

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Marija D. Kosić

GENSKA EKSPRESIJA β -ADRENERGIČKIH
RECEPTORA I KLJUČNIH MOLEKULA
UKLJUČENIH U PROCES NJIHOVE
NISHODNE REGULACIJE U KARDIOMIOPATIJI
IZAZVANOJ DOKSORUBICINOM

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Marija D. Kosić

GENE EXPRESSION OF β -ADRENERGIC
RECEPTORS AND THE KEY MOLECULES
INVOLVED IN THEIR DOWNREGULATION IN
DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOMYOPATHY

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

Mentor:

prof. dr Zorica Nešić, Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komentor:

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

Članovi komisije:

1. doc. dr Marko Stojanović, Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. prof. dr Sanja Milutinović-Smiljanić, vanredni profesor, Opšta i oralna histologija i embriologija, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu
3. prof. dr Dragana Bajić, Katedra za telekomunikacije i obradu signala, Fakultet tehničkih nauka Univerziteta u Novom Sadu

Datum odbrane: _____

Svima, koji su na pragu nekakvog odustajanja, a iznova traže unutrašnju snagu da nastave.

Mojoj porodici, koja mi je razumevanjem i ljubavlju, pomogla da tu snagu pronađem.

GENSKA EKSPRESIJA β -ADRENERGIČKIH RECEPTORA I KLJUČNIH MOLEKULA UKLJUČENIH U PROCES NJIHOVE NISHODNE REGULACIJE U KARDIOMIOPATIJ IZAZVANOJ DOKSORUBICINOM

Sažetak

Doksorubicin je efikasan lek u terapiji solidnih tumora i hematoloških maligniteta, u populacijama dece i odraslih. Najozbiljnije neželjeno dejstvo doksorubicina je kardiomiopatija, koja može dovesti do kongestivne srčane insuficijencije, čiji je mortalitet približno 50%. Mehanizmi doksorubicinske kardiomiopatije nisu sasvim razjašnjeni i, zbog toga, ne postoje efikasna prevencija i terapija. Imajući u vidu priznatu ulogu maladaptivnog procesa nishodne regulacije beta adrenergičkih receptora (β -AR) u dekompenzaciji srca, cilj ove studije bio je da u doksorubicinskoj kardiomiopatiji izmerimo gensku ekspresiju i sintezu β_1 -AR i β_2 -AR, kao i ključnih molekula uključenih u proces njihove nishodne regulacije: kinaza G protein-spregnutih receptora (GRK) i beta arestina (ARRB). Takođe, pretpostavili smo da bi inhibicija GRK2, ključne kinaze u nishodnoj regulaciji β -AR, mogla da prevenira toksično remodelovanje srca uzrokovano doksorubicinom i da poveća preživljavanje. U eksperimente su uključeni mužjaci *Wistar* pacova, nasumično raspoređeni u kontrolnu grupu – control (0,5 mL/kg 0,9% NaCl, *i.v.*, n = 7), grupu tretiranu doksorubicinom – DOX (doksorubicin, 5 mg/kg *i.v.*, n = 23) i grupu tretiranu doksorubicinom i paroksetinom – DOX+P (doksorubicin, 5 mg /kg *i.v.* + paroksetin 10 mg/kg/dan *p.o.* 5 dana pre aplikacije doksorubicina, n = 11). Tokom perioda praćenja u trajanju od 70 dana, evaluirani su znaci opšti znaci toksičnosti, telesna masa, preživljavanje i ultrazvučni parametri srčane morfologije i funkcije. Histopatološka analiza i RT-qPCR analiza ekspresije gena za β_1 -AR, β_2 -AR, GRK2, GRK3, ARRB1 i ARRB2 rađene su nakon žrtvovanja eksperimentalnih životinja. DOX pacovi bili su lošeg opšteg stanja i smanjenog preživljavanja, adinamični i progresivno su gubili na telesnoj masi. Ehokardiografijom je utvrđeno postojanje dve kliničke prezentacije srčane dekompenzacije: hipertrofična (DOX-HCM) sa smanjenim volumenom krvi leve komore na kraju dijastole (EDV_{LV}) i očuvanom ejekcionom frakcijom leve komore (EF_{LV}), i dilataciona (DOX-DCM), sa povećanim EDV_{LV} , a smanjenom EF_{LV} . Kod svih pacova tretiranih doksorubicinom, ekspresija β -AR i ARRB bila je nepromenjena. Jedino je kod DOX-HCM pacova pokazana povećana ekspresija i sinteza GRK2 i GRK3. Postojanje pozitivne korelacije između GRK2 i relativne debljine zida leve komore srca kod ovih pacova, sugeriše moguću ulogu GRK2 u nastanku srčane hipertrofije. DOX+P pacovi bili su dobrog opšteg stanja, povećanog preživljavanja i dobijali su na telesnoj masi tokom vremena. Ehokardiografija je pokazala očuvanu srčanu morfologiju i kontraktilnost. Kod ovih pacova, utvrđena je smanjena genska ekspresija i sinteza GRK2 i GRK3, a povećana ekspresija i sinteza β_1 -AR i β_2 -AR, što može predstavljati potencijalni mehanizam očuvanja inotropne rezerve srca. Ova studija pokazala je, po prvi put, da GRK2 inhibicija paroksetinom efikasno prevenira kardiotoksično remodelovanje uzrokovano doksorubicinom i povećava preživljavanje.

Ključne reči: doksorubicin, beta-adrenergički receptor, kinaza G protein-spregnutih receptora, arestin, paroksetin

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Medicinska farmakologija

UDK broj: _____

GENE EXPRESSION OF β -ADRENERGIC RECEPTORS AND THE KEY MOLECULES INVOLVED IN THEIR DOWNREGULATION IN DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOMYOPATHY

Abstract

Doxorubicin is an effective drug for the treatment of solid tumors and hematological malignancies, in both children and adults. The most prominent side effect of doxorubicin is cardiotoxicity, which can lead to cardiomyopathy and irreversible and highly mortal cardiac decompensation (with mortality rate ~50%). The mechanisms of doxorubicin-induced cardiomyopathy are not fully elucidated and thus no effective prevention and treatment are available. Having in mind the acknowledged role of maladaptive beta-adrenergic receptor (β -AR) downregulation in cardiac decompensation, the aim of this study was to quantify the gene expression and synthesis of β_1 -AR and β_2 -AR in doxorubicin-induced cardiomyopathy, as well as of the key molecules involved in their downregulation: G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and beta arrestins (ARRBs). We also tackled the possibility that by inhibiting GRK2, a key kinase in β -AR downregulation, we can prevent toxic cardiac remodelling by doxorubicin and increase survival. The experiments were performed in male *Wistar* rats, randomly assigned to control group – control (0.5 mL/kg 0.9% NaCl, *i.v.*, n = 7), doxorubicin-treated group – DOX (doxorubicin, 5 mg/kg *i.v.*, n = 23) and doxorubicin plus paroxetine cotreated group – DOX+P (doxorubicin, 5 mg/kg *i.v.* + paroxetine 10 mg/kg/day *p.o.* 5 days prior to doxorubicin administration, n = 11). In the 70-days long follow-up period appearance of general signs of toxicity, changes in body weight and survival were monitored, as well as cardiac morphology and function by echocardiography. Postmortem, cardiac histology, and β_1 -AR, β_2 -AR, GRK2, GRK3, ARRB1, and ARRB2 gene expression by RT-PCR, were performed. DOX rats exhibited poor general condition, adynamia, progressive weight loss, and reduced survival. Echocardiography revealed two clinical presentations of cardiac decompensation: hypertrophic (DOX-HCM) with decreased left ventricular volume at the end of diastole (EDV_{LV}) and preserved left ventricular ejection fraction (EF_{LV}), and dilated (DOX-DCM) with increased EDV_{LV}, and reduced EF_{LV}. In all rats treated with doxorubicin, β -ARs and ARRBs gene expression was unchanged. Only DOX-HCM rats displayed increased expression and synthesis of GRK2 and GRK3. A positive correlation between GRK2 and relative left ventricular wall thickness in these rats suggests a possible role of GRK2 in the development of cardiac hypertrophy. DOX+P rats showed good general condition, weight gain, and increased survival. At echocardiography, cardiac morphology and contractility were preserved. In these rats, decreased gene expression and synthesis of GRK2 and GRK3, as well as increased expression and synthesis of β_1 -AR and β_2 -AR were found uncovering the underpinning mechanisms for preserved inotropic cardiac reserve. This study shows, for the first time that paroxetine-induced GRK2 downregulation effectively prevents the cardiotoxic remodelling by doxorubicin and increases survival.

Key words: doxorubicin, beta-adrenergic receptor, G protein-coupled receptor kinase, arrestin, paroxetine

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Medical Pharmacology

UDK number: _____

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Doksorubicin	1
1.1.1. Hemijska struktura i osobine	1
1.1.2. Farmakokinetika	2
1.1.3. Mehanizam antitumorskog dejstva	2
1.1.4. Neželjena dejstva i toksičnost	4
1.2. Kardiomiopatija izazvana doksorubicinom	5
1.2.1. Epidemiologija i klasifikacija	5
1.2.2. Molekularni mehanizmi nastanka hronične kardiomiopatije	6
1.2.2.1. Oksidativni stres	7
1.2.2.2. Signalni put AMPK	8
1.2.2.3. Endotelin I	9
1.2.2.4. Indukcija apoptoze	9
1.2.2.5. Indukcija autofagije	9
1.2.2.6. Remodelovanje vanćelijskog matriksa i nastanak fibroze	9
1.2.2.7. Uticaj epigenetskih faktora	9
1.2.3. Dijagnoza	10
1.2.4. Prevencija i terapija	11
1.2.5. Životinjski modeli	12
1.3. Beta-adrenergički receptori i njihovi signalni putevi u zdravom srcu i srčanoj dekompenzaciji	13
1.4. Kinaze G protein-spregnutih receptora i aretini	15
1.4.1. Uloga GRK i ARRB u desenzitizaciji GPCR	16
1.4.2. Uloga GRK i ARRB u prometu GPCR	17
1.4.3. Uloga GRK i ARRB u signalnim putevima GPCR	18
1.5. Inhibicija GRK2 kao nova terapijska mogućnost u lečenju srčane insuficijencije	19
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	21
3. MATERIJAL I METODE	22
3.1. Eksperimentalne životinje	22
3.2. Eksperimentalni protokol	22
3.3. Doksorubicinski model kardiotoksičnosti	23
3.4. Određivanje selektivne doze paroksetina	24

3.5. Procena preživljavanja i opšte toksičnosti	25
3.6. Ehokardiografska procena srčane morfologije i funkcije	25
3.7. Patohistološka analiza	26
3.7.1. Priprema tkiva i histohemijska bojenja	26
3.7.2. Histomorfometrija	26
3.7.3. Imunohistohemijska bojenja	27
3.8. Genska ekspresija β_1 -AR, β_2 -AR, GRK2, GRK3, ARRB1 i ARRB2 u srčanom tkivu	28
3.8.1. Izolacija ukupne RNK	28
3.8.2. Sinteza komplementarne DNK (cDNK)	28
3.8.3. Reakcija lančane polimerizacije u realnom vremenu (RT-qPCR)	28
3.9. Korišćene supstance	30
3.10. Statistička analiza	30
4. REZULTATI	31
4.1. Određivanje selektivne doze paroksetina	31
4.2. Procena preživljavanja i opšte toksičnosti	32
4.3. Ehokardiografska procena srčane morfologije i funkcije	33
4.4. Patohistološka analiza	35
4.4.1. Histohemijska bojenja	35
4.4.2. Histomorfometrija	38
4.4.3. Imunohistohemijska bojenja	39
4.5. Genska ekspresija β_1 -AR, β_2 -AR, GRK2, GRK3, ARRB1 i ARRB2 u srčanom tkivu	40
5. DISKUSIJA	43
6. ZAKLJUČCI	49
7. LITERATURA	50

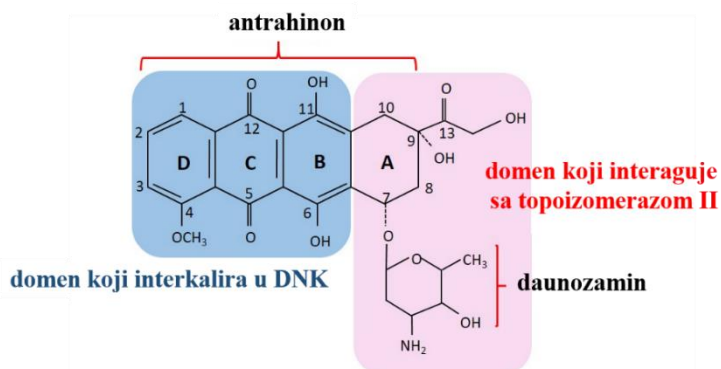
1. UVOD

1.1. Doksorubicin

Ishod bolesti i kvalitet života obolelih od tumora znatno su poboljšani pravovremenim i preciznim postavljanjem dijagnoze, kao i razvojem novih terapijskih opcija (McGowan i saradnici, 2017). Među njima, u modernoj eri lečenja tumora, glavnu ulogu ima terapija antraciklinskim antibioticima. Sinteza antraciklina iz bakterijskog soja *Streptomyces peucetius subsp.caesius* šezdesetih godina prošlog veka: doksorubicina i njegovog prekursora, daunorubicina, smatra se prekretnicom u lečenju solidnih i hematoloških maligniteta u populacijama i odraslih i dece (Arcamone i saradnici, 1969). Svetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation – WHO*) uvrstila je doksorubicin na listu esencijalnih lekova (*WHO model list of essential medicines*, 22. izdanje, septembar 2021), a interesovanje naučnika za njegova terapijska i toksična dejstva ne jenjava ni 50 godina od otkrića i prvog registrovanog preparata *Adriamycin*[®] (Takemura i Fujiwara, 2007). Doksorubicin se danas primenjuje za lečenje karcinoma dojke, karcinoma jajnika, karcinoma pluća, karcinoma mokraćne bešike; u terapiji akutne limfoblastne i akutne mijeloidne leukemije, Kapošijevog sarkoma i različitih solidnih tumora. U kombinaciji sa drugim antitumorskim lekovima, deo je terapijskih protokola za karcinom kostiju, sarkome mekih tkiva, karcinom materice i cerviksa, karcinom pankreasa, multipli mijelom, Vilmsov tumor (engl. *Wilms tumour*) i Juingov sarkom (engl. *Ewing sarcoma*) (Alghorabi i saradnici, 2019).

1.1.1. Hemijska struktura i osobine

Doksorubicin ima planarnu aromatičnu strukturu i sastoji se iz tetraciklinskog aglikonskog jezgra, za koje je glikozidnom vezom na sedmom ugljenikovom atomu (C7) prstena A vezan šećer daunozamin (**Slika 1**). Na prstenovima C i B tetraciklinskog jezgra nalaze se hinonske, odnosno hidrohinske grupe; prsten D na C4 atomu ima metoksi supstituent, dok se u C9 položaju prstena A nalazi kratki bočni lanac sa karbonilnom grupom (Minotti, 2004) (**Slika 1**). Razlika između doksorubicina i daunorubicina je samo u strukturi kratkog bočnog lanca; doksorubicin ima primarni alkohol, dok daunorubicin ima metil grupu te je nešto lipofilniji (Gallois i saradnici, 1998). Budući da je antrahinonski deo prstena nerastvorljiv u vodi i lipofilan, aminoglikozid je važan za rastvorljivost u vodi i amfoterna svojstva antraciklina, zahvaljujući kojima lako prodiru u ćelije (Corremans i saradnici, 2019). Doksorubicin-hidrohlorid se dobro rastvara u vodi. Rastvor je intenzivno crvene boje, stabilan na sobnoj temperaturi najmanje 24 sata (Benvenuto i saradnici, 1987).



Slika 1. Hemijska struktura doksorubicina. Preuzeto i modifikovano iz Corremans i saradnici, 2019.

1.1.2. Farmakokinetika

Nakon oralne primene, zbog izraženog metabolizma prvog prolaza u jetri (Gustafson i saradnici, 2005) i vezivanja za P-glikoprotein efluks pumpu u digestivnom traktu (Lee i Lee, 1999), samo 5% leka dospeva do krvotoka. Ovako mala bioraspoloživost onemogućava oralnu primenu doksorubicina, pa se najčešće primenjuje intravenskim putem, a moguća je i intraarterialna, intraperitonealna, intrapleuralna i intravezikalna primena (Speth i saradnici, 1988). Subkutana, intramuskularna i intratekalna aplikacija leka, zbog izražene ekstravazacije, dovodi do ozbiljnih nekroza tkiva (Maral i Jouann, 1981)

Nakon intravenske bolusne injekcije, doksorubicin postiže veliku koncentraciju u plazmi, koja opada zbog brze i ekstenzivne distribucije leka u tkiva (Speth i saradnici, 1988). U plazmi je 50-85% doksorubicina i njegovog glavnog metabolita doksorubicinola vezano za albumine, nezavisno od njihove koncentracije do 1,1 µg/mL (Barpe i saradnici, 2010; Speth i saradnici, 1988). Doksorubicin ne prolazi krvno-moždanu barijeru pa nije efikasan u terapiji tumora centralnog nervnog sistema (Bigotte i saradnici, 1982). Prividni volumen distribucije doksorubicina iznosi 20 – 30 l/kg (Greene i saradnici, 1983).

Doksorubicin se metaboliše u jetri u hidrofilni 13-hidroksil metabolit, doksorubicinol i slabo hidrosolubilne aglikone, doksorubicinon i 7-deoksidoksorubicinon (Takanashi i Bachur, 1976). Pri razgradnji doksorubicina nastaju slobodni radikali, što doprinosi njegovom kardiotsičnom dejstvu. Doksorubicinol je glavni metabolit, koji nastaje reakcijom redukcije tokom prve faze biotransformacije, a zatim se, tokom druge faze biotransformacije, konvertuje u glukuronid ili sulfat, kako bi se lakše izlučio iz organizma (Sturgill i saradnici, 2000).

Izlučivanje doksorubicina i njegovih metabolita primarno se odvija putem žuči, pri čemu se više od 50% leka eliminiše nakon prvog prolaska kroz jetru. Oko 40% date doze pojavljuje se u žuči tokom 5 dana od primene leka, dok se samo 5 – 12% leka i njegovih metabolita pojavljuje u urinu za isti vremenski period (Greene i saradnici, 1983). Vremenska kriva koncentracije doksorubicina u plazmi opisuje se pomoću biekspencijalnog modela, koji karakteriše kratko poluvremene distribucije leka 5 – 10 minuta i poluvreme eliminacije od približno 30 sati (Wisher, 2012; Speth i saradnici, 1988).

Farmakokinetika dokosrubicina kod pacova, slična je farmakokinetici kod ljudi. Nakon intravenske primene, brzo se postižu maksimalne koncentracije leka u plazmi. Inicijalno poluvreme distribucije leka iznosi 5 minuta. Lek se brzo i ekstenzivno distribuira u tkiva. Terminalno poluvreme eliminacije je približno 18 sati, dok je klirens leka približno 0,9 l/h (Choi i saradnici, 2011; Rahman i saradnici, 1986). Kod pacova je frakcija leka izlučena urinom nešto veća i opada sa starenjem pacova (Alrushaid i saradnici, 2017; Colombo i saradnici, 1989).

1.1.3. Mehanizam antitumorskog dejstva

Uprkos širokoj kliničkoj upotrebi, tačan mehanizam kojim doksorubicin dovodi do citotoksičnog oštećenja i smrti tumorskih ćelija nije potpuno razjašnjen (Minotti i saradnici, 2004). Predloženo je nekoliko glavnih molekularnih mehanizama antitumorskog dejstva doksorubicina: (1) inhibicija enzima topoizomeraze II i sledstveno ometanje replikacije dezoksiribunukleinske kiseline (DNK) (**Slika 2A**); (2) stvaranje slobodnih radikala, što dodatno oštećuje DNK i dovodi do lipidne peroksidacije (**Slika 2B**); (3) interkalacija između baznih parova u molekul DNK, što dovodi do njegovog oštećenja i inhibicije replikacije i transkripcije i (4) stvaranje ceramida i aktivacija transkripcionog faktora CREB3L1 (engl. *cAMP response element-binding protein 3-like1*) (Gewirtz, 1999; Denard i saradnici, 2012). Ovim mehanizmima dolazi do smanjenja deobe tumorskih ćelija i programirane ćelijske smrti (apoptoze). Prilikom primene uobičajenih terapijskih doza, inhibicija DNK topoizomeraze II predstavlja osnov antitumorskog dejstva doksorubicina, dok se pri primeni

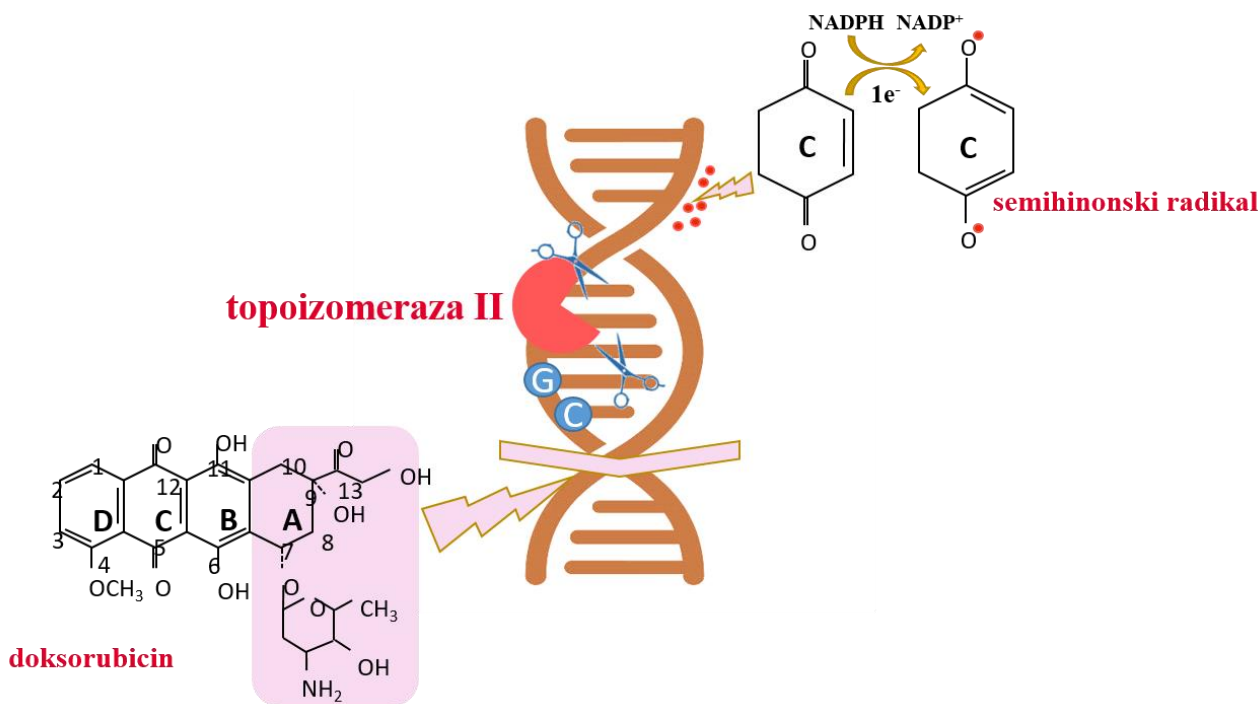
doza većih od 40 – 60 mg/m², uključuju i ostali mehanizmi, naročito inhibicija replikacije i transkripcije DNK (Gewirtz, 1999).

Topoizomeraza II je enzim važan za regulaciju topologije molekula DNK tokom procesa replikacije i transkripcije i povećane je aktivnosti kod ćelija koje se intenzivno dele, kao što su tumorske ćelije. Ona se vezuje za supernavoje DNK i koristi energiju adenozin trifosfata (engl. *adenosine triphosphate* – ATP) da preseče oba lanca DNK heliksa i oslobodi ga torzionog stresa (Pommier i saradnici, 2010). Doksorubicin se kovalentnim vezama vezuje za topoizomerazu II i onemogućava ponovno zatvaranje lanaca DNK, čime se zaustavlja proces replikacije (Yang i saradnici, 2014). Antitumorsko dejstvo doksorubicina potiče od inhibicije izoenzima topoizomeraze II α (Marinello i saradnici, 2018), koja je eksprimirana u svim ćelijama koje se intenzivno dele. S druge strane, kardiotoksični efekti doksorubicina vezuju se za inhibiciju topoizomeraze II β , koja je jedini prisutni izoenzim kod terminalno diferenciranih kardiomiocita (Yi i saradnici, 2007).

Hinonska struktura doksorubicina može se redukovati u semihinonski slobodni radikal, posredstvom različitih NAD(P)H-zavisnih reduktaza (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent oxidoreductase* – NOX) (Minotti i saradnici, 2004). Semihinonski radikali reaguju sa kiseonikom i grade superoksid anjon radikal O₂⁻, koji se dalje dejstvom superoksid dismutaze pretvara u vodonik-peroksid (Yang i saradnici, 2014; Berlin i Haseltine, 1981). Takođe, doksorubicin vezuje jone gvožđa, a kompleks doksorubicin-gvožđe katalizuje konverziju vodonik peroksida u veoma reaktivne hidrosil radikale OH^{*} (Myers, 1998). Hidrosil radikali izazivaju lipidnu peroksidaciju i dovode do oštećenja ćelijske membrane. Oksidativni stres remeti fiziološku strukturu i funkciju ćelije i dovodi do programirane smrti tumorskih ćelija (Xu i saradnici, 2005).

Semihinonski deo molekula doksorubicina se ugrađuje u regione jedarne i mitohondrijalne DNK bogate guanin-citozin baznim parovima (Liao i saradnici, 2005) i remeti strukturu hromatina, dovodi do torzije DNK i destabilizacije nukleozoma (Pang i saradnici, 2013). Sve ovo povećava izloženost molekula DNK različitim agensima i dovodi do oštećenja i ćelijske smrti, nezavisno od inhibicije topoizomeraze II (Yang i saradnici, 2014; Swift i saradnici, 2006).

Jedan od novijih predloženih mehanizama antitumorskog dejstva doksorubicina je povećanje sinteze ceramida (Kawase i saradnici, 2002). Ceramidi su lipidni molekuli izgrađeni od sfingozina i masnih kiselina, sa važnom ulogom u procesima zaustavljanja rasta, starenja i ćelijske smrti (Senchenkov, 2001). Pokazano je da egzogeno dat ceramid povećava osetljivost tumorskih ćelija na oštećenja izazvana doksorubicinom (Ji i saradnici, 2010). Ćelije tumora koje pojačano eksprimiraju glukozilceramid-sintazu, enzim koji konvertuje ceramid u glukozilceramid, rezistentnije su na terapiju doksorubicinom (Liu i saradnici, 2001). Ceramidi aktiviraju proteolitičko odvajanje transkripcionog faktora CREB3L1 od ćelijske membrane, omogućavajući mu da uđe u jedro i aktivira transkripciju gena inhibitora ćelijskog ciklusa, npr. p21. Nivo CREB3L1 danas se smatra markerom osetljivosti tumorskih ćelija na terapiju doksorubicinom (Denard i saradnici, 2012).



Slika 2. Mehanizam citotoksičnog dejstva doksorubicina: inhibicija topoizomeraze II i zaustavljanje procesa replikacije DNK (A), nastanak semihinonskog radikala posredstvom NADPH-zavisnih reduktaza i oštećenje DNK slobodnim radikalima (B). NADPH/NADP⁺: nikotinamid-adenin-dinukleotid- fosfat; G: guanin; C: citozin. *Preuzeto i modifikovano iz Corremans i saradnici, 2019.*

1.1.4. Neželjena dejstva i toksičnost

Kao najozbiljnije neželjeno dejstvo doksorubicina, koje umnogome ograničava njegovu kliničku primenu, navodi se kardiomiopatija, koja može dovesti do kongestivne srčane insuficijencije (Chatterjee i saradnici, 2010). Pored dejstva na diferencirane kardiomiocite, doksorubicin, kao i većina antitumorskih lekova, deluje na ćelije koje se intenzivno dele: visokoproliferativne ćelije tumora, ali i ćelije koštane srži, sluznice gastrointestinalnog trakta, kože i reproduktivnog sistema (Wang i saradnici, 2006). Mijelosupresija je glavno neželjeno dejstvo koje ograničava primenu većih doza antitumorskih lekova (Daniel i Crawford, 2006). Pored toga, ona predstavlja i loš prognostički faktor, jer značajno umanjuje imunski odgovor organizma na tumor (Richardson i Johnson, 1997).

Gastrointestinalni neželjeni efekti uključuju mučninu i povraćanje kod 20-85% pacijenata. Pojava stomatitisa se javlja kod oko 80% pacijenata i dozno je zavisna. Opisane su ulceracije jednjaka i debelog creva, a približno 15% pacijenata ima anoreksiju i dijareju. Upala sluznice uzrokovana dokosrubicinom često se komplikuje krvarenjem ili lokalnom infekcijom, a teški slučajevi ulceracija debelog creva mogu biti fatalni (Boussios i saradnici, 2012).

Eksperimentalna istraživanja na životinjama pokazala su da doksorubicin ima ozbiljne neželjene efekte na reproduktivno zdravlje kod oba pola (Mohan i saradnici, 2021). Kod mužjaka pacova, tretman doksorubicinom u dozi 1 – 2mg/kg tokom 9 nedelja, smanjio je masu testisa, a histološkim pregledom zapažena je atrofija, fibroza, smanjen broj spermatoocita i narušena spermatoogeneza (Yang i saradnici, 2017). Terapija doksorubicinom utiče i na smanjenu pokretljivost i pojavu defekata glave i repa spermatoocida (Mohan i saradnici, 2021; Gungor-Ordueri i saradnici, 2019). Pored navedenog, doksorubicin dovodi do hromozomskih aberacija u ćelijama testisa (Au i Hsu, 1980), smanjuje nivo testosterona (Takahashi i saradnici, 2011) i dovodi do nishodne regulacije

enzima uključenih u sintezu polnih hormona (Prahalthan i saradnici, 2006). Doksorubicin izaziva reproduktivnu toksičnost kod žena, okarakterisanu kao sindrom prevremenog otkazivanja jajnika (engl. *premature ovarian failure* – POF) (Thomson i saradnici, 2010).

Smatra se da su oksidativni stres i lipidna peroksidacija, u osnovi oštećenja bubrega i jetre izazvanih doksorubicinom. Kod eksperimentalnih životinja registruju se povećane vrednosti kreatinina, BUN-a (engl. *blood urea nitrogen*) i enzima jetre, kao i histološki izmenjeni bubrezi i jetra (Lahoti i saradnici, 2012; Damodar i saradnici, 2014). Terapija doksorubicinom povećava rizik od razvoja akutne/subakutne nekroze jetre, hepatitisa i hepatične kome (Grigorian i O'Brien, 2014).

Važno je dodati da, pored sistemske toksičnosti doksorubicina i širokog spektra pomenutih neželjenih dejstava, dodatni terapijski izazov predstavlja rezistencija tumorskih ćelija na doksorubicin. Mehanizmi rezistencije uključuju povećanu ekspresiju efluks pumpi, promenu ciljnog mesta delovanja leka i modulaciju signalnih puteva programirane ćelijske smrti. Otpornost tumorskih ćelija na doksorubicin, često je razlog neuspelog lečenja i pojave recidiva tumora (Cox i Weinman, 2016).

1.2. Kardiomiopatija izazvana doksorubicinom

Nacionalni institut za rak (engl. *National Cancer Institute*) definisao je kardiotoksičnost kao toksičnost koja pogađa srce (Corremans i saradnici, 2019). Kroz istoriju, kardiotoksičnost je definisana kao smanjenje ejsione frakcije leve komore srca (engl. *left ventricular ejection fraction* – EF_{LV}), ali se brzo pokazalo da ova definicija nije primenljiva na sve tipove kardiotoksičnosti (Plana i saradnici, 2014). Nažalost, ni danas nemamo jedinstvene dijagnostičke kriterijume za kardiotoksičnost izazvanu lekovima kod različitih tipova tumora (Chung i Youn, 2016).

1.2.1. Epidemiologija i klasifikacija

Doksorubicin može da izazove akutnu kardiotoksičnost, koja nastaje tokom primene leka ili 2 – 3 dana po prestanku primene leka (Chatterjee i saradnici, 2010). Javlja se u oko 11% pacijenata na terapiji doksorubicinom i manifestuje kao bol u grudima zbog mioperikarditisa i poremećaj srčanog ritma, od sinusne tahikardije do paroksizmalne supraventrikularne tahikardije i ventrikularnih ekstrasistola (Takemura i Fujiwara, 2007). Elektrokardiogram pokazuje nespecifične ST-T promene, smanjenu amplitudu QRS kompleksa i devijaciju električne ose srca ulevo. Pretpostavlja se da je u osnovi nastanka akutne kardiotoksičnosti srčani edem, koji je reverzibilan (Chatterjee i saradnici, 2010).

Drugi tip doksorubicinske kardiotoksičnosti predstavlja hronična kardiotoksičnost, koja se najčešće javlja tokom mesec dana od prestanka primene leka, ali je njena pojava moguća i nakon 6 – 10 godina (Chatterjee i saradnici, 2010). Ona je prototip ireverzibilnog (tip 1) oblika kardiotoksičnosti, koji je opisan još šezdesetih godina prošlog veka (Tan i saradnici, 1967). Tip 1 toksičnosti je dozna zavistan, a histopatološki ga karakteriše vakuolarna degeneracija kardiomiocita i gubitak miofibrila sa sledstvenom fibrozom (Mladěnka i saradnici, 2018). Incidenca javljanja primarno zavisi od doze: oko 4% za doze doksorubicina 500 – 550 mg/m², 18% za doze 551 – 600 mg/m² i preko 30% za doze preko 600 mg/m² (Corremans i saradnici, 2019).

Neke retrospektivne studije pokazuju da čak više od polovine tretiranih bolesnika razvija lakši oblik disfunkcije leve komore srca tokom šest godina nakon prekida terapije doksorubicinom (Swain i saradnici, 2003). Osobe starije od 65 godina, mlađe od 4 godine i ženske osobe sklonije su razvoju kardiomiopatije. Kardiovaskularni i drugi komorbiditeti, nagli način primene velikih doza i istovremena primena medijastinalne radioterapije ili drugih kardiotoksičnih lekova, povećavaju

incidencu i težinu kliničke slike kardiomiopatije (Volkova i Russel, 2011). Treba imati u vidu da kardiotoksičnost može nastati i bez faktora rizika, kao posledica neočekivane, najčešće akutne, reakcije na lek (Lipshultz i saradnici, 2014).

Činjenica da često nema pravovremene dijagnoze i adekvatne terapije, čini doksorubicinsku kardiomiopatiju letalnom bolešću. Kada se razvije kongestivna srčana insuficijencija, mortalitet je približno 50% (Chatterjee i saradnici, 2010).

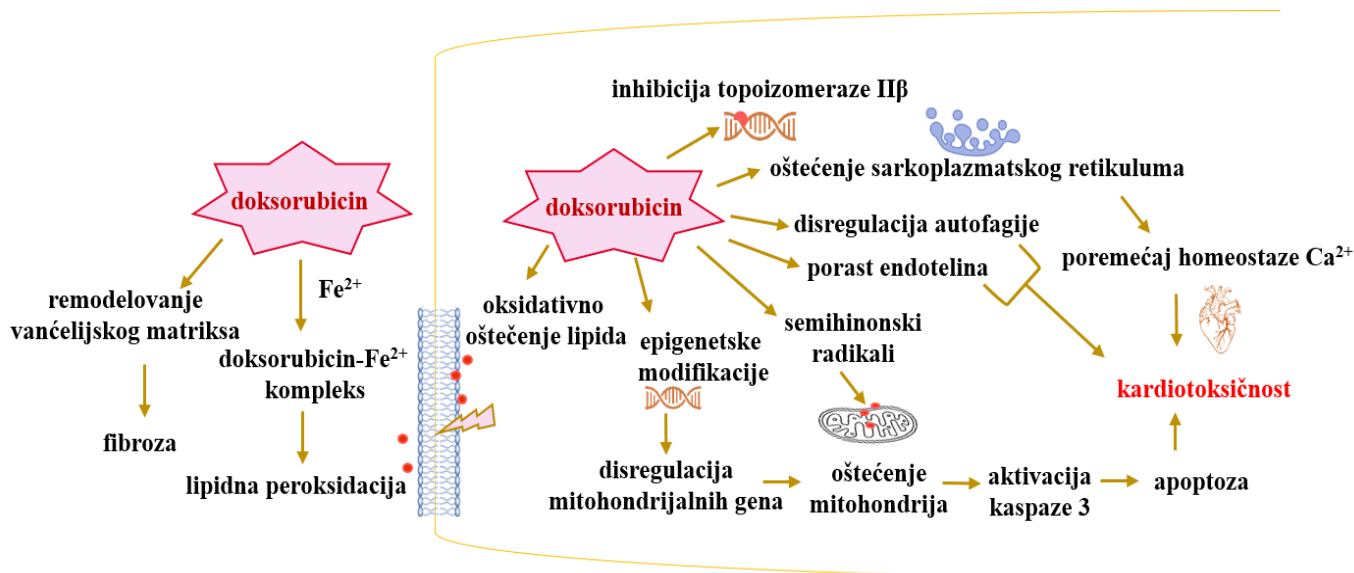
1.2.2. Molekularni mehanizmi nastanka hronične kardiomiopatije

Predloženo je nekoliko molekularnih mehanizama za razvoj kardiomiopatije izazvane doksorubicinom, a tzv. klasičnim mehanizmom smatra se oksidativni stres u srčanom tkivu: povećano stvaranje slobodnih radikala i lipidna peroksidacija (Takemura i saradnici, 2007). U osnovi kardiotoksičnog delovanja su slični mehanizmi kojima doksorubicin ispoljava željeno antitumorsko dejstvo (**Slika 3**): geneza slobodnih radikala, stvaranje kompleksa sa gvožđem, oštećenje ćelijske membrane, poremećaj transporta unutarćelijskih jona i sledstvena aktivacija signalnih puteva koji dovode do ćelijske smrti (Corremans i saradnici, 2019).

Za razliku od tumorskih ćelija, adultne srčane ćelije se uglavnom ne dele, iako je dovedena u pitanje njihova terminalna diferencijacija i pokazano da zadržavaju izvestan kapacitet za deobu (Leri i saradnici, 2015). Postavlja se pitanje, zbog čega su onda one sklonije oksidativnom oštećenju i toksičnom delovanju doksorubicina. Jedno od objašnjenja je ekspresija izoenzima DNK topoizomeraze II β , ciljnog mesta delovanja doksorubicina, u srčanim ćelijama (Yi i saradnici, 2007). Takođe, mitohondrije čine 50% mase kardiomiocita i predstavljaju glavne organele redoks metabolizma i ćelijske energije, kao i važne izvore slobodnih radikala (Simunek i saradnici, 2009). S druge strane, aktivnost antioksidativnih enzima mnogo je manja u srčanom tkivu. Smatra se da je aktivnost katalaze, koja učestvuje u prvoj liniji antioksidativne odbrane (Noichri i saradnici, 2013), u srcu čak 150 puta manja nego u jetri (Doroshov i Davies, 1986). Pozitivno naelektrisani doksorubicin ima veliki afinitet za negativno naelektrisani kardiolipin, fosfolipid unutrašnje ćelijske membrane mitohondrija, pa se posebno akumulira u njima (Wallace i saradnici, 2020). Kompleks doksorubicin-kardiolipin onemogućava vezivanje citohroma C i interakcije važnih mitohondrijalnih proteina (Goormaghtigh i saradnici, 1986), a oksidovani kardiolipin može doprineti aktiviranju signalnog puta ćelijske smrti inicirane mitohondrijalnim oštećenjem (Kagan i saradnici, 2009).

Rawat i saradnici su 2021. godine dali pregled do sada predloženih molekularnih mehanizama doksorubicinom indukovane kardiotoksičnosti i srčane insuficijencije (Rawat i saradnici, 2021):

- oksidativni stres: sinteza slobodnih radikala zavisna od azot-oksida sintaze (engl. *nitric oxide synthase* – NOS), sinteza slobodnih radikala u mitohondrijama, sinteza slobodnih radikala zavisna od NAD(P)H, interakcija doksorubicina sa jonima gvožđa, uloga kreatinkinaze, disregulacija unutarćelijskog prometa Ca²⁺
- signalni put AMP-aktivirane protein kinaze (engl. *AMP-activated protein kinase* – AMPK)
- indukcija autofagije
- indukcija apoptoze
- remodelovanje vanćelijskog matriksa i nastanak fibroze
- uticaj epigenetskih faktora: metilacija DNK, modifikacija histona, nekodirajuće ribonukleinske kiseline (RNK)



Slika 3. Shematski prikaz mehanizama doksorubicinske kardiotoksičnosti izvan i unutar ćelije. Preuzeto i modificirano iz Rawat i saradnici, 2021.

1.2.2.1. Oksidativni stres

Doksorubicin se vezuje za endotelnu NOS (eNOS) i indukuje stvaranje semihinonskog slobodnog radikala, koji redukuje slobodni kiseonik u superoksidni radikal $O_2^{\cdot-}$. Vezivanje doksorubicina za eNOS dovodi do disbalansa između nivoa slobodnih radikala superoksida i nivoa azotnog oksida, u korist superoksidnog radikala, što uzrokuje toksična oštećenja srčanog tkiva (Griffith i saradnici, 1995). Povećana je i transkripcija inducibilne NOS (iNOS) i stvaranje nitrotirozina, posredstvom reaktivnih azotnih jedinjenja kao što su peroksininitrit ONOO⁻ i azot-dioksid (Mukhopadhyay i saradnici, 2009). Doksorubicin ne menja gensku i proteinsku ekspresiju neuronalne NOS (nNOS), pa se smatra da ova izoforma enzima nije značajna za nastanak doksorubicinske kardiotoksičnosti (Liu i saradnici, 2006).

Vezivanje doksorubicina za kardiolipin mitohondrija menja njegovu funkciju i dovodi do stvaranja superoksidnog radikala $O_2^{\cdot-}$ (Chen i saradnici, 2020). Pogođene su i druge strukturne komponente mitohondrija, mitohondrijalna DNK i proteini respiratornog lanca, što značajno remeti funkciju ovih organela (Wallace i saradnici, 2020). Smanjena je oksidacija dugolančanih masnih kiselina, a povećan metabolizam glukoze, što dovodi do poremećaja u kontrakciji i relaksaciji srčane mišićne ćelije (Ventura-Clapier i saradnici, 2004). Doksorubicin smanjuje ekspresiju GATA4 gena, važnog za preživljavanje kardiomiocita i srčanu funkciju, i na taj način indukuje apoptozu. Neki antioksidativni enzimi štite kardiomiocite od apoptoze oporavljanjem funkcije GATA4 gena (Suliman i saradnici, 2007).

U nastanku kardiomiopatije izazvane doksorubicinom ključnu ulogu igra NAD(P)H-zavisna reduktaza NOX2, koja učestvuje u stvaranju semihinonskih radikala, transferom jednog elektrona sa NADPH na hinonski deo molekula doksorubicina. Semihinon se vezuje za kiseonik i formira superoksidni anjon, od koga dalje nastaju drugi kiseonični slobodni radikali. Istraživanja na *nokaut* miševima za NOX2 pokazala su da su ovi miševi veoma otporni na kardiotoksičnost izazvanu doksorubicinom, zbog smanjene proizvodnje slobodnih radikala (Zhao i saradnici, 2010).

Interakcija doksorubicina sa jonima gvožđa oštećuje kako tumorske, tako i srčane mišićne ćelije. Verovatno najubedljiviji dokaz za to predstavljaju studije na eksperimentalnim životinjama i ljudima, koje pokazuju zaštitne efekte helatora gvožđa, dok povećana koncentracija gvožđa

pogoršava kardiotskične efekte doksorubicina (Gammella i Stuehr, 2014; Hershko i saradnici, 1993). Smatra se da formiranjem kompleksa doksorubicin-gvožđe, gvožđe pojačava toksičnost slobodnih radikala, transformišući superoksidni anjon i vodonik-peroksid u mnogo reaktivnije i toksičnije hidroksil radikale ili gvožđe-perokso komplekse, koji oštećuju DNK, proteine i lipide (Simůnek i saradnici, 2009). Činjenice da klinička primena antioksidanasa nije bila delotvorna u terapiji kardiotskičnosti (Minotti i saradnici, 2004) i da je doksorubicin izazivao apoptozu srćanih H9c2 miocita u odsustvu slobodnih radikala (Bernuzzi i saradnici, 2009), govore u prilog alternativnim mehanizmima oštećenja kardiomiocita. Naime, doksorubicin utiče na proteine uključene u metabolizam gvožđa i time narušava funkciju gvožđa u fundamentalnim ćelijskim procesima poput DNK sinteze, stvaranja energije i funkcionisanja Ca²⁺ kanala (Hentze i saradnici, 2004). Vezujući se za ključne regulatore unutarćelijskog prometa gvožđa (engl. *iron regulatory proteins* – IRP1 i IRP2) menja aktivnost feritina, proteina koji sekvstrira gvožđe, i transferina, receptora za preuzimanje gvožđa u ćeliju (Gammella i Stuehr, 2014). Iako je u *in vitro* eksperimentima, pokazano da redukcija hinonske strukture doksorubicina u semihinonski radikal, mobilise gvožđe iz depoa feritina, povećava njegovu unutarćelijsku koncentraciju i oksidativno oštećenje (Thomas i Aust, 1986), uloga feritina *in vivo* izgleda sasvim suprotno. Povećanje sinteze feritina moglo bi zapravo predstavljati odbrambeni mehanizam za ograničenje količine gvožđa dostupnog za katalizu reakcija stvaranja slobodnih radikala (Arosio i Levi, 2010). Doksorubicin, u prisustvu jona gvožđa, menja aktivnost srćanog izoenzima kreatin-kinaze i smanjuje nivo fosfokreatinina, srćane rezerve visokoenergetskih fosfata (Rawat i saradnici, 2021).

Doksorubicin povećava unutarćelijski nivo kalcijuma, što dovodi do povećanja sinteze slobodnih radikala i apoptoze srćanih ćelija (Kalivendi i saradnici, 2005). Toksični metabolit doksorubicina, doksorubicinol, ima veliki afinitet za Na⁺-Ca²⁺ izmenjivač, koji ima važnu ulogu u regulaciji kontraktilnosti srćanog mišića preko Ca²⁺ pumpe na sarkoplazmatskom retikulumu i Ca²⁺ kanala L-tipa na membrani kardiomiocita (Rawat i saradnici, 2021). Slobodni radikali nastali pod uticajem doksorubicina menjaju ekspresiju SERCA2 gena (engl. *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*), čija je glavna uloga transport Ca²⁺ iz citosola u sarkoplazmatski retikulum i RYR2 gena (engl. *ryanodine receptor 2*), koji kontroliše izlazak Ca²⁺ iz sarkoplazmatskog retikuluma. Modifikovani RYR2 kanali ostaju trajno otvoreni, što dovodi do porasta unutarćelijske koncentracije kalcijuma i nepravilne relaksacije srćanih mišićnih ćelija (Saeki i saradnici, 2002). Takođe, unutarćelijski kalcijum aktivira kalpaine, Ca²⁺-zavisne proteaze, koje cepaju proapoptotsku kaspazu 12 i uvode ćeliju u programiranu ćelijsku smrt (Jang i saradnici, 2004). Kalpaini razrgrađuju titin, glavni protein srćanih sarkomera, i time im narušavaju strukturnu stabilnost (Rawat i saradnici, 2021). Povećana unutarćelijska koncentracija Ca²⁺ aktivira kinazu CaMKII (engl. *calmodulin-activated protein kinase II*) i fosfolamban, što dovodi do apoptoze kardiomiocita aktivacijom kaspaza 3 i 9, fragmentacije DNK i povećanog stvaranja slobodnih radikala (Tscheschner i saradnici, 2019).

1.2.2.2. Signalni put AMPK

Pokazano je da doksorubicin blokira AMPK signalni put i smanjuje enzimsku aktivnost acetil-koenzim A karboksilaze (engl. *acetyl-coA carboxylase* – ACC). Inhibicija ovog signalnog puta dovodi do aktivacije protein kinaze B (Akt) i mitogenima-aktiviranih kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase* – MAPK), što oštećuje DNK i dovodi do povećanog „energetskog stresa“ i hipertrofije srćanog tkiva (Rawat i saradnici, 2021).

1.2.2.3. Endotelin I

Doksorubicin povećava nivo endotelina I u srčanim mišićnim ćelijama i dovodi do hipertrofične kardiomiopatije preko signalnog puta receptora za epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor* – EGF). Antagonisti endotelinskih A i B receptora pokazuju kardioprotektivne efekte smanjenjem nivoa faktora tumorske nekroze- α (engl. *tumor necrosis factor* α – TNF- α), smanjenjem lidne peroksidacije i povećanjem ekspresije GATA4 (Bien i saradnici, 2007).

1.2.2.4. Indukcija apoptoze

Pod uticajem oksidativnog oštećenja uzrokovanog doksorubicinom, mogu se pokrenuti i spoljašnji i unutrašnji put strogo kontrolisane, tzv. programirane, ćelijske smrti – apoptoze (Rawat i saradnici, 2021). Spoljašnji put apoptoze aktivira se vezivanjem liganada za tzv. receptore smrti (engl. *death receptors* – DR) na ćelijskoj membrani, dok je okidač unutrašnjeg puta apoptoze oštećenje mitohondrija. Doksorubicin ushodno reguliše ekspresiju gena za receptore smrti, kao što su Fas, DR4, D5, TNFR1 (Zhao i Zhang, 2017). Aktiviranjem HSF-1 (engl. *heat shock factor 1*) i time HSP-25 (engl. *heat shock protein 25*), doksorubicin stabilizuje tumor-supresorski gen p53, odgovoran za sintezu različitih proapoptorskih faktora kao što su c-Myc, Fas, FasL, p53 (Vedam i saradnici, 2010). Povećan je i nivo cirkulišućeg HSP-70, što dovodi do inflamacije i fibroze u srčanom tkivu (Liu i saradnici, 2019). Oštećenje mitohondrija oksidativnim stresom i povećanom koncentracijom unutarćelijskog Ca^{2+} , dovodi do njihove dezintegracije i oslobađanja citohroma c, koji formira apoptozom sa Apaf-1 (engl. *adaptor protein apoptosis protease activator protein-1*) i kaspazom 9 i dalje aktivira „izvršilačke“ kaspaze, koje uvode ćeliju u proces apoptoze (Deniaud i saradnici, 2008).

1.2.2.5. Indukcija autofagije

Doksorubicin remeti proces autofagije, koji je od izuzetne važnosti za održavanje ćelijske homeostaze i preživljavanje ćelije u fiziološkim i patofiziološkim uslovima. Autofagija podrazumeva uklanjanje oštećenih i „starih“ organela i smatra se zaštitnim mehanizmom (Rawat i saradnici, 2021). Doksorubicin menja ekspresiju gena uključenih u ovaj proces, izaziva akumulaciju autofagozoma i izmenjen nastanak fagolizozoma. Ovako narušen proces autofagije dovodi do programirane smrti srčanih ćelija (Koleini i Kardami, 2017).

1.2.2.6. Remodelovanje vanćelijskog matriksa i nastanak fibroze

U tumorskim ćelijama, doksorubicin inhibira sintezu kolagenaza i metaloproteaza matriksa (engl. *matrix metalloprotease* – MMP), enzima koji razgrađuju vanćelijski matriks i učestvuju u širenju tumorskog tkiva. U srčanom tkivu, efekat doksorubicina na MMP-2 i MMP-9 potpuno je suprotan – dolazi do povećanog stvaranja kolagena i fibroze miokarda (Spallarossa i saradnici, 2006).

1.2.2.7. Uticaj epigenetskih faktora

Epigenetika proučava nasledne fenotipske promene, koje ne uključuju promene u sekvenci molekula DNK. U osnovi epigenetskih modifikacija je izmenjena funkcija gena različitim faktorima (starost, okruženje, bolest), koji ostavljaju biohemijski otisak na našem genomu (engl. *biochemical footprint*) (Dupont i saradnici, 2009). Tri najvažnije epigenetske modifikacije koje doprinose doksorubicinskoj kardiotoksičnosti uključuju metilaciju DNK, modifikacije histona i nekodirajuće RNK (Ryan i saradnici, 2011).

Metilacija citozin-guanin (CG) baznih parova je u osnovi „utišavanja“ 60 – 90% gena kod u ljudskom genomu (Nakao, 2001). Doksorubicin nishodno reguliše DNK metiltransferazu 1 (engl.

DNA methyltransferase 1), što dovodi do smanjenja procesa metilacije i disregulacije različitih mitohondrijalnih gena (Ferreira i saradnici, 2017).

Histoni su glavna proteinska komponenta hromatina, koja omogućava pakovanje ogromne dužine DNK u jedro, mnogostruko manjeg prečnika. Doksorubicin utiče na različite gene uključene u modifikacije histona npr. inhibira deacetilazu histona, što indukuje Rac1, NOX i p53 i dovodi do apoptoze i hipertrofije ćelije (Rawat i saradnici, 2021).

Nekodirajuće RNK predstavljaju funkcionalne RNK, koje se ne prevode u proteine. Pokazano je da su neke mikro nekodirajuće RNK ushodno regulisane u doksorubicinskoj kardiomiopatiji (npr. miR-23a, miR-34a, miR-140, miR-146a, miR-532, miR-15), dok su druge nishodno regulisane (miR-29b i miR-30) (Kumari i saradnici, 2020). Njihova funkcija je od značaja za preživljavanje kardiomiocita, električno sprovođenje srčanog impulsa i kontrakciju kardiomiocita. Na primer, pokazano je da ushodna regulacija miR-15 dovodi do apoptoze u H9c2 ćelijskoj liniji (Ruggeri i saradnici, 2018).

1.2.3. Dijagnoza

Primena doksorubicina u terapiji tumora obavezuje na praćenje srčane funkcije, naročito kod pacijenata sa faktorima rizika za razvoj doksorubicinske kardiotoksičnosti. Ovo je od izuzetnog značaja za rano otkrivanje subkliničkih formi kardiotoksičnosti, s obzirom da su terapijske mogućnosti ograničene, a pravovremenim prekidom primene doksorubicina moguće je sprečiti ireverzibilno oštećenje srčanog mišića (Jain i saradnici, 2017). U kliničkoj praksi to podrazumeva najčešće elektrokardiografiju, ehokardiografsku procenu funkcije leve komore srca i praćenje biomarkera oštećenja srčanog mišića, pre početka terapije i pre primene svake nove doze (Sawaya i saradnici, 2011).

Elektrokardiogram najčešće pokazuje nespecifične ST-T promene i smanjenu voltažu QRS kompleksa, dok rendgen radiografija grudnog koša često otkriva kardiomegaliju i znake venske kongestije u plućima (Chatterjee i saradnici, 2010).

Ehokardiografsko praćenje EF_{LV} jedan je od osnovnih pokazatelja procene srčane funkcije. Vrednost EF_{LV} manja od 55% ili svaki pad veći od 5% u odnosu na vrednost pre terapije, kriterijumi su za postavljanje dijagnoze oštećenja srca izazvanog lekovima (Zito i saradnici, 2016). Ehokardiografija, zbog neinvazivnosti, bezbednosti, dostupnosti i male cene predstavlja standard u onkološkoj praksi za otkrivanje i praćenje kardiotoksičnosti. Ipak, pokazano je da EF_{LV} često nije dovoljno osetljiv parametar za pravovremenu dijagnozu slabosti srca, jer se njen pad registruje tek kada je srčani mišić veoma oštećen (Cardinale i saradnici, 2015). Dopler ehokardiografija se koristi za raniju detekciju dijastolne i sistolne disfunkcije leve komore srca, a stres ehokardiografija za procenu srčane rezerve (Chatterjee i saradnici, 2010). Miokardijalni strejn (engl. *myocardial strain*) je savremena ehokardiografska metoda, koja merenjem deformiteta srčanog mišića u različitim osama, daje preciznije podatke o srčanoj funkciji, i pre smanjenja EF_{LV} (Smiseth i saradnici, 2016).

Radionuklidna ventrikulografija (engl. *Multigated Acquisition Scan – MUGS*) je senzitivnija u otkrivanju poremećaja funkcije leve komore u odnosu na 2D ehokardiografiju (Chatterjee i saradnici, 2010), ali podrazumeva primenu radionuklida. Primena antitela na miozin obeleženih indijumom (^{111}In) koristi se za otkrivanje srčanih oštećenja izazvanih doksorubicinom i u proceni težine kardiotoksičnosti (Hiroe i saradnici, 1992). Magnetnom rezonancom se otkrivaju najdiskretnije strukturne i funkcionalne promene miokarda, međutim one često nisu specifične za doksorubicinsku kardiotoksičnost (Chatterjee i saradnici, 2010). Zbog velike cene i ograničene dostupnosti, magnetna rezonanca ima malu rutinsku primenu i koristi se kada su potrebni precizniji podaci o srčanoj funkciji (Fallah-Rad i saradnici, 2011).

Biopsija endomiokarda pokazuje karakteristične patohistološke promene srčanog tkiva (gubitak miofibrila, vakuolizacija citoplazme srčanih mišićnih ćelija, distenzija sarkoplazmatskog retikuluma), i koristi se za ocenu težine oštećenja srčanog tkiva (Takemura i Fujiwara, 2007). Iako veoma senzitivna i specifična, biopsija predstavlja invazivnu dijagnostičku proceduru i zahteva značajno iskustvo i obuku, te se retko primenjuje.

Od serumskih biomarkera najčešće se mere kardijalni troponini T i I, atrijalni natriuretički peptid (engl. *atrial natriuretic peptide* – ANP), moždani natriuretički peptid (engl. *brain natriuretic peptide* – BNP) i fragment N-terminusa prekursora BNP-a (NT-proBNP) (Christenson i saradnici, 2015). Troponini povezuju aktin i miozin i regulišu kontraktilnost srčanih ćelija. Detektuju se prilikom oštećenja srčanog mišića i pokazano je da postoji korelacija između koncentracije troponina u krvi i pada EF_{LV} (Khan i saradnici, 2017). Natriuretske peptide sintetišu i izlučuju u cirkulaciju srčane ćelije, kada dođe do njihove distenzije usled povećanja intravaskularnog volumena. Neke studije pokazuju da je NT-proBNP osetljiviji pokazatelj kardiotsičnosti od troponina kod pacijenata koji primaju manje ili srednje doze antraciklina (Christenson i saradnici, 2015). Biomarkeri oksidativnog stresa (npr. NAD(P)H oksidaza), biomarkeri zapaljenja (npr. C-reaktivni protein) i ekspresija određenih tipova nekodirajućih RNK (miRNA) mogu da ukažu na rana oštećenja srčanog tkiva (Cardinale i saradnici, 2011; Rawat i saradnici, 2021).

1.2.4. Prevencija i terapija

S obzirom da su terapijske mogućnosti doksorubicinske kardiomiopatije ograničene i često neefikasne, u prvi plan se stavlja prevencija toksičnih oštećenja srca. Obavezno je uzimanje detaljne anamneze pacijenta, sa fokusom na faktore rizika, postojeće kardiovaskularne bolesti i raniju primenu antitumorskih lekova, kao i procena srčane funkcije pre započinjanja terapije. Treba proceniti sveukupnu korist od lečenja doksorubicinom, u odnosu na potencijalni rizik od kardiotsičnosti (Corremans i saradnici, 2019).

Ograničenje kumulativne doze doksorubicina na 450mg/m² predstavlja prvu liniju prevencije kardiotsičnosti (Takemura i Fujiwara, 2007). Pokazano je da davanje doksorubicina sporom infuzijom tokom 48 do 96 sati, umesto bolus injekcijom, smanjuje rizik od nastanka hronične srčane insuficijencije, a ne utiče na antitumorsko dejstvo leka (Legha i saradnici, 1982). Ipak, primena doksorubicina na ovaj način ima nedostatke zbog nelagodnosti pacijenta, produženog trajanja hospitalizacije i potenciranja drugih neželjenih dejstava poput mijelotoksičnosti i mukozitisa (Menna i Salvatorelli, 2017). Moguće je primeniti analoge doksorubicina, poput epirubicina, idarubicina, amrubicina i piksantrona, koji su nešto izmenjene hemijske strukture i manje kardiotsični. Idarubicin je, u poređenju sa doksorubicinom, povećane lipofilnosti i bolje stabilizuje kompleks DNK-topoizomeraza II. Može se primenjivati oralnim putem, ali je i dalje nejasno da li ima prednost u odnosu na doksorubicin po pitanju kardiotsičnosti (Corremans i saradnici, 2019). Primena lipozomalnih formulacija doksorubicina menja njegovu farmakinetiku – lek se pakuje u lipidne nanonosae i ciljano doprema do tumorskog tkiva, što značajno smanjuje njegovu sistemsku toksičnost (Salvatorelli i saradnici, 2015).

Deksrazoksan je jedini kardioprotektivni agens odobren od strane Američke uprave za hranu i lekove (engl. *Food and drug administration* – FDA) za doksorubicinsku kardiotsičnost (Corremans i saradnici, 2019). On je derivat etilendiamintetrasirćetne kiseline (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid* – EDTA) i helira gvožđe, čime sprečava stvaranje izuzetno reaktivnog hidroksil radikala. Međutim, helacija jona gvožđa i smanjenje oksidativnog stresa nisu glavni mehanizmi u osnovi kardioprotekcije deksrazoksana. On se velikim afinitetom vezuje za srčani izoenzim topoizomerazu II β i na taj način sprečava vezivanje doksorubicina i inhibiciju replikacije DNK u srčanim ćelijama (Menna i Salvatorelli, 2017). Primena deksrazoksana odlaže pojavu eksponencijalnog rasta kardiotsičnosti kod dece na doze doksorubicina veće od 400 mg/m², dok se

bez deksrazoksana eksponencijalni rast kardiotoksičnosti javlja već sa dozama doksorubicina od 200 mg/m² (Liesse i saradnici, 2018). Zbog ozbiljnih neželjenih dejstava: povećane incidence sekundarnih tumora, mijelosupresije i infekcije, primenjuje se za kumulativne doze doksorubicina veće od 300 mg/m² (Jain i saradnici, 2017).



Slika 4. Mehanizam dejstva deksrazoksana. Deksrazoksan se velikim afinitetom vezuje za ADP-vezujuće mesto na topoizomerazi II β , inhibira hidrolizu ATP-a i sprečava vezivanje doksorubicina. ADP: adenzin difosfat. *Preuzeto i modifikovano iz Corremans i saradnici, 2019.*

Ispituje se se primena različitih supstanci sa potencijalnim kardioprotektivnim dejstvom u prevenciji doksorubicinske kardiotoksičnosti poput metformina, koji inhibira AMPK signalni put, statina, fosfodiesteraznih inhibitora, resveratrola, α_1 -adrenergičkih antagonista, vitamina E, probukola, alicina, eritorpoetina, kurkumina i mnogih drugih (Rawat i saradnici, 2021).

Ne postoji specifična terapija za doksorubicinsku kardiomiopatiju. Efikasnost su pokazali vazodilatatorni antagonisti beta-adrenergičkih receptora (karvedilol sa antioksidantnim dejstvom i nebivolol, donor NO), inhibitori angiotenzin-konvertujućeg enzima (ACE inhibitori), antagonisti angiotenzinskih receptora i antagonisti mineralokortikoidnih receptora. U praksi se najčešće koriste kombinacije antagonisti beta-adrenergičkih receptora i ACE inhibitora, koje su najefikasnije u sprečavanju srčanog oštećenja (Octavia i saradnici, 2012).

1.2.5. Životinjski modeli

Idealan eksperimentalni model doksorubicinske kardiomiopatije trebalo bi da zadovolji sledeće kriterijume: sličnost sa morfološkim, biohemijskim i funkcionalnim karakteristikama na različitim nivoima integracije organizma (nivo organa, ćelije, subcelularni i molekularni nivo); sličan mehanizam nastanka bolesti; slične fenotipske manifestacije i sličan princip terapije kod ljudi i u životinjskom modelu. Potrebno je dobro razumeti kliničke simptome i znake doksorubicinske kardiomiopatije kod ljudi, kako bismo odabrali optimalnu dozu doksorubicina za davanje životinji (Podyacheva i saradnici, 2021).

U eksperimentalnoj praksi se dominantno koriste male laboratorijske životinje (pacovi i miševi) i primenjuju se isti kriterijumi za procenu oštećenja srčanog tkiva kao kod ljudi: ehokardiografija, merenje serumskih markera oštećenja miokarda, kao i histološki pregled sa procenom stepena oštećenja i razvoja fibroze. Modeli doksorubicinske kardiomiopatije razvijeni na pacovima i miševima ne pokazuju značajnu razliku u težini morfoloških promena u miokardu. Inflamacija, fibroza srčanog tkiva i vakuolizacija kardiomiocita registrovani su kod obe životinjske

vrste. Ipak, daje se prednost modelu na pacovima, zbog male količine tkiva srca kod miševa, dostupne za različite molekularne analize (Podyacheva i saradnici, 2021).

Životinjski modeli doksorubicinske kardiomiopatije mogu se podeliti na kratkotrajne i dugotrajne, u zavisnosti od protokola davanja doksorubicina (Robert, 2007). U kratkotrajnim modelima, životinje dobijaju pojedinačnu dozu doksorubicina 5 – 30 mg/kg intravenskim putem (Todorova i saradnici, 2012) ili višekratno intraperitonealnim putem do dostizanja kumulativne doze 12 – 20 mg/kg (Cappetta i saradnici, 2017). Dugoročni modeli podrazumevaju davanje doksorubicina na nedeljnom nivou tokom dužeg vremenskog perioda, do postizanja kumulativne doze 3 – 25 mg/kg (Podyacheva i saradnici, 2021).

1.3. Beta-adrenergički receptori i njihovi signalni putevi u zdravom srcu i srčanoj dekompenzaciji

Efekte simpatičkog nervnog sistema na srce, povećanje snage srčane kontrakcije i sprovodljivosti, primarno su posredovani beta-adrenergičkim receptorima (β -AR). β -AR pripadaju G protein-spregnutim receptorima (engl. *G protein coupled receptors* – GPCR) (Bernstein i saradnici, 2011). U srčanom mišiću detektovana su sva tri podtipa β -AR. Dominantno ekspimirani i najviše proučavani su β_1 -AR i β_2 -AR, čiji je odnos u zdravom srcu približno 75:25%, u korist β_1 -AR (Ho i saradnici, 2010). β_1 -AR i β_2 -AR aktiviraju različite signalne puteve i ostvaruju drugačija, ponekad čak i suprotna dejstva (Xiao i saradnici, 2004). β_3 -AR, iako male ekspresije u srčanom tkivu, imaju višestruke funkcije koje utiču na kardiovaskularni sistem. Stimulacijom β_3 -AR smanjuje se kontraktilna snaga srca i dolazi do vazodilatacije (Tavernier i saradnici, 2003).

Za razumevanje β -AR, potrebno je poznavati osnove strukture i funkcije GPCR. GPCR (tzv. heptaheliksni, serpentiniski receptori) predstavljaju najveću familiju integralnih membranskih proteina, koju kodira oko 5% ljudskog genoma (Zhang i saradnici, 2006). Oni prenose signale između ćelijskog okruženja i unutrašnjosti ćelije i tako posreduju u ćelijskim odgovorima na različite ligande (Milić i Veprintsev, 2015). Izmenjena GPCR signalizacija uključena je u nastanak mnogih oboljenja i smatra se da približno 40% svih lekova ostvaruje svoj efekat preko GPCR (Eglen i saradnici, 2007). Nobelova nagrada za hemiju je 2012. godine dodeljena Brajanu Kobilki i Robertu Lefkovicu za njihov rad koji se smatra presudnim za razumevanje načina na koji GPCR funkcionišu (Lin, 2013).

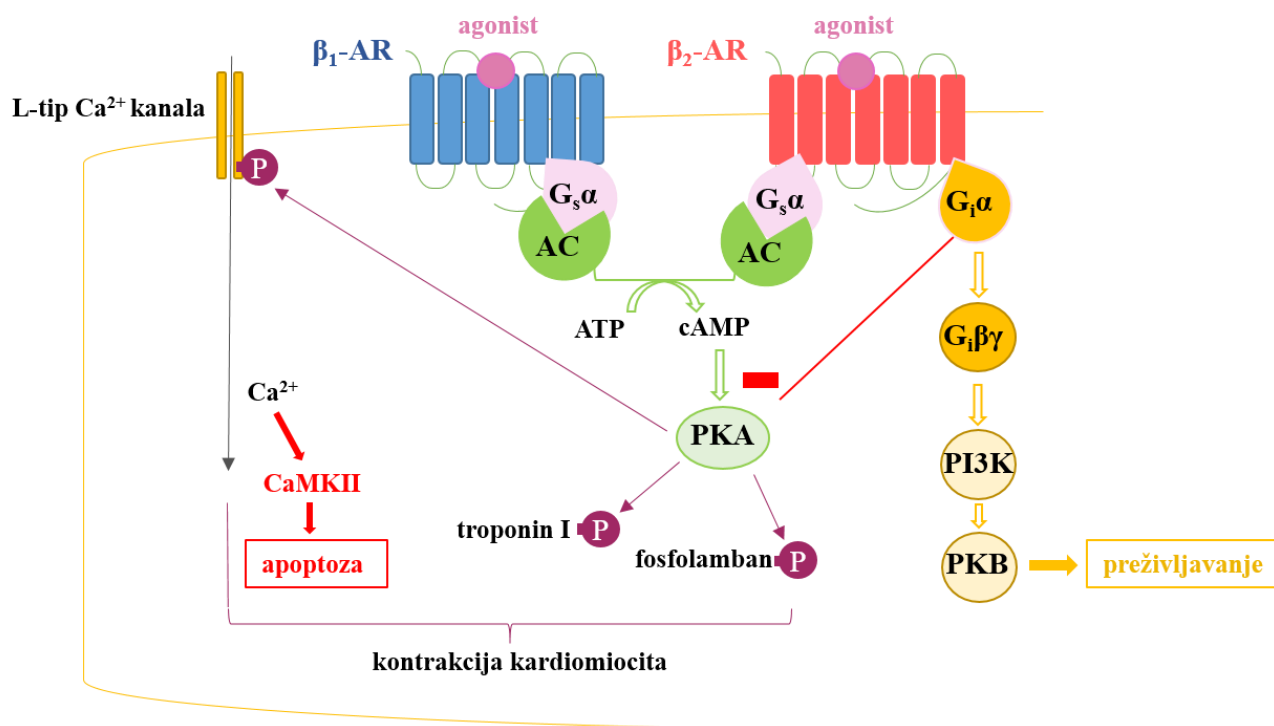
GPCR se sastoje iz tri dela: vanćelijski region sadrži amino (N) kraj i tri vanćelijske petlje; transmembranski region sadrži sedam α heliksa; unutarćelijski region sadrži tri unutarćelijske petlje, kratki α heliks (H8) i karboksilni (C) kraj (Venkatakrishnan i saradnici, 2013). Vanćelijski domen modulira pristup različitih liganada, transmembranski deo formira strukturno jezgro i prenosi signal u ćeliju, dok se unutarćelijski deo vezuje za različite G proteine (G_s , $G_{q/11}$, G_i , $G_{12/13}$) i može aktivirati niz alternativnih signalnih kaskada unutar ćelije. Ovime je, bez obzira na strukturnu sličnost, omogućena velika funkcionalna raznolikost GPCR, koja uključuje signalne puteve zavisne od G proteina, ali i signalne puteve nezavisne od G proteina i komplikovane regulatorne procese (Zhao i saradnici, 2016).

β -AR primarno su vezani za stimulatorni G protein, G_s . U prisustvu kateholamina, prirodnih liganada β -AR, dolazi do konformacione promene receptora i disocijacije G_s proteina na aktiviranu α subjedinicu i $\beta\gamma$ dimer. Aktivirana α subjedinica dalje aktivira adenilat-ciklazu, koja katalizuje konverziju ATP-a u sekundarni glasnik, ciklični adenozin monofosfat (engl. *cyclic adenosine monophosphate* – cAMP). Povećani nivo cAMP-a aktivira cAMP-zavisnu proteinsku kinazu A (engl. *protein kinase A* – PKA), koja fosforiliše serin/treonin rezidue različitih proteina. Jedna od najvažnijih

signalnih kaskada završava fosforilacijom L-tipa Ca^{2+} kanala, troponina I i fosfolambana, što dovodi do kontrakcije srčane mišićne ćelije (Wachter i Gilbert, 2012) (Slika 5).

Iako u fiziološkim uslovima, β_2 -AR pokreću G_s signalni put u ćeliji, pokazano je da mogu aktivirati i G_i signalni put, što dovodi do inhibicije PKA i relaksacije srčane mišićne ćelije (Xiao i saradnici, 2004). Ova dvostruka sprega β_2 -AR sa G_s i G_i proteinima predstavlja protektivni mehanizam za srce u patološkim stanjima (Slika 5). Naime, tokom dugotrajne kateholaminske stimulacije β_2 -AR u srčanoj insuficijenciji, favorizuje se inhibitorna G_i signalna kaskada, što štiti srce od kardiotoksičnih efekata (Daaka i saradnici, 1997).

Pokazano je da β_1 -AR i β_2 -AR imaju suprotne uloge u regulaciji sudbine kardiomiocita (Slika 5). Studije na adultnim kardiomiocitima miševa (Zhu i saradnici, 2001) i neonatalnim kardiomiocitima pacova (Chesley i saradnici, 2000), pokazale su da stimulacija β_1 -AR uvodi ćelije u apoptozu preko PKA nezavisnog signalnog puta (povećanjem unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} i aktivacijom CaMKII), dok stimulacija β_2 -AR štiti ćelije od apoptoze (Xiao i saradnici, 2004). Smatra se da je u osnovi antiapoptotske uloge β_2 -AR sprega ovih receptora sa G_i proteinom i sledstvena aktivacija $G\beta\gamma$, fosfatidilinozitol-3 kinaze (PI3K) i protein kinaze B (Zhu i saradnici, 2001) (Slika 5). Različite studije sugerišu i ulogu MAP kinaza u antiapoptotskoj signalnoj kaskadi posredovanoj β_2 -AR (Communal i saradnici, 2000). S obzirom da je i mala stopa apoptoze dovoljna da izazove letalnu dilatacionu kardiomiopatiju, aktivacija antiapoptotskih signalnih puteva predstavlja novu metu za terapiju srčane insuficijencije (Wencker i saradnici, 2003).



Slika 5. Signalni putevi β_1 -AR i β_2 -AR u zdravom srcu. β -AR: beta-adrenergički receptor; G_s : stimulatorni G protein; G_i : inhibitorni G protein; AC: adenilat ciklaza; ATP: adenzin trifosfat; cAMP: ciklični adenzin monofosfat; PKA: protein kinaza A; CaMKII: Ca^{2+} /kaldmodulin-zavisna proteinska kinaza; PI3K: fosfatidilinozitol-3-kinaza; PKB: protein kinaza B; P: fosforilacija; – : inhibicija. Preuzeto i modifikovano iz Ho i saradnici, 2010.

U srčanoj insuficijenciji smanjen je minutni volumen srca zbog patološkog remodelovanja srčanog tkiva. Kako bi se zadovoljili zahtevi perifernih tkiva za kiseonikom i hranljivim materijama, dolazi do kompenzatorno povećane aktivnosti simpatičkog nervnog sistema i kateholaminske stimulacije β -AR, s ciljem da se oporavi snaga srčane kontrakcije (Brum i saradnici, 2006). Iako je

ovo korisno u akutnoj fazi srčane insuficijencije, hronična stimulacija β -AR pokreće kaskadu promena na nivou srčane mišićne ćelije i finalno rezultira slabljenjem kontraktilne snage srca (Bristow i saradnici, 1986).

Prekomerena kateholaminska stimulacija dovodi do selektivne nishodne regulacije β_1 -AR pa se odnos β_1 -AR: β_2 -AR u insuficijentnom srcu menja na približno 50:50% (Bristow i saradnici, 1986). Takođe, favorizuje se aktivacija antiapoptotskog G_i signalnog puta β_2 -AR, što dovodi do smanjene kontraktilne snage srca (Daaka i saradnici, 1997). Proces desenzitizacije i nishodne regulacije receptora započinje fosforilacijom β -AR protein kinazom A, protein kinazom C i kinazama G protein-spregnutih receptora (engl. *G protein-coupled receptor kinase* – GRK) (Najafi i saradnici, 2016). Fosforilacije β -AR preko PKA (koju aktivira $G_{s\alpha}$) i preko PKC (koju aktivira $G\beta\gamma$) menjaju konformaciju receptora i remete njegovu interakciju sa G proteinom i dalji prenos signala. Ovaj proces se naziva heterologa desenzitizacija receptora ili desenzitizacija receptora nezavisna od agoniste, jer se fosforilišu i agonistima stimulisani i nestimulisani receptori. S druge strane, homologu desenzitizaciju receptora okupiranih agonistima vrše GRK (Rockman i saradnici, 2002). One fosforilišu C-terminus β -AR, omogućavaju vezivanje beta arestina (ARRB), desenzitizaciju i klatrinom posredovanu internalizaciju receptora (Penela i saradnici, 2010).

Genetičke epidemiološke studije na ljudima pokazale su da pojačana aktivacija β_1 -AR pogoršava kardiovaskularnu bolest. Određeni polimorfizmi gena za β_1 -AR, koji dovode do povećane osetljivosti ovih receptora za ligande, povećavaju rizik od akutnog infarkta miokarda i srčane insuficijencije (Xiao i saradnici, 2004). S druge strane, analizom polimorfizama gena za β_2 -AR kod pacijenata sa hroničnom srčanom insuficijencijom, pokazano je da se posredstvom β_2 -AR ostvaruju povoljni efekti na srčanu funkciju (Liggett i saradnici, 1998).

1.4. Kinaze G protein-spregnutih receptora i arestini

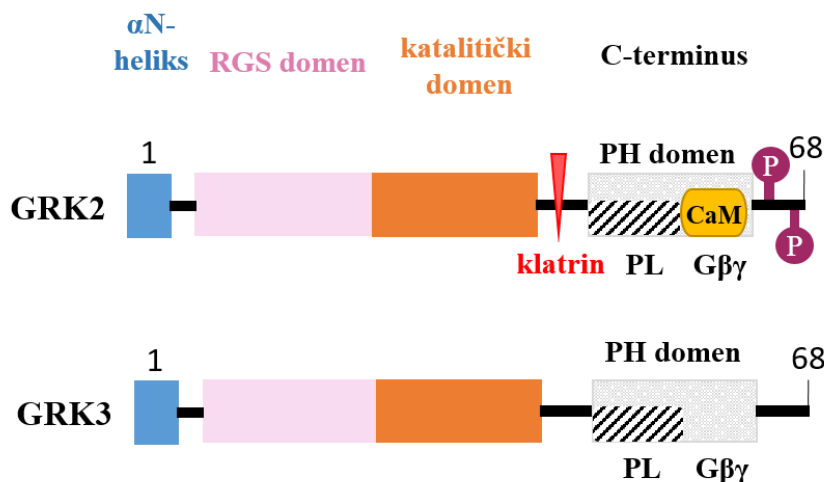
GRK su inicijalno identifikovane kao serin/treonin kinaze koje, zajedno sa arestinima, učestvuju u procesu nishodne regulacije različitih GPCR (Penela i saradnici, 2003). Međutim, pored ove „negativne“, inhibitorne uloge u GPCR signalizaciji, pokazano je da stupaju u interakcije sa različitim ćelijskim proteinima uključenim u transdukciju signala i imaju mnogostruke efektorske uloge, nezavisne od GPCR (Reiter i Lefkowitz, 2006).

Članovi GRK familije mogu se, na osnovu homologije sekvenci, svrstati u tri glavne grupe (Penela i saradnici, 2010):

- rodopsin kinaze važne za čulo vida (GRK1 i GRK7)
- GRK2/GRK3 subfamilija, koja obuhvata dve kinaze β -AR (engl. *β -adrenergic receptor kinase* – β ARK1 i β ARK2)
- GRK4 subfamilija (GRK4, GRK5 i GRK6), čiji su članovi konstitutivni delovi ćelijske membrane

Sve GRK izoforme dele zajedničku strukturu sa centralnim katalitičkim domenom (~270 aminokiselina), koji je sličan kod svih serin/treonin kinaza. N-terminalni domen (~185 aminokiselina) važan je za prepoznavanje receptora i sadrži domen homolog regulatorima signalizacije G proteina (engl. *regulator of G protein signalling homology domain* – RH). C-terminalni domen varijabilne dužine (150-203 aminokiselina) vezuje se za fosfolipide membrane i $G\beta\gamma$ protein i učestvuje u translokaciji kinaza do ćelijske membrane (Ribas i saradnici, 2007).

U srčanom tkivu najzastupljenije su kinaze β -AR (GRK2 i GRK3) i membranske kinaze GRK5 i GRK6 (Yi i saradnici, 2005). GRK2 i GRK3 su citoplazmatski proteini, koji se nakon stimulacije GPCR privremeno translociraju na membranu ćelije (Senarath i saradnici, 2018). Ove kinaze na svom C-terminusu poseduju domen homolog plekstrinu (PH domen), za koji se velikim afinitetom vezuje $G\beta\gamma$ (Slika 6). Interakcija $G\beta\gamma$ sa GRK2 i GRK3 targetira ove kinaze i premešta ih na membranu, na mesto gde su lokalizovani GPCR, nakon čega dolazi do disocijacije $G\beta\gamma$ dimera. Vezivanje $G\beta\gamma$ subjedinice potencira fosforilaciju GPCR, ubrzavajući alosternu aktivaciju ovih kinaza. Membranske kinaze GRK5 i GRK6 na C-terminusu imaju amfipatsku spiralu sa hidrofobnim jezgrom (Mushegian i saradnici, 2012). One fosforilišu receptore okupirane agonistom i, za razliku od GRK2 i GRK3, stimulišu arestinom-posredovanu signalnu transdukciju u ćeliji, pre nego arestinom-posredovanu desenzitizaciju i internalizaciju receptora (Kim i saradnici, 2005).



Slika 6. Struktura kinaza β -AR. GRK: kinaza G protein-spregnutog receptora; RGS: regulator funkcije G protein signalnog puta; PH: domen homolog plekstrinu; PL: fosfolipidi. CaM: Ca^{2+} kalmodulin; P: fosforilacija. *Preuzeto i modifikovano iz Senarath i saradnici, 2018.*

Arestini predstavljaju malu familiju proteina važnih za regulaciju signalne transdukcije GPCR (Moore i saradnici, 2007). Prvi arestini otkriveni su kao deo visokokonzerviranog dvostepenog mehanizma za regulaciju aktivnosti GPCR u vizuelnom rodopsinskom sistemu (Wilden i saradnici, 1986) i β -adrenergičkom sistemu (Lohse i saradnici, 1990). Kod nestimuliranih ćelija, arestini su u bazalnoj „neaktivnoj“ konformaciji, lokalizovani u citoplazmi. Fosforilisani GPCR regrutuje arestine na plazma membranu i oni služe kao adapteri, koji povezuju receptor za elemente endocitotskog kompleksa. U srčanom tkivu eksprimirani su arestin 2 poznatiji kao β -arestin 1 (engl. *arrestin beta 1* – ARRB1) i arestin 3 poznatiji kao β -arestin 2 (engl. *arrestin beta 2* – ARRB2) (Shenoy i Lefkowitz, 2003).

1.4.1. Uloga GRK i ARRB u desenzitizaciji GPCR

GRK fosforilišu GPCR aktivirane agonistima, na reziduama serina i treonina, lokalizovanim na C-kraju i/ili tečaj citoplazmatskoj petlji receptora (Slika 7). ARRB imaju veliki afinitet jedino za receptore okupirane agonistima i fosforilisane ovim kinazama, i vrše sternu inhibiciju vezivanja G proteina (Shenoy i Lefkowitz, 2003). Pokazano je da ARRB interaguju i sa cAMP fosfodiesterazama i time povećavaju degradaciju cAMP-a, što doprinosi terminaciji signala (Perry i saradnici, 2002). Oni povezuju receptor sa različitim elementima endocitotskog kompleksa (klatrin, adapter klatrina AP2, fuzioni protein osetljiv na N-etilmaleimid) i tako učestvuju u internalizaciji fosforilisanog receptora (Reiter i Lefkowitz, 2006). Endocitoza nije neophodna za desenzitizaciju receptora, ali se smatra neophodnom za defosforilaciju i resenzitizaciju receptora (Lefkowitz i saradnici, 1998).

1.4.2. Uloga GRK i ARRB u prometu GPCR

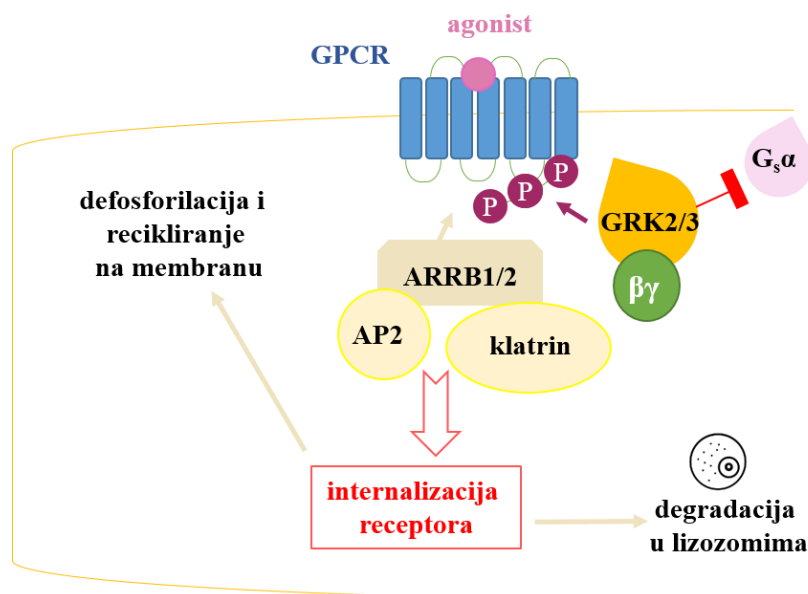
Opisana su tri glavna mehanizma internalizacije GPCR: endocitoza posredovana klatrinskim vezikulama, endocitoza posredovana kaveolama i endocitoza posredovana neobloženim vezikulama (Marchese i saradnici, 2003). Bez obzira na to što je signalni put kojim se vrši internalizacija receptora zavistan od receptora i tipa ćelije, endocitoza posredovana sa ARRB i klatrinskim vezikulama je najčešća kod GPCR (Reiter i Lefkowitz, 2006).

Internalizacija receptora može da dovede do (Reiter i Lefkowitz, 2006) (Slika 7):

- defosforilacije receptora, resenzitizacije i recikliranja na ćelijsku površinu
- deportovanja receptora u lizosome na degradaciju
- naknadne aktivacije unutarćelijskih signalnih puteva

Očuvani serin/treonin klasteri na C-terminusu GPCR najverovatnije određuju jačinu interakcije između receptora i ARRB, a smatra se da od jačine arestin-receptor interakcije zavisi u kom će smeru ići sudbina receptora nakon internalizacije (Oakley i saradnici, 2001). Klasa A receptora (npr. β_2 -AR) ne poseduje ove klasteri na C-terminusu. Oni se vezuju za ARRB2, bivaju internalizovani procesom endocitoze posredovane klatrinskim vezikulama, ali se brzo disociraju od arestina, „recikliraju“ i vraćaju na površinu ćelijske membrane. Klasa B GPCR (npr. receptor za angiotenzin tip 1A, receptor za vazopresin tip V2) sa jednakim afinitetom aktivira ARRB1 i ARRB2 i dolazi do formiranja stabilnih kompleksa sa arestinom unutar endocitotske vezikule i degradacije receptora (Oakley i saradnici, 2000).

Pokazano je da klase A i B GPCR imaju različit proces ubikvitinacije ARRB vezanih za receptore, a obeležavanje ARRB ubikvitinom važno je za klatrinom posredovanu endocitozu. Klasa A receptora indukuje privremenu ubikvitinaciju ARRB, dok je za klasu B karakteristična trajna ubikvitinacija. Ubikvitinacija ARRB koju pokreću agonisti preduslov je za njihovu funkciju u internalizaciji receptora, kao i determinanta različitih obrazaca prometa različitih klasa GPCR (Shenoy i Lefkowitz, 2003).

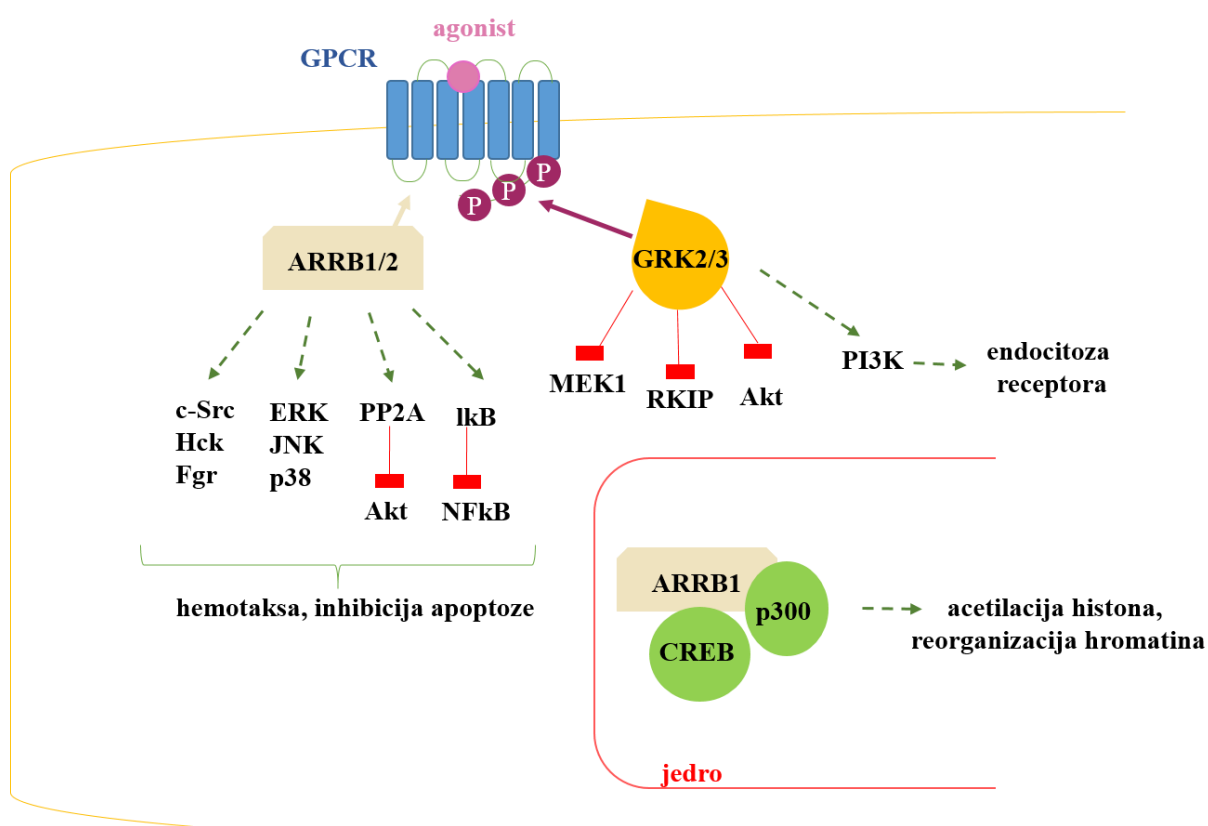


Slika 7. Uloga GRK u desenzitizaciji i prometu GPCR. GPCR: G protein-spregnuti receptor; GRK: kinaza G protein-spregnutog receptora; ARRB: beta arestin, G_s: stimulatorni G protein; AP2: adapter klatrina; – : inhibicija. *Preuzeto i modifikovano iz Reiter i Lefkowitz, 2006.*

1.4.3. Uloga GRK i ARRB u signalnim putevima GPCR

Pored klasične tzv. kanonske uloge u desenzitizaciji i internalizaciji GPCR, pokazano je da GRK i ARRB učestvuju u brojnim interakcijama sa signalnim proteinima u ćeliji (**Slika 8**). GRK2 moduliše ćelijski odgovor nezavisno od fosforilacije GPCR, stupajući u interakciju sa različitim proteinima uključenim u prenos signala. Sa ciljem da se naglase njene mnogostruke uloge, GRK2 se često naziva interaktomom (Penela i saradnici, 2010).

GRK2 fosforiliše Smad proteine i tako inhibira apoptozu posredovanu faktorom transformacije rasta beta (engl. *transforming growth factor beta* – TGF- β) (Ho i saradnici, 2005). Interakcija GRK2 sa PI3K γ olakšava prenos PI3K γ do membrane, nakon stimulacije receptora agonistom, i time desenzitizaciju i internalizaciju receptora (Naga Prasad i saradnici, 2002). GRK2-MAPK asocijacija važna je za kontrolu produkcije hemokina (Jiménez -Sainz i saradnici, 2006), dok GRK2 i GIT1 (engl. *G protein-coupled receptor kinase-interacting protein 1*) učestvuju u procesima organizacije citoskeleta, ćelijske adhezije i migracije ćelija (Penela i saradnici, 2008).



Slika 8. Uloga GRK i ARRB u signalnim putevima GPCR. GPCR: G protein-spregnuti receptor; GRK: kinaza G protein-spregnutog receptora; ARRB: beta arestin; c-Src: protoonkogen; Hck: tirozin-kinaza; Fgr: onkogen; ERK: kinaza regulisana ekstracelularnim signalom; JNK: Jun kinaza; p38: mitogenom aktivirana kinaza; PP2A: protein fosfataza 2A; Akt: protein kinaza B; IκB: inhibitor nuklearnog faktora kapa beta; NFκB: nuklearni faktor kapa beta; MEK1: mitogenom aktivirana protein kinaza 1; RKIP: inhibitor Raf kinaze; PI3K: fosfatidilinozitol-3-kinaza; CREB, p300: transkripcioni faktori; P: fosforilacija; zelene isprekidane linije: aktivacija, crvene linije: inhibicija. *Preuzeto i modifikovano iz Reiter i Lefkowitz, 2006.*

Lista signalnih puteva posredovanih ARRB stalno se uvećava (Reiter i Lefkowitz, 2006). ARRB učestvuju u transdukciji signala različitih receptora, uključujući GPCR, receptore sa aktivnošću tirozin-kinaza (engl. *receptor tyrosine kinase* – RTK), jonske kanale i citokinske receptore. Vezivanje agoniste za RTK npr. receptor za epidermalni faktor rasta ili receptor za faktor rasta fibroblasta, dovodi do ARRB-zavisne aktivacije MAPK signalnih puteva (Eishingdrelo i saradnici, 2014). Citokini poput faktora nekroze tumora α (engl. *tumor necrosis factor α* – TNF α) i interleukina 1 β takođe aktiviraju signalne puteve zavisne od ARRB (Hwang i saradnici, 2004).

Jedan od najviše proučavanih signalnih puteva koji zavisi od ARRB je ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase* – ERK) signalni put. GPCR mogu aktivirati ERK G protein-zavisnim signalnim putevima ili ARRB-zavisnim signalnim putevima. ERK aktivacija zavisna od G proteina rezultuje translokacijom aktivirane ERK u jedro, dok ARRB-zavisna ERK aktivacija „zadržava“ ERK u citosolu, sporija je i duže traje (Eishingdrelo i saradnici, 2014). Ova dva različita puta aktivacije ERK upućuju na postojanje različitih fizioloških ishoda nakon aktivacije svakog od njih. Zapravo, različite izoforme GRK i ARRB imaju drugačije, ponekad antagonističke uloge u ERK-posredovanoj transdukciji signala u ćeliji (Reiter i Lefkowitz, 2006).

1.5. Inhibicija GRK2 kao nova terapijska mogućnost u lečenju srčane insuficijencije

Citosolna GRK2 najzastupljenija je GRK izoforma u srčanom tkivu i predstavlja glavni regulator GPCR signalne transdukcije u zdravom srcu, a pokazano je da je uključena i u nastanak i progresiju srčane insuficijencije (Schlegel i saradnici, 2017). Vezujući se za G $\beta\gamma$ subjedinicu disociranog G proteina, GRK2 fosforiliše agonistom okupirane β -AR u srcu, uslovljava vezivanje ARRB i odvajanje (engl. *uncoupling*) receptora od G proteina i efektorskih molekula u signalnim putevima (tzv. desenzitizacija receptora) Vezivanje ARRB dovodi do kltrinom posredovane endocitoze i degradacije fosforilisanih receptora, što uzrokuje smanjenje neurohumoralnog odgovora i posledično povećanu aktivnost simpatičkog nervnog sistema (Pierce i Lefkowitz, 2001).

Pokazano je da je, već u ranoj fazi nastanka srčane insuficijencije, povećan nivo GRK2, i pretpostavlja se da bi ova kinaza mogla da služi kao novi rani biomarker srčane insuficijencije kod ljudi (Iaccarino i saradnici, 2005). Naime, povećana aktivnost simpatičkog nervnog sistema u srčanoj insuficijenciji i prekomerena kateholaminska stimulacija β -AR u srcu predstavljaju rani okidač za porast ekspresije GRK2, što dovodi do desenzitizacije i nishodne regulacije β_1 -AR (Petrofski i Koch, 2003). Ovo predstavlja rani odbrambeni mehanizam koji štiti srce od toksičnih efekata kateholamina. Međutim, dugotrajna desenzitizacija β_1 -AR i smanjenje njihovog broja na površini srčanih ćelija za posledicu imaju slabljenje kontraktilne snage srca i ubrzano propadanje srčanog mišića (Vasić i Japundžić Žigon, 2013). Različite studije pokazale su dodatne štetne efekte GRK2 u srčanoj insuficijenciji: narušeno preuzimanje glukoze u srčane mišićne ćelije (Ciccarelli i saradnici, 2011), promene Ca²⁺ kanala L-tipa (Raake i saradnici, 2012) i proapoptotske efekte na mitohondrijama (Chen i saradnici, 2013).

U različitim modelima srčane insuficijencije kod ljudi (Ungerer i saradnici, 1993) i životinja (Schlegel i saradnici, 2017; Yi i saradnici, 2002), GRK2 je ushodno regulisana. U eksperimentalnom modelu srčane insuficijencije dobijenom delecijom gena za mišićni LIM protein (engl. *muscle LIM protein*) kod transgenih miševa (MLP^{-/-}), administracija GRK2 inhibitora (β ARKct) sprečila je štetno remodelovanje miokarda i poboljšala preživljavanje eksperimentalnih životinja (Rockman i saradnici, 1998). Ovaj genetski model dilatacione kardiomiopatije dobro „imitira“ isti fenotip kardiomiopatije kod ljudi (Arber i saradnici, 1997) pa je moguća translacija eksperimentalnih podataka na čoveka. Inhibicija GRK2 predložena je za novu terapijsku metu u srčanoj insuficijenciji sa potencijalno značajnim uticajem na progresiju i ishod ove bolesti (Rockman i saradnici, 1998).

GRK2 inhibitor (β ARKct) sadrži poslednjih 195 aminokiselina C-terminusa GRK2, gde je vezno mesto za $G\beta\gamma$ subjedinicu. On se takmiči sa endogenim GRK2 u vezivanju za $G\beta\gamma$, „istiskujući“ ga sa veznog mesta na membrani kardiomiocita (Koch i saradnici, 1995). Kardiospecifična inhibicija GRK2 transferom gena za β ARKct uz pomoć virusnih vektora efikasno je oporavljala srčanu funkciju u ćelijskim i životinjskim modelima srčane insuficijencije. Zbog dokazanih benefita genske terapije, bilo je očekivano da oralna primena malih selektivnih inhibitora određenih GRK izoformi potencijalno ima klinički značaj u terapiji kardiovaskularnih bolesti (Homan i saradnici, 2015).

Razvoj inhibitora protein kinaza umnogome ometaju nepovoljna farmakokinetička svojstva ili nedostatak selektivnosti (Homan i saradnici, 2015). Uprkos ovim preprekama, pokazano je da je paroksetin, antidepresiv iz grupe selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina (engl. *selective serotonin reuptake inhibitor* – SSRI), efikasni direktni inhibitor GRK2, sa 50 puta većom selektivnošću u odnosu na druge GRK izoforme (Thal i saradnici, 2012). Ovo otkriće pokazalo je da se velika selektivnost, dobra biorasploživost nakon oralne primene i druga povoljna farmakokinetička svojstva mogu postići u jednom GRK inhibitoru.

Kristalografska analiza pokazala je da se paroksetin vezuje za aktivno mesto GRK2, koje se preklapa sa ATP-vezujućim mestom, i stabilizuje GRK2 u „zatvorenoj“ neaktivnoj konformaciji. Struktura veznog mesta predstavlja osnov za racionalni dizajn drugih selektivnijih GRK2 inhibitora. Dodatno, paroksetin je lek relativno male molekulske mase (329,3 Da) i njegova hemijska struktura može lako da se modifikuje i bude polazište za sintezu strukturno sličnih inhibitora (Thal i saradnici, 2012).

Konzorcijum za strukturnu genomiku Univerziteta Oksford (engl. *the Structural Genomics Consortium at the University of Oxford*) pregledao je listu jedinjenja koja povećavaju tačku topljenja GRK2 i/ili GRK5. Od 14 jedinjenja dobijenih od *GlaxoSmithKline*[®], za 13 je, u testovima fosforilacije, potvrđeno da su GRK inhibitori. Jedinjenja se na osnovu strukture mogu grupisati u tri klase: indazoli (strukturno slični paroksetinu), pirolopirimidini i drugi. GSK180736A, razvijen kao inhibitor Ro-vezane protein kinaze (engl. *Rho-associated coiled-coil containing kinase*), vezuje se za GRK2 na način analogan onom kod paroksetina, dok GSK2163632A, razvijen kao inhibitor receptora za insulinu-sličan faktor rasta 1 (engl. *insulin-like growth factor 1*) zauzima drugi deo GRK aktivnog mesta, koji bi verovatno mogao da se iskoristi za postizanje veće selektivnosti. Međutim, nijedno ispitano jedinjenje ne inhibira GRK snažnije nego svoja početna ciljna mesta (Homan i saradnici, 2015).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Da razvijemo eksperimentalni model doksorubicinske kardiomiopatije kod mužjaka *Wistar* pacova: opšti toksikološki profil i preživljavanje.
2. Da, upotrebom ehokardiografije i patohistološke analize, utvrdimo funkcionalne i morfološke promene na srcu pacova sa doksorubicinskom kardiomiopatijom i definišemo kliničku prezentaciju.
3. Da kvantifikujemo ekspresiju β_1 -AR i β_2 -AR, kao i ključnih molekula uključenih u procese desenzitizacije i nishodne regulacije ovih receptora: GRK2, GRK3, ARRB1 i ARRB, u srcu pacova koji su razvili doksorubicinsku kardiomiopatiju.
4. Da ispitamo efekte inhibicije GRK2 paroksetinom na preživljavanje eksperimentalnih životinja i remodelovanje srčane funkcije u kardiomiopatiji izazvanoj doksorubicinom.

3. MATERIJAL I METODE

Sve eksperimentalne procedure izvedene su u saglasnosti sa ARRIVE (engl. *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) smernicama, Direktivom 2010/63/EU Evropskog parlamenta za zaštitu životinja koje se koriste u naučno-istraživačke svrhe, kao i Aktom o dobrobiti životinja 2009/6/RS i Pravilnikom 2010/RS. Eksperimentalni protokol je u skladu sa preporukama dobre laboratorijske prakse o etičkom radu sa oglednim životinjama Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i odobren je od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj rešenja: 323-07-04083/2016-05/1).

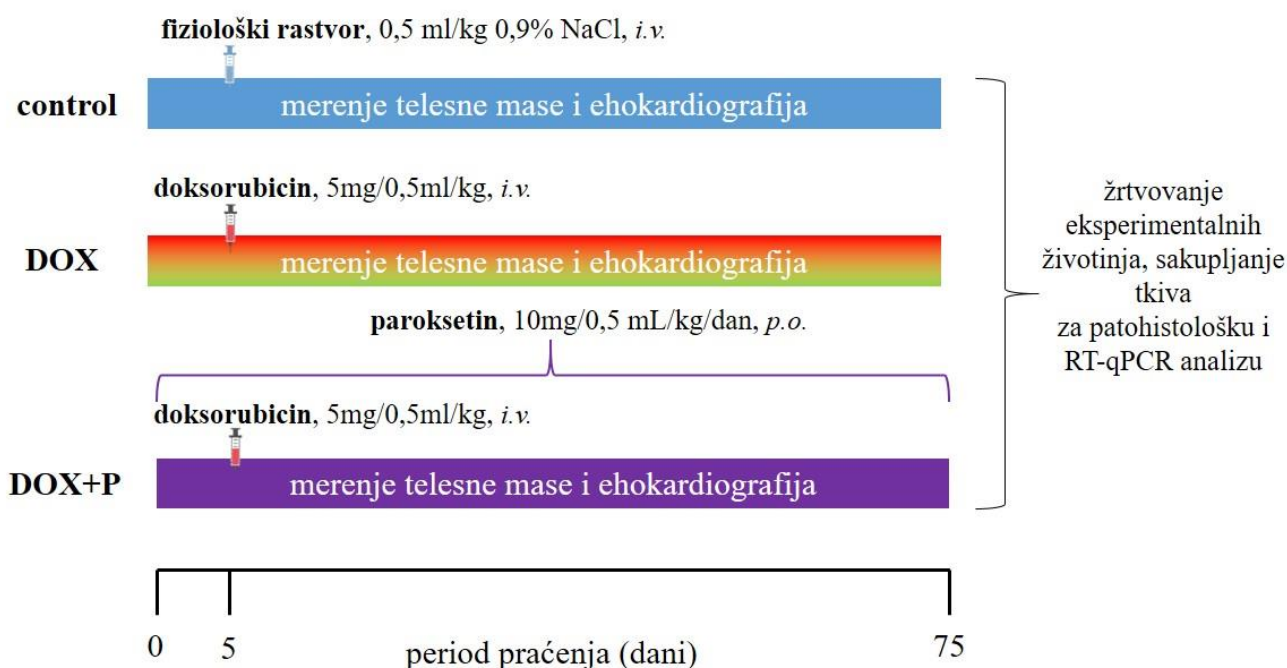
3.1. Eksperimentalne životinje

U ovom eksperimentalnom istraživanju korišćeni su mužjaci *Wistar* nesrodničkog (engl. *outbred*) soja, starosti deset nedelja, telesne mase 250 – 300g iz uzgajivačnice Instituta za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Tokom trajanja eksperimentalnog protokola, životinje su bile smeštene u pojedinačne kaveze od pleksiglasa, sa neograničenim pristupom vodi i hrani (komercijalni briketi, Veterinarski zavod, Subotica, Republika Srbija). Laboratorijski uslovi (ambijentalna temperatura 22 ± 2 °C, relativna vlažnost vazduha $65\% \pm 5$, 12:12h ciklus svetlost:tama) održavani su stalnim.

3.2. Eksperimentalni protokol

Nakon perioda prilagođavanja na laboratorijske uslove u trajanju od 48h, životinje su metodom slučajnog izbora raspoređene u tri eksperimentalne grupe: kontrolnu (control), grupu tretiranu doksorubicinom (DOX) i grupu tretiranu doksorubicinom i paroksetinom (DOX+P) (**Slika 9**). Broj životinja u svakoj eksperimentalnoj grupi određen je u skladu sa unutargrupnom varijabilnošću EF_{LV} u *Power Sample Size Calculation* softveru (besplatno dostupan na: <https://biostat.app.vumc.org/wiki/Main/PowerSampleSize>) za grešku I tipa sa snagom od 90% i verovatnoćom od 0,05. Pacovi iz kontrolne grupe ($n = 7$) dobijali su bolus fiziološkog rastvora (0,5 ml/kg 0,9% NaCl, *i.v.*). U DOX grupi ($n = 23$) pacovi su tretirani bolus toksičnom dozom doksorubicina (5mg/0,5ml/kg, *i.v.*), dok su DOX+P pacovi ($n = 11$), 5 dana pre aplikacije doksorubicina (5mg/0,5ml/kg, *i.v.*) i tokom celog perioda praćenja, tretirani paroksetinom (10mg/0,5 mL/kg/dan, *p.o.*).

Preživljavanje, opšti znaci toksičnosti, telesna masa i ultrazvučni parametri srca evaluirani su na nedeljnom nivou, pre tretmana i maksimalno 70 dana od tretmana. Životinje su žrtvovane kada se ustanove znaci lošeg opšteg stanja i promene ehokardiografskih parametara, metodom brze dekapitacije (giljotina za pacove, *Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, SAD*), kako bismo izbegli upotrebu anestetika koja bi mogla da utiče na gensku ekspresiju u srčanom tkivu. Nakon žrtvovanja, tkiva srca, jetre i bubrega su sakupljena i fiksirana u 4% formaldehidu za patohistološku analizu. Vrhovi levih srčanih komora izdvajani su za trenutno zamrzavanje tečnim azotom, zbog daljih molekularnih analiza metodom reakcija lančane polimerizacije u realnom vremenu (RT-qPCR).

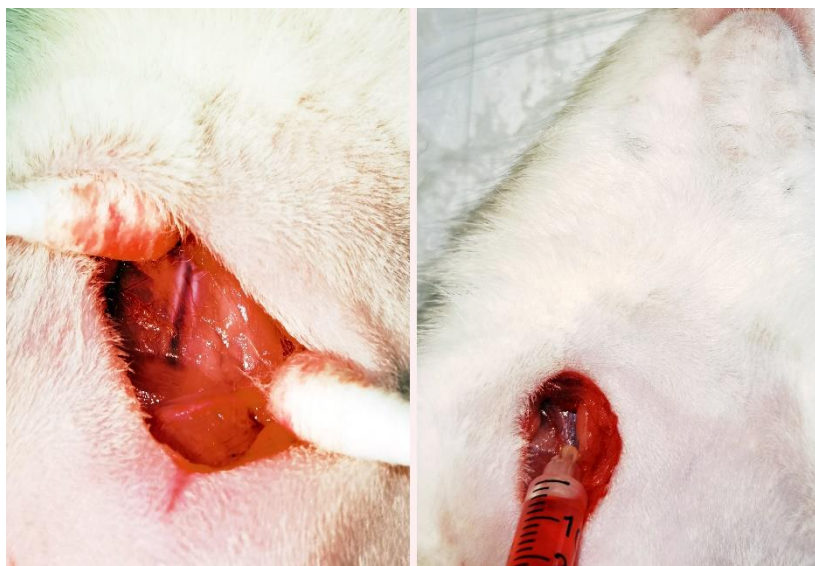


Slika 9. Shematski prikaz eksperimentalnog protokola. control: kontrolna grupa; DOX: pacovi tretirani doksorubicinom; DOX+P: pacovi tretirani doksorubicinom i paroksetinom.

3.3. Doksorubicinski model kardiotoksičnosti

Model kardiotoksičnosti izazvane pojedinačnom dozom doksorubicina 5mg/kg primenjenom intravenskim putem preuzet je iz literature (Duncan i saradnici, 1998; Rasmussen i saradnici, 1989) i proveren u našoj laboratoriji (Cheah i saradnici, 2017). Doksorubicin je aplikovan pacovima u desnu jugularnu venu (**Slika 10**), u balansiranoj opštoj anesteziji (acepromazin 0,5 mg/kg, *i.m.* i ketamin 90mg/kg, *i.m.*). Dubina anestezije proveravana je ispitivanjem kornealnog i pedalnog refleksa na početku i tokom aplikacije leka. Životinje su postavljane u leđni položaj, na ploču od pleksiglasa, ispod koje se nalazila grejna podloga za održavanje telesne temperature (*Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, SAD*). Nakon uklanjanja dlačnog pokrivača i dezinfekcije kože povidon jodom u vratnoj regiji, pravljen je incizija duga 5mm i preparisano potkožno tkivo pamučnim štapićima do ukazivanja jugularne vene. Nakon intravenske injekcije doksorubicina insulinskim špricom i hemostaze kompresijom, rez je zatvaran šavovima, hirurškim koncem debljine 4-0, a rana tretirana antibiotskim sprejom (neomicin i bacitracin) kako bi se sprečila sekundarna bakterijska infekcija.

Zbog fenotipskih razlika u ispoljavanju doksorubicinske kardiomiopatije, registrovanih ehokardiografskim pregledom, pacovi su tokom perioda praćenja raspoređivani u dve DOX podgrupe: DOX-DCM u kojoj su pacovi koji su razvili dilatacionu kardiomiopatiju i DOX-HCM u kojoj su pacovi koji su razvili hipertrofičnu kardiomiopatiju.



Slika 10. Preparisanje desne jugularne vene pacova (levo) i aplikacija doksorubicina u desnu jugularnu venu pacova (desno).

3.4. Određivanje selektivne doze paroksetina

U pilot studiju za određivanje doze paroksetina koja inhibira GRK2, uključeno je petnaest pacova, nasumično raspoređenih u tri eksperimentalne grupe ($n = 5$ u svakoj). Broj pacova po grupi određen je prema unutargrupnoj varijabilnosti ekspresije GRK2 gena u softveru *Power Sample Size Calculation* za snagu od 90% i verovatnoću greške tipa I od 0,05. Kontrolnoj grupi je oralno aplikovan fiziološki rastvor (0,5 ml/kg/dan 0,9% NaCl), dok su eksperimentalne grupe tretirane paroksetinom oralno, jedna grupa dozom od 5mg/kg/0,5ml/dan, a druga dozom od 10mg/kg/0,5ml/dan (**Slika11**). Na kraju dvonedeljnog tretmana, pacovi su eutanazirani brзом dekapitacijom (giljotina za pacove, *Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, SAD*) i srčano tkivo sakupljeno je za analizu genske ekspresije β_1 -AR, β_2 -AR, GRK2 i GRK3 metodom RT-qPCR.



Slika 11. Aplikacija paroksetina orogastričnom sondom.

3.5. Procena preživljavanja i opšte toksičnosti

Kaplan-Majerove (engl. *Kaplan-Meier*) krive generisane su kako bi se utvrdila srednja stopa preživljavanja eksperimentalnih životinja. Tokom trajanja eksperimentalnog protokola, procenjavano je opšte stanje pacova, spontano ponašanje, izgled dlačnog pokrivača, znakovi stresa i merena je telesna masa na nedeljnom nivou. Nakon žrtvovanja eksperimentalnih životinja, rađena je nekropsija i uzeta su tkiva za patohistološku analizu.

3.6. Ehokardiografska procena srčane morfologije i funkcije

Svesni pacovi, sedirani acepromazinom (0,5 mg/kg, *i.m.*) pregledani su od strane jednog eksperimentatora, koji nije imao uvid u informacije o tretmanu, linearnom sondom od 13MHz povezanom na komercijalni ultrazvučni aparat ALOKA ProSound 2 (*Hitachi Medical Systems Europe*, Ciri, Švajcarska). Merenja su vršena u desnoj parasternalnoj kratkoj osi, sa poprečno postavljenom sondom, na nivou papilarnih mišića u M-modu (**Slika 12, levo**). M-mod (engl. *Motion mode*), definisan kao vremenski prikaz kretanja ultrazvučnog talasa duž odabrane ultrazvučne linije, pruža monodimenzionalni pogled na srce. Mereni su sledeći parametri (**Slika 12, desno**): prečnik međukomorskog septuma u dijastoli (engl. *interventricular septum in diastole* – IVSd), prečnik međukomorskog septuma u sistoli (engl. *interventricular septum in systole* – IVSs), unutrašnji prečnik leve komore u dijastoli (engl. *left ventricular end-diastolic internal diameter* – LVIDd), unutrašnji prečnik leve komore u sistoli (engl. *left ventricular end-systolic internal diameter* – LVIDs), debljina zadnjeg zida leve komore u dijastoli (engl. *posterior wall thickness in diastole* – PWd) i debljina zadnjeg zida leve komore u sistoli (engl. *posterior wall thickness in systole* – PWS).

Relativna debljina zida leve komore (engl. *relative wall thickness* – RWT) računata je prema formuli Foppa i saradnika: $RWT = (IVSd + PWd) / LVIDd$ (Foppa i saradnici, 2005). Formula Devereux i saradnika: $0,8 [1,04 (IVSd + LVIDd + PWd)^3 - (LVIDd)^3] + 0,6$ g korišćena je za računanje ehokardiografske mase leve komore (engl. *echocardiographic left ventricular mass* – LVM) (Devereux i saradnici, 1986). Indeks mase leve komore (engl. *left ventricular mass index* – LVMI) računat je kao količnik mase leve komore i telesne mase pacova.

Funkcionalni parametri računati su prema sledećim formulama (Brown i saradnici, 2002):

- volumen krvi leve komore na kraju dijastole (engl. *left ventricular end-diastolic volume* – EDV_{LV})

$$EDV_{LV} \text{ (mL)} = 1,047 (LVIDd)^3$$

- volumen krvi leve komore na kraju sistole (engl. *left ventricular end-systolic volume* – ESV_{LV})

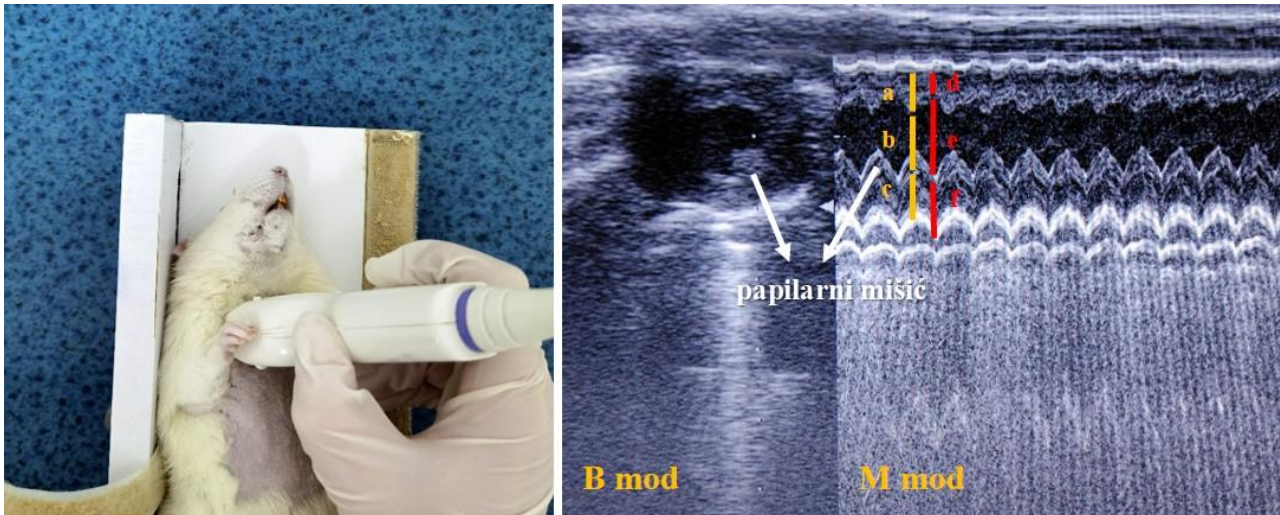
$$ESV_{LV} \text{ (mL)} = 1,047 (LVIDs)^3$$

- udarni volumen leve komore (engl. *stroke volume* – SV)

$$SV \text{ (mL)} = EDV_{LV} - ESV_{LV}$$

- e젝ciona frakcija leve komore (engl. *left ventricular ejection fraction* – EF_{LV})

$$EF_{LV} \text{ (\%)} = (SV/EDV_{LV}) 100$$



Slika 12. Poprečni položaj sonde pri ultrazvučnom pregledu srca pacova (levo); ehokardiografski zapis u B i M modu, presek na nivou papilarnih mišića (desno) a, b, c - dijametri mereni u sistoli, redom: IVSd, LVIDd, PWd; d, e, f – dijametri mereni u dijastoli, redom: IVSs, LVIDs, PWs.

3.7. Patohistološka analiza

3.7.1. Priprema tkiva i histohemijska bojenja

Sakupljena tkiva levih komora srca (bez vrhova), jetre i bubrega fiksirana su u rastvoru 4% formaldehida tokom 48h na sobnoj temperaturi, zatim ukalupljena u parafinske blokove (*Bioplastextra*, *Bio Optica*, Milano, Italija) i ručno sečena pomoću mikrotoma (rotacioni mikrotom *Leica model RM 2245*, *Leica Biosystems Inc*, *Buffalo Grove, Illinois*, SAD) na tkivne isečke debljine 3 μ m. Isečki su zatim postavljeni na predmetna stakalca i bojeni hematoksilin-eozin (HE) rutinskim bojenjem i Mason trihrom tehnikom (engl. *Masson's trichrome*) za vizuelizaciju vezivnog tkiva, naročito kolagena tip I. Preparati su analizirani pod svetlosnim mikroskopom (mikroskop polarizovanog svetla *Olympus BX50*, *Olympus Optical Co*, Tokio, Japan) pomoću kamere (*Olympus DP70 Camera System*, Tokio, Japan), korišćenjem softvera *Cell F Imaging Software Sistem* (*Olimpus Optical Co*, Tokio, Japan).

3.7.2. Histomorfometrija

Histomorfometrijske karakteristike srčanog tkiva evaluirane su svetlosnom mikroskopijom (*Leitz LaborLux S Fluorescence Microscope*, *Ernst Leitz Wetzlar GMBH*, Nemačka). Pojedinačne dvodimenzionalne mikrofotografije snimljene na 4x uvećanju, uz pomoć digitalne kamere u boji (*Leica DFC295*, *Leica Microsystems*, Nemačka), spojene su u jednu sliku za svaki histološki preparat i analizirane u *Leica University Suite* softveru, verzija 4.3 (*Leica Microsystems*, Nemačka). Računat je srednji dijametar zida leve komore srca (D_{LV}) na poprečnom preseku (**Slika 13**).



Slika 13. Histomorfometrijsko merenje srednjeg dijametra leve komore srca pacova u Leica University Suite softveru.

3.7.3. Imunohistohemijska bojenja

Prethodno pripremljeni parafinski isečci srčanog tkiva korišćeni su za imunohistohemijsko bojenje. Tkivni preparati su deparafinizovani ksilolom i rehidrirani opadajućim koncentracijama alkohola (100%, 96%, 70%,) do destilovane vode. Demaskiranje antigena vršeno je prema preporuci proizvođača korišćenog antitela, kuvanjem u citratnom puferu. Imunohistohemijsko bojenje standardizovano je korišćenjem odgovarajuće pozitivne kontrole za svako antitelo, prema uputstvima proizvođača. Negativna kontrola rađena je izostavljanjem primarnog antitela uz standardnu proceduru bojenja. Razblaženje komercijalno dostupnih koncentrovanih antitela vršeno je pomoću TBS-Tween pufera (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD*) pH vrednosti 7,4. Inkubacija sa sledećim specifičnim antitelima rađena je tokom noći, na sobnoj temperaturi: mišje anti-CD68 antitelo (*CD68, monoclonal DAKO, clone PG-M1, razblaženje 1:50*), mišje anti-LCA antitelo (*Leucocyte Common Antigen LCA IHC, DAKO, clone 2B11 +PD7/26, razblaženje 1:200*), zečije anti- β_1 -AR antitelo (*ADRB1 polyclonal antibody, Elabscience[®], razblaženje 1:200*), zečije anti- β_2 -AR antitelo (*ADRB2 polyclonal antibody, Elabscience[®], razblaženje 1:200*), zečije anti-GRK2 antitelo (*GRK2 polyclonal antibody, Elabscience[®], razblaženje 1:300*) i zečije anti-GRK3 antitelo (*GRK3 polyclonal antibody, Elabscience[®], razblaženje 1:300*). Za bojenje je korišćen *The LabVision[™] IHC stainer Autostainer 360 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)*. Imunoreakcije su vizualizovane korišćenjem 3,3'-diaminobenzidin hromogena (*The Mouse/Rabbit PolyDetector Plus DAB HRP Brown Detection System, Bio SB, Santa Barbara, California, SAD*) i kontrastno bojene Majerovim (engl. Mayer) hematoksilinom. Reprezentativne imunohistohemijske mikrofotografije napravljene su pomoću svetlosnog mikroskopa (*Olympus BX50, Olympus Optical Co, Tokio, Japan*) i kamere *Olympus DP70 (Camera System, Tokio, Japan)* korišćenjem uveličanja 40x.

3.8. Genska ekspresija β_1 -AR, β_2 -AR, GRK2, GRK3, ARRB1 i ARRB2 u srčanom tkivu

3.8.1. Izolacija ukupne RNK

Zamrznuti vrhovi srca isečeni su na blokove tkiva od 50 mg i najpre mehanički homogenizovani na ledu, a nakon toga i ultrazvučnim homogenizatorom (*Bandelin Sonopuls*, Berlin, Nemačka) u 500 μ l TRIzol reagensa (*Life Technologies, Carlsbad, SAD*). Nakon razgradnje proteina u trizolu i inkubacije na ledu 5 minuta, ukupna RNK ekstrahovana je iz vodene faze dodavanjem 100 μ l hloroforma (*Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemačka*). Uzorci su zatim vorteksovani, inkubirani na sobnoj temperaturi 3 minuta i centrifugirani 15 minuta na 12 000 rpm na 4°C, nakon čega su supernatanti premeštani u nove ependorfice. Za taloženje RNK, uzorcima je dodato 250 μ l 2-propranola. Nakon vorteksovanja, inkubacije na sobnoj temperaturi 10 minuta i centrifugiranja 15 minuta na 12 000 rpm na 4°C, supernatanti su uklanjani, a talog RNK pran sa 500 μ l 70% etanola. Ovaj postupak je ponavljan do potpunog uklanjanja supernatanata, nakon čega su uzorci sušeni u laminaru 10 minuta i svakom je dodato 10 μ l vode oslobođene od RNKaza. Na kraju protokola izolacije, uzorci su inkubirani 10 minuta na 55 °C. Količina i kvalitet dobijene RNK procenjeni su na *BioSpec-nano* spektrofotometru (*Shimadzu, Kyoto, Japan*), a zatim su svi uzorci svedeni na koncentraciju od 500 ng/ml i čuvani na -80°C.

3.8.2. Sinteza komplementarne DNK (cDNK)

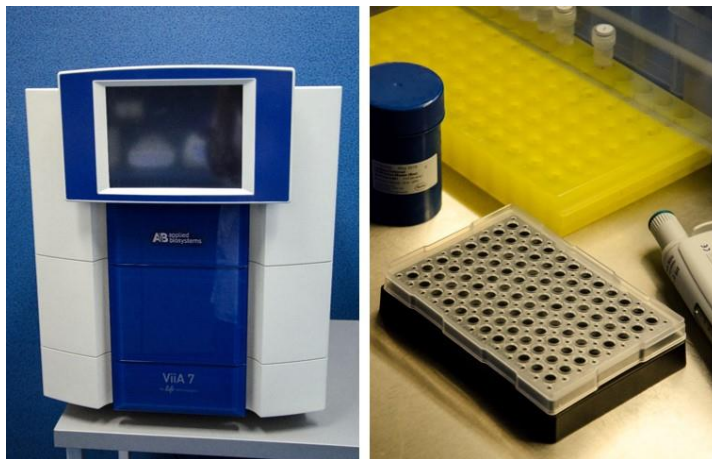
Za sintezu cDNK reverznom transkripcijom iz 500 ng/ml RNK, korišćen je komercijalni kit *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (*Qiagen, Hilden, Nemačka*). Za eliminaciju genomske DNK, u uzorak od 1 μ l RNK, dodato je 2 μ l *gDNA Wipeout Buffer*-a i 12 μ l vode oslobođene od RNKaza (do ukupne zapremine reakcije 14 μ l). Nakon kratke inkubacije na 42 °C 2 min, smeša za reakciju reverzne transkripcije (1 μ l reverzne transkriptaze (*Quantiscript Reverse Transcriptase*), 1 μ l smeše prajmera za reverznu transkripciju (*RT Primer Mix*) i 4 μ l pufera za reverznu transkripciju (*Quantiscript RT Buffer*)) dodavana je prethodnim volumenima od 14 μ l (ukupni volumen reakcije 20 μ l). Uzorci su zatim inkubirani 30 min na 42 °C, nakon čega su reakcije reverzne transkripcije prekidane inkubacijom na 95 °C. Ependorfice sa nosivom cDNK prebacivane su na led i čuvane na -20 °C.

3.8.3. RT-qPCR

PCR reakcije izvedene su i analizirane uz pomoć *Applied Biosystems Viia7 Real-Time PCR* aparata (*Applied Biosystems, Foster City, California, SAD*) (**Slika 14, levo**). Kao fluorescentna boja korišćen je *SYBR Green* (*Applied Biosystems, Warrington, Velika Britanija*), koji se nespecifično vezuje za dvolančanu DNK, a intenzitet fluorescencije direktno je proporcionalan količini uzorka.

Sve reakcije su rađene u triplikatu: cDNK uzorci nalivani su u bunariće na pločama sa 96 raspoloživih bunarića (*Applied Biosystems, Foster City, SAD*) (**Slika 14, desno**) u 12 μ l ukupne zapremine reakcije (1 μ l cDNK, 6 μ l *SYBR Green PCR Master Mix*, po 0,5 μ l 100 nM F (engl. *forward*) i R (engl. *reverse*) prajmera i 4 μ l vode slobodne od RNKaza). Svi prajmeri (*Invitrogen, Pače, Velika Britanija*) dizajnirani su korišćenjem baze podataka *GenBank database* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) i prikazani su u **Tabeli 1**. Ploče prekrivene zaštitnom folijom (*Applied Biosystems, Foster City, SAD*), centrifugirane su 30s na 2500 rpm na *Mini plate spinner* uređaju (*Labnet International, Inc, New Jersey, SAD*), kako bi se iz reakcione smeše uklonili mehurići vazduha. Temperaturni protokol reakcije lančanog umnožavanja DNK sadržao je: denaturaciju cDNK (50 °C – 2min, 95 °C – 10min), 40 ciklusa umnožavanja cDNK (95 °C – 15 s, 60 °C – 1 min) i završetak reakcije (95 °C – 15 s, 60 °C – 1 min, 95 °C – 15 s).

Analiza dobijenih rezultata urađena je korišćenjem *ViiA 7 v1.2* softvera (*Applied Biosystems, Foster City, SAD*). Relativne promene genske ekspresije računane su metodom *Livak* i saradnika korišćenjem formule $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (*Livak i Schmittgen, 2001*). Kao referentni gen, za normalizaciju ekspresije gena od interesa, korišćen je konstitutivno eksprimirani gen za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (engl. *Glyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase – GAPDH*).



Slika 14. Applied Biosystems ViiA7 Real-Time PCR aparat (levo) i ploče za PCR sa 96 raspoloživih bunarića (desno).

Tabela 1. Pregled prajmera korišćenih u ovom eksperimentalnom istraživanju.

gen	sekvenca	dužina u nukleotidima
GAPDH	F: 5'-CAG GGC TGC CTT CTC TTG TG-3'	20
	R: 5'-GAT CTC GCT CCT GGA AGA TGG-3'	21
β₁-AR	F: 5'-AGA CGT GCT ATG TGT GAC GG-3'	20
	R: 5'-AGC ACT TGG GGT CGT TGT AG-3'	20
β₂-AR	F: 5'-TGG ATT GTG TCG GGC CTT A-3'	19
	R: 5'-TGG CAC GGT ACC AGT GCA T-3'	19
GRK2	F: 5'- TGG CCC CGG AAG TCC TA-3'	17
	R: 5'- CCG CAA CAA CTT GAA GAG CAT-3'	21
GRK3	F: 5'- CCC CCA AGT TCC TCA ACA AA-3'	20
	R: 5'- GCG GTG GCT TGG AGA ACT C-3'	19
ARRB1	F: 5'- CGG TGC GCC AGT ATG CA3'	17
	R: 5'- GCC ACT GGG CAC TTG TAC TGA3'	21
ARRB2	F: 5'- AGC ACC GCG CAG TAC AAG T-3'	19
	R: 5'- CAC GCT TCT CTC GGT TGT CA-3'	20

GAPDH: gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza; β-AR: beta-adrenergički receptor; GRK: kinaza G protein-spregnutog receptora; ARRB: beta arestin; F: *forward* prajmer; R: *reverse* prajmer.

3.9. Korišćene supstance

Ketamin hidrohlorid (*Ketamidor10%*[®], rastvor za injekcije 100 mg/mL) nabavljen je od *Richter Pharma AG* (Vels, Austrija), doksorubicin (*Adriblastina*[®] RD doksorubicin hidrohlorid, prah za injekcije 50 mg) od *Pfizer-a* (Beograd, Republika Srbija), paroksetin (*Seroxat*[®] film-tablete 20 mg) od kompanije *GlaxoSmithKline export limited* (Beograd, Republika Srbija), a acepromazin maleat (*Neurotranq*[®] rastvor za injekcije 10 mg/mL) od kompanije MarloFarma (Beograd, Republika Srbija). Povidon jod 10% rastvor za kožu, fiziološki rastvor (*Natrii chloridi infundibile* 9g/L rastvor za infuziju) i neomicin i bacitracin sprej (*Bivacin*[®] sprej) kupljeni su od Hemofarma AD (Vršac, Republika Srbija). Ksilol (ksilen smeša o-, m-, p- izomera), formaldehid (35%) i etanol (100%, 96%, 70%) naručeni su od Zorka Pharma Hemije (Šabac, Republika Srbija).

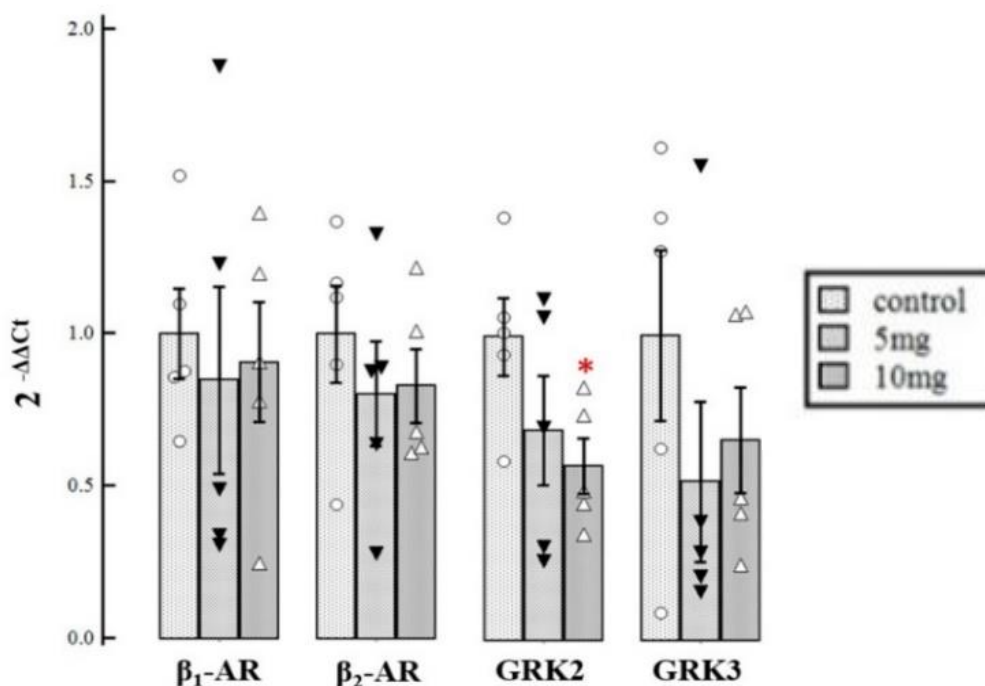
3.10. Statistička analiza

Rezultati su prikazani tabelarno i grafički kao srednja vrednost \pm standardna greška srednje vrednosti (engl. *standard error of the mean* – SEM). Za proveru normalnosti raspodele podataka korišćen je Kolmogorov-Smirnov test. t-test za zavisne uzorke (engl. *Paired sample t-test*) i jednosmerna ANOVA ponovljenih merenja (engl. *one-way ANOVA with repeated measures*) korišćeni su za procenu postojanja statističkih razlika unutar jedne grupe. Međugrupne razlike ispitivane su t-testom za nezavisne uzorke (engl. *Student's t-test for unpaired observations*) i, kada poredimo više od 2 grupe, *One-way ANOVA* statističkim testom, praćenim *Tukey post hoc* testom. U slučajevima odstupanja od normalne raspodele primenjena je *Kruskal–Wallis ANOVA* praćena *Mann–Whitney U* testom. Kaplan-Majerove (engl. *Kaplan-Meier*) krive i *log-rank (Mantel-Cox)* test korišćeni su za poređenje srednje stope preživljavanja. Za ispitivanje povezanosti primenjeni su Pirsonov/Spirmanov koeficijent korelacije. Statističkom značajnošću smatrana je vrednost $p \leq 0,05$. Za statističku analizu korišćeni su softveri *IBM SPSS Statistics for Windows*, verzija 20.0 (*IBM Corporation, Armonk, New York, SAD*) i *GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc, San Diego, SAD)*.

4. REZULTATI

4.1. Određivanje selektivne doze paroksetina

Paroksetin je statistički značajno smanjio gensku ekspresiju GRK2 samo u dozi od 10 mg/kg/dan *p.o.* (**Grafikon 1**). Na ekspresiju gena za β_1 -AR, β_2 -AR i GRK3, paroksetin nije uticao u selektovanim dozama (**Grafikon 1**).

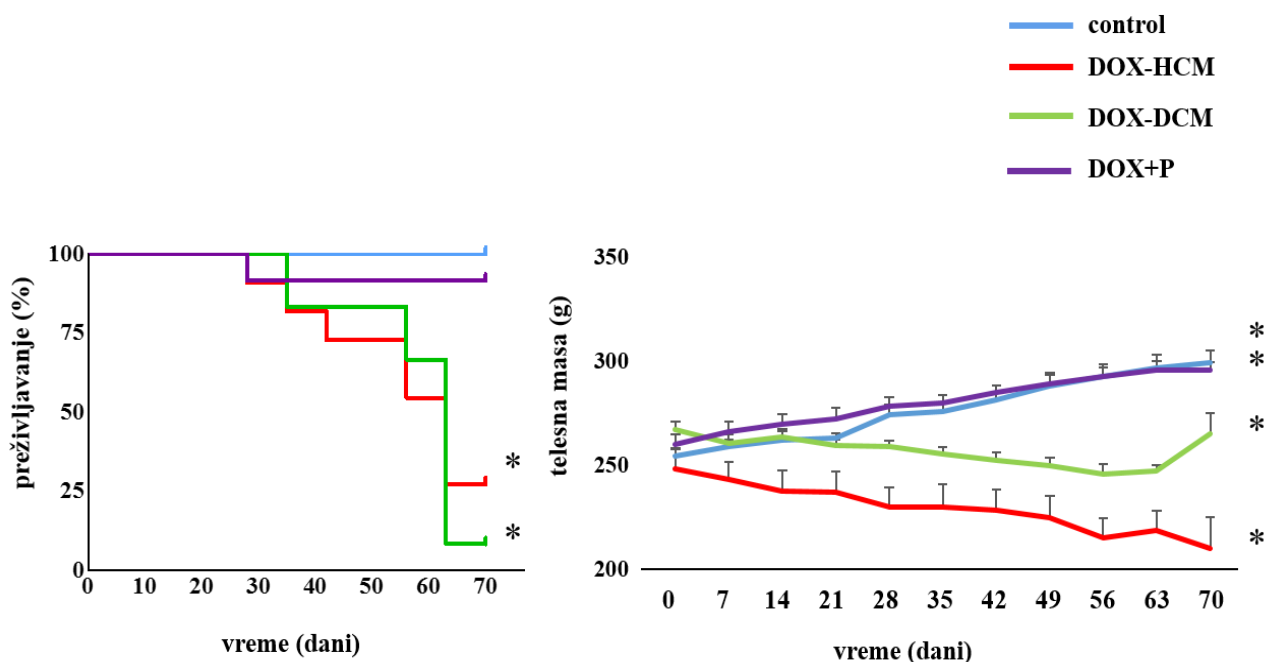


Grafikon 1. Relativna genska ekspresija β_1 -AR, β_2 -AR, GRK2 i GRK3 u srčanom tkivu pacova tretiranih paroksetinom. Uočava se statistički značajno smanjena ekspresija GRK2 gena kod pacova tretiranih paroksetinom u dozi od 10 mg/kg/dan *p.o.* Rezultati su prikazani kao srednja vrednost 5 pacova \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. control (*One-way ANOVA*, praćena *Tukey post hoc* testom). control: kontrolna grupa; β -AR: beta-adrenergički receptor; GRK: kinaza G protein-spregnutog receptora.

4.2. Procena preživljavanja i opšte toksičnosti

Kod pacova tretiranih doksorubicinom, simptomi i znaci intoksikacije bili su očigledni: naborano i oštećeno krzno, nakupljanje crvenog eksudata oko očiju (hromodakrioreja), dijareja, smanjen unos hrane i progresivno smanjenje telesne mase tokom vremena (**Grafikon 2, desni panel**), praćeno adinamijom i prostracijom. Medijana preživljavanja bila je 55 dana (**Grafikon 2, levi panel**) i nije se statistički značajno razlikovala između DOX-HCM i DOX-DCM pacova ($p > 0,05$, *log-rank Mantel-Cox* test). Makroskopskim pregledom organa primećena su najizrazitija toksična oštećenja na srcu, bubrezima i jetri. Bubrezi su bili uvećani, promenjene boje i izgleda na uzdužnom preseku. Jetra je bila uvećana, nehomogenog parenhima.

Opšte stanje DOX+P pacova bilo je značajno bolje, bez simptoma i znakova intoksikacije opasne po život. Hromodakrioreja se izgubila oko trećeg dana od intravenskog ubrizgavanja doksorubicina. Pacovi su tokom perioda praćenja dobijali na telesnoj masi, a medijana preživljavanja bila je ista kao kod pacova iz kontrolne grupe (**Grafikon 2**). Sve životinje, osim jedne, žrtvovane su na kraju perioda praćenja od 70 dana, a makroskopski obdukcioni nalaz pokazao je diskretne promene na organima.

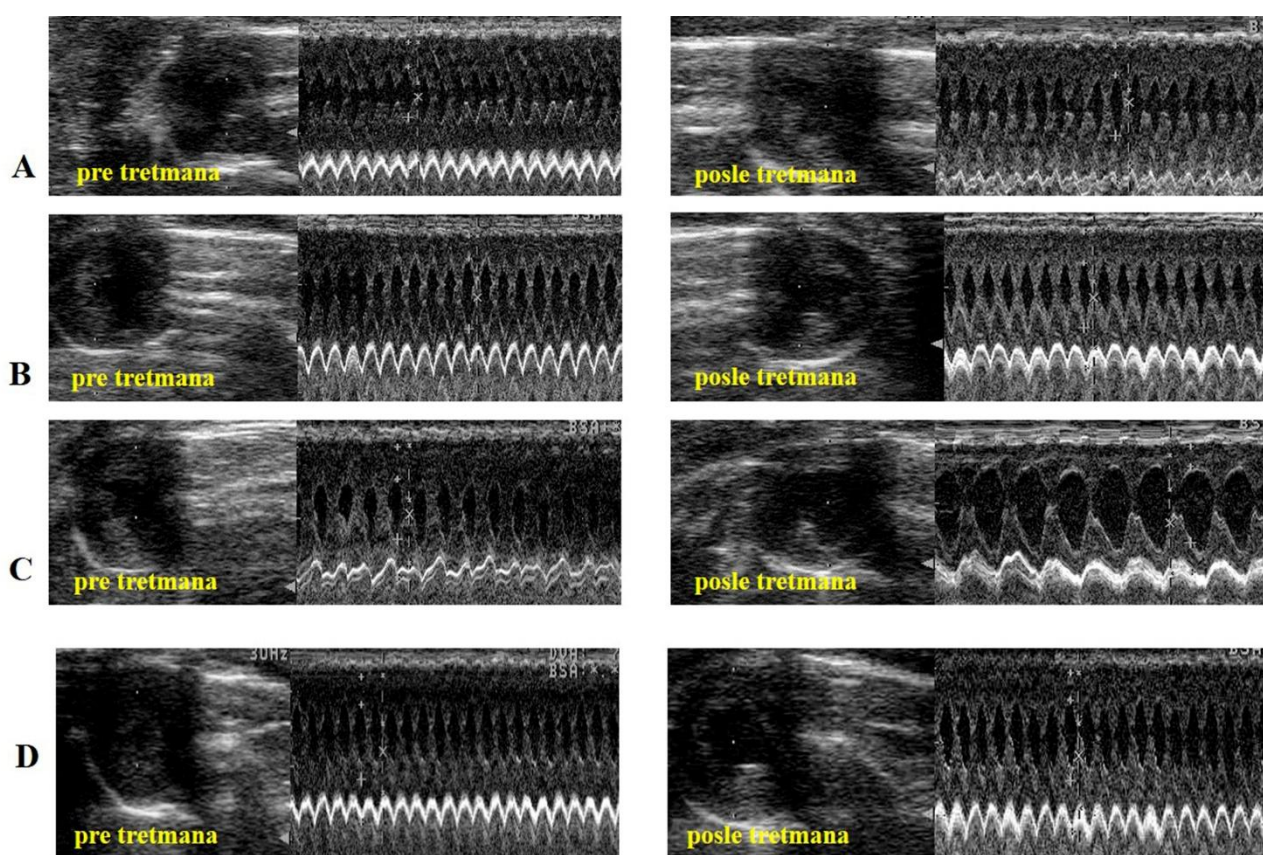


Grafikon 2. Kaplan-Majerova kriva preživljavanja i kriva promene telesne mase kod DOX i DOX+P pacova. Uočava se statistički značajno manja stopa preživljavanja kod DOX-HCM i DOX-DCM pacova (levi panel, $*p < 0,05$ vs. control, *log-rank Mantel-Cox* test) i smanjenje telesne mase tokom vremena, dok su kontrolni i DOX+P pacovi dobijali na masi tokom vremena (desni panel, $*p < 0,05$; ANOVA ponovljenih merenja). control: kontrolna grupa; DOX-HCM: pacovi tretirani doksorubicinom sa hipertrofičnom kardiomiopatijom; DOX-DCM: pacovi tretirani doksorubicinom sa dilatacionom kardiomiopatijom; DOX+P: pacovi tretirani doksorubicinom i paroksetinom.

4.3. Ehokardiografska procena srčane morfologije i funkcije

Ehokardiografski zapisi u B i M modu kod različitih grupa pacova, pre i nakon tretmana, prikazani su na **Slici 15**.

Ehokardiografskim pregledom ustanovljeno je postojanje dva različita fenotipa kardiomiopatije izazvane doksorubicinom: DOX-HCM (n = 11) i DOX-DCM (n = 12). DOX-HCM fenotip okarakterisan je statistički značajno povećanim RWT, a smanjenim LVIDd i EDV_{LV}, u odnosu na vrednost izmerenu pre tretmana, i u odnosu na kontrolnu grupu, dok je EF_{LV} ostala nepromenjena (Tabela 2). DOX-DCM pacovi imali su statistički značajno smanjene PWd, RWT i EF_{LV}, a povećanje LVIDd i EDV_{LV} (**Tabela 2**). DOX+P pacovi pokazali su normalan ehokardiografski nalaz, kao pacovi iz kontrolne grupe (**Tabela 2**).



Slika 15. Ehokardiogrami u B i M modu kontrolnog pacova (A), DOX-HCM pacova (B), DOX-DCM pacova (C) i DOX+P pacova (D). Uočava se da B pacov ima povećanu debljinu zida leve komore, a smanjen lumen komore, dok C pacov ima stanjen zid leve komore, a povećan lumen, u odnosu na dijemetre pre tretmana i dijemetre kontrolnog pacova.

Tabela 2. Ultrazvučni parametri kod pacova tretiranih doksorubicinom i kod pacova tretiranih doksorubicinom i paroksetinom.

parametar	control (n=7)		DOX-HCM (n=11)		DOX-DCM (n=12)		DOX+P (n=11)	
	pre	posle	pre	posle	pre	posle	pre	posle
IVSd (cm)	0.20±0.01	0.20±0.01	0.20±0.00	0.22±0.01	0.20±0.01	0.19±0.01	0.20±0.01	0.19±0.00
IVSs (cm)	0.33±0.01	0.32±0.01	0.32±0.02	0.34±0.01	0.32±0.02	0.32±0.02	0.34±0.01	0.33±0.01
LVIDd (cm)	0.57±0.01	0.56±0.01	0.56±0.02	0.49±0.02^{**†}	0.52±0.02	0.63±0.01^{**†}	0.52±0.01	0.54±0.01
LVIDs (cm)	0.28±0.01	0.27±0.02	0.27±0.01	0.26±0.01	0.26±0.01	0.27±0.02	0.26±0.01	0.25±0.01
PWd (cm)	0.34±0.01	0.35±0.01	0.30±0.02	0.32±0.02	0.31±0.02	0.28±0.01^{††}	0.33±0.01	0.34±0.01
PWs (cm)	0.35±0.01	0.35±0.01	0.35±0.01	0.39±0.01	0.35±0.01	0.37±0.01	0.35±0.01	0.35±0.01
EF_{LV} (%)	94.68±2.00	92.54±1.19	92.33±2.14	93.11±1.39	94.05±1.46	89.48±1.80^{**}	91.74±1.39	91.70±1.05
EDV_{LV} (ml)	0.44±0.02	0.42±0.05	0.39±0.03	0.27±0.03^{**†}	0.36±0.03	0.56±0.04 ^{**†}	0.34±0.02	0.38±0.02
LVMi	4.12±0.11	3.86±0.25	3.90±0.33	4.14±0.43	3.76±0.44	3.51±0.27	3.05±0.14	2.93±0.08
RWT	0.95±0.02	0.98±0.03	0.90±0.05	1.11±0.06^{**}	0.95±0.05	0.72±0.03^{†††}	0.94±0.02	0.91±0.02

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje sedam pacova ± SEM.

*p<0.05; **p<0.01 vs. vrednost pre (Studentov t-test za zavisne uzorke); †p<0.05; ††p<0.01 vs. control (Studentov t-test za nezavisne uzorke).

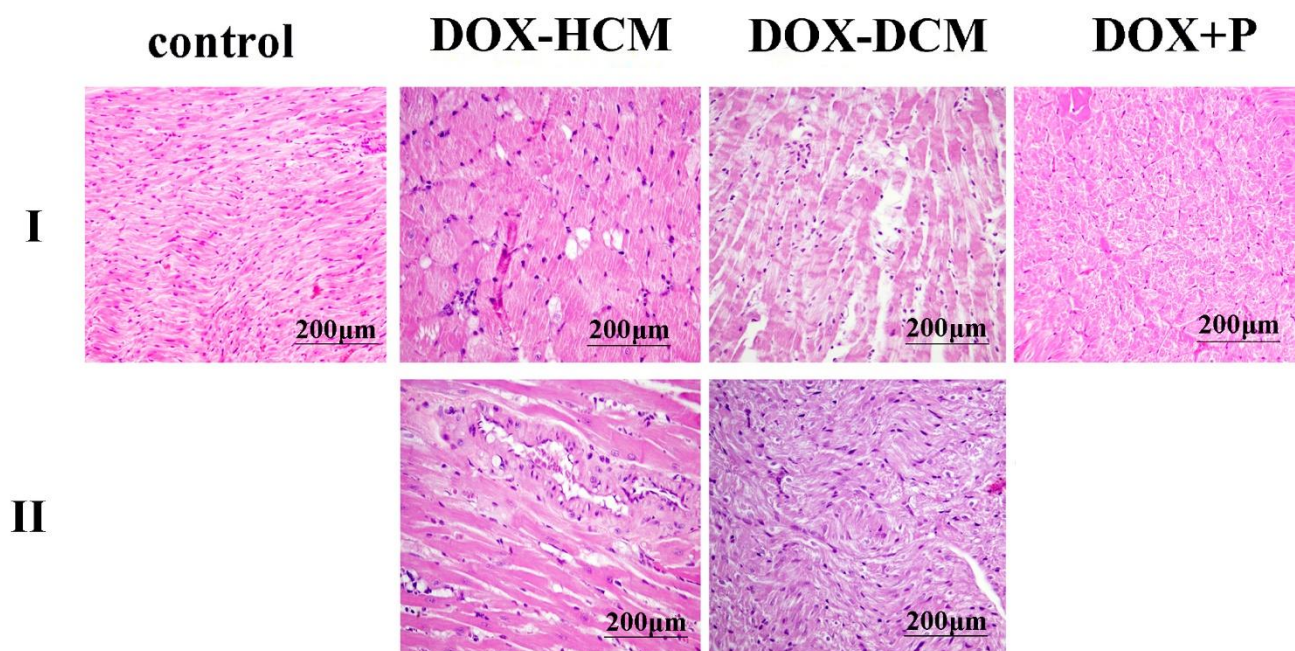
control: kontrolna grupa; DOX-HCM: pacovi tretirani doksorubicinom sa hipertrofičnom kardiomiopatijom; DOX-DCM: pacovi tretirani doksorubicinom sa dilatacionom kardiomiopatijom; DOX+P: pacovi tretirani doksorubicinom i paroksetinom. IVSd: prečnik međukomorskog septuma u dijastoli; IVSs: prečnik međukomorskog septuma u sistoli; LVIDd: unutrašnji prečnik leve komore u dijastoli; LVIDs: unutrašnji prečnik leve komore u sistoli; PWd: debljina zadnjeg zida leve komore u dijastoli; PWs: debljina zadnjeg zida leve komore u sistoli; EF_{LV}: ejectiona frakcija leve komore; EDV_{LV}: volumen krvi leve komore na kraju dijastole; LVMi: indeks mase leve komore; RWT: relativna debljina zida leve komore.

4.4. Patohistološka analiza

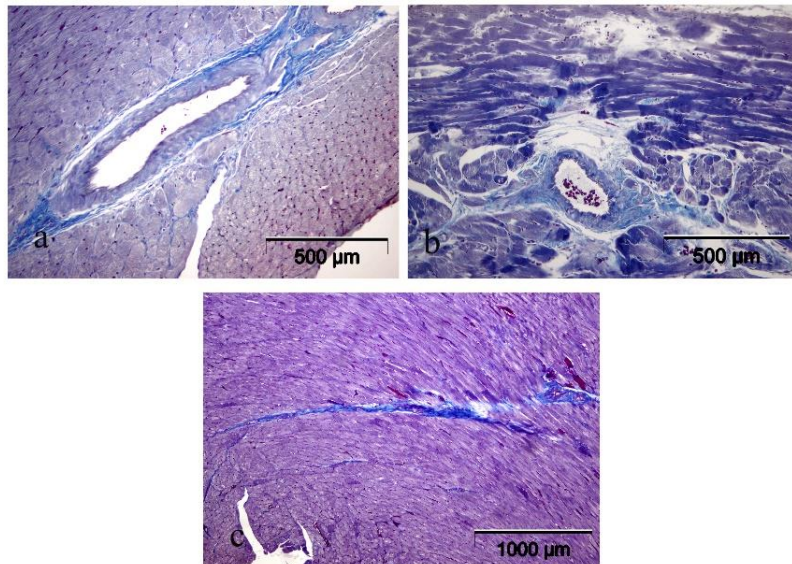
4.4.1. Histoheмиjska bojenja

Kod oba fenotipa doksorubicinske kardiomiopatije, uočene su patohistološke promene srčanog tkiva tipične za doksorubicinsku kardiotoksičnost: gubitak miofibrila, vakuolizacija srčanih ćelija, infiltracija intersticijuma zapaljenskim ćelijama (pretežno makrofagima), leukostaza i nekroza sa kontrakcijskim prugama (engl. *contraction band necrosis*). Pacovi u DOX-DCM grupi imali su izraženije patohistološke promene: nekrozu, apoptozu, inflamaciju i gubitak miofibrila, dok je kod pacova u DOX-HCM grupi dominantna promena bila uvećanje srčanih ćelija i grupisanje jedara u „kutije“ tzv. *car-box nuclei* (Slika 16, kolone DOX-HCM i DOX-DCM). Kod oba fenotipa doksorubicinske kardiomiopatije, uočena je perivaskularna i intersticijalna fibroza (Slika 17).

Kod DOX+P pacova dominantne promene bile su hronične degenerativne promene srčanog tkiva: izmenjen izgled srčanih mišićnih ćelija, vakuolizirana mišićna vlakna i zamena srčanog mišićnog tkiva poljima vezivnog i masnog tkiva (Slika 16, kolona DOX+P). Nekroze sa kontrakcijskim prugama uočene su kod dva od jedanest DOX+P pacova, dok su tri DOX+P pacova imala perivaskularnu fibrozu.

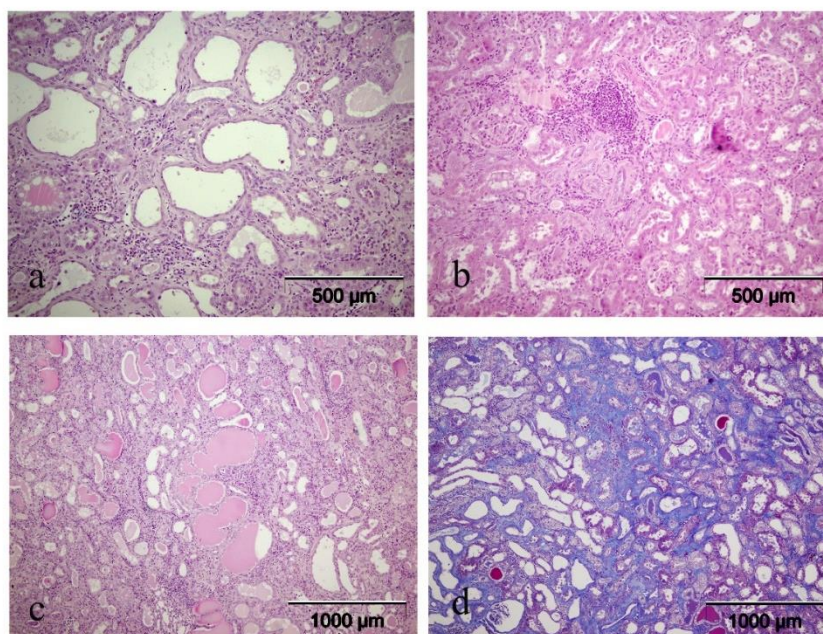


Slika 16. Srčano mišićno tkivo kod DOX i DOX+P pacova. control: zdravo tkivo srca; HE; 40x uveličanje; DOX-HCM: vakuolarna degeneracija kardiomiocita; HE, 40x uveličanje (I), perivaskularna fibroza i penaste ćelije u arterijskom zidu; HE, 40x uveličanje (II); DOX-DCM: nekroza sa kontrakcijskim prugama; HE; 40x uveličanje (I), atenuacija kardiomiocita i gubitak normalne tkivne strukture; HE, 40x uveličanje (II); DOX+P: degeneracija srčanih mišićnih ćelija; HE, 40x uveličanje (I). control: kontrolna grupa; DOX-HCM: pacovi tretirani doksorubicinom sa hipertrofičnom kardiomiopatijom; DOX-DCM: pacovi tretirani doksorubicinom sa dilatacionom kardiomiopatijom; DOX+P: pacovi tretirani doksorubicinom i paroksetinom.

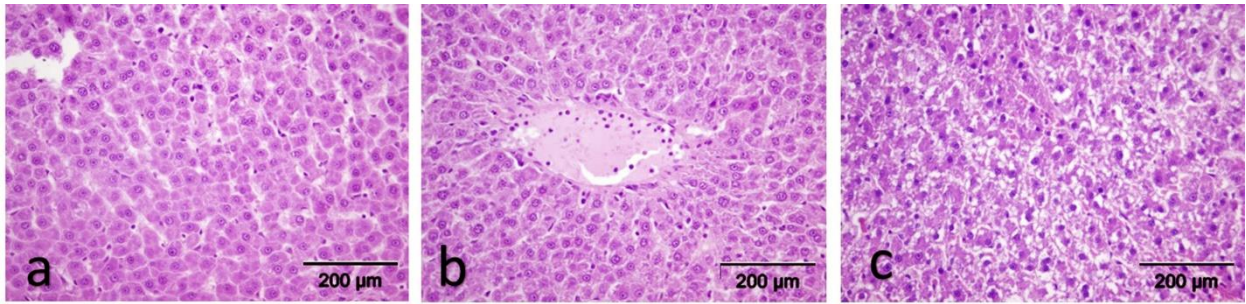


Slika 17. Srčano mišićno tkivo kod DOX pacova (Mason trihrom bojenje). a: perivaskularna fibroza, 20x uveličanje; b: nekroze kardiomiocita, 20x uveličanje; c: intersticijalna fibroza, 10x uveličanje.

Na patohistološkim presecima tkiva bubrega, kod DOX pacova uočavaju se hronični pijelonefritis sa infiltratima u intersticijumu, dilatacija proksimalnih bubrežnih tubula sa proteinskim depozitima i periglomerularna fibroza (**Slika 18**). Dominantne promene tkiva jetre kod pacova tretiranih doksorubicinom bile su inflamacija portnih prostora, masna promena i venski zastoj (**Slika 19**).

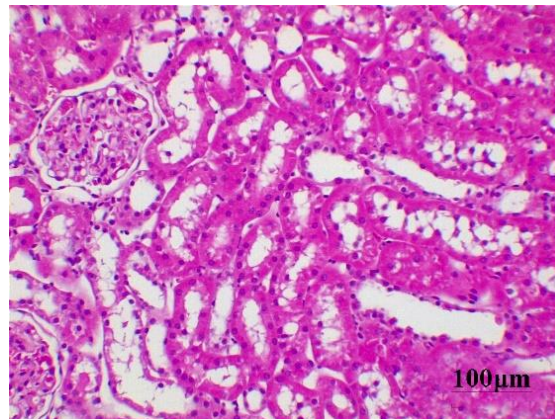


Slika 18. Tkivo bubrega kod DOX pacova. a: dilatacija proksimalnih tubula bubrega sa gubitkom četkastog pokrova; HE, 20x uveličanje; b: hronično zapaljenje bubrežnog tkiva sa mononuklearnim infiltratom; HE, 20x uveličanje; c: proteinski depoziti u bubrežnim tubulima; HE, 10x uveličanje; d: fibroza intersticijuma; Mason Trihrom, 10x uveličanje.

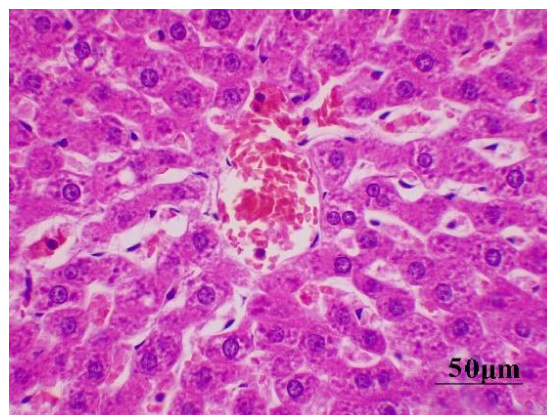


Slika 19. Tkivo jetre kod DOX pacova. a: proliferacija mononuklearnih fagocita – Kupferove ćelije; HE, 40x uveličanje; b: venski zastoj; HE, 40x uveličanje; c: krupnokapljčasta i sitnokapljčasta masna promena; HE, 40x uveličanje

Kod DOX+P pacova, uočena su ograničena polja dilatiranih proksimalnih bubrežnih tubula (**Slika 20**), kao i masna promena i venski zastoj u tkivu jetre (**Slika 21**).



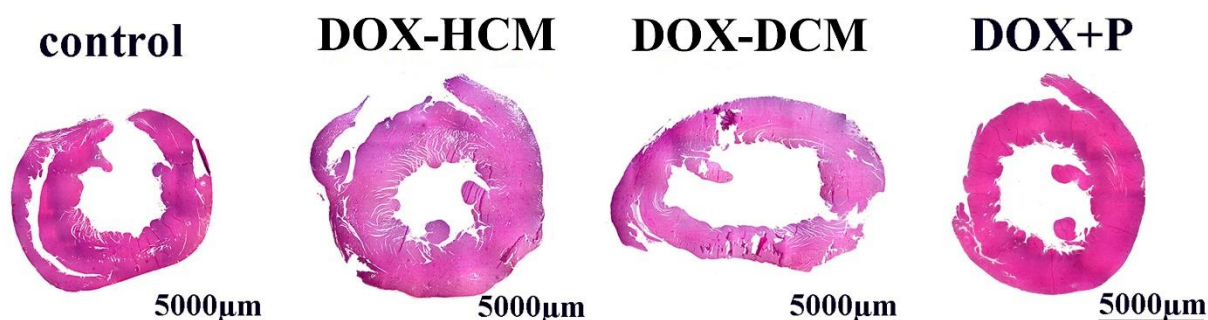
Slika 20. Dilatacija proksimalnih bubrežnih tubula kod DOX+P pacova. HE, 20x uveličanje.



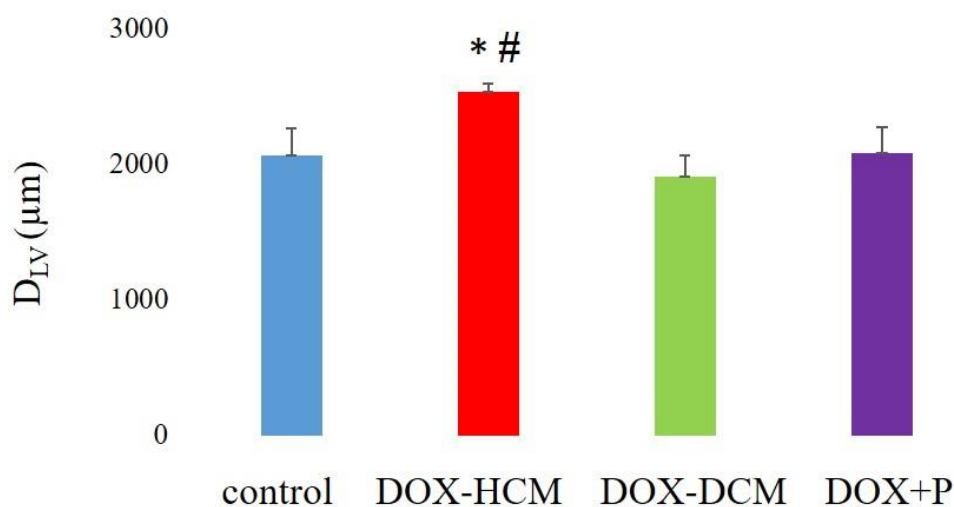
Slika 21. Venski zastoj u tkivu jetre kod DOX+P pacova. HE, 40x uveličanje.

4.4.2. Histomorfometrija

Mikrofotografije poprečnog preseka srca prikazane su na **Slici 22**. D_{LV} bio je statistički značajno veći kod DOX-HCM pacova, u odnosu na kontrolne pacove i pacove iz DOX-DCM grupe (**Grafikon 3**).



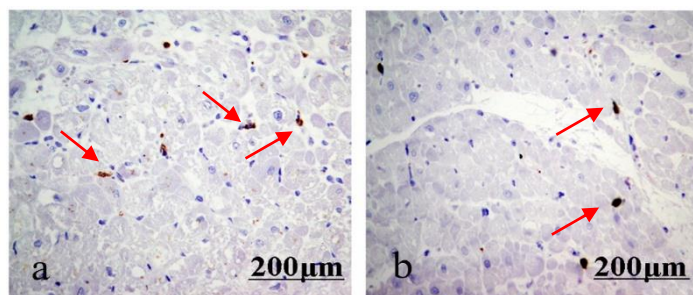
Slika 22. Poprečni presek tkiva srca. HE, mikrofotografije snimljene na 4x uveličanju i spojene u jednu sliku za svaki histološki presek. control: kontrolna grupa; DOX-HCM: pacovi tretirani doksorubicinom sa hipertrofičnom kardiomiopatijom; DOX-DCM: pacovi tretirani doksorubicinom sa dilatacionom kardiomiopatijom; DOX+P: pacovi tretirani doksorubicinom i paroksetinom.



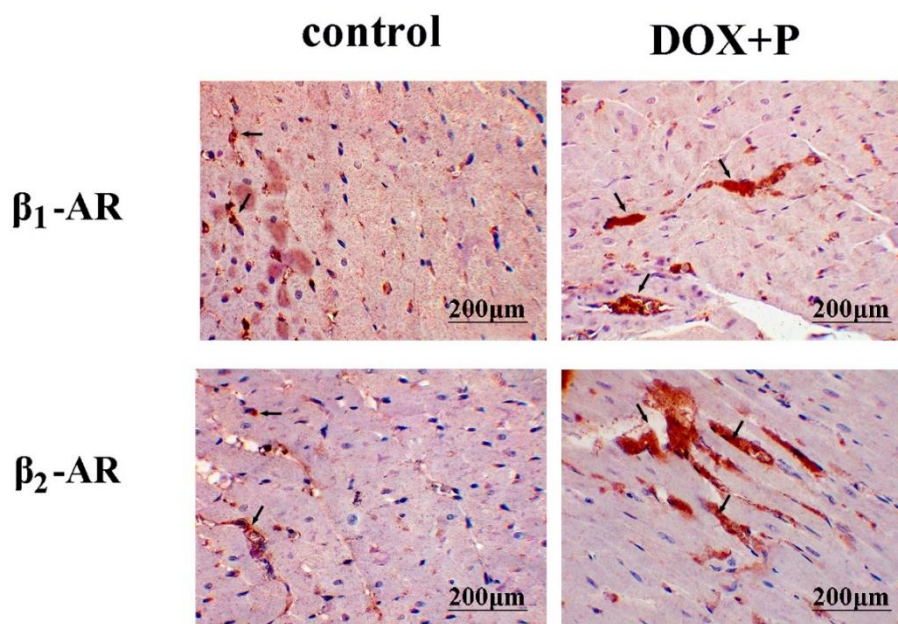
Grafikon 3. Morfometrijski D_{LV} kod DOX i DOX+P pacova. D_{LV} : srednji dijametar zida leve komore srca; control: kontrolna grupa; DOX-HCM: pacovi tretirani doksorubicinom sa hipertrofičnom kardiomiopatijom; DOX-DCM: pacovi tretirani doksorubicinom sa dilatacionom kardiomiopatijom; DOX+P: pacovi tretirani doksorubicinom i paroksetinom. * $p < 0,05$ vs. control; # $p < 0,05$ vs. DOX-DCM (*One-way ANOVA*, praćena *Tukey post hoc* testom).

4.4.3. Imunohistohemijska bojenja

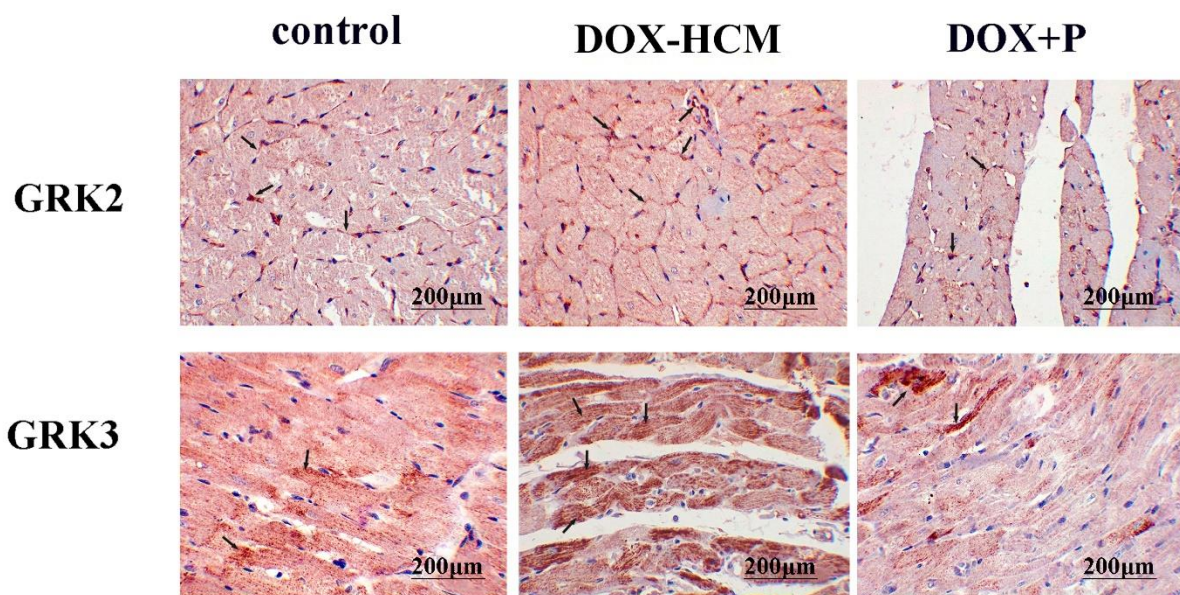
Imunohistohemijskim bojenjem srčanog tkiva na LCA i CD68 kod DOX pacova, registrovani su pojedinačni LCA⁺ leukociti i intersticijalni CD68⁺ makrofagi (**Slika 23**). Imunohistohemijska detekcija β_1 -AR i β_2 -AR u srčanom tkivu, pokazala je povećanu imunoreaktivnost kod DOX+P pacova (**Slika 24**). Kod DOX-HCM pacova, imunohistohemijsko bojenje isečaka srčanog tkiva, pokazalo je veće regione GRK2 i GRK3 imunopozitivnosti, u odnosu na kontrolnu i DOX+P grupu pacova (**Slika 25**).



Slika 23. Reprezentativne fotomikrografije imunohistohemijskog bojenja CD68 (a) i LCA (b) u srčanom tkivu kod pacova tretiranog doksorubicinom. a: intersticijalni CD68⁺ makrofagi u srčanom tkivu; imunohistohemijsko bojenje, 40x uveličanje; b: retki LCA⁺ u srčanom tkivu; imunohistohemijsko bojenje, 40x uveličanje.



Slika 24. Reprezentativne fotomikrografije imunohistohemijskog bojenja β_1 -AR i β_2 -AR u srčanom tkivu. Uočava se povećana imunoreaktivnost kod DOX+P pacova; imunohistohemijsko bojenje, 40x uveličanje. β -AR: beta-adrenergički receptor; control: kontrolna grupa; DOX+P: pacovi tretirani doksorubicinom i paroksetinom.

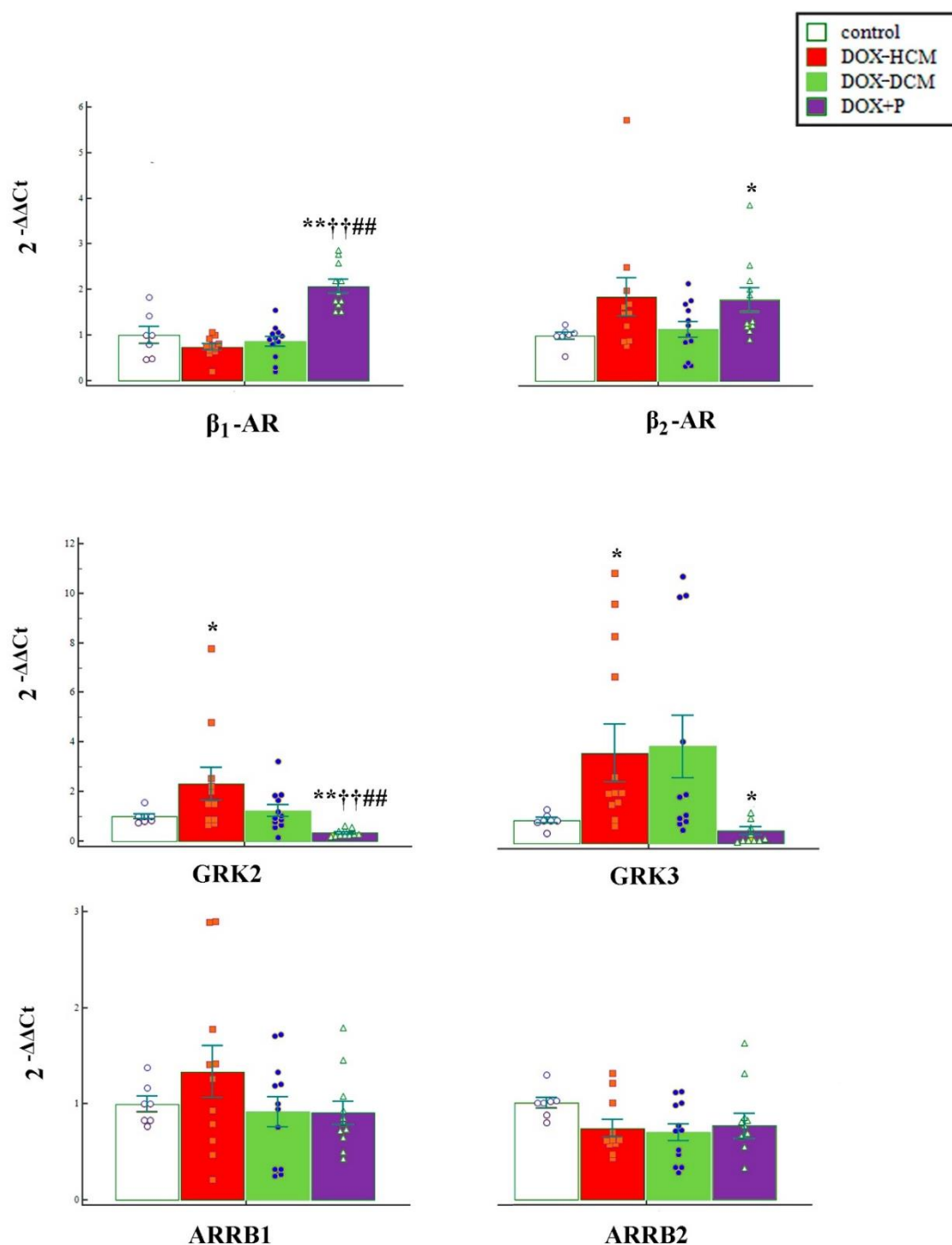


Slika 25. Reprezentativne fotomikrografije imunohistochemijskog bojenja GRK2 i GRK3 u srčanom tkivu. Uočava se povećana imunoreaktivnost kod DOX-HCM pacova, a smanjena kod DOX+P pacova; imunohistochemijsko bojenje, 40x uveličanje. GRK: kinaza G protein-spregnutog receptora; control: kontrolna grupa; DOX-HCM: pacovi tretirani doksorubicinom sa hipertrofičnom kardiomiopatijom; DOX-DCM: pacovi tretirani doksorubicinom sa dilatacionom kardiomiopatijom; DOX+P: pacovi tretirani doksorubicinom i paroksetinom.

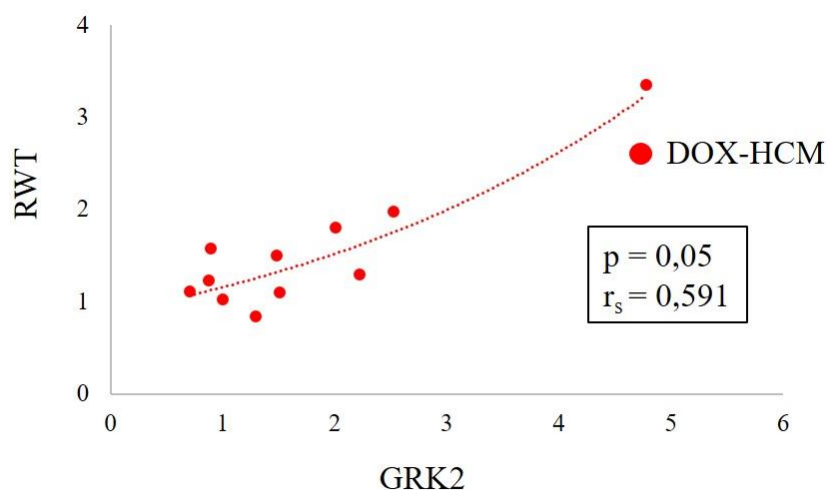
4.5. Genska ekspresija β_1 -AR, β_2 -AR, GRK2, GRK3, ARRB1 i ARRB2 u srčanom tkivu

U DOX-DCM grupi pacova nije bilo statistički značajnih promena u srčanoj ekspresiji gena za β_1 -AR, β_2 -AR, GRK2, GRK3, ARRB1 i ARRB2 (**Grafikon 4**). Tendencija smanjenja ekspresije β_1 -AR, a povećanja β_2 -AR zabeležena kod svih pacova tretiranih doksorubicinom, nije statistički značajno promenila njihov odnos ($p > 0,05$; *Kruskal-Wallis ANOVA* praćena *Mann-Whitney U* testom; nije prikazano na grafikonu). GRK2 i GRK3 bili su povećano ekspimirani samo kod DOX-HCM pacova (**Grafikon 4**). Kod DOX+P pacova, genska ekspresija β_1 -AR i β_2 -AR bila je statistički značajno povećana, dok je ekspresija GRK2 i GRK3 bila statistički značajno smanjena (**Grafikon 4**).

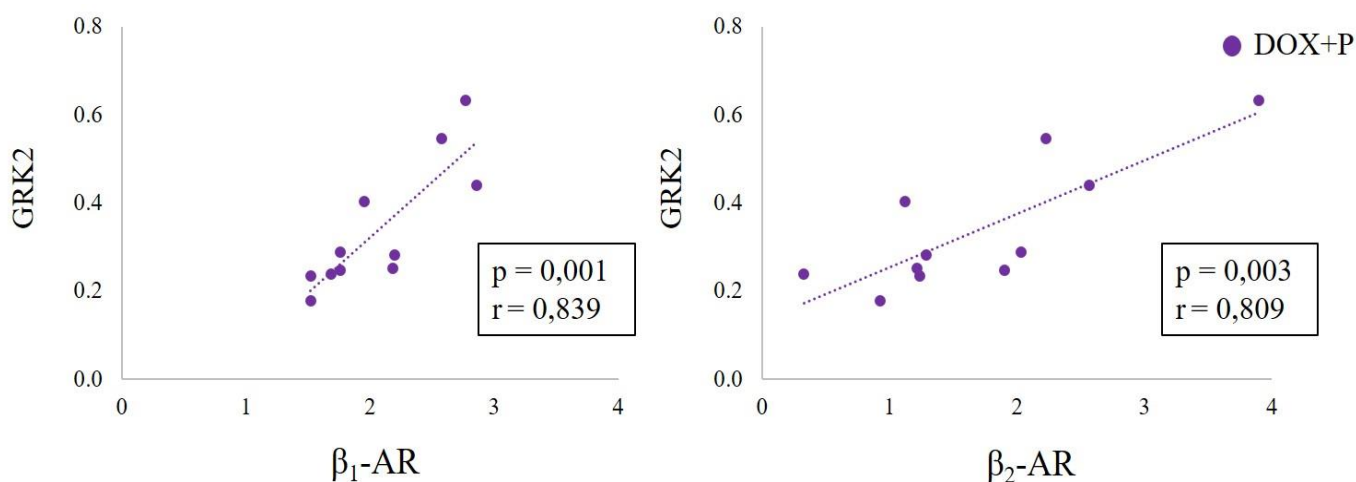
Uočena je pozitivna povezanost između ekspresije GRK2 i RWT kod DOX-HCM pacova (**Grafikon 5**). Kod DOX+P pacova postojala je snažna pozitivna povezanost između ekspresije β_1 -AR i ekspresije GRK2, kao i između ekspresije β_2 -AR i ekspresije GRK2 (**Grafikon 6**).



Grafikon 4. Relativna mRNA ekspresija β_1 -AR, β_2 -AR, GRK2, GRK3, ARRB1 i ARRB2 u srčanom tkivu kod DOX i DOX+P pacova. Uočava se statistički značajno povećanje ekspresije GRK2 i GRK3 kod DOX-HCM pacova, statistički značajno povećanje ekspresije β_1 -AR i β_2 -AR, a smanjenje ekspresije GRK2 i GRK3 kod DOX+P pacova (*p < 0,05; **p < 0,01 vs. control group; †p < 0,05; ††p < 0,01 vs. DOX-HCM; #p < 0,05; ##p < 0,01 vs. DOX-DCM (One-way ANOVA, praćena Tukey post hoc testom ili Kruskal-Wallis ANOVA praćena Mann-Whitney U testom)). control: kontrolna grupa; DOX-HCM: pacovi tretirani doksorubicinom sa hipertrofičnom kardiomiopatijom; DOX-DCM: pacovi tretirani doksorubicinom sa dilatacionom kardiomiopatijom; DOX+P: pacovi tretirani doksorubicinom i paroksetinom; β -AR: beta-adrenergički receptor; GRK: kinaza G protein-spregnutog receptora; ARRB: beta arestin.



Grafikon 5. Povezanost između genske ekspresije GRK2 i RWT kod DOX-HCM pacova. RWT: relativna debljina zida leve komore; GRK: kinaza G protein-spregnutog receptora; DOX-HCM: pacovi tretirani doksorubicinom sa hipertrofičnom kardiomiopatijom; r_s : Spirmanov koeficijent korelacije.



Grafikon 6. Linearna povezanost između genske ekspresije β_1 -AR i GRK2 (levo) i β_2 -AR i GRK2 (desno) kod DOX+P pacova. β -AR: beta-adrenergički receptor; GRK: kinaza G protein-spregnutog receptora; DOX+P: pacovi tretirani doksorubicinom i paroksetinom; r: Pirsonov koeficijent korelacije.

5. DISKUSIJA

Glavni nalaz ovog istraživanja je da paroksetin smanjuje kardiotoksične efekte doksorubicina i povećava preživljavanje eksperimentalnih životinja mehanizmom različitim od selektivne inhibicije preuzimanja serotonina, koja je u osnovi njegovog antidepresivnog dejstva. Ovo otvara mogućnost primene paroksetina kod onkoloških pacijenata, koji su na terapiji velikim dozama doksorubicina. DOX+P pacovi bili su značajno boljeg opšteg stanja i povećanog preživljavanja, zbog manje izraženih toksičnih oštećenja organa i očuvane morfologije i kontraktilne funkcije leve komore srca. RT-qPCR i imunohistohemijska analiza srčanog tkiva DOX+P pacova, pokazale su po prvi put nishodnu regulaciju i smanjenu sintezu kinaza β -AR (GRK2 i GRK3), a ushodnu regulaciju i povećanu sintezu β_1 -AR i β_2 -AR, ukazujući na moguće mehanizme u osnovi kardioprotektivnog efekta paroksetina. S druge strane, povećana genska i proteinska ekspresija GRK2 i GRK3 detektovana je samo kod DOX-HCM pacova, sugerišući potencijalnu ulogu ovih kinaza u nastanku srčane hipertrofije.

U ovoj studiji, doksorubicin je primenjen kod mužjaka *Wistar* pacova intravenskim putem u pojedinačnoj, udarnoj dozi od 5mg/kg. Ovaj eksperimentalni model doksorubicinske kardiomiopatije preuzet je iz literature (Duncan i saradnici, 1998; Rasmussen i saradnici, 1989), a u našoj laboratoriji potvrđeno je da je odgovarajući, u smislu karakterističnih ehokardiografskih i histopatoloških promena srca (Cheah i saradnici, 2017), kao i po pitanju sličnosti sa doksorubicinskom kardiomiopatijom kod ljudi (Nebigil i D'esaubry, 2018). Doksorubicin nismo aplikovali intraperitonealnim putem, sa ciljem da izazovemo kardiotoksičnost, iako su mnogi autori to činili (Merlet i saradnici, 2013; Teraoka i saradnici, 2000). Razlog su ozbiljni neželjeni efekti intraperitonealne primene doksorubicina: masivna akumulacija tečnosti u trbušnoj duplji (ascites) i direktno oštećenje peritoneuma (Vasić i saradnici, 2019). Takođe, pojedinačna doza doksorubicina 3 – 9 mg/kg primenjena intraarterijalnim putem pacovima sa adenokarcinomom pljuvačne žlezde ispoljavala je antitumorske efekte (Napoli i saradnici, 1992). U onkološkoj praksi, doksorubicin se najčešće primenjuje intravenski i pokazano je da je incidenca kardiotoksičnosti mala, za doze doksorubicina ispod 550 mg/m² (Nebigil i D'esaubry, 2018). Iz ovih istraživanja možemo zaključiti da su kardiotoksične doze doksorubicina istovremeno klinički efikasne i ispoljavaju antitumorsko dejstvo, dok obrnuto ne važi.

Svi pacovi tretirani doksorubicinom pokazali su pogoršanje opšteg stanja, progresivno smanjenje telesne mase i malu stopu preživljavanja, što je u skladu sa nalazima različitih istraživanja (Vasić i saradnici, 2019; Cheah i saradnici, 2017; Kenk i saradnici, 2010). Izraženi znaci intoksikacije obuhvatali su oštećeni dlačni pokrivač, eksudat oko očiju, smanjenu spontanu motornu aktivnost, tigmotaksiju (provođenje vremena u ćoškovima kaveza) i kaheksiju. Nekoliko istraživanja pokazalo je pogoršanje lokomotorne aktivnosti i smanjenje istraživačkog ponašanja pacova već 72h nakon primene doksorubicina (Aziriova i saradnici, 2014; Merzoug i saradnici, 2011). Bihevioralnim testovima pokazano je da su pacovi manje vremena provodili u centralnoj zoni otvorenog polja, na otvorenim kracima uzdignutog plus lavirinta, kao i u svetlom delu svetlo/tamne kutije, što ukazuje na povećanu anksioznost (Aziriova i saradnici, 2014). Opšte stanje DOX+P pacova bilo je dobro, bez simptoma i znakova intoksikacije opasne po život. Ovi pacovi su tokom perioda praćenja dobijali na telesnoj masi, a medijana preživljavanja bila je ista kao kod pacova iz kontrolne grupe.

Ehokardiografija, koja predstavlja zlatni standard za procenu srčane morfologije i funkcije u eksperimentalnoj i kliničkoj praksi (Oh, 2007), otkrila je u ovom istraživanju postojanje dve različite kliničke prezentacije doksorubicinske kardiomiopatije, sa gotovo jednakom učestalošću i preživljavanjem: DOX-HCM (n = 11) i DOX-DCM (n = 12). Ovaj nalaz je u skladu sa našim istraživanjem iz 2021. godine (Pajović i saradnici, 2021). Kod DOX-HCM pacova ehokardiografskim pregledom ustanovljeno je zadebljanje zida leve komore i pad EDV_{LV}, dok je EF_{LV} ostala očuvana. DOX-DCM pacovi imali su stanjen zid leve komore, značajno povećan EDV_{LV}, a smanjenu EF_{LV} –

promene koje ukazuju na sistolnu disfunkciju srca. U eksperimentalnim studijama doksorubicinske kardiomiopatije kod pacova, sa različitim putevima administracije i različitim režimima doziranja doksorubicina, ehokardiografski pregled rađen je uvek na anestetisanim pacovima i EF_{LV} bila je značajno smanjena (Liu i saradnici, 2016; Merlet i saradnici, 2013) zbog sinergističkih negativno inotropnih efekata anestetika (Stein i saradnici, 2007) i doksorubicina. U ovoj studiji, pregledani su svesni pacovi, sedirani acepromazinom, što objašnjava manji, ali ipak statistički značajan pad EF_{LV} kod DOX-DCM pacova. U kliničkoj praksi, ehokardiografsko praćenje EF_{LV} jedan je od osnovnih pokazatelja srčane disfunkcije (Villani i saradnici, 2006). Međutim, EF_{LV} je neosetljiv parametar u otkrivanju ranih znakova srčanog stresa i oštećenja miokarda (Kang i saradnici, 2017). Kang i saradnici pokazali su da je EF_{LV} ostala u fiziološkom opsegu kod pacova tretiranih doksorubicinom, uprkos povećanim vrednostima serumskog troponina I i lezijama srčanog mišića potvrđenim histopatološkom analizom (Kang i saradnici, 2017). Različite studije pokazale su širok raspon variranja vrednosti EF_{LV} (31 – 90%) u modelima doksorubicinske kardiomiopatije (Georgiadis i saradnici, 2020). Takođe, EF_{LV} nije od značaja u postavljanju dijagnoze dijastolne disfunkcije srca (Migrino i saradnici, 2008), koja često prethodi sistolnoj disfunkciji (Merlet i saradnici, 2013). Većina studija doksorubicinske kardiomiopatije uzima u obzir samo dilatacioni fenotip – sistolnu disfunkciju srcasa značajnim smanjenjem EF_{LV} , iako je kao ravnopravni klinički entitet opisana doksorubicinska kardiomiopatija sa očuvanom EF_{LV} (Ho i saradnici, 2010; Lee i saradnici, 1987). S obzirom da očuvana EF_{LV} ne isključuje disfunkciju srca i da su u ovom istraživanju podjednako loše preživljavanje imali pacovi sa smanjenom EF_{LV} i pacovi sa očuvanom EF_{LV} , odvojeno smo analizirali ova dva fenotipa doksorubicinske kardiomiopatije.

U ovom istraživanju, ehokardiografski nalaz DOX+P pacova nije pokazao odstupanja srčane morfologije i funkcije, u odnosu na kontrolnu grupu. Ehokardiografijom i magnetnom rezonancom pokazano je da paroksetin smanjuje neželjeno remodelovanje leve komore srca nakon infarkta miokarda (Lassen i saradnici, 2017). Srčano remodelovanje definisano je kao skup molekularnih, ćelijskih i intersticijalnih promena, koje menjaju veličinu, masu, geometrijski oblik srca i narušavaju mu funkciju, a nastaju kao rezultat bolesti ili oštećenja srčanog tkiva. Ovaj proces ima lošu prognozu jer dovodi do disfunkcije srca i malignih aritmija (Azevedo i saradnici, 2016). Najčešće korišćene metode za otkrivanje srčanog remodelovanja su ehokardiografija, ventrikulografija i nuklearna magnetna rezonanca (Anand i saradnici, 2002). U studiji Lassen i saradnika, tretman paroksetinom u dozi 20 mg/kg/dan *p.o.* tokom 4 nedelje smanjio je LVIDd, redukovao EDV_{LV} i sprečio dilatacionu kardiomiopatiju kod pacova nakon infarkta miokarda, u poređenju sa kontrolnom grupom (Lassen i saradnici, 2017), u skladu sa našim ehokardiografskim nalazom. Tretman paroksetinom primenom potkožnih osmotskih pumpi u dozi 5 mg/kg/dan, u trajanju od 4 nedelje, smanjio je dimenzije leve komore nakon infarkta miokarda i kod miševa (Schumacher i saradnici, 2015).

Histološkom analizom srca kod DOX-HCM i DOX-DCM pacova ustanovljeni su karakteristični znaci kardiotoksičnosti izazvane doksorubicinom: vakuolizacija kardiomiocita, gubitak miofibrila, nekroza sa kontrakcijskim prugama, leukostaza, perivaskularna i intersticijalna fibroza, u skladu sa prethodnim istraživanjima (Octavia i saradnici, 2012; Takemura i Fujiwara, 2007; Bertinchant i saradnici, 2003). Pokazano je da su polja intersticijalne fibroze široko rasprostranjena, kao i vakuolizirani kardiomiociti (tzv. *Adria* ćelije), dok su područja akutnog oštećenja kardiomiocita ređa (Chatterjee i saradnici, 2010). Imunohistohemijskim bojenjem na CD68 i LCA, potvrdili smo pristustvo makrofaga i retkih limfocita u zapaljenskom infiltratu intersticijuma. Ovaj nalaz je u skladu sa nalazom Kobayashi i saradnika, koji su analizirali sastav zapaljenskog infiltrata u doksorubicinskoj kardiomiopatiji i došli do zaključka da su, u poređenju sa neutrofilima, T i B limfocitima, makrofazi dominantne zapaljenske ćelije (Kobayashi i saradnici, 2016). Smatra se da bi makrofazi u srčanom tkivu zbog produkcije interleukina 10 mogli da ispoljavaju kardioprotektivne efekte u patološkim stanjima poput doksorubicinske kardiomiopatije (Fujiu i saradnici, 2014). Patohistološke promene srčanog tkiva bile su izraženije u DOX-DCM grupi: nekroza srčanih ćelija, inflamacija i gubitak poprečne ispruganosti kardiomiocita. Kod DOX-HCM pacova dominirali su uvećanje kardiomiocita i grupisanje njihovih jedara (engl. *car-box nuclei*), ukazujući na hipertrofiju i povećanu simpatičku

stimulaciju (Pajović i saradnici, 2021). U ovom istraživanju dominantne patohistološke promene kod DOX+P pacova bile su hronične degenerativne promene srčanog tkiva. *Picrosirius* crvenim bojenjem kolagenih vlakana pokazan je manji stepen fibroze srčanog tkiva kod spontano hipertenzivnih pacova tretiranih paroksetinom (Sun i saradnici, 2021).

U ovom eksperimentalnom modelu doksorubicinske kardiomiopatije, bubrezi i jetra bili su umereno oštećeni doksorubicinom, očekivano prema podacima iz literature (Lee i Harris, 2011; Injac i Strukelj, 2008). Međutim, funkcija ovih organa ostala je očuvana, na šta ukazuju fiziološke vrednosti bilirubina, kreatinina, alanin aminotransferaze i aspartat aminotransferaze u našem prethodnom istraživanju (Pajović i saradnici, 2021). Ovo se može smatrati prednošću modela jer nespecifična hepatorenalna kardiotoksičnost nije „ometala“ specifične, kardiotoksične efekte doksorubicina. Iako se ne zna tačan mehanizam doksorubicinskog oštećenja bubrega, smatra se da glavnu ulogu imaju oksidativni stres i lipidna peroksidacija. To dovodi do dilatacije proksimalnih bubrežnih tubula sa proteinskim depozitima i periglomerularne fibroze (Giri i saradnici, 2004). Oksidativni stres je glavni medijator i hepatotoksičnosti izazvane doksorubicinom (Yagmurca i saradnici, 2007). U jetri se doksorubicin metaboliše do doksorubicinola i drugih citotoksičnih metabolita (Ballet i saradnici 1987). U našem istraživanju, dominantne promene tkiva jetre kod pacova tretiranih doksorubicinom bile su inflamacija portnih prostora, masna promena i venski zastoj. Kod DOX+P pacova, uočena su ograničena polja dilatiranih proksimalnih bubrežnih tubula, kao i masna promena i venski zastoj u tkivu jetre, u skladu sa patohistološkim nalazom kod miševa tretiranih paroksetinom (Dethloff i saradnici, 2020). U eksperimentalnom istraživanju na pacovima tretiranim paroksetinom u dozi od 7,5 mg/kg obdukcioni nalaz pokazao je diskoloracije bubrega i jetre, kao i naglašene konture režnjeva jetre (Konkle i Bielajew, 1999).

U ovom eksperimentalnom modelu doksorubicinske kardiomiopatije kod pacova, genska ekspresija β_1 -AR i β_2 -AR kod DOX-HCM i DOX-DCM pacova nije bila promenjena, potvrđujući nalaz o neizmenjenoj gustini β -AR iz istraživanja *Robison* i *Girija* (Robison i Giri, 1986). Model *Robison* i *Girija* podrazumevao je subkutanu primenu 2 mg/kg doksorubicina nedeljno, tokom 13 nedelja. Iako se u njemu gustina β -AR nije promenila, pokazan je smanjen afinitet β -AR za kateholamine, što dovodi do smanjene kontraktilne funkcije srca (Robison i Giri, 1986). Od ovog istraživanja, publikovano je nekoliko oprečnih rezultata ekspresije β_1 -AR i β_2 -AR u doksorubicinskoj kardiomiopatiji, što se makar delom može objasniti razlikama u korišćenim eksperimentalnim životinjama, dozi doksorubicina, doznom režimu i načinu aplikacije. Studija na *Sprague-Dawley* pacovima tretiranim sa 6 intraperitonealnih injekcija u dozi 2,5 mg/kg doksorubicina, pokazala je povećanu proteinsku ekspresiju β_2 -AR 35. dana nakon prve doksorubicinske injekcije, dok je proteinska ekspresija β_1 -AR bila smanjena i 35. i 70. dana nakon prve doksorubicinske injekcije. Međutim, funkcija β_1 -AR u ranoj fazi doksorubicinske kardiomiopatije ostala je očuvana, što se može objasniti nepromenjenom ekspresijom $G_s\alpha$ i povećanom ekspresijom adenilat-ciklaze (Merlet i saradnici, 2013). U našem ranijem istraživanju na intraperitonealnom modelu doksorubicinske kardiomiopatije kod pacova *Wistar* soja, izmerili smo povećanje genske ekspresije β_1 -AR i nepromenjenu ekspresiju β_2 -AR 35. dana nakon aplikacije doksorubicina, ali nismo merili ekspresiju na nivou proteina (Vasić i saradnici, 2019).

Kod DOX-DCM pacova nismo uočili promene u genskoj ekspresiji molekula uključenih u proces nishodne regulacije β -AR: GRK2, GRK3, ARRB1 i ARRB2. Zanimljivo je da je genska ekspresija i imunoreaktivnost GRK2 i GRK3 u srčanom tkivu bila povećana samo kod DOX-HCM pacova. S obzirom da ovi pacovi nisu razvili srčanu dekompenzaciju (očuvana EF_{LV}), možemo pretpostaviti da ovaj porast GRK2 genske ekspresije i sinteze nije povezan sa maladaptivnom nishodnom regulacijom β -AR. S druge strane, važno otkriće *Schlegel* i saradnika ukazuje na nekanonsku ulogu GRK2 u nastanku srčane hipertrofije kod miševa sa transverzalnom konstrikcijom aorte. Naime, miševi sa delecijom gena za GRK2 (*GRK2 nokaut* miševi) imali su očuvanu geometriju srčanih komora 6 nedelja nakon konstrikcije aorte, u poređenju sa miševima divljeg soja (*Schlegel* i saradnici, 2017). U ovom istraživanju pokazano je da GRK2-PI3K γ posreduje u fosforilaciji protein

kinaze B (Akt) i naknadnoj inaktivaciji glikogen sintaze kinaze-3 β (engl. *glycogen synthase kinase-3* – GSK3), što potencira aktivnost ključnog hipertrofičnog faktora- nuklearni faktor aktiviranih T ćelija (engl. *nuclear factor of activated T-cells* – NFAT) (Schlegel i saradnici, 2017). Dodatno, važno otkriće je da PI3K γ i Akt mogu biti aktivirani nezavisno od ARRB (Mehta i Griendling, 2007). Zbog rezultata ovih studija, čini se logičnim predložiti da u našim eksperimentima povećana ekspresija gena i povećana sinteza GRK2 doprinose hipertrofiji srca preko sličnih unutarćelijskih signalnih puteva. Ovome u prilog ide i postojanje snažne pozitivne korelacije između ekspresije GRK2 i RWT kod DOX-HCM pacova, uočene u ovom istraživanju. Pošto hipertrofija srca obično prethodi srčanoj insuficijenciji, rana inhibicija relevantnih signalnih molekula mogla bi da spreči napredovanje bolesti. Sa tim u vezi, GRK2 se nameće kao nova obećavajuća meta u terapiji srčane hipertrofije (Schlegel i saradnici, 2017). Tačne uloge GRK3 u srcu i dalje su nejasne (Vinge i saradnici, 2008). Izgleda da GRK3, u odnosu na GRK2, ima veći afinitet za endotelinske receptore i alfa-adrenergički receptor 1 (α_1 -AR), što ovu kinazu čini primarnim regulatorom signalnih puteva rasta i preživljavanja kardiomiocita (Eckhart i saradnici, 2000). Takođe, pokazano je da povećana ekspresija GRK3 u srčanom tkivu nije menjala normalnu biohemijsku β -AR signalizuju, a *in vivo* hemodinamska funkcija, kao odgovor na agoniste β -AR, nije se razlikovala u odnosu na kontrolne netransgene životinje (Iaccarino i saradnici, 1998). Povećana ekspresija GRK3 kod DOX-HCM pacova u ovom istraživanju, mogla bi da ukaže na potencijalnu ulogu GRK3 u signalnim putevima rasta kardiomiocita, nezavisnim od β -AR.

Novo otkriće ove studije je da paroksetin povećava gensku ekspresiju i sintezu β_1 -AR i β_2 -AR u srčanom tkivu pacova tretiranih doksorubicinom, što nije pokazano kod pacova tretiranih samo paroksetinom. Ovaj efekat bi mogao biti posledica simpatolitičkog efekta paroksetina u patofiziološkim uslovima poput doksorubicinske kardiomiopatije, koje karakteriše povećana aktivnost simpatikusa (van Melle i saradnici, 2004; McFarlane i saradnici, 2001). U ovim okolnostima, povećana ekspresija i sinteza β_1 -AR i β_2 -AR pod uticajem paroksetina, mogle bi predstavljati zaštitni mehanizam protiv maladaptivne desenzitizacije β_1 -AR i osnov očuvanja kontraktilne rezerve leve komore srca. Pokazano je da paroksetin u dozi 5mg/kg/dan *p.o.* smanjuje cirkulišuće nivoe kateholamina, renina i aldosterona kod spontano hipertenzivnih pacova, kao i da povećava odgovor β -AR na kateholamine (Sun i saradnici, 2021). Neuroendokrina modulacija postala je osnov farmakološke terapije hroničnih kardiovaskularnih oboljenja jer dovodi do značajnog smanjenja morbiditeta i mortaliteta (Bucciarelli i saradnici, 2020). Zbog toga je efekat paroksetina u zaštiti organa, smanjenjem nivoa cirkulišućih kateholamina kod pacijenata sa hipertenzijom, neuroendokrina modulacija bolesti i mnogo više od proste kontrole krvnog pritiska (Sun i saradnici, 2021). Tretman paroksetinom, ali ne i srodnim lekom fluoksetinom, preko osmotskih potkožnih pumpi, u dozi od 5mg/kg, tokom 4 nedelje, smanjio je nivo kateholamina u plazmi kod miševa, nakon infarkta miokarda. Štaviše, kateholamini u plazmi ostali su male koncentracije 2 nedelje nakon prestanka tretmana paroksetinom, a inotropna rezerva posredovana β -AR ostala je očuvana (Schumacher i saradnici, 2015).

Još jedno važno otkriće u ovom istraživanju je da paroksetin smanjuje gensku ekspresiju i sintezu GRK2 i GRK3 kod pacova tretiranih doksorubicinom. Ova nishodna regulacija kinaza β -AR mogla bi imati povoljne efekte na doksorubicinsku kardiomiopatiju iz najmanje dva razloga: sprečavanjem maladaptivne desenzitizacije β -AR i posledičnim očuvanjem srčane inotropne rezerve (Thal i saradnici, 2012) i sprečavanjem porasta NFAT-a i nastanka hipertrofije srca (Schlegel i saradnici, 2017). Pored toga, pokazano je da paroksetin smanjuje ekspresiju gena za srčani marker hipertrofije – miozinski teški lanac 7 (engl. *myosin heavy chain 7* – MYH7) i gena za markere fibroze poput faktora rasta vezivnog tkiva (engl. *connective tissue growth factor* – CTGF) i kolagena I (Sun i saradnici, 2021). Svi ovi efekti paroksetina verovatno deluju zajedno kako bi smanjili patološko preoblikovanje srca pod uticajem doksorubicina. Desenzitizacija β -AR odavno je prepoznata kao faktor koji doprinosi progresiji različitih patoloških stanja (Sato i saradnici, 2015). U srčanoj insuficijenciji, smanjenje kontraktilne snage srca, dovodi do kompenzatornog povećanja nivoa kateholamina, što dalje uslovljava deseizitizaciju β -AR i gubitak inotropne rezerve srca (Eschenhagen,

2008). Proces funkcionalnog odvajanja β -AR od G proteina poklapa se sa porastom GRK2 na genskom i proteinskom nivou (Ungerer i saradnici, 1983). Pokazano je da paroksetin, kao direktni GRK2 inhibitor, blokira fosforilaciju β -AR, regrutovanje ARRB i posledičnu internalizaciju receptora, što ima povoljne efekte na očuvanje kontraktilne snage srca (Guo i saradnici, 2017). Izolovani kardiomiociti imali su povećanu amplitudu kontrakcije i izoproterenolom-indukovano skraćanje u prisustvu paroksetina, a tretman paroksetinom pre davanja izoproterenola, značajno je povećao inotropnu rezervu leve komore srca miševa *in vivo* (Thal i saradnici, 2012). S obzirom da paroksetin utiče na desenzitizaciju β -AR, moglo bi se pretpostaviti da postoji interakcija između paroksetina i antagonista β -AR, koji imaju vodeći značaj u terapiji doksorubicinske kardiomiopatije (Octavia i saradnici, 2012). Studije su pokazale da, među pacijentima sa srčanom insuficijencijom i hipertenzijom, postoje oni koji reaguju na terapiju antagonistima β -AR i oni koji ne reaguju na istu terapiju (Márquez i saradnici, 2007; Feely i saradnici, 1981). Potvrđeno je da polimorfizam gena za β_1 -AR utiče na signalizaciju GPCR, koju pokreću agonisti (Mason i saradnici, 1999). Kako GRK2 olakšava internalizaciju β -AR okupiranih kateholaminima, može dovesti do slabijeg odgovora kardiomiocita na antagoniste β -AR, kao što je metoprolol. Paroksetin kao GRK2 inhibitor, smanjenjem internalizacije β -AR, stabilizuje i poboljšava njihovu aktivnost i time terapijski efekat antagonista β -AR kod osoba sa smanjenom osetljivošću na ovu terapiju (Sun i saradnici, 2021).

Naši rezultati pokazuju da kod DOX+P pacova postoji značajna povezanost između genske ekspresije β_1 -AR i GRK2, kao i između β_2 -AR i GRK2, u skladu sa rezultatom iz studije Monto i saradnika (Montó i saradnici, 2015). Na osnovu ovoga, moglo bi se tumačiti da je GRK2 izoforma uglavnom odgovorna za fosforilaciju i posledičnu desenzitizaciju β -AR. Činjenica da genska ekspresija GRK3 nije korelisala sa ekspresijom ni β_1 -AR ni β_2 -AR, može se tumačiti kao nedostatak zajedničkog regulatornog mehanizma. Pokazano je da je GRK2 od primarnog značaja za regulaciju srčane kontraktilnosti i frekvencije posredstvom β -AR, dok je uloga GRK3 predominantno u regulaciji rasta i hipertrofije srčanih ćelija, preko pomenute selektivne kontrole endotelinskih i α_1 -AR (Eckhart i saradnici, 2000).

Glavni mehanizam doksorubicinske kardiotoksičnosti predstavlja povećan oksidativni stres, koji dovodi do oštećenja DNK i mitohondrija, lipidne peroksidacije i apoptoze srčanih ćelija (Minotti i saradnici, 2004). Iako u ovom istraživanju nismo merili stvaranje slobodnih radikala, važno je dotaći se ovog pitanja, posebno jer je utvrđeno da paroksetin smanjuje produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (Lassen i saradnici, 2017; Gerö i saradnici, 2013). Gerö i saradnici su na modelu dijabetične endotelne disfunkcije, utvrdili da paroksetin smanjuje formiranje superoksidnih radikala u mitohondrijama, bez uticaja na transport elektrona i sadržaj ATP-a u ćeliji, i time ublažava oštećenje endotelnih ćelija izazvano hiperglikemijom (Gerö i saradnici, 2013). Paroksetin je smanjio stvaranje reaktivnih kiseoničnih radikala u srčanom tkivu pacova, 7 dana nakon infarkta miokarda (Lassen i saradnici, 2017). Pokazano je da nastanak slobodnih radikala utiče na remodelovanje leve komore srca (Heusch i saradnici, 2014; Suematsu i saradnici, 2003) i da terapija „čistačima“ hidrosil radikala smanjuje aktivnost MMP-2, razgradnju vanćelijskog matriksa i remodelovanje srčanog tkiva u mišjem modelu infarkta miokarda (Kinugawa i saradnici, 2000). Studija slučajeva i kontrola kod ljudi, pokazala je značajno smanjen rizik od infarkta miokarda kod pacijenata na terapiji paroksetinom, u odnosu na pacijente bez antidepressivne terapije i one na terapiji drugim antidepressivima (Sauer i saradnici, 2003). Sve ovo ukazuje na povoljne efekte paroksetina na stvaranje slobodnih radikala i naknadno remodelovanje srca, međutim, tačan mehanizam antioksidativnog dejstva paroksetina i dalje je nerazjašnjen (Lassen i saradnici, 2017).

Mogli bismo da spekuliramo da je smanjenje produkcije slobodnih radikala povezano sa nishodnom regulacijom GRK2 kod DOX+P pacova u ovom istraživanju. Najmanje tri studije sugerišu da GRK2 pokreće stvaranje slobodnih radikala u mitohondrijama kardiomiocita. Dve studije na mišjem modelu ishemijsko/reperfuzijskog (I/R) oštećenja srca naglašavaju ulogu GRK2 u pokretanju signalnih puteva ćelijske smrti i nazivaju je „kinazom smrti“ (engl. *pro-death kinase*) (Chen i saradnici, 2013; Fan i saradnici, 2013). Fosforilacija GRK2 od strane ERK translocira GRK2

u mitohondrije i rezultuje povećanim vezivanjem GRK2 za HSP-90 (engl. *heat shock protein 90*), što dovodi do aktivacije proapoptotske signalne kaskade. Povećan nivo mitohondrijalne GRK2 dovodi do povećane Ca^{2+} -indukovane permeabilnosti mitohondrijalnih pora i posledičnog ćelijskog oštećenja (Chen i saradnici, 2013). Pokazano je da je kod GRK2 *nokaut* miševa nakon I/R oštećenja srca, smanjen nivo citosolnog antiapoptotskog proteina – citohroma C. Takođe, nishodna regulacija GRK2 imala je povoljne antiapoptotske efekte usled povećanja nivoa antiapoptotskih proteina poput Bcl-2 i Bcl-xl u srčanom tkivu (Fan i saradnici, 2013). Treća studija pokazala je da povećana ekspresija GRK2 indukuje stvaranje mitohondrijalnih slobodnih radikala regulacijom nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaze-4 (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-4* – NOX-4), što dovodi do smrti kardiomiocita (Theccanat i saradnici, 2016). Zbog svega navedenog, možemo pretpostaviti da je, u ovim eksperimentima, smanjena ekspresija GRK2 pod uticajem paroksetina smanjila GRK2-indukovano formiranje mitohondrijalnih slobodnih radikala, što je moglo doprineti smanjenju doksorubicinskog oštećenja srca kod DOX+P pacova.

Ovo istraživanje ima važnu translacionu vrednost. Kardioprotektivni efekat paroksetina može se lako evaluirati kod onkoloških pacijenata izloženih velikim, kardiotoksičnim dozama doksorubicina. Depresija je čest komorbiditet kod obolelih od tumora, sa prevalencom većom od 10% (Smith, 2015) i čest komorbiditet kod obolelih od srčane insuficijencije (Gottlieb i saradnici, 2007). Ona dovodi do lošijeg kvaliteta života i kompromituje ishod osnovne bolesti (Colleoni i saradnici, 2000). Paroksetin je efikasan lek u terapiji depresije i lek koji se dobro podnosi (Bourin i Guillon, 2001). Rezultati ove studije po prvi put pokazuju da primena paroksetina povećava preživljavanje, smanjuje toksičnost organa i čuva morfologiju i funkciju leve komore srca kod pacova tretiranih doksorubicinom. Nalaz je najverovatnije povezan sa smanjenjem ekspresije i sinteze molekula uključenih u proces nishodne regulacije β -AR, a povećanjem ekspresije i sinteze β -AR, što zajedno poboljšava inotropnu rezervu srca. Ovaj rad prepoznaje novo farmakološko dejstvo paroksetina – kardioprotekciju kod doksorubicinske kardiomiopatije i sugeriše potencijalnu prenamenu ovog leka za prevenciju/terapiju doksorubicinske kardiomiopatije kod onkoloških pacijenata.

6. ZAKLJUČCI

1. Doksorubicin aplikovan mužjacima pacova *Wistar* soja, u pojedinačnoj, udarnoj dozi od 5mg/kg intravenskim putem, dovodi do ehokardiografskih i patohistoloških promena srca pacova, koje su ekvivalentne promenama karakterističnim za doksorubicinsku kardiomiopatiju kod ljudi. Zbog toga je ovaj eksperimentalni model pouzdan za proučavanje kardiotoksičnosti doksorubicina kod ljudi.
2. Ehokardiografskom i histomorfometrijskom analizom utvrđeno je postojanje dve različite kliničke prezentacije doksorubicinske kardiomiopatije, sa gotovo jednakom učestalošću i preživljavanjem: DOX-HCM (n = 11) i DOX-DCM (n = 12). Kod DOX-HCM pacova ustanovljeno je zadebljanje zida leve komore i pad EDV_{LV}, dok je EF_{LV} ostala očuvana. DOX-DCM pacovi imali su smanjen dijametar zida leve komore, značajno povećan EDV_{LV}, a smanjenu EF_{LV} – morfološke i funkcionalne promene koje ukazuju na sistolnu disfunkciju srca.
3. U ovom eksperimentalnom modelu doksorubicinske kardiomiopatije kod pacova, genska ekspresija β_1 -AR i β_2 -AR kod DOX-HCM i DOX-DCM pacova nije bila promenjena. Kod DOX-DCM pacova nismo uočili promene u genskoj ekspresiji molekula uključenih u proces nishodne regulacije β -AR: GRK2, GRK3, ARRB1 i ARRB2. Genska ekspresija i imunoreaktivnost GRK2 i GRK3 u srčanom tkivu bila je povećana samo kod DOX-HCM pacova. S obzirom da ovi pacovi nisu razvili srčanu dekompenzaciju (očuvana EF_{LV}), možemo pretpostaviti da ovaj porast GRK2 nije povezan sa maladaptivnom nishodnom regulacijom β -AR. Pozitivna korelacija između genske ekspresije GRK2 i RWT kod DOX-HCM pacova, sugeriše da GRK2 doprinosi nastanku hipertrofije srca kod ovih pacova.
4. Pacovi kod kojih je istovremeno primenjen doksorubicin i GRK2 inhibitor (paroksetin) bili su dobrog opšteg stanja; tokom perioda praćenja dobijali su na telesnoj masi, a medijana preživljavanja bila je ista kao kod pacova iz kontrolne grupe. Ehokardiografski nalaz pokazao je očuvanu morfologiju i funkciju leve komore srca. Genska ekspresija i sinteza GRK2 i GRK3 bila je smanjena, a genska ekspresija i sinteza β_1 -AR i β_2 -AR povećana, što može predstavljati osnov kardioprotektivnog efekta GRK2 inhibicije i očuvanja inotropne rezerve srca.

7. LITERATURA

- Alghorabi AA, Kabel AM, Elmaaboud MA (2019). Doxorubicin: Insights into Dynamics, Clinical Uses and Adverse Effects. *J Cancer Res* 7(1):17-20. doi: 10.12691/jcrt-7-1-3
- Alrushaid S, Sayre CL, Yáñez JA, Forrest ML, Senadheera SN, Burczynski FJ, Löbenberg R, Davies NM (2017). Pharmacokinetic and Toxicodynamic Characterization of a Novel Doxorubicin Derivative. *Pharmaceutics* 9(3): 35. doi: 10.3390/pharmaceutics9030035
- Anand IS, Florea VG, Solomon SD, Konstam MA, Udelson JE (2002). Noninvasive assessment of left ventricular remodeling: concepts, techniques, and implications for clinical trials. *J Card Fail* 8(6 Suppl):S452-64. doi: 10.1054/jcaf.2002.129286
- Arber S, Hunter JJ, Ross Jr J, Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard JC, Chien KR, Caroni P (1997). MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 88(3):393-403. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81878-4
- Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* 11(6):1101–1110. doi: 10.1002/(sici)1097-0290(20000320)67:6<704::aid-bit8>3.0.co;2-1
- Arosio P, Levi S (2010). Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim Biophys Acta* 1800(8):783-792. doi: 10.1016/j.bbagen.2010.02.005
- Au WW, Hsu TC (1980). The genotoxic effects of adriamycin in somatic and germinal cells of the mouse. *Mutat Res* 79(4):351-361. doi: 10.1016/0165-1218(80)90160-3
- Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SA, Zornoff LA (2016). Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol* 106(1):62-69. doi: 10.5935/abc.20160005
- Aziriova S, Bednarova KR, Krajcirovicova K, Hrenak J, Rajkovicova R, Arendasova K, Kamodyova N, Celec P, Zorad S, Adamcova M, Paulis L, Simko F (2014). Doxorubicin-induced behavioral disturbances in rats: protective effect of melatonin and captopril. *Pharmacol Biochem Behav* 124:284-289. doi: 10.1016/j.pbb.2014.06.021
- Ballet F, Vrignaud P, Robert J, Rey C, Poupon R (1987). Hepatic extraction, metabolism and biliary excretion of doxorubicin in the isolated perfused rat liver. *Cancer Chemother Pharmacol* 19(3):240-245. doi: 10.1007/BF00252979
- Barpe DR, Rosa DD, Froehlich PE (2010). Pharmacokinetic evaluation of doxorubicin plasma levels in normal and overweight patients with breast cancer and simulation of dose adjustment by different indexes of body mass. *Eur J Pharm Sci* 41(3-4):458-463. doi: 10.1016/j.ejps.2010.07.015
- Benvenuto JA, Adams SC, Vyas HM, Anderson RW (1987). Pharmaceutical Issues in Infusion Chemotherapy Stability and Compatibility. In: *Cancer Chemotherapy by Infusion*. Springer, Dordrecht; pp 100-113. https://doi.org/10.1007/978-94-009-3193-0_7
- Berlin V, Haseltine WA (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. *J Biol Chem* 256: 4747–4756. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69315-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69315-4)
- Bernstein D, Fajardo G, Zhao M (2011). The role of β -adrenergic receptors in heart failure: Differential regulation of cardiotoxicity and cardioprotection. *Prog Pediatr Cardiol* 31(1): 35–38. doi: 10.1016/j.ppedcard.2010.11.007

- Bernuzzi F, Recalcati S, Alberghini A, Cairo G (2009). Reactive oxygen species-independent apoptosis in doxorubicin-treated H9c2 cardiomyocytes: role for heme oxygenase-1 down-modulation. *Chem Biol Interact* 177(1):12-20. doi: 10.1016/j.cbi.2008.09.012
- Bertinchant JP, Polge A, Juan JM, Oliva-Lauraire MC, Giuliani I, Marty-Double C, Burdy JY, Fabbro-Peray P, Laprade M, Bali JP, Granier C, de la Coussaye JE, Dautat M (2009). 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. *Clin Chim Acta* 329(1-2):39-51. doi: 10.1016/s0009-8981(03)00013-5
- Bien S, Riad A, Ritter CA, Gratz M, Olshausen F, Westermann D, Grube M, Krieg T, Ciecholewski S, Felix SB, Staudt A, Schultheiss HP, Ewert R, Völker U, Tschöpe C, K Kroemer H (2007). The endothelin receptor blocker bosentan inhibits doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cancer Res* 67(21):10428-10435. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1344
- Bigotte L, Arvidson B, Olsson Y (1982). Cytofluorescence localization of adriamycin in the nervous system. I. Distribution of the drug in the central nervous system of normal adult mice after intravenous injection. *Acta Neuropathologica* 57 (2-3): 121-129. doi: 10.1007/BF00685380
- Bourin M, Chue P, Guillon Y (2001). Paroxetine: a review. *CNS Drug Rev* 7(1):25-47. doi: 10.1111/j.1527-3458.2001.tb00189.x
- Boussios S, Pentheroudakis G, Katsanos K, Pavlidis N (2012). Systemic treatment-induced gastrointestinal toxicity: incidence, clinical presentation and management. *Ann Gastroenterol* 25(2): 106–118.
- Bristow Mr, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S, Stinson EB (1986). β 1- and β 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective down-regulation in heart failure. *Circ Res* 59:297–309. doi: 10.1161/01.res.59.3.297
- Brown L, Fenning A, Chan V, Loch D, Wilson K, Anderson B, Burstow D (2002). Echocardiographic assessment of cardiac structure and function in rats. *Heart Lung Circ* 11(3):167-173. doi: 10.1046/j.1444-2892.2002.00148.x
- Brum PC, Rolim NPL, Bacurau AVN, Medeiros A (2006). Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. *An Acad Bras Cienc* 78(3):485-503. doi: 10.1590/s0001-37652006000300009
- Bucciarelli V, Caterino AL, Bianco F, Caputi CG, Salerni S, Sciomer S, Maffei S, Gallina S (2020). Depression and cardiovascular disease: The deep blue sea of women's heart. *Trends Cardiovasc Med* 30(3):170-176. doi: 10.1016/j.tcm.2019.05.001
- Cappetta D , Esposito G, Coppini R, Piegari E, Russo R, Ciuffreda LP, Rivellino A, Santini L, Rafaniello C, Scavone C, Rossi F, Berrino L, Urbanek K, De Angelis A (2017). Effects of ranolazine in a model of doxorubicin- induced left ventricle diastolic dysfunction. *Br J Pharmacol* 174(21): 3696–3712. doi: 10.1111/bph.13791
- Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, Tedeschi I, Meroni CA, Veglia F, Civelli M, Lamantia G, Colombo N, Curigliano G, Fiorentini C, Cipolla CM (2015). Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation* 131(22):1981-1988. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013777
- Cardinale D, Salvatici M, Sandri MT (2011). Role of biomarkers in cardioncology. *Clin Chem Lab Med* 49(12):1937-1948. doi: 10.1515/CCLM.2011.692

- Chatterjee K, Zhang J, Honbo N and Karliner JS (2010). Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology* 115(2): 155–162. doi: 10.1159/000265166
- Cheah HY, Šarenac O, Arroyo JJ, Vasić M, Lozić M, Glumac S, Hoe SZ, Hindmarch CCT, Murphy D, Kiew LV, Lee HB, Vicent MJ, Chung LY, Japundžić-Žigon N (2017). Hemodynamic effects of HPMA copolymer based doxorubicin conjugate: A randomized controlled and comparative spectral study in conscious rats. *Nanotoxicology* 11(2):210-222. doi: 10.1080/17435390.2017.1285071
- Chen M, Sato PY, Chuprun JK, Peroutka RJ, Otis NJ, Ibetti J, Pan S, Sheu SS, Gao E, Koch WJ (2013). Prodeath signaling of G protein-coupled receptor kinase 2 in cardiac myocytes after ischemic stress occurs via extracellular signal-regulated kinase-dependent heat shock protein 90-mediated mitochondrial targeting. *Circ Res* 112(8):1121-1134. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300754
- Chen Y, Huang T, Shi W, Fang J, Deng H, Cui G (2020). Potential targets for intervention against doxorubicin-induced cardiotoxicity based on genetic studies: a systematic review of the literature. *J Mol Cell Cardiol* 138:88-98. doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.11.150
- Chesley A, Lundberg MS, Asai T, Xiao RP, Ohtani S, Lakatta EG, Crow MT (2000). The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res* 87(12):1172-1179. doi: 10.1161/01.res.87.12.1172
- Choi JS, Piao YJ, Kang KW (2011). Effects of quercetin on the bioavailability of doxorubicin in rats: role of CYP3A4 and P-gp inhibition by quercetin. *Arch Pharm Res* 34(4):607-13. doi: 10.1007/s12272-011-0411-x
- Christenson ES, James T, Agrawal V, Parkb BH (2015). Use of biomarkers for the assessment of chemotherapy-induced cardiac toxicity. *Clin Biochem* 48(0): 223–235. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.10.013
- Chung WB, Youn HJ (2016). Pathophysiology and preventive strategies of anthracycline- induced cardiotoxicity. *Korean J Intern Med* 2016; 31:625- 633. *Korean J Intern Med* 31(4): 625–633. doi: 10.3904/kjim.2016.017
- Ciccarelli M, Chuprun JK, Rengo G, Gao E, Wei Z, Peroutka RJ, Gold JI, Gumpert A, Chen M, Otis NJ, Dorn 2nd GW, Trimarco B, Iaccarino G, Koch WJ (2011). G protein-coupled receptor kinase 2 activity impairs cardiac glucose uptake and promotes insulin resistance after myocardial ischemia. *Circulation* 123(18):1953-62. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.988642
- Colleoni M, Mandala M, Peruzzotti G, Robertson C, Bredart A, Goldhirsch A (2000). Depression and degree of acceptance of adjuvant cytotoxic drugs. *Lancet* 356(9238):1326-1327. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02821-X
- Colombo T, Donelli MG, Urso R, Dallarda S, Bartosek I, Guaitani A (1989). Doxorubicin toxicity and pharmacokinetics in old and young rats. *Exp Gerontol* 24(2): 159-171. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(89\)90026-0](https://doi.org/10.1016/0531-5565(89)90026-0)
- Communal C, Colucci WS, Singh K (2000). p38 mitogen-activated protein kinase pathway protects adult rat ventricular myocytes against beta -adrenergic receptor-stimulated apoptosis. Evidence for Gi-dependent activation. *J Biol Chem* 275(25):19395-19400. doi: 10.1074/jbc.M910471199
- Corremans R, Adão R, De Keulenaer GW, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C (2019). Update on pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 46(3):204-215. doi: 10.1111/1440-1681.13036
- Cox J, Weinman S (2016). Mechanisms of doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma. *Hepat Oncol* 3(1): 57–59. doi: 10.2217/hep.15.41

- Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390(6655):88-91. doi: 10.1038/36362
- Damodar G, Smitha T, Gopinath S, Vijayakumar S, Rao YA (2014). An evaluation of hepatotoxicity in breast cancer patients receiving injection Doxorubicin. *Ann Med Health Sci Res* 4(1): 74–79. doi: 10.4103/2141-9248.126619
- Daniel D, Crawford J (2006). Myelotoxicity from chemotherapy. *Semin Oncol* 33(1):74–85. doi: 10.1053/j.seminoncol.2005.11.003
- Denard B, Lee C, Ye J (2012). Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1. *Elife* 1:e00090. doi: 10.7554/eLife.00090
- Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, Brenne C (2008). Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* 27(3):285-299. doi: 10.1038/sj.onc.1210638
- Dethloff F, Vargas F, Elijah E, Quinn R, Park DI, Herzog DP, Müller MB, Gentry EC, Knight R, Gonzalez A, Dorrestein PC, Turck CW (2020). Paroxetine Administration Affects Microbiota and Bile Acid Levels in Mice. *Front Psychiatry* 11:518. doi: 10.3389/fpsyt.2020.00518
- Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, Reichek N (1986). Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 57(6):450-458. doi: 10.1016/0002-9149(86)90771-x
- Doroshov JH, Davies KJ (1986). Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *J Biol Chem* 261(7):3068-3074.
- Duncan R, Coatsworth JK, Burtles S (1998). Preclinical toxicology of a novel polymeric antitumour agent: HPMa copolymer-doxorubicin (PK1). *Hum Exp Toxicol* 17(2):93-104. doi: 10.1177/096032719801700204
- Dupont C, D Armant R, Brenner CA (2009). Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med* 27(5):351-7. doi: 10.1055/s-0029-1237423
- Eckhart AD, Duncan SJ, Penn RB, Benovic JL, Lefkowitz RJ, Koch WJ (2000). Hybrid transgenic mice reveal in vivo specificity of G protein-coupled receptor kinases in the heart. *Circ Res* 86(1):43-50. doi: 10.1161/01.res.86.1.43
- Eglen RM, Bosse R, Reisine T (2007). Emerging concepts of guanine nucleotide binding protein-coupled receptor (GPCR) function and implications for high throughput screening. *Assay Drug Dev Technol* 5(3):425–451. doi: 10.1089/adt.2007.062
- Eishingdrelo H, Sun W, Li H, Wang L, Eishingdrelo A, Dai S, McKew JC, Zheng W (2015). ERK and β -arrestin interaction: a converging point of signaling pathways for multiple types of cell surface receptors. *J Biomol Screen* 20(3):341-349. doi: 10.1177/1087057114557233
- Eschenhagen T (2008). Beta-adrenergic signaling in heart failure-adapt or die. *Nat Med* 14(5):485-7. doi: 10.1038/nm0508-485
- Fallah-Rad N, Walker JR, Wassef A, Lytwyn M, Bohonis S, Fang T, Tian G, Kirkpatrick IDC, Singal PK, Krahn M, Grenier D, Jassal DS (2011). The utility of cardiac biomarkers, tissue velocity and strain imaging, and cardiac magnetic resonance imaging in predicting early left ventricular dysfunction in patients with human epidermal growth factor receptor II-positive breast cancer treated with adjuvant trastuzumab therapy. *J Am Coll Cardiol* 57(22):2263-2270. doi: 10.1016/j.jacc.2010.11.063

- Fan Q, Chen M, Zuo L, Shang X, Huang MZ, Ciccarelli M, Raake P, Brinks H, Chuprun KJ, Dorn GW 2nd, Koch WJ, Gao E (2013). Myocardial Ablation of G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 (GRK2) Decreases Ischemia/Reperfusion Injury through an Anti-Intrinsic Apoptotic Pathway. *PLoS One* 8(6):e66234. doi: 10.1371/journal.pone.0066234
- Feely J, Crooks J, Stevenson IH (1981). The influence of age, smoking and hyperthyroidism on plasma propranolol steady state concentration. *Br J Clin Pharmacol* 12(1):73-78. doi: 10.1111/j.1365-2125.1981.tb01857.x
- Ferreira A, Cunha-Oliveira T, Simões RF, Carvalho FS, Burgeiro A, Nordgren K, Wallace KB, Oliveira PJ (2017). Altered mitochondrial epigenetics associated with subchronic doxorubicin cardiotoxicity. *Toxicology* 390:63-73. doi: 10.1016/j.tox.2017.08.011
- Foppa M, Duncan BB, Rohde LEP (2005). Echocardiography-based left ventricular mass estimation. How should we define hypertrophy? *Cardiovasc Ultrasound* 3:17. doi: 10.1186/1476-7120-3-17
- Fujiu K, Wang J, Nagai R (2014). Cardioprotective function of cardiac macrophages. *Cardiovasc Res* 102(2):232-239. doi: 10.1093/cvr/cvu059
- Gallois L, Fiallo M, Garnier-Suillerot A (1998). Comparison of the interaction of doxorubicin, daunorubicin, idarubicin and idarubicinol with large unilamellar vesicles. Circular dichroism study. *Biochim Biophys Acta* 1370(1):31-40. doi: 10.1016/s0005-2736(97)00241-1
- Gammella E, Maccarinelli F, Buratti P, Recalcati S, Cairo G (2014). The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *Front Pharmacol* 5: 25. doi: 10.3389/fphar.2014.00025
- Georgiadis N, Tsarouhas K, Rezaee R, Nepka H, Kass GEN, Dorne JCM, Stagkos D, Toutouzas K, Spandidos DA, Kouretas D, Tsitsimpikou C (2020). What is considered cardiotoxicity of anthracyclines in animal studies. *Oncol Rep* 44(3):798-818. doi: 10.3892/or.2020.7688
- Gerő D, Szoleczky P, Suzuki K, Módis K, Oláh G, Coletta C, Szabo C (2013). Cell-based screening identifies paroxetine as an inhibitor of diabetic endothelial dysfunction. *Diabetes* 62(3):953-964. doi: 10.2337/db12-0789
- Gewirtz DA (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem pharmacol* 57(7):727-741. doi: 10.1016/s0006-2952(98)00307-4
- Giri SN, Al-Bayati MA, Du X, Schelegle E, Mohr FC, Margolin SB (2004). Amelioration of doxorubicin-induced cardiac and renal toxicity by pifenidone in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 53(2):141-150. doi: 10.1007/s00280-003-0703-z
- Goormaghtigh E, Huart P, Brasseur R, Ruyschaert JM (1986). Mechanism of inhibition of mitochondrial enzymatic complex I-III by adriamycin derivatives. *Biochim Biophys Acta* 861(1):83-94. doi: 10.1016/0005-2736(86)90374-3
- Gottlieb SS, Kop WJ, Thomas SA, Katzen S, Vesely MR, Greenberg N, Marshall J, Cines M, Minshall S (2007). A double-blind placebo-controlled pilot study of controlled-release paroxetine on depression and quality of life in chronic heart failure. *Am Heart J* 153(5):868-873. doi: 10.1016/j.ahj.2007.02.024
- Greene RF, Collins JM, Jenkins JF, Speyer JL, Myers CE (1983). Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols. *Cancer Research* 43(7): 3417-3421.
- Griffith OW, Stuehr DJ (1995). Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57:707-36. doi: 10.1146/annurev.ph.57.030195.003423

- Grigorian A, O'Brien CB (2014). Hepatotoxicity Secondary to Chemotherapy. *J Clin Transl Hepatol* 2(2):95–102. doi: 10.14218/JCTH.2014.00011
- Gungor-Ordueri NE, Kuscu N, Tasatargil A, Burgucu D, Karacan M, Celik-Ozenci C (2019). Doxorubicin-induced testicular damage is related to PARP-1 signaling molecules in mice. *Pharmacol Rep* 71(4):591-602. doi: 10.1016/j.pharep.2019.02.018
- Guo S, Carter RL, Grisanti LA, Koch WJ, Tilley DG (2017). Impact of paroxetine on proximal β -adrenergic receptor signaling. *Cell Signal* 38:127-133. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.07.006
- Gustafson DL, Merz AL, Long ME (2005). Pharmacokinetics of combined doxorubicin and paclitaxel in mice. *Cancer Lett* 220 (2), 161–169. doi 10.1016/j.canlet.2004.09.007
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117(3):285-297. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00343-5
- Hershko C, Link G, Tzahor M, Kaltwasser J P, Athias P, Grynberg A, Pinson A (1993). Anthracycline toxicity is potentiated by iron and inhibited by deferoxamine: studies in rat heart cells in culture. *J Lab Clin Med* 122(3):245–251.
- Heusch G, Libby P, Gersh B, Yellon D, Böhm M, Lopaschuk G, Opie L (2014). Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet* 383(9932):1933-1943. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60107-0
- Hiroe M, Ohta Y, Fujita N, Nagata M, Toyozaki T, Kusakabe K, Sekiguchi M, Marumo F (1992). Myocardial uptake of ¹¹¹In monoclonal antimyosin Fab in detecting doxorubicin cardiotoxicity in rats. Morphological and hemodynamic findings. *Circulation* 86(6): 1965-1972. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.86.6.1965>
- Ho D, Yan L, Iwatsubo K, Vatner DE, Vatner SF (2010). Modulation of β -Adrenergic Receptor Signaling in Heart Failure and Longevity: Targeting Adenylyl Cyclase Type 5. *Heart Fail Rev* 15(5): 495–512. doi: 10.1007/s10741-010-9183-5
- Ho E, Brown A, Barrett P, Morgan RB, King G, Kennedy MJ, Murphy RT (2010). Subclinical anthracycline- and trastuzumab-induced cardiotoxicity in the long-term follow-up of asymptomatic breast cancer survivors: a speckle tracking echocardiographic study. *Heart* 96(9):701-707. doi: 10.1136/hrt.2009.173997
- Ho J, Cocolakis E, Dumas VM, Posner BI, Laporte SA, Lebrun JJ (2005). The G protein-coupled receptor kinase-2 is a TGF β -inducible antagonist of TGF β signal transduction. *EMBO J* 24(18):3247-3258. doi: 10.1038/sj.emboj.7600794
- Homan KT, Larimore KM, Elkins JM, Szklarz M, Knapp S, Tesmer JGG (2015). Identification and structure-function analysis of subfamily selective G protein-coupled receptor kinase inhibitors. *ACS Chem Biol* 10(1):310-319. doi: 10.1021/cb5006323
- Hwang YS, Jeong M, Park JS, Kim MH, Lee DB, Shin BA, Mukaida N, Ellis LM, Kim HR, Ahn BW, Jung YD (2004). Interleukin-1 β stimulates IL-8 expression through MAP kinase and ROS signaling in human gastric carcinoma cells. *Oncogene* 23(39):6603-6611. doi: 10.1038/sj.onc.1207867
- Iaccarino G, Barbato E, Cipolletta E, De Amicis V, Margulies KB, Leosco D, Trimarco B, Koch WJ (2005). Elevated myocardial and lymphocyte GRK2 expression and activity in human heart failure. *Eur Heart J* 26(17):1752-1758. doi: 10.1093/eurheartj/ehi429
- Iaccarino G, Rockman HA, Shotwell KF, Tomhave ED, Koch WJ (1998). Myocardial overexpression of GRK3 in transgenic mice: evidence for in vivo selectivity of GRKs. *Am J Physiol* 275(4):H1298-306. doi: 10.1152/ajpheart.1998.275.4.H1298

- Injac R, Strukelj B (2008). Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. *Technol Cancer Res Treat* 7(6):497-516. doi: 10.1177/153303460800700611
- Jain D, Russell RR, Schwartz RG, Panjra GS, Aronow W (2017). Cardiac Complications of Cancer Therapy: Pathophysiology, Identification, Prevention, Treatment, and Future Directions. *Curr Cardiol Rep* 19(5):36. doi: 10.1007/s11886-017-0846-x
- Jang YM, Kendaiah S, Drew B, Phillips T, Selman C, Julian D, Leeuwenburgh C (2004). Doxorubicin treatment in vivo activates caspase-12 mediated cardiac apoptosis in both male and female rats. *FEBS Lett* 577 (3) 483–490. doi:10.1016/j.febslet.2004.10.053
- Ji C, Yang B, Yang YL, He SH, Miao DS, He L, Bi ZG (2010). Exogenous cell-permeable C6 ceramide sensitizes multiple cancer cell lines to Doxorubicin-induced apoptosis by promoting AMPK activation and mTORC1 inhibition. *Oncogene* 29(50):6557-68. doi: 10.1038/onc.2010.379
- Jiménez-Sainz MC, Murga C, Kavelaars A, Jurado-Pueyo M, Krakstad BF, Heijnen CJ, Mayor Jr F, Aragay AM (2006). G protein-coupled receptor kinase 2 negatively regulates chemokine signaling at a level downstream from G protein subunits. *Mol Biol Cell* 17(1):25-31. doi: 10.1091/mbc.e05-05-0399.
- Kagan VE, Bayir HA, Belikova NA, Kapralov O, Tyurina YY, Tyurin VA, Jiang J, Stoyanovsky DA, Wipf P, Kochanek PM, Greenberger JS, Pitt B, Shvedova AA, Borisenko G (2009). Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic Biol Med* 46(11):1439–1453. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.004
- Kalivendi SV, Konorev EA, Cunningham S, Vanamala SK, Kaji EH, Joseph J, Kalyanaraman B (2005). Doxorubicin activates nuclear factor of activated T-lymphocytes and Fas ligand transcription: role of mitochondrial reactive oxygen species and calcium. *Biochem J* 389(Pt 2):527-539. doi: 10.1042/BJ20050285
- Kang Y, Wang W, Zhao H, Qiao Z, Shen X, He B (2017). Assessment of Subclinical Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in a Rat Model by Speckle-Tracking Imaging. *Arq Bras Cardiol* 109(2): 132–139. doi:10.5935/abc.20170097
- Kawase M, Watanabe M, Kondo T, Yabu T, Taguchi Y, Umehara H, Uchiyama T, Mizuno K, Okazaki T (2002). Increase of ceramide in adriamycin-induced HL-60 cell apoptosis: detection by a novel anti-ceramide antibody. *Biochim Biophys Acta* 1584 (2-3): 104–114. doi: 10.1016/s1388-1981(02)00301-3
- Kenk M, Thackeray JT, Thorn SL, Dhimi K, Chow BJ, Ascah KJ, DaSilva JN, Beanlands RS (2010). Alterations of pre- and postsynaptic noradrenergic signaling in a rat model of adriamycin-induced cardiotoxicity. *J Nucl Cardiol* 17(2):254-263. doi: 10.1007/s12350-009-9190-x
- Khan MH, Islam MN, Aditya GP, Islam MZ, Bhuiyan AS, Saha B, Bhowmick K, Hassan M, Paul PK, Chowdhury S, Rahman R (2017). Correlation of Troponin-I Level with Left Ventricular Ejection Fraction and In-hospital outcomes after First Attack of Non-ST Segment Elevation Myocardial Infarction. *Mymensingh Med J* 26(4):721-731.
- Kim J, Ahn S, Ren XR, Whalen EJ, Reiter E, Wei H, Lefkowitz RJ (2005). Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(5):1442-1447. doi: 10.1073/pnas.0409532102
- Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, Ide T, Suematsu N, Satoh S, Utsumi H, Takeshita A (2000). Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. *Circ Res* 87(5):392-398. doi: 10.1161/01.res.87.5.392

- Kobayashi M, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Kimura H, Mizushina Y, Shirasuna K, Mizukami H, Kasahara T, Hasebe N, Takahashi M (2016). NLRP3 Deficiency Reduces Macrophage Interleukin-10 Production and Enhances the Susceptibility to Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. *Sci Rep* 6:26489. doi: 10.1038/srep26489
- Koch WJ, Rockman HA, Samama P, Hamilton RA, Bond RA, Milano CA, Lefkowitz RJ (1995). Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. *Science* 268(5215):1350-1353. doi: 10.1126/science.7761854
- Koleini N, Kardami E (2017). Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncotarget* 8(28):46663-46680. doi: 10.18632/oncotarget.16944
- Konkle AT, Bielajew C (1999). Feeding and reward interactions from chronic paroxetine treatment. *Pharmacol Biochem Behav* 63(3):435-440. doi: 10.1016/s0091-3057(99)00044-1
- Kumari H, Huang WH, Chan MWY (2020). Review on the role of epigenetic modifications in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Front Cardiovasc Med* 7:56. doi: 10.3389/fcvm.2020.00056
- Lahoti TS, Patel D, Thekkemadom V, Beckett R, Ray SD (2012). Doxorubicin-induced in vivo nephrotoxicity involves oxidative stress-mediated multiple pro- and anti-apoptotic signaling pathways. *Curr Neurovasc Res* 9(4):282-295. doi: 10.2174/156720212803530636
- Lassen TR, Nielsen JM, Johnsen J, Ringgaard S, Bøtker HE, Kristiansen SB (2017). Effect of paroxetine on left ventricular remodeling in an in vivo rat model of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 112(3):26. doi: 10.1007/s00395-017-0614-5
- Lee BH, Goodenday LS, Muswick GJ, Yasnoff WA, Leighton RF, Skeel RT (1987). Alterations in left ventricular diastolic function with doxorubicin therapy. *J Am Coll Cardiol* 9(1):184-188. doi: 10.1016/s0735-1097(87)80099-2
- Lee VW, Harris DC (2011). Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology (Carlton)* 16(1):30-38. doi: 10.1111/j.1440-1797.2010.01383.x
- Lee, HJ, Lee MG (1999). Effects of dexamethasone on the pharmacokinetics of adriamycin after intravenous administration to rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 105 (1-2): 87–96.
- Lefkowitz RJ, Pitcher J, Krueger K, Daaka Y (1998). Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv Pharmacol* 42:416-420. doi: 10.1016/s1054-3589(08)60777-2
- Legha SS, Benjamin RS, Mackay B, Ewer M, Wallace S, Valdivieso M, Rasmussen SL, Blumenschein GR, Freireich EJ (1982). Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *Ann Intern Med* 96(2):133- 139. doi: 10.7326/0003-4819-96-2-133
- Leri A, Rota M, Pasqualini FS, Goichberg P, Anversa P (2015). Origin of Cardiomyocytes in the Adult Heart. *Circ Res* 116(1): 150–166. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303595
- Liao LB, Zhou HY, Xiao XM (2005). Spectroscopic and viscosity study of doxorubicin interaction with DNA. *Journal of molecular structure* 749(1-3):108-113. doi 10.1016/j.molstruc.2005.04.007
- Liesse K, Harris J, Chan M, Schmidt ML, Chiu B (2018). Dexrazoxane significantly reduces anthracycline- induced cardiotoxicity in pediatric solid tumor patients: a systematic review. *J Pediatr Hematol Oncol* 40(6):417- 425. doi: 10.1097/MPH.0000000000001118
- Liggett SB, Wagoner LE, Craft LL, Hornung RW, Hoit BD, McIntosh TC, Walsh RA (1998). The Ile164 beta2-adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *Clin Invest* 102(8):1534-9. doi: 10.1172/JCI4059

- Lin HH (2013). G-protein-coupled receptors and their (Bio) chemical significance win 2012 Nobel Prize in Chemistry. *Biomed J* 36(3):118-124. doi: 10.4103/2319-4170.113233
- Lipshultz SE, Diamond MB, Franco VI, Aggarwal S, Leger K, Santos MV, Sallan SE, Chow EJ (2014). Managing chemotherapy-related cardiotoxicity in survivors of childhood cancers. *Paediatr Drugs* 16(5):373-389. doi: 10.1007/s40272-014-0085-1
- Liu B, Li H, Qu H, Sun B (2006). Nitric oxide synthase expressions in ADR-induced cardiomyopathy in rats. *J Biochem Mol Biol* 39(6):759-765. doi: 10.5483/bmbrep.2006.39.6.759
- Liu G, Liu Y, Wang R, Hou T, Chen C, Zheng S, Dong Z (2016). Spironolactone Attenuates Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Rats. *Cardiovasc Ther* 34(4):216-224. doi: 10.1111/1755-5922.12189
- Liu P, Bao HY, Jin CC, Zhou JC, Hua F, Li K, Lv XX, Cui B, Hu ZW, Zhang XW (2019). Targeting Extracellular Heat Shock Protein 70 Ameliorates Doxorubicin-Induced Heart Failure Through Resolution of Toll-Like Receptor 2-Mediated Myocardial Inflammation. *J Am Heart Assoc* 8(20):e012338. doi: 10.1161/JAHA.119.012338
- Liu YY, Han TY, Giuliano AE, Cabot MC (2001). Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *FASEB J* 15(3):719-730. doi: 10.1096/fj.00-0223com
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248(4962):1547-50. doi: 10.1126/science.2163110
- Maral RJ, Jouanne M (1981). Toxicology of daunorubicin in animals and man. *Cancer Treatment Reports* 65 (4): 9-18.
- Marchese A, Chen C, Kim YM, Benovic JL (2003). The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem Sci* 28(7):369-376. doi: 10.1016/S0968-0004(03)00134-8
- Marinello J, Delcuratolo M, Capranico G (2018). Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives. *Int J Mol Sci* 19(11): 3480. doi: 10.3390/ijms19113480
- Márquez MF, Hernández-Pacheco G, Hermosillo AG, Gómez JR, Cárdenas M, Vargas-Alarcón G (2007). The Arg389Gly beta1-adrenergic receptor gene polymorphism and susceptibility to faint during head-up tilt test. *Europace* 9(8):585-588. doi: 10.1093/europace/eum059
- Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB (1999). A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta1-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 274(18):12670-12674. doi: 10.1074/jbc.274.18.12670
- McFarlane A, Kamath MV, Fallen EL, Malcolm V, Cherian F, Norman G (2001). Effect of sertraline on the recovery rate of cardiac autonomic function in depressed patients after acute myocardial infarction. *Am Heart J* 142(4):617-623. doi: 10.1067/mhj.2001.116766
- McGowan JV, Chung R, Maulik A, Piotrowska I, Walker JM, and Yellon DM (2017). Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther* 31(1): 63–75. doi: 10.1007/s10557-016-6711-0
- Mehta PK, Griendling KK (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1):C82-97. doi: 10.1152/ajpcell.00287.2006

- Menna P, Salvatorelli E (2017). Primary prevention strategies for anthracycline cardiotoxicity: a brief overview. *Chemotherapy* 62(3):159- 168. doi: 10.1159/000455823
- Merlet N, Piriou N, Rozec B, Grabherr A, Lauzier B, Trochu JN, Gauthier C (2013). Increased beta2-adrenoceptors in doxorubicin-induced cardiomyopathy in rat. *Plos One* 8 8(5): e64711. doi: 10.1371/journal.pone.0064711
- Merzoug S, Toumi ML, Boukhris N, Baudin B, Tahraoui A (2011). Adriamycin-related anxiety-like behavior, brain oxidative stress and myelotoxicity in male Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 99(4):639-647. doi: 10.1016/j.pbb.2011.06.015
- Migrino RQ, Aggarwal D, Konorev E, Brahmabhatt T, Bright M, Kalyanaraman B (2008). Early detection of doxorubicin cardiomyopathy using two-dimensional strain echocardiography. *Ultrasound Med Biol* 34(2):208-214. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2007.07.018
- Milić D, Veprintsev DB (2015). Large-scale production and protein engineering of G protein-coupled receptors for structural studies. *Front Pharmacol* 6:66. doi: 10.3389/fphar.2015.00066
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56 (2):185-229. doi: 10.1124/pr.56.2.6
- Mladěnka P, Applová L, Patočka J, Costa VM, Remiao F, Pourová J, Mladěnka A, Karličková J, Jahodář L, Vopršalová M, Varner KJ, Štěrba M (2018). Comprehensive review of cardiovascular toxicity of drugs and related agents. *Med Res Rev* 38(4):1332-1403. doi: 10.1002/med.21476
- Mohan UP, P B TP, Iqbal STA, Arunachalam S (2021). Mechanisms of doxorubicin-mediated reproductive toxicity - A review. *Reprod Toxicol* 102:80-89. doi: 10.1016/j.reprotox.2021.04.003
- Montó F, Oliver E, Vicente D, Buendía F, Rueda J, Agüero J, Almenar L, Valldecabres C, Rovira E, Muedra V, Noguera MA, Ivorra MD, D'Ocon P (2015). β 2- and β 1-Adrenoceptor Expression Exhibits a Common Regulatory Pattern With GRK2 and GRK5 in Human and Animal Models of Cardiovascular Diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 66(5):478-486. doi: 10.1097/FJC.0000000000000299
- Moore CA, Milano SK, Benovic JL (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69:451-482. doi: 10.1146/annurev.physiol.69.022405.154712
- Mukhopadhyay P, Rajesh M, B'atkai S, Kashiwaya Y, Hask'ó G, Liaudet L, Szab'ó C, Pacher P (2009). Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296 (5):H1466–1483. doi: 10.1152/ajpheart.00795.2008
- Mushegian A, Gurevich VV, Gurevich EV (2012). The Origin and Evolution of G Protein-Coupled Receptor Kinases. *PLoS One* 7(3):e33806. doi: 10.1371/journal.pone.0033806
- Myers C (1998). The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol* 25(4):10-14.
- Naga Prasad SV, Laporte SA, Chamberlain D, Caron MG, Barak L, Rockman HA (2002). Phosphoinositide 3-kinase regulates beta2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/beta-arrestin complex. *J Cell Biol* 158(3):563-575. doi: 10.1083/jcb.200202113
- Najafi A, Sequeira V, Kuster DWD, van der Velden J (2016). β -adrenergic receptor signalling and its functional consequences in the diseased heart. *Eur J Clin Invest* 46(4):362-7. doi: 10.1111/eci.12598
- Nakao M (2001). Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 278(1-2):25-31. doi: 10.1016/s0378-1119(01)00721-1

- Napoli S, Burton MA, Martins IJ, Chen Y, Codde JP, Gray BN (1992). Dose response and toxicity of doxorubicin microspheres in a rat tumor model. *Anticancer Drugs* 3(1):47-53. doi: 10.1097/00001813-199202000-00009
- Nebigil CG, Désaubry L (2018). Updates in Anthracycline-Mediated Cardiotoxicity. *Front Pharmacol* 9:1262. doi: 10.3389/fphar.2018.01262
- Noichri Y, Chalghoum A, Chkioua L, Baudin B, Erne S, Ferchichi S, Miled A (2013). Low erythrocyte catalase enzyme activity is correlated with high serum total homocysteine levels in tunisian patients with acute myocardial infarction. *Diagn Pathol* 8: 68. doi: 10.1186/1746-1596-8-68
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis. *J Biol Chem* 276(22):19452-19460. doi: 10.1074/jbc.M101450200
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* 275(22):17201-17210. doi: 10.1074/jbc.M910348199
- Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL (2012). Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol* 52(6):1213-25. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.03.006
- Oh JK. Echocardiography in heart failure: beyond diagnosis (2007). *Eur J Echocardiogr* 8(1):4-14. doi: 10.1016/j.euje.2006.09.002
- Pajović V, Kováčsházi C, Kosić M, Vasić M, Đukić Lj, Brenner GB, Giricz Z, Bajić D, Ferdinandy P, Japundžić-Žigon N (2021). Phenomapping for classification of doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 423:115579. doi: 10.1016/j.taap.2021.115579
- Pang B, Qiao X, Janssen L, Velds A, Groothuis T, Kerkhoven R, Nieuwland M, Ovaas H, Rottenberg S, van Tellingen O, Janssen J, Huijgens P, Zwart W, Neefjes J (2013). Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin. *Nat Commun* 4:1908. doi: 10.1038/ncomms2921
- Penela P, Murga C, Ribas C, Lafarga V, Mayor Jr F (2010). The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets. *Br J Pharmacol* 160(4): 821–832. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00727.x
- Penela P, Ribas C, Aymerich I, Eijkelkamp N, Barreiro O, Heijnen CJ, Kavelaars A, Sánchez-Madrid F, Mayor Jr F (2008). G protein-coupled receptor kinase 2 positively regulates epithelial cell migration *EMBO J* 27(8):1206-1218. doi: 10.1038/emboj.2008.55
- Penela P, Ribas C, Mayor Jr F (2003). Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* 15(11):973-981. doi: 10.1016/s0898-6568(03)00099-8
- Perry SJ, Baillie GS, Kohout TA, McPhee I, Magiera MM, Ang KL, Miller WE, McLean AJ, Conti M, Houslay MD, Lefkowitz RJ (2002). Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science* 298(5594):834-836. doi: 10.1126/science.1074683
- Petrofski JA, Koch WJ (2003). The beta-adrenergic receptor kinase in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 35(10):1167-1174. doi: 10.1016/s0022-2828(03)00243-8
- Pierce KL, Lefkowitz RJ (2001). Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci* 2(10):727-733. doi: 10.1038/35094577

- Plana JC, Galderisi M, Barac A, Ewer MS, Ky B, Scherrer-Crosbie M, Ganame J, Sebag IA, Agler DA, Badano LP, Banchs J, Cardinale D, Carver J, Cerqueira M, DeCara JM, Edvardsen T, Flamm SD, Force T, Griffin BP, Jerusalem G, Liu JE, Magalhães A, Marwick T, Sanchez LY, Sicari R, Villarraga HR, Lancellotti P (2014). Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 27(9):911-939. doi: 10.1016/j.echo.2014.07.012
- Podyacheva EY, Kushnareva EA, Karpov AA, Toropova YG (2021). Analysis of Models of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rats and Mice. A Modern View From the Perspective of the Pathophysiologist and the Clinician. *Front Pharmacol* 12: 670479. doi: 10.3389/fphar.2021.670479
- Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol* 17(5): 421–433.
- Prahalathan C, Selvakumar E, Varalakshmi P (2006). Lipoic acid modulates adriamycin-induced testicular toxicity. *Reprod Toxicol* 21(1):54-59. doi: 10.1016/j.reprotox.2005.07.002
- Raake PW, Zhang X, Vinge LE, Brinks H, Gao E, Jaleel N, Li Y, Tang M, Most P, Dorn 2nd GW, Houser SR, Katus HA, Chen X, Koch WJ (2012). Cardiac G-protein-coupled receptor kinase 2 ablation induces a novel Ca²⁺ handling phenotype resistant to adverse alterations and remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 125(17):2108-18. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.044255
- Rahman A, Carmichael D, Harris M, Roh JK (1986). Comparative pharmacokinetics of free doxorubicin and doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes. *Cancer Res* 46(5):2295-9.
- Rasmussen IMN, Schou HS, Hermansen K (1989). Cardiotoxic effects and the influence on the β -adrenoceptor function of doxorubicin (Adriamycin®) in the rat. *Pharmacol. Toxicol* 65 (1):69-72. doi: 10.1111/j.1600-0773.1989.tb01129.x
- Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS, Navik U (2021). Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomed Pharmacother* 139:111708. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111708
- Reiter E, Lefkowitz RJ (2006). GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 17(4):159-165. doi: 10.1016/j.tem.2006.03.008
- Ribas C, Penela P, Murga C, Salcedo A, García-Hoz C, Jurado-Pueyo M, Aymerich I, Mayor Jr F (2007). The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim Biophys Acta* 1768(4):913-922. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.09.019
- Richardson DS, Johnson SA (1997). Anthracyclines in haematology: preclinical studies, toxicity and delivery systems. *Blood Rev* 11(4):201–223. doi: 10.1016/s0268-960x(97)90020-5
- Robert J (2007). Preclinical assessment of anthracycline cardiotoxicity in laboratory animals: predictiveness and pitfalls. *Cell Biol Toxicol* 23(1):27-37. doi: 10.1007/s10565-006-0142-9
- Robison TW, Giri SN (1986). Effects of chronic administration of doxorubicin on myocardial beta-adrenergic receptors. *Life Sci* 39(8):731-736. doi: 10.1016/0024-3205(86)90021-4
- Rockman HA, Chien KR, Choi DJ, Iaccarino G, Hunter JJ, Ross J Jr, Lefkowitz RJ, Koch WJ (1998). Expression of a β -adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12):7000-7005. doi: 10.1073/pnas.95.12.7000

- Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 415(6868):206-212. doi: 10.1038/415206a
- Ruggeri C, Gioffré S, Achilli F, Colombo GI, D'Alessandra Y (2018). Role of microRNAs in doxorubicin-induced cardiotoxicity: an overview of preclinical models and cancer patients. *Heart Fail Rev* 23(1):109-122. doi: 10.1007/s10741-017-9653-0
- Ryan L, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, Antosiewicz-Bourget J, O'Malley R, Castanon R, Klugman S, Downes M, Yu R, Stewart R, Ren B, Thomson JA, Evans RM, Ecker JR (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471(7336):68-73. doi: 10.1038/nature09798
- Saeki K, Obi I, Ogiku N, Shigekawa M, Imagawa T, Matsumoto T (2002). Doxorubicin Directly Binds to the Cardiac-Type Ryanodine Receptor. *Life Sciences* 70 (20): 2377–2389. doi: 10.1016/S0024-3205(02)01524-2
- Salvatorelli E, Menna P, Cantalupo E, Chello M, Covino E, Wolf FI, Minotti G (2015). The concomitant management of cancer therapy and cardiac therapy. *Biochim Biophys Acta* 1848(10PtB):2727- 2737. doi: 10.1016/j.bbamem.2015.01.003
- Sato PY, Chuprun JK, Schwartz M, Koch WJ (2015). The evolving impact of g protein-coupled receptor kinases in cardiac health and disease. *Physiol Rev* 95(2):377-404. doi: 10.1152/physrev.00015.2014
- Sauer WH, Berlin JA, Kimmel SE (2003). Effect of antidepressants and their relative affinity for the serotonin transporter on the risk of myocardial infarction. *Circulation* 108(1):32-36. doi: 10.1161/01.CIR.0000079172.43229.CD
- Sawaya H, Sebag IG, Plana JC, Januzzi JL, Ky B, Cohen V, Gosavi S, Carver JR, Wieggers SE, Martin RP, Picard MH, Gerszten RE, Halpern EF, Passeri J, Kuter I, Scherrer-Crosbie M (2011). Early detection and prediction of cardiotoxicity in chemotherapy-treated patients. *Am J Cardiol* 107(9):1375-1380. doi: 10.1016/j.amjcard.2011.01.006
- Schlegel P, Reinkober J, Meinhardt E, Tscheschner H, Gao E, Schumacher SM, Yuan A, Bacs J, Most P, Wieland T, Koch WJ, Katus HA, Raake PW (2017). G protein-coupled receptor kinase 2 promotes cardiac hypertrophy. *PLoS One* 12(7):e0182110. doi: 10.1371/journal.pone.0182110
- Schumacher SM, Gao E, Zhu W, Chen X, Chuprun JK, Feldman AM, Tesmer JJ, Koch WJ (2015). Paroxetine-mediated GRK2 inhibition reverses cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Sci Transl Med* 7(277):277ra31. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa0154
- Senchenkov A, Litvak DA, Cabot MC (2001). Targeting ceramide metabolism—a strategy for overcoming drug resistance. *J Natl Cancer Inst* 93(5):347-357. doi: 10.1093/jnci/93.5.347
- Senarath K, Kankanamge D, Samaradivakara S, Ratnayake K, Tennakoon M, Karunarathne A (2018). Regulation of G Protein $\beta\gamma$ Signaling. *Int Rev Cell Mol Biol* 339:133-191. doi: 10.1016/bs.ircmb.2018.02.008
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2003). Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* 375(Pt 3):503-515. doi: 10.1042/BJ20031076
- Simůnek T, Stěrba M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R, Gersl V (2009). Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* 61(1):154-171. doi: 10.1016/s1734-1140(09)70018-0

- Smiseth OA, Torp H, Opdahl A, Haugaa HK, Urheim S (2016). Myocardial strain imaging: how useful is it in clinical decision making? *Eur Heart J* 37(15): 1196–1207. doi: 10.1093/eurheartj/ehv529
- Smith HR (2015). Depression in cancer patients: Pathogenesis, implications and treatment (Review). *Oncol Lett* 9(4):1509-1514. doi: 10.3892/ol.2015.2944
- Spallarossa P, Altieri P, Garibaldi S, Ghigliotti G, Barisione C, Manca V, Fabbi P, Ballestrero A, Brunelli C, Barsotti A (2006). Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase. *Cardiovasc Res* 69(3):736-745. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.08.009
- Speth PA, van Hoesel QG, Haanen C (1988). Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clin Pharmacokinet* 15(1):15-31. doi: 10.2165/00003088-198815010-00002
- Stein AB, Tiwari S, Thomas P, Hunt G, Levent C, Stoddard MF, Tang XL, Bolli R, Dawn B (2007). Effects of anesthesia on echocardiographic assessment of left ventricular structure and function in rats. *Basic Res Cardiol* 102(1):28-41. doi: 10.1007/s00395-006-0627-y
- Sturgill MG, August DA, Brenner DE (2000). Hepatic enzyme induction with phenobarbital and doxorubicin metabolism and myelotoxicity in the rabbit. *Cancer Invest* 18(3):197–205. doi: 10.3109/07357900009031824
- Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, Hayashidani S, Shiomi T, Kubota T, Hamasaki N, Takeshita A (2003). Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation* 107(10):1418-1423. doi: 10.1161/01.cir.0000055318.09997.1f
- Suliman HB, Carraway MS, Ali AS, Reynolds CM, Welty-Wolf KE, Piantadosi CA (2007). The CO/HO system reverses inhibition of mitochondrial biogenesis and prevents murine doxorubicin cardiomyopathy. *J Clin Invest* 117(12):3730-41. doi: 10.1172/JCI32967
- Sun X, Zhou M, Wen G, Huang Y, Wu J, Peng L, Jiang W, Yuan H, Lu Y, Cai J (2021). Paroxetine Attenuates Cardiac Hypertrophy Via Blocking GRK2 and ADRB1 Interaction in Hypertension. *J Am Heart Assoc* 10(1):e016364. doi: 10.1161/JAHA.120.016364
- Swain SM, Whaley FS, Ewer MS (2003). Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer* 97(11):2869-2879. doi: 10.1002/cncr.11407
- Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR, Cutts SM (2006). Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res* 66(9): 4863–4871. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3410
- Takahashi H, Tainaka H, Umezawa M, Takeda K, Tanaka H, Nishimune Y, Oshio S (2011). Evaluation of testicular toxicology of doxorubicin based on microarray analysis of testicular specific gene expression. *J Toxicol Sci* 36(5):559-567. doi: 10.2131/jts.36.559
- Takanashi S, Bachur NR (1976). Adriamycin metabolism in man, evidence for urinary metabolites. *Drug Metabolism and Disposition* 4(1): 79-87.
- Takemura G, Fujiwara H (2007). Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: From the Cardiotoxic Mechanisms to Management. *Prog Cardiovasc Dis* 49(5):330-352. doi: 10.1016/j.pcad.2006.10.002
- Tan C, Tasaka H, Yu KP, Murphy ML, Karnofsky DA (1967). Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer* 20(3):333-353. doi: 10.1002/1097-0142(1967)20:3<333::aid-cncr2820200302>3.0.co;2-k.

- Tavernier G, Toumaniantz G, Erfanian M, Heymann MF, Laurent K, Langin D, Gauthier C (2003). beta3-Adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human beta3-adrenergic receptor. *Cardiovasc Res* 59(2):288-296. doi: 10.1016/s0008-6363(03)00359-6
- Teraoka K, Hirano M, Yamaguchi K, Yamashina A (2000). Progressive cardiac dysfunction in adriamycin-induced cardiomyopathy rats. *Eur J Heart Fail* 2(4):373-378. doi: 10.1016/s1388-9842(00)00111-2
- Thal DM, Homan KT, Chen J, Wu EK, Hinkle PM, Huang ZM, Chuprun JK, Song J, Gao E, Cheung JY, Sklar LA, Koch WJ, Tesmer JJG (2012). Paroxetine Is a Direct Inhibitor of G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 and Increases Myocardial Contractility. *ACS Chem Biol* 7(11): 1830–1839. doi: 10.1021/cb3003013
- Theccanat T, Philip JL, Razzaque AM, Ludmer N, Li J, Xu X, Akhter SA (2016). Regulation of cellular oxidative stress and apoptosis by G protein-coupled receptor kinase-2; The role of NADPH oxidase 4. *Cell Signal* 28(3):190-203. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.11.013
- Thomas E, Aust SD (1986). Reductive release of iron from ferritin by cation free radicals of paraquat and other bipyridyls. *J Biol Chem* 261(28):13064–13070.
- Thomson T, Fitzpatrick KE, Johnson J (2010). Intrinsic and extrinsic mechanisms of oocyte loss. *Mol Hum Reprod* 16(12):916-927. doi: 10.1093/molehr/gaq066
- Todorova VK, Beggs ML, Delongchamp RR, Dhakal I, Makhoul I, Wei JY, Klimberg VS (2012). Transcriptome Profiling of Peripheral Blood Cells Identifies Potential Biomarkers for Doxorubicin Cardiotoxicity in a Rat Model. *PLoS One* 7(11):e48398. doi: 10.1371/journal.pone.0048398
- Tscheschner H, Meinhardt E, Schlegel P, Jungmann A, Lehmann LH, Müller OJ, Most P, Katus HA, Raake PW (2019). CaMKII activation participates in doxorubicin cardiotoxicity and is attenuated by moderate GRP78 overexpression. *PLoS One* 14(4):e0215992. doi: 10.1371/journal.pone.0215992
- Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ (1993). Altered expression of β -adrenergic receptor kinase and β 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 87(2):454–463. doi: 10.1161/01.cir.87.2.454
- van Melle JP, Buikema H, van den Berg MP, van Buiten A, van Veldhuisen DJ, Boonstra PW, van Gilst WH (2004). Sertraline causes strong coronary vasodilation: possible relevance for cardioprotection by selective serotonin reuptake inhibitors. *Cardiovasc Drugs Ther* 18(6):441-447. doi: 10.1007/s10557-004-6221-3
- Vasić M, Japundžić Žigon N (2013). GRK-2 inhibitor lek kandidat u terapiji srčane insuficijencije. *Srce i krvni sudovi* 32(4): 304-308.
- Vasić M, Lončar-Turukalo T, Tasić T, Matić M, Glumac S, Bajić D, Popović B, Japundžić-Žigon N (2019). Cardiovascular variability and β -ARs gene expression at two stages of doxorubicin - Induced cardiomyopathy. *Toxicol Appl Pharmacol* 362:43-51. doi: 10.1016/j.taap.2018.10.015
- Vedam K, Nishijima Y, Druhan LJ, Khan M, Moldovan NI, Zweier JL, Ilanogvan G (2010). Role of heat shock factor-1 activation in the doxorubicin-induced heart failure in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298(6):H1832-1841. doi: 10.1152/ajpheart.01047.2009
- Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494(7436):185-194. doi: 10.1038/nature11896
- Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V (2004). Energy metabolism in heart failure. *J Physiol* 555(Pt 1):1-13. doi: 10.1113/jphysiol.2003.055095

- Villani F, Meazza R, Materazzo C (2006). Non-invasive monitoring of cardiac hemodynamic parameters in doxorubicin-treated patients: comparison with echocardiography. *Anticancer Res* 26(1B):797-801.
- Vinge LE, von Lueder TG, Aasum E, Qvigstad E, Gravning JA, How OJ, Edvardsen T, Bjørnerheim R, Ahmed MS, Mikkelsen BW, Oie E, Attramadal T, Skomedal T, Smiseth OA, Koch WJ, Larsen TS, Attramadal H (2008). Cardiac-restricted expression of the carboxyl-terminal fragment of GRK3 Uncovers Distinct Functions of GRK3 in regulation of cardiac contractility and growth: GRK3 controls cardiac alpha1-adrenergic receptor responsiveness. *J Biol Chem* 283(16):10601-10610. doi: 10.1074/jbc.M708912200
- Volkova M, Russell R, III (2011). Anthracycline Cardiotoxicity: Prevalence, Pathogenesis and Treatment. *Curr Cardiol Rev* 7(4): 214–220. doi: 10.2174/157340311799960645
- Wachter SB, Gilbert EM (2012). Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application. *Cardiology* 122(2):104-112. doi: 10.1159/000339271
- Wallace KB, Sardão VA, Oliveira PJ (2020). Mitochondrial Determinants of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *Circ Res* 126(7):926-941. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.314681
- Wang Y, Probin V, Zhou D (2006). Cancer therapy-induced residual bone marrow injury-Mechanisms of induction and implication for therapy. *Curr Cancer Ther Rev* 2(3):271-279. doi: 10.2174/157339406777934717
- Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN (2003). A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* 111(10):1497-1504. doi: 10.1172/JCI17664
- Wilden U, Hall SW, Kühn H (1986). Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(5):1174-1178. doi: 10.1073/pnas.83.5.1174
- Wisher D (2012). Martindale: The Complete Drug Reference. 37th ed. *Journal of the Medical Library Association* : JMLA 100(1), 75–76. <https://doi.org/10.3163/1536-5050.100.1.018>
- Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Chakir K, Bond R, Lakatta EG, Cheng H (2004). Subtype-specific beta-adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* 25(7):358-365. doi: 10.1016/j.tips.2004.05.007
- Xu X, Persson HL, Richardson DR (2005). Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Mol Pharmacol* 68(2):261-271. doi: 10.1124/mol.105.013383
- Yagmurca M, Bas O, Mollaoglu H, Sahin O, Nacar A, Karaman O, Songur A (2007). Protective effects of erdosteine on doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats. *Arch Med Res* 38(4):380-385. doi: 10.1016/j.arcmed.2007.01.007
- Yang CC, Chen YT, Chen CH, Chiang JY, Zhen YY, Yip HK (2017). Assessment of doxorubicin-induced mouse testicular damage by the novel second-harmonic generation microscopy. *Am J Transl Res* 9(12):5275-5288.
- Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1845(1):84-89. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.12.002
- Yi LL, Kerrigan JE, Lin CP, Azarova AM, Tsai YC, Ban Y, Liu LF (2007). Topoisomerase II β -mediated DNA double-strand breaks: Implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res* 67(18):8839–8846. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1649

- Yi XP, Gerdes AM, Li F (2002). Myocyte redistribution of GRK2 and GRK5 in hypertensive, heart-failure-prone rats. *Hypertension* 39(6):1058-1063. doi: 10.1161/01.hyp.0000019130.09167.3b
- Yi XP, Zhou J, Baker J, Wang X, Gerdes AM, Li F (2005). Myocardial expression and redistribution of GRKs in hypertensive hypertrophy and failure. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 282(1):13-23. doi: 10.1002/ar.a.20143
- Zhang Y, Devries ME, Skolnick J (2006). Structure modeling of all identified G protein-coupled receptors in the human genome. *PLoS Comput Biol* 2(2):e13. doi: 10.1371/journal.pcbi.0020013
- Zhao J, Deng Y, Jiang Z, Qing H (2016). G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) in Alzheimer's Disease: A Focus on BACE1 Related GPCRs. *Front Aging Neurosci* 8:58. doi: 10.3389/fnagi.2016.00058
- Zhao L, Zhang B (2017). Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. *Sci Rep* 7:44735. doi: 10.1038/srep44735
- Zhao Y, McLaughlin D, Robinson E, Harvey AP, Hookham MB, Shah AM, McDermott BJ, Grieve DJ (2010). Nox2 NADPH oxidase promotes pathologic cardiac remodeling associated with Doxorubicin chemotherapy. *Cancer Res* 70(22):9287-9297. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2664
- Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP (2001). Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4):1607-1612. doi: 10.1073/pnas.98.4.1607
- Zito C, Longobardo L, Cadeddu C, Monte I, Novo G, Dell'Oglio S, Pepe A, Madonna R, Tocchetti CG, Mele D (2016). Cardiovascular imaging in the diagnosis and monitoring of cardiotoxicity: role of echocardiography. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 17 Suppl 1 Special issue on Cardiotoxicity from Antitubercular Drugs and Cardioprotection:e35-e44. doi: 10.2459/JCM.000000000000003

BIOGRAFIJA

Marija D. Kosić rođena je 25. aprila 1988. godine u Smederevu. Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Smederevu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisuje 2007. godine. Diplomirala je septembra 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,89/10. Dobitnica je pohvalnica za najboljeg studenta Medicinskog fakulteta u Beogradu školske 2009/2010, 2010/2011 i 2011/2012. godine.

Doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu, modul Medicinska farmakologija, upisala je 2013. godine, a specijalizaciju iz Kliničke farmakologije 2018. godine. Od marta 2015. godine angažovana je kao istraživač saradnik na projektu Funkcionalna genomika hipotalamusa i medule u hipertenziji indukovanoj hroničnim stresom, III41013 pod rukovodstvom prof. dr Nine Japundžić Žigon. Izabrana je za saradnika u nastavi na Katedri za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju 2017. godine, reizabrana 2018. godine, a 2019. godine je izabrana u zvanje asistenta.

Od 2012. godine do danas učestvovala je na nekoliko međunarodnih simpozijuma. U periodu od 2017. do 2019. bila je angažovana u bilateralnoj saradnji Laboratorije za kardiovaskularnu farmakologiju i Departmana za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta Semmelweis Univerziteta u Budimpešti.

Odlukom Veća naučnih oblasti medicinskih nauka od dana 10.9.2019. godine odobrena joj je teza doktorske disertacije pod naslovom: Genska ekspresija β -adrenergičkih receptora i ključnih molekula uključenih u proces njihove nishodne regulacije u kardiomiopatiji izazvanoj doksorubicinom.

Marija D. Kosić položila je sve ispite predviđene planom i programom Doktorskih akademskih studija Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za smer Medicinska farmakologija, sa prosečnom ocenom 10,00/10. Glavni rezultat njenog višegodišnjeg truda je prvo autorstvo u radu objavljenom 2021. godine u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a) – Biomedicine and Pharmacotherapy pod nazivom: „Paroxetine mitigates cardiac remodelling by doxorubicin and increases survival” Biomed Pharmacother 2022 Jan;145:112411. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112411. Epub 2021 Nov 12. Bila je i koautor u radovima koji se bave doksorubicinskom kardiomiopatijom: „Cardiovascular variability and β -ARs gene expression at two stages of doxorubicin – induced cardiomyopathy” Toxicol Applied Pharmacol 362 (2019) 43–51. doi: 10.1016/j.taap.2018.10.015 i „Phenomapping for classification of doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats” Toxicol Appl Pharmacol 2021 Jul;423:115579. doi: 10.1016/j.taap.2021.115579.

образац изјаве о ауторству

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Марија Косић**

Број индекса **МФ 01/13**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ГЕНСКА ЕКСПРЕСИЈА β -АДРЕНЕРГИЧКИХ РЕЦЕПТОРА И КЉУЧНИХ МОЛЕКУЛА УКЉУЧЕНИХ У ПРОЦЕС ЊИХОВЕ НИСХОДНЕ РЕГУЛАЦИЈЕ У КАРДИОМИОПАТИЈИ ИЗАЗВАНОЈ ДОКСОРУБИЦИНОМ

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора



У Београду, 31. 01. 2021.

образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Марија Косић**

Број индекса **МФ 01/13**

Студијски програм **Докторске академске студије; Медицинска фармакологија**

Наслов рада

ГЕНСКА ЕКСПРЕСИЈА β -АДРЕНЕРГИЧКИХ РЕЦЕПТОРА И КЉУЧНИХ МОЛЕКУЛА УКЉУЧЕНИХ У ПРОЦЕС ЊИХОВЕ НИСХОДНЕ РЕГУЛАЦИЈЕ У КАРДИОМИОПАТИЈИ ИЗАЗВАНОЈ ДОКСОРУБИЦИНОМ

Ментор **проф. др Зорица Нешић**

Коментор **проф. др Нина Јапунцић Жигон**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора



У Београду, 31. 01. 2021.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ГЕНСКА ЕКСПРЕСИЈА β -АДРЕНЕРГИЧКИХ РЕЦЕПТОРА И КЉУЧНИХ МОЛЕКУЛА УКЉУЧЕНИХ У ПРОЦЕС ЊИХОВЕ НИСХОДНЕ РЕГУЛАЦИЈЕ У КАРДИОМИОПАТИЈИ ИЗАЗВАНОЈ ДОКСОРУБИЦИНОМ

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора



У Београду, 31. 01. 2021.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.