotherapy." *Nature Reviews. Cancer* 9 (5): 338–50.
- Nousiainen, Tapio, Esko Vanninen, Esa Jantunen, Jouko Remes, Eira Ritanen, Olli Vuolteenaho, and Juha Hartikainen. 2001. "Neuroendocrine Changes during the Evolution of Doxorubicin-Induced Left Ventricular Dysfunction in Adult Lymphoma Patients." *Clinical Science* 101 (6): 601.
- Okada, Yoshiyuki, M. Melyn Galbreath, Shigeki Shibata, Sara S. Jarvis, Tiffany B. VanGundy, Rhonda L. Meier, Wanpen Vongpatanasin, Benjamin D. Levine, and

- Qi Fu. 2012. "Relationship between Sympathetic Baroreflex Sensitivity and Arterial Stiffness in Elderly Men and Women." *Hypertension* 59 (1): 98–104.
- Oliveira, Paulo J., Anabela P. Rolo, Vilma A. Sardão, Pedro Monteiro, Lino Gonçalves, Luís A. Providência, Carlos M. Palmeira, and António J. M. Moreno. 2004. "Advantages in the Use of Carvedilol versus Propranolol for the Protection of Cardiac Mitochondrial Function." *Revista Portuguesa de Cardiologia: Orgao Oficial Da Sociedade Portuguesa de Cardiologia = Portuguese Journal of Cardiology: An Official Journal of the Portuguese Society of Cardiology* 23 (10): 1291–98.
- Packer, Milton, Michael B. Fowler, Ellen B. Roecker, Andrew J. S. Coats, Hugo A. Katus, Henry Krum, Paul Mohacsi, et al. 2002. "Effect of Carvedilol on the Morbidity of Patients With Severe Chronic Heart Failure." *Circulation* 106 (17): 2194–99.
- Palmeira, C. M., J. Serrano, D. W. Kuehl, and K. B. Wallace. 1997. "Preferential Oxidation of Cardiac Mitochondrial DNA Following Acute Intoxication with Doxorubicin." *Biochimica et Biophysica Acta* 1321 (2): 101–6.
- Patrick, Kennerly S. 2002. "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th Edition Edited by J. G. Hardman, L. E. Limbird, and A. G. Gilman. McGraw Hill, New York. 2001. Xxvii 2148 Pp. 21 × 26 Cm. ISBN 0-07-1354469-7. \$125.00." *Journal of Medicinal Chemistry* 45 (6): 1392–93.
- Patterson, Cam, and Monte Willis. 2012. *Translational Cardiology: Molecular Basis of Cardiac Metabolism, Cardiac Remodeling, Translational Therapies and Imaging Techniques*. Springer Science & Business Media.
- Peer, Dan, Jeffrey M. Karp, Seungpyo Hong, Omid C. Farokhzad, Rimona Margalit, and Robert Langer. 2007. "Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy." *Nature Nanotechnology* 2 (12): 751–60.
- Pein, F., O. Sakiroglu, M. Dahan, J. Lebidois, P. Merlet, A. Shamsaldin, E. Villain, F. de Vathaire, D. Sidi, and O. Hartmann. 2004. "Cardiac Abnormalities 15 Years and More after Adriamycin Therapy in 229 Childhood Survivors of a Solid Tumour at the Institut Gustave Roussy." *British Journal of Cancer* 91 (1): 37–44.
- Penn, R. B., R. A. Panettieri Jr, and J. L. Benovic. 1998. "Mechanisms of Acute Desensitization of the beta2AR-Adenylyl Cyclase Pathway in Human Airway Smooth Muscle." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 19

(2): 338–48.

- Perez, Jeanne Miale, Deborah A. Rathz, Natalia N. Petrashevskaya, Harvey S. Hahn, Lynne E. Wagoner, Arnold Schwartz, Gerald W. Dorn, and Stephen B. Liggett. 2003. “ β 1-Adrenergic Receptor Polymorphisms Confer Differential Function and Predisposition to Heart Failure.” *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm930>.
- Perkiömäki, Juha S., Timo H. Mäkikallio, and Heikki V. Huikuri. 2000. “Nonlinear Analysis of Heart Rate Variability: Fractal and Complexity Measures of Heart Rate Behavior.” *Annals of Noninvasive Electrocardiology: The Official Journal of the International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology, Inc* 5 (2): 179–87.
- Pincus, S. M. 1991. “Approximate Entropy as a Measure of System Complexity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (6): 2297–2301.
- Pincus, S. M., and A. L. Goldberger. 1994. “Physiological Time-Series Analysis: What Does Regularity Quantify?” *The American Journal of Physiology* 266 (4 Pt 2): H1643–56.
- Pincus, Steve. 1995. “Approximate Entropy (ApEn) as a Complexity Measure.” *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science* 5 (1): 110–17.
- Piskorski, J., and P. Guzik. 2007. “Geometry of the Poincaré Plot of RR Intervals and Its Asymmetry in Healthy Adults.” *Physiological Measurement* 28 (3): 287–300.
- Pitt, B., F. Zannad, W. J. Remme, R. Cody, A. Castaigne, A. Perez, J. Palensky, and J. Wittes. 1999. “The Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients with Severe Heart Failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators.” *The New England Journal of Medicine* 341 (10): 709–17.
- Ponikowski, Piotr, Stefan D. Anker, Tuan Peng Chua, Roman Szelemej, Massimo Piepoli, Stamatis Adamopoulos, Katharine Webb-Peploe, et al. 1997. “Depressed Heart Rate Variability as an Independent Predictor of Death in Chronic Congestive Heart Failure Secondary to Ischemic or Idiopathic Dilated Cardiomyopathy.” *The American Journal of Cardiology* 79 (12): 1645–50.
- Ponikowski, Piotr, Adriaan A. Voors, Stefan D. Anker, Héctor Bueno, John G. F. Cleland, Andrew J. S. Coats, Volkmar Falk, et al. 2016. “2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure.” *Revista*

- Espanola de Cardiologia* 69 (12): 1167.
- Pouillart, Pierre. 2004. "Evaluating the Role of Dexrazoxane as a Cardioprotectant in Cancer Patients Receiving Anthracyclines." *Cancer Treatment Reviews* 30 (7): 643–50.
- Richman, J. S., and J. R. Moorman. 2000. "Physiological Time-Series Analysis Using Approximate Entropy and Sample Entropy." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 278 (6): H2039–49.
- Rivankar, Sangeeta. 2014. "An Overview of Doxorubicin Formulations in Cancer Therapy." *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 10 (4): 853–58.
- Robinson, Timothy W., and Shri N. Giri. 1986. "Effects of Chronic Administration of Doxorubicin on Myocardial Beta-Adrenergic Receptors." *Life Sciences* 39 (8): 731–36.
- Saeki, Kazuhiko, Ichiro Obi, Noriko Ogiku, Munekazu Shigekawa, Toshiaki Imagawa, and Takeshi Matsumoto. 2002. "Doxorubicin Directly Binds to the Cardiac-Type Ryanodine Receptor." *Life Sciences* 70 (20): 2377–89.
- Salisbury, John I., and Ying Sun. 2004. "Assessment of Chaotic Parameters in Nonstationary Electrocardiograms by Use of Empirical Mode Decomposition." *Annals of Biomedical Engineering* 32 (10): 1348–54.
- Santos, D. 2002. "Carvedilol Protects against Doxorubicin-Induced Mitochondrial Cardiomyopathy." *Toxicology and Applied Pharmacology* 185 (3): 218–27.
- Schwartz, R. G., W. B. McKenzie, J. Alexander, P. Sager, A. D'Souza, A. Manatunga, P. E. Schwartz, H. J. Berger, J. Setaro, and L. Surkin. 1987. "Congestive Heart Failure and Left Ventricular Dysfunction Complicating Doxorubicin Therapy. Seven-Year Experience Using Serial Radionuclide Angiocardigraphy." *The American Journal of Medicine* 82 (6): 1109–18.
- Seymour, Leonard W., David R. Ferry, David J. Kerr, Daniel Rea, Maggie Whitlock, Richard Poyner, Christopher Boivin, et al. 2009. "Phase II Studies of Polymer-Doxorubicin (PK1, FCE28068) in the Treatment of Breast, Lung and Colorectal Cancer." *International Journal of Oncology* 34 (6): 1629–36.
- Shimomura, H., F. Terasaki, T. Hayashi, Y. Kitaura, T. Isomura, and H. Suma. 2001. "Autophagic Degeneration as a Possible Mechanism of Myocardial Cell Death in Dilated Cardiomyopathy." *Japanese Circulation Journal* 65 (11): 965–68.

- Singal, P. K., and N. Iliskovic. 1998. "Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy." *The New England Journal of Medicine* 339 (13): 900–905.
- Siveski-Iliskovic, N., N. Kaul, and P. K. Singal. 1994. "Probucol Promotes Endogenous Antioxidants and Provides Protection against Adriamycin-Induced Cardiomyopathy in Rats." *Circulation* 89 (6): 2829–35.
- Sosnowski, Maciej, Elaine Clark, Shahid Latif, Peter W. Macfarlane, and Michal Tendera. 2005. "Heart Rate Variability Fraction-A New Reportable Measure of 24-Hour R-R Interval Variation." *Annals of Noninvasive Electrocardiology: The Official Journal of the International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology, Inc* 10 (1): 7–15.
- Souza Neto, Edmundo Pereira de, Patrice Abry, Patrick Loiseau, Jean Christophe Cejka, Marc Antoine Custaud, Jean Frutoso, Claude Gharib, and Patrick Flandrin. 2007. "Empirical Mode Decomposition to Assess Cardiovascular Autonomic Control in Rats." *Fundamental & Clinical Pharmacology* 21 (5): 481–96.
- Souza Neto, E. P., M. A. Custaud, J. C. Cejka, P. Abry, J. Frutoso, C. Gharib, and P. Flandrin. 2004. "Assessment of Cardiovascular Autonomic Control by the Empirical Mode Decomposition." *Methods of Information in Medicine* 43 (1): 60–65.
- Spallarossa, Paolo, Paola Altieri, Silvano Garibaldi, Giorgio Ghigliotti, Chiara Barisione, Valeria Manca, Patrizia Fabbi, Alberto Ballestrero, Claudio Brunelli, and Antonio Barsotti. 2006. "Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Are Induced Differently by Doxorubicin in H9c2 Cells: The Role of MAP Kinases and NAD(P)H Oxidase." *Cardiovascular Research* 69 (3): 736–45.
- Spallarossa, Paolo, Silvano Garibaldi, Paola Altieri, Patrizia Fabbi, Valeria Manca, Sabina Nasti, Pierfranco Rossettin, Giorgio Ghigliotti, Alberto Ballestrero, and Franco Patrone. 2004. "Carvedilol Prevents Doxorubicin-Induced Free Radical Release and Apoptosis in Cardiomyocytes in Vitro." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 37 (4): 837–46.
- Spiliotis, J., E. Halkia, and E. De Bree. 2016. "Treatment of Peritoneal Surface Malignancies with Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy—current Perspectives." *Current Oncology* 23 (3): 266.
- Stein, Phyllis K., Peter P. Domitrovich, Heikki V. Huikuri, Robert E. Kleiger, and Cast

- Investigators. 2005. "Traditional and Nonlinear Heart Rate Variability Are Each Independently Associated with Mortality after Myocardial Infarction." *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 16 (1): 13–20.
- Stojičić, S., S. Milutinović-Smiljanić, O. Šarenac, S. Milosavljević, J. F. R. Paton, D. Murphy, and N. Japundžić-Žigon. 2008. "Blockade of Central Vasopressin Receptors Reduces the Cardiovascular Response to Acute Stress in Freely Moving Rats." *Neuropharmacology* 54 (5): 824–36.
- Swain, Sandra M., Fredrick S. Whaley, and Michael S. Ewer. 2003. "Congestive Heart Failure in Patients Treated with Doxorubicin: A Retrospective Analysis of Three Trials." *Cancer* 97 (11): 2869–79.
- Swift, Lonnie P., Suzanne M. Cutts, Abraham Nudelman, Inessa Levovich, Ada Rephaeli, and Don R. Phillips. 2008. "The Cardio-Protecting Agent and Topoisomerase II Catalytic Inhibitor Sobuzoxane Enhances Doxorubicin-DNA Adduct Mediated Cytotoxicity." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 61 (5): 739–49.
- Takanashi, S., and N. R. Bachur. 1976. "Adriamycin Metabolism in Man. Evidence from Urinary Metabolites." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 4 (1): 79–87.
- Takemura, Genzou, and Hisayoshi Fujiwara. 2007. "Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy." *Progress in Cardiovascular Diseases* 49 (5): 330–52.
- Tardi, Paul, Nancy Boman, and Peter Cullis. 1996. "Liposomal Doxorubicin." *Journal of Drug Targeting* 4 (3): 129–40.
- Taylor, Chloe E., Greg Atkinson, Christopher K. Willie, Helen Jones, Philip N. Ainslie, and Yu-Chieh Tzeng. 2011. "Diurnal Variation in the Mechanical and Neural Components of the Baroreflex." *Hypertension* 58 (1): 51–56.
- Teraoka, K., M. Hirano, K. Yamaguchi, and A. Yamashina. 2000. "Progressive Cardiac Dysfunction in Adriamycin-Induced Cardiomyopathy Rats." *European Journal of Heart Failure* 2 (4): 373–78.
- Thavendiranathan, Paaladinesh, Bernd J. Wintersperger, Scott D. Flamm, and Thomas H. Marwick. 2013. "Cardiac MRI in the Assessment of Cardiac Injury and Toxicity from Cancer Chemotherapy: A Systematic Review." *Circulation. Cardiovascular Imaging* 6 (6): 1080–91.

- Thomas, C. E., and S. D. Aust. 1986. "Release of Iron from Ferritin by Cardiotoxic Anthracycline Antibiotics." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 248 (2): 684–89.
- Tjeerdsma, G., M. T. Meinardi, W. T. van Der Graaf, M. P. van Den Berg, N. H. Mulder, H. J. Crijns, E. G. de Vries, and D. J. van Veldhuisen. 1999. "Early Detection of Anthracycline Induced Cardiotoxicity in Asymptomatic Patients with Normal Left Ventricular Systolic Function: Autonomic versus Echocardiographic Variables." *Heart* 81 (4): 419–23.
- Toichi, Motomi, Takeshi Sugiura, Toshiya Murai, and Akira Sengoku. 1997. "A New Method of Assessing Cardiac Autonomic Function and Its Comparison with Spectral Analysis and Coefficient of Variation of R–R Interval." *Journal of the Autonomic Nervous System* 62 (1-2): 79–84.
- Tong, J., P. K. Ganguly, and P. K. Singal. 1991. "Myocardial Adrenergic Changes at Two Stages of Heart Failure due to Adriamycin Treatment in Rats." *The American Journal of Physiology* 260 (3 Pt 2): H909–16.
- Torti, F. M., M. M. Bristow, B. L. Lum, S. K. Carter, A. E. Howes, D. A. Aston, B. W. Brown Jr, J. F. Hannigan Jr, F. J. Meyers, and E. P. Mitchell. 1986. "Cardiotoxicity of Epirubicin and Doxorubicin: Assessment by Endomyocardial Biopsy." *Cancer Research* 46 (7): 3722–27.
- Ungerer, Martin, Kerstin Kessebohm, Kai Kronsbein, Martin J. Lohse, and Gert Richardt. 1996. "Activation of β -Adrenergic Receptor Kinase During Myocardial Ischemia." *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/01.res.79.3.455>.
- Vasey, P. A., S. B. Kaye, R. Morrison, C. Twelves, P. Wilson, R. Duncan, A. H. Thomson, et al. 1999. "Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of PK1 [N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer Doxorubicin]: First Member of a New Class of Chemotherapeutic Agents-Drug-Polymer Conjugates. Cancer Research Campaign Phase I/II Committee." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 5 (1): 83–94.
- Vasić, Marko, Tatjana Lončar-Turukalo, Tatjana Tasić, Marija Matić, Sofija Glumac, Dragana Bajić, Branka Popović, and Nina Japundžić-Žigon. 2019. "Cardiovascular Variability and β -ARs Gene Expression at Two Stages of Doxorubicin – Induced Cardiomyopathy." *Toxicology and Applied*

Pharmacology. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.10.015>.

- Vásquez-Vivar, J., P. Martasek, N. Hogg, B. S. Masters, K. A. Pritchard Jr, and B. Kalyanaraman. 1997. "Endothelial Nitric Oxide Synthase-Dependent Superoxide Generation from Adriamycin." *Biochemistry* 36 (38): 11293–97.
- Vassilatis, D. K., J. G. Hohmann, H. Zeng, F. Li, J. E. Ranchalis, M. T. Mortrud, A. Brown, et al. 2003. "The G Protein-Coupled Receptor Repertoires of Human and Mouse." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (8): 4903–8.
- Von Hoff, Daniel D. 1979. "Risk Factors for Doxorubicin-Induced Congestive Heart Failure." *Annals of Internal Medicine* 91 (5): 710.
- Wallace, Kendall B. 2007. "Adriamycin-Induced Interference with Cardiac Mitochondrial Calcium Homeostasis." *Cardiovascular Toxicology* 7 (2): 101–7.
- Wang, Suizhao, Wenhong Ren, Jeffery Liu, Guy Lahat, Keila Torres, Gonzalo Lopez, Alexander J. Lazar, et al. 2010. "TRAIL and Doxorubicin Combination Induces Proapoptotic and Antiangiogenic Effects in Soft Tissue Sarcoma in Vivo." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 16 (9): 2591–2604.
- Wess, J. 1997. "G-Protein-Coupled Receptors: Molecular Mechanisms Involved in Receptor Activation and Selectivity of G-Protein Recognition." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11 (5): 346–54.
- Wilkinson, P. M., M. Israel, W. J. Pegg, and E. Frei 3rd. 1979. "Comparative Metabolism and Excretion of Adriamycin in Man, Monkey, and Rat." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2 (2): 121–25.
- Wiseman, L. R., and C. M. Spencer. 1998. "Dexrazoxane. A Review of Its Use as a Cardioprotective Agent in Patients Receiving Anthracycline-Based Chemotherapy." *Drugs* 56 (3): 385–403.
- Wolf, M. M., G. A. Varigos, D. Hunt, and J. G. Sloman. 1978. "Sinus Arrhythmia in Acute Myocardial Infarction." *The Medical Journal of Australia* 2 (2): 52–53.
- Woo, Anthony Yiu-Ho, Ying Song, Rui-Ping Xiao, and Weizhong Zhu. 2015. "Biased β_2 -Adrenoceptor Signalling in Heart Failure: Pathophysiology and Drug Discovery." *British Journal of Pharmacology* 172 (23): 5444–56.
- Woo, M. A., W. G. Stevenson, D. K. Moser, and H. R. Middlekauff. 1994. "Complex Heart

- Rate Variability and Serum Norepinephrine Levels in Patients with Advanced Heart Failure." *Journal of the American College of Cardiology* 23 (3): 565–69.
- Woo, M. A., W. G. Stevenson, D. K. Moser, R. B. Trelease, and R. M. Harper. 1992. "Patterns of Beat-to-Beat Heart Rate Variability in Advanced Heart Failure." *American Heart Journal* 123 (3): 704–10.
- Wu, Mei-Ping, Yi-Shuai Zhang, Qian-Mei Zhou, Jian Xiong, Yao-Rong Dong, and Chen Yan. 2016. "Higenamine Protects Ischemia/reperfusion Induced Cardiac Injury and Myocyte Apoptosis through Activation of β 2-AR/PI3K/AKT Signaling Pathway." *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society* 104 (February): 115–23.
- Wu, Xiu-Xian, Yoshiyuki Kakehi, Youichi Mizutani, Hiroyuki Nishiyama, Toshiyuki Kamoto, Yuzuru Megumi, Noriyuki Ito, and Osamu Ogawa. 2003. "Enhancement of TRAIL/Apo2L-Mediated Apoptosis by Adriamycin through Inducing DR4 and DR5 in Renal Cell Carcinoma Cells." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 104 (4): 409–17.
- Xiang, Yang K. 2011. "Compartmentalization of Beta-Adrenergic Signals in Cardiomyocytes." *Circulation Research* 109 (2): 231–44.
- Xiao, R-P, and R. -P. Xiao. 2001. "-Adrenergic Signaling in the Heart: Dual Coupling of the 2-Adrenergic Receptor to Gs and Gi Proteins." *Science Signaling* 2001 (104): re15–re15.
- Yamada, Takaaki, Nobuaki Egashira, Ayami Bando, Yui Nishime, Yuki Tonogai, Maiko Imuta, Takahisa Yano, and Ryozo Oishi. 2012. "Activation of p38 MAPK by Oxidative Stress Underlying Epirubicin-Induced Vascular Endothelial Cell Injury." *Free Radical Biology & Medicine* 52 (8): 1285–93.
- Yamada, Takaaki, Mitsuyo Ueda, Nobuaki Egashira, Nina Zukeyama, Jun Kuwahara, and Satohiro Masuda. 2016. "Involvement of Intracellular cAMP in Epirubicin-Induced Vascular Endothelial Cell Injury." *Journal of Pharmacological Sciences* 130 (1): 33–37.
- Yesair, D. W., M. A. Asbell, R. Bruni, F. J. Bullock, and E. Schwartzbach. 1972. "Pharmacokinetics and Metabolism of Adriamycin and Daunomycin." In *International Symposium on Adriamycin*, 117–23.
- Yeung, Tai K., John W. Hopewell, Rosemary H. Simmonds, Leonard W. Seymour, Ruth

- Duncan, Ornella Bellini, Maria Grandi, Federico Spreafico, Jiri Strohalm, and Karel Ulbrich. 1991. "Reduced Cardiotoxicity of Doxorubicin given in the Form of N-(2-Hydroxypropyl) Methacrylamide Conjugates: An Experimental Study in the Rat." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 29 (2): 105–11.
- Yokoyama, Masayuki. 2014. "Polymeric Micelles as Drug Carriers: Their Lights and Shadows." *Journal of Drug Targeting* 22 (7): 576–83.
- Zannad, Faiez, John J. V. McMurray, Henry Krum, Dirk J. van Veldhuisen, Karl Swedberg, Harry Shi, John Vincent, Stuart J. Pocock, Bertram Pitt, and EMPHASIS-HF Study Group. 2011. "Eplerenone in Patients with Systolic Heart Failure and Mild Symptoms." *The New England Journal of Medicine* 364 (1): 11–21.
- Zaugg, Michael, Weimin Xu, Eliana Lucchinetti, Saiyid A. Shafiq, Nasir Z. Jamali, and M. A. Q. Siddiqui. 2000. "β-Adrenergic Receptor Subtypes Differentially Affect Apoptosis in Adult Rat Ventricular Myocytes." *Circulation* 102 (3): 344–50.
- Zaugg, M., W. Xu, E. Lucchinetti, S. A. Shafiq, N. Z. Jamali, and M. A. Siddiqui. 2000. "Beta-Adrenergic Receptor Subtypes Differentially Affect Apoptosis in Adult Rat Ventricular Myocytes." *Circulation* 102 (3): 344–50.
- Zhang, Yufeng, Yali Gao, Le Wang, Jianhua Chen, and Xinling Shi. 2007. "The Removal of Wall Components in Doppler Ultrasound Signals by Using the Empirical Mode Decomposition Algorithm." *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering* 54 (9): 1631–42.
- Zhao, Youyou, Declan McLaughlin, Emma Robinson, Adam P. Harvey, Michelle B. Hookham, Ajay M. Shah, Barbara J. McDermott, and David J. Grieve. 2010. "Nox2 NADPH Oxidase Promotes Pathologic Cardiac Remodeling Associated with Doxorubicin Chemotherapy." *Cancer Research* 70 (22): 9287–97.
- Zhu, Hongxin, Beverly A. Rothermel, and Joseph A. Hill. 2009. "Autophagy in Load-Induced Heart Disease." *Methods in Enzymology* 453: 343–63.
- Zhu, Weizhong, Sharon Tsang, David M. Browe, Anthony Yh Woo, Ying Huang, Chanjuan Xu, Jian-Feng Liu, Fengxiang Lv, Yan Zhang, and Rui-Ping Xiao. 2016. "Interaction of β1-Adrenoceptor with RAGE Mediates Cardiomyopathy via CaMKII Signaling." *JCI Insight* 1 (1): e84969.
- Zhu, Wei-Zhong, Ming Zheng, Brian Kobilka, and Rui-Ping Xiao. 2000. "Dual

Modulation of Cell Survival and Cell Death by β 2-Adrenergic Gi and Gs Signaling in Adult Mouse Cardiac Myocytes." *Circulation* 102 (21): 2672–2672.

Zhu, W. Z., M. Zheng, W. J. Koch, R. J. Lefkowitz, B. K. Kobilka, and R. P. Xiao. 2001. "Dual Modulation of Cell Survival and Cell Death by beta(2)-Adrenergic Signaling in Adult Mouse Cardiac Myocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (4): 1607–12.

Zima, A., and L. Blatter. 2006. "Redox Regulation of Cardiac Calcium Channels and Transporters." *Cardiovascular Research* 71 (2): 310–21.

BIOGRAFIJA

Marko S. Vasić rođen je 29. Februara 1984. godine u Kruševcu. Osnovnu školu i Gimnaziju završio je u Kruševcu. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisuje 2003. godine. Diplomirao je septembra 2011. godine sa prosečnom ocenom 8,64/10.

Od 1. aprila 2012. godine bio je angažovan kao istraživač-pripravnik na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na interdisciplinarnom projektu III 41013, Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj pod nazivom: *Funkcionalna genomika hipotalamusa i medule u hipertenziji indukovanoj hroničnim stresom*, pod rukovodstvom prof. dr Nine Japundžić Žigon. Septembra 2012. godine upisuje Doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna medicina, pod mentorstvom prof. dr Nine Japundžić Žigon.

Od septembra 2014. do danas učestvovao je na nekoliko međunarodnih simpozijuma, kao predavač po pozivu (*Neurocard* u Beogradu, *Congress Of Physiological Sciences Of Serbia With International Participation* u Beogradu, APHAR u Gracu).

U periodu maj 2015. – decembar 2016. godine učestvovao je u seriji eksperimenata vezanih za toksikološka ispitivanja doksorubicina konjugovanog sa nanočesticama, izvedenih u saradnji sa malezijskim Univezitetom iz Kuala Lumpura.

Odlukom Veća naučnih oblasti medicinskih nauka od dana 9.3.2017. godine odobrena mu je teza doktorske disertacije pod naslovom: *Varijabilitet srčane frekvencije i ekspresija β -adrenergičkih receptora u kardiomiopatiji indukovanoj doksorubicinom*.

Maja 2017. godine unapređen je u zvanje istraživač-saradnik.

U periodu od maja 2017. do danas učesnik je bilateralne saradnje Laboratorije za kardiovaskularnu farmakologiju i Departmana za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta Semmelweis Univerziteta u Budimpešti.

Marko S. Vasić položio je sve ispite predviđene planom i programom Doktorskih akademskih studija Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za smer Molekularna medicina, sa prosečnom ocenom 9,00/10. Do sada ima objavljenih 26 autorskih radova. Glavni rezultat njegovog višegodišnjeg truda je i prvo autorstvo u radu objavljenom 2019. godine u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21) – Toxicology and Applied Pharmacology pod nazivom: “Cardiovascular variability and β -ARs gene expression at two stages of doxorubicin – Induced cardiomyopathy”. Toxicol Applied Pharmacol 362 (2019) 43–51. Bio je i koautor u radu objavljenom u časopisu od izuzetnog međunarodnog značaja – Nanotoxicology (M21A) pod nazivom: “Hemodynamic effects of HPMA copolymer based doxorubicin conjugate: a randomized controlled and comparative spectral study in conscious rats“, kao i koautor na radu objavljenom u međunarodnom časopisu Physiological Measurements (M23) pod nazivom: “Heart rate dynamics in doxorubicin-induced cardiomyopathy“; Physiol. Meas. 36 (2015) 727–739.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani: **Marko Vasić**

broj upisa: **MM 13/12**

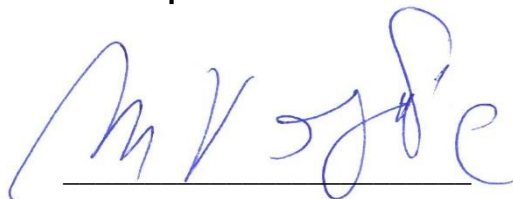
Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom: **VARIJABILITET SRČANE FREKVENCije I EKSPRESIJA β -ADRENERGIČKIH RECEPTORA U KARDIOMIOPATIJI IZAZVANOJ DOKSORUBICINOM**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 9.4.2019.



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Vasić', is written over a horizontal line.

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Marko Vasić**

Broj upisa: MM 13/12

Studijski program: Doktorske akademske studije; Molekularna medicina

Naslov rada:

VARIJABILITET SRČANE FREKVENCije I EKSPRESIJA β -ADRENERGIČKIH RECEPTORA U KARDIOMIOPATIJI IZAZVANOJ DOKSORUBICINOM

Mentor: Prof. dr Nina Japundžić Žigon

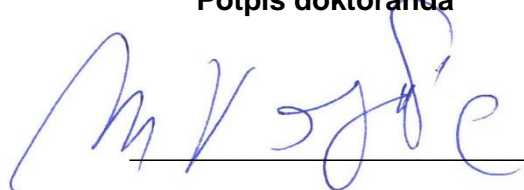
Potpisani Marko Vasić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 9.4.2019.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: **VARIJABILITET SRČANE FREKVENCije I EKSPRESIJA β -ADRENERGIČKIH RECEPTORA U KARDIOMIOPATIJI IZAZVANOJ DOKSORUBICINOM** koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

U Beogradu, 9.4.2019.

Potpis doktoranda

