PROMENE SENZITIVNOSTI BARORECEPTORSKOG REFLEKSA KOD TOKSIČNE MIOKARDIOPATIJE IZAZVANE DOKSORUBICINOM

Aleksandar Ninić¹, Marko Vasić², Sofija Glumac³, Nina Žigon⁴

¹ Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

² Komentor; Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

³ Komentor; Institut za patologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

⁴ Mentor; Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Sažetak

Zaključak: Kod pacova u ranoj fazi doksorubinske miokardiopatije dolazi do povećanja senzitivnosti barorefleksa.

Uvod: Doksorubicin je efikasan citostatik u lečenju neoplastičnih oboljenja. Njegova primena je ograničena zbog razvoja dilatacione miokardiopatije koja ima smrtni ishod. Dobro je poznato da kod razvoja srčane insuficijencije dolazi do remodelovanja autonomne nervne regulacije kardiovaskularnog sistema.

Cilj: Istražiti promene rada barorefleksa, glavnog regulacionog neurogenog mehanizma cirkulacije, kod miokardiopatije izazvane doksorubicinom.

Materijal i metode: Eksperimenti su izvedeni na odraslim mužjacima pacova Wistar soja 35 dana nakon tretiranja doksorubicinom (kumulativna doza 15 mg/kg i.p. DOXO grupa) ili fizioloskim rastvorom (CONT). Toksičnost doksorubicina utvrđena je histološki. Krvni pritisak registrovan je direktnom metodom kroz kateter postavljen u femoralnu arteriju. Nakon digitalizacije analoga signala arterijskog pulsog pritiska, iz njega je izvučen sistolni (SBP) i dijasolni (DBP) arterijski krvni pritisak u formi maksimuma (za SBP) i minimuma (za DBP) arterijskog pulsog talasa, pulsog intervala (za PI) i srčane frekvencije (za HR). Senzitivnost spontanog barorefleksa (BRS) je određena metodom sekvenci.

Rezultati: Doksorubicin je prouzrokovao vakuolarnu degeneraciju kardiomiocita i intersticijalnu inflamaciju tkiva. DOXO pacovi imali su povećanje BRS u odnosu na CONT pacove, kako za rastuće tako i za padajuće sekvence ($p < 0,05$). Kod DOXO pacova došlo je i do smanjenja HR ($p < 0,05$) bez promena visine SBP-a i DBP-a.

Ključne reči: barorefleks, doksorubicin, srčana insuficijencija, krvni pritisak, pacov.

Abstract

Conclusion: In the early stage of doxorubicin-induced cardiomyopathy, there is an increase of baroreflex sensitivity in rats.

Introduction: Doxorubicin is an effective anti-neoplastic drug used to treat many malignancies. However, the use of this cytostatic is often limited due to the development of myocardopathy. It is well known that heart failure is associated with remodelling of autonomic nerve regulation involved in homeostasis of cardiovascular system.

The Aim: To evaluate baroreflex function in doxorubicin-induced myocardopathy.

Material and methods: Experiments were performed on adult male Wistar rats 35 days after being treated with doxorubicin (cumulative dose 15 mg/kg, ip; DOXO) or saline (CONT). The toxicity of doxorubicin was determined histologically. Blood pressure was recorded using the direct method – cannulation of the femoral artery. After digitizing, the signals were divided into systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), pulse interval (PI) and heart rate (HR) as maximum (for SBP), minimum (for DBP), distance between two peaks (for PI) and 60/PI (for HR). The sensitivity of the baroreceptor reflex (BRS) was calculated using the sequence method.

Results: Doxorubicin induced vacuolar degeneration of cardiomyocytes and interstitial infiltration of polymorphonuclear granulocytes. The increase of BRS was noted in DOX rats, in regards to CONT group ($p < 0,05$). DOXO rats also exhibited lower HR ($p < 0,05$), but changes in SBP and DBP values were not found.

Key words: baroreflex, doxorubicin, heart failure, blood pressure, rat.

Uvod

Doksorubicin je efikasan citostatik. Međutim, njegova primena je ograničena zbog razvoja dilatacione miokardiopatije. Dilataciona kardiomiopatija se najčešće klinički manifestuje kongestivnom srčanom insuficijencijom, koja se može razviti i 10 do 15 godina nakon završetka terapije doksorubicinom. Danas se odluka o prekidu terapije doksorubicinom donosi na osnovu makroskopskih promena srčanog mišića i poremećaja funkcije koje se vide u toku ultrazvučnog pregleda. Zbog toga je važno naći osetljiviji dijagnostički metod kako bi se kardiotoksičnost doksorubicina ustanovila pre makroskopskih i funkcionalnih promena i time predupredio nastanak kongestivne srčane insuficijencije.

Dobro je poznato da je razvoj srčane insuficijencije praćen remodelovanjem rada neuroendokrinih regulacionih mehanizama. Jedan od mehanizama koji se remodeluje je i barorefleks [1-3].

Baroreceptori detektuju visinu krvnog pritiska i nalaze se u luku aorte i u račvi karotidnih arterija. Informacije o promeni arterijskog pritiska iz baroreceptora putuju aferentnim vlaknima vagusa do produžene moždine. Eferentna vlakna simpatikusa i vagusa iz produžene moždine inervišu srce i regulišu brzinu srčanog rada i snagu srčane kontrakcije. Baroreceptorski refleks (BRR) radi na principu negativne povratne sprege. Pad arterijskog krvnog pritiska izazvaće povećanje tonusa simpatikusa i/ili inhibiciju vagusa i posledično vazokonstrikciju i tahikardiju. Kada krvni pritisak raste, tada barorefleks smanjuje tonus simpatikusa i/ili porast tonusa vagusa.

Mi smo pretpostavili da se barorefleks menja i u miokardiopatiji izazvanoj doksorubicinom, pa je cilj rada bio da se istraže promene senzitivnosti barorefleksa u eksperimentalnom modelu miokardiopatije izazvane doksorubicinom, i to u ranim fazama miokardiopatije pre razvoja ireverzibilnih ožiljnih oštećenja srčanog mišića.

Materijal i metode

Životinje

Eksperimenti su izvođeni na mužjacima Wistar pacova ($n = 40$), tri meseca starosti, prosečne telesne mase 290 ± 10 g, iz uzgajivačnice Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Sve procedure u ovom radu odobrila je Etička komisija Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprave za veterinu, pod brojem: 323-07-1059/2013-05/02, 30.12.2013 godine.

Eksperimentalni protokol

Četrdeset pacova je randomizirano u dve grupe

(DOXO i CONT) od po dvadeset pacova u svakoj. Životinje su smeštene u individualne kaveze od pleksiglasa ($25 \times 25 \times 25$ cm) u kontrolisanim laboratorijskim uslovima (temperatura $21 \pm 1^\circ\text{C}$, vlažnost $60 \pm 1\%$, cirkadijalni ritam od 12 sati svetla, 12 sati mraka). Voda i peletirana hrana (Veterinarski zavod, Subotica) su im bili dostupni po volji. DOXO grupa pacova bila je dve nedelje tretirana sa šest doza doksorubicina ($2.5 \text{ mg}/0.5 \text{ mL/kg}$ i.p. svakog drugog dana, **slika 1**). Kontrolna grupa pacova (CONT) dobijala je fiziološki rastvor (0.5 mL/kg i.p.). Preživljavanje životinja je praćeno 70 dana. U posebnoj grupi od osam pacova, nakon perioda mirovanja u trajanju od 35 dana, u femoralnu arteriju plasiran je polietilenski kateter za registrovanje hemodinamskih parametara (**Slika 1**).

Slika 1. Vremenski tok eksperimenta.

Hirurška procedura

Životinje su anestetizirane kombinacijom 2% ksilazina (Xylazin 2%, CP-Pharma, Burgdorf, Nemačka, u dozi od 10 mg/kg i.p.) i 10% ketamina (Ketamidol® 10%, Richter Pharma AG, Wells, Austrija u dozi od 90 mg/kg i.p.). U desnu femoralnu arteriju, pacovima je insertovan polietilenski kateter (PE, SD 0.90 mm, UD 0.58 mm) prethodno ispunjen heparinizovanim fiziološkim rastvorom (50 IU/mL). Kateter je sproveden subkutano do mesta između lopatica. Da bi se što više smanjio post-operativni period oporavka, pravljani su rezovi minimalne dužine na operacionim mestima u okviru ingvinalne regije (10 mm) i prostoru između lopatica (3 mm). Peri-operativno, aplikovan je analgetik karprofen (Rimadyl®, Pfizer, New York, SAD u dozi od 5 mg/kg s.c.), a rane su površinski tretirane antiseptikom u spreju.

Registrovanje i obrada hemodinamskih parametara

Uz pomoć sfigmografa registrovane su vrednosti arterijskog krvnog pritiska pacova u dužini od 30 minuta (HA-HSE D79232 PlugSys MiniCase) i potom digitalizovane na 1000 Hz u softveru zasnovanom na LabView-u, koji je modifikovan u Laboratoriji za kardiovaskularnu farmakologiju Medicinskog fakulteta. Sistolni krvni pritisak (*systolic blood pressure*, SBP) i dijastolni krvni pritisak (*diastolic blood pressure*, DBP), pulsni interval (*pulse*

interval, PI) i srčana frekvenca (heart rate, HR) izdvojeni su iz talasa arterijskog pritiska kao maksimum (SBP), minimum (DBP), rastojanje između dva maksimuma (PI) i 60/PI (HR).

Evaluacija senzitivnosti sponatnog 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 uzimane su u obzir [4]. Funkcija barorefleksa procenjena 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 OR [$\text{ms} \cdot \text{mmHg}$] (dobija se kao pravougaona površina 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).

Histomorfološka identifikacija kardiomiopatije

Na kraju eksperimenta, pacovi su eutanazirani sa T61™ injekcijama (T61™, Intervet®, Boxmeer, Holandija u dozi od 150 mg/kg i.p.) i preuzeta srca su fiksirana 48 časova u 4% formaldehidu. Nakon parafinskog kalupljenja isecci debljine od 3 μm obojeni su hematoksilin-eozinom.

Statistika

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ s.e.m. Razlike između DOXO i CONT grupe analizirane su Studentovim t-testom. Rezultati su smatrani statistički značajnim samo za vrednosti $p < 0,05$.

Rezultati

Hemodinamski parametri i barorefleks kod pacova tretiranih doksorubicinom

Kod pacova tretiranih doksorubicinom došlo je do značajnog smanjenja srčane frekvence bez promena visine krvnog pritiska (tabela 1). Ustanovljeno je i povećanje osetljivosti barorefleksa kako za rastuće tako i za padajuće sekvence (grafikon 1). Težište rada barorefleksa nije se promenilo u odnosu na kontrole, dok se opseg rada barorefleksa povećao (grafikon 2).

Preživljavanje pacova tretiranih doksorubicinom

Preživljavanje pacova tretiranih doksorubicinom predstavljeno je na grafikonu 3. Vidi se da je medijana

preživljavanja bila 41 dan.

Histomorfološka analiza

Kod svih pacova tretiranih doksorubicinom, nađena je vakuolarna degeneracija kardiomiocita (slika 1). Kod 2 od 8 pacova, prisutan je intersticijalni infiltrat polimorfonukleara (slika 2). Šest od osam pacova imalo je nekrozu miofibrila miokarda (engl. contraction band necrosis) (slika 3).

Tabela 1. Hemodinamski parametri kod pacova tretiranih doksorubicinom: prikazane su srednje vrednosti hemodinamskih parametara za 8 životinja $\pm$ SE.

	CONT	DOXO
SBP (mmHg)	129 $\pm$ 6	126 $\pm$ 6
DBP (mmHg)	81 $\pm$ 3	82 $\pm$ 2
HR (bpm)	353 $\pm$ 4	320 $\pm$ 8 *

* $p < 0,05$

SBP – sistolni krvni pritisak; DBP – dijastolni krvni pritisak; HR – srčana frekvenca; CONT – kontrolna grupa pacova; DOXO – pacovi tretirani doksorubicinom (kumulativna doza 15 mg/kg i.p.)

Grafikon 1. Senzitivnost barorefleksa (BRS) kod pacova tretiranih doksorubicinom.

Grafikon 2. Opseg rada barorefleksa (OR BRR) kod pacova tretiranih doksorubicinom.

Grafikon 3. Kaplan-Meier kriva preživljavanja pacova tretiranih doksorubicinom.

Slika 1. DOXO grupa. Vakuolarna degeneracija kardiomiocita (strelice). HE 40x

Slika 2. DOXO grupa. Infiltracija mononukleara u intersticijum (strelice). HE 40x

Slika 3. Nekroza miofibrila miokarda (eozinofilne poprečne pruge – strelice). HE 40x

Diskusija

U našem radu prvi put je pokazano da u ranoj fazi razvoja miokardiopatije kod pacova indukovane doksorubicinom, kada se još uvek nije razvila fibroza, postoji povećanje osetljivosti barorefleksa, kako vagalne, tako i simpatičke grane. Naši nalazi, takođe, potvrđuju da je smrtnost životinja tretiranih doksorubicinom očekivana, i ona je iznosila 40% posle sedamdesetog dana.

Kada se razvije srčana slabost, barorefleks se remodeluje i kao posledica toga povećava se upliv simpatikusa na srce i krvne sudove te se razvija tahikardija i porast perifernog otpora. Ranije objavljene studije na pacovima pokazale su da u dilatacionoj fazi doksorubinske kardiomiopatije dolazi do smanjenja osetljivosti barorefleksa i tahikardije [5]. Siveski-Iliskovic i saradnici [6] su pokazali da kod pacova tretiranih toksičnim kumulativnim dozama doksorubicina dolazi do pada krvnog pritiska i srčane frekvencije, što je ustanovljeno plasiranjem mikro sonde za merenje krvnog pritiska u levu srčanu komoru preko karotidne arterije. Prethodne studije su pokazale da dugotrajna aplikacija doksorubicina dovodi do smanjenja inotropnog odgovora na stimulaciju beta adrenergičkih receptora izoprenalinom i redukcije senzitivnosti barorefleksa [7]. U našem istraživanju praćene su rane promene hemodinamskih parametara kod pacova koji su tretirani doksorubicinom, pre razvoja fibrozirajućih promena. Mi smo pokazali da se još u ranoj fazi toksičnosti senzitivnost barorefleksa povećava i da je upliv simpatikusa i vagusa na srce podjednako zastupljen, što se vidi iz promena rastućih i padajućih sekvenci koje predstavljaju simpatičku i

vagalnu eferentnu granu prema srcu.

U našem radu mortalitet izazvan doksorubicinom bio je očekivan, i uglavnom se poklapa sa nalazima u prethodnim istraživanjima [8]. Međutim, mi nismo istraživali da li je mortalitet nastupio samo usled kardiotoksičnosti ili i toksičnosti koje doksorubicin ispoljava na druge vitalne organe kao što su jetra, koštana srž, bubreg i drugi.

U radu je prvi put pokazano da u eksperimentalnom modelu miokardiopatije izazvane doksorubicinom postoji povećanje osetljivosti obe grane barorefleksa, vagusne i simpatikusne. Naša ispitivanja sugerišu da bi osetljivost barorefleksa mogla da bude jedna od ranih dijagnostičkih pokazatelja razvoja miokardiopatije indukovane doksorubicinom.

Literatura

1. Mortara A, La Rovere MT, et al. Arterial baroreflex modulation of heart rate in chronic heart failure. Clinical and hemodynamic correlates and prognostic implications. *Circulation*. 1997;96: 3450–3458
2. Ryan S, Ward S, Heneghan C, McNicholas WT. Predictors of decreased spontaneous baroreflex sensitivity in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest*. 2007;131: 1100–1107
3. La Rovere MT, Pinna GD, et al. Baroreflex sensitivity and heart rate variability in the identification of patients at risk for life-threatening arrhythmias: Implications for clinical trials. *Circulation*. 2001;103:2072–2077
4. Bajić D, Lončar-Turukalo T, et al. Temporal analysis of the spontaneous baroreceptor reflex during mild emotional stress in the rat. *Stress*. 2010; 13: 142–154.
5. Siveski-Iliskovic N, Kaul N, Singal PK. Probucol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin induced cardiomyopathy. *Circulation*. 1994;89: 2829–2835
6. Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singal PK. Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effects. *Circulation*. 1995;91: 10–15.
7. Gorodetskaya EA1, Dugin SF, Golikov MA, Kapelko VI, Medvedev OS. The cardiac contractile function and hemodynamic control in rats after chronic adriamycin treatment. *Can J Physiol Pharmacol*. 1990;68(2): 211–5.
8. Schwarz ER, Pollick C, Dow J, Patterson M, Birnbaum Y, Kloner RA. A small animal model of non-ischemic cardiomyopathy and its evaluation by transthoracic echocardiography. *Cardiovasc Res*. 1998;39(1): 216–23.