

Pathological changes in cardiovascular system in long-term doxorubicin-treated rats and effect of quercetin

Patologické zmeny v kardiovaskulárnom systéme u zvierat po dlhodobom podávaní doxorubicínu a účinkov kvercetínu

Dovinová I¹, Barančík M², Krátka D³, Fogarassyová M², Kvandová M¹, Barteková M²

¹Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava Slovenská republika

Dovinova I, Barancik M, Kratka D, Fogarassyova M, Kvandova M, Bartekova M. **Pathological changes in cardiovascular system in long-term doxorubicin-treated rats and effect of quercetin.** Cardiology Letters 2015;24(4):243–246

Abstract. *Aims:* Doxorubicin is an effective anticancer drug, but with several limitations in treatment. Application of anthracycline – doxorubicin (DOX) induces chronic pathological changes in the myocardium. The mechanisms of DOX cardiotoxicity may be multifactorial, including increased production of reactive oxygen species leading to oxidative stress, cell necrosis and apoptosis induction. Treatment with additional substances such as flavonoids can influence the negative effect of doxorubicin, and quercetin (QCT) was found as a potential preventive substance in the treatment of cardiovascular diseases. The aim of the present study was to determine the effect of QCT administration in long-term doxorubicin treated Wistar rats.

Methods: In the study, 11-weeks old male Wistar rats were divided into control group, saline-treated and experimental groups. Experimental groups of animal were treated either with cumulative doses of doxorubicin (DOX, 15 mg/kg, 3 weeks, i.p.) or with combination of doxorubicin+quercetin (DOX-QCT, each for 3 weeks, QCT, 20 mg/kg, in biscuit pieces). Blood pressure was determined using the plethysmography method. Eight weeks after the completion of DOX, DOX-QCT or saline treated samples from the left ventricle were collected for further biochemical studies: Western blot analysis and enzyme activity measurements.

Results: DOX influenced blood pressure increase, while a combination of QCT + DOX lowered blood pressure increase and stabilised its to the control values. The effect of DOX on MMP-2 activities and improvement of SOD activities and mitochondrial SOD protein expression to control level was affected by QCT administration.

Conclusion: Quercetin administration was effective in blood pressure normalisation as well as in backward remodeling and improvement of antioxidant response in the left ventricle of long-term DOX-treated animals. Fig. 2, Tab. 1, Ref. 11, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: blood pressure – heart failure – matrix metalloproteinase-2 – antioxidant response and mitochondrial SOD – doxorubicin – quercetin

Dovinová I, Barančík M, Krátka D, Fogarassyová M, Kvandová M, Barteková M. **Patologické zmeny v kardiovaskulárnom systéme u zvierat po dlhodobom podávaní doxorubicínu a účinkov kvercetínu.** Cardiology Letters 2015;24(4):243–246

Abstrakt. *Ciel:* Doxorubicín (DOX) je efektívne protinádorové liečivo, avšak jeho klinické používanie má svoje limitácie spojené s nepriaznivými kardiotoxickými účinkami. Podávanie antracyklínu – doxorubicínu (DOX) môže generovať chronické patologické zmeny v myokarde. Mechanizmus kardiotoxicity DOX je multifaktoriálny proces spojený s nárastom produkcie reaktívnych foriem kyslíka spojených s oxidačným stresom, nekrozou

Z ¹Ústavu normálnej a patologickej fyziológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava, ²Ústavu pre výskum srdca, Slovenská akadémia vied, Bratislava
³Ústavu patologickej fyziológie, Lekárska fakulta UK, Bratislava, Slovenská republika

Do redakcie došlo dňa 26. júna 2015; prijaté dňa 30. júna 2015.

Adresy pre korešpondenciu: RNDr. Ima Dovinová, PhD., Ústav normálnej a patologickej fyziológie SAV, Sienkiewiczova 1, 813 71 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: ima.dovinova@savba.sk a RNDr. Miroslav Barančík, DrSc., Ústav pre výskum srdca, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, POBox 104, 840 05 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: miroslav.barancik@savba.sk

alebo apoptózou myokardu. Kvercetín (KVE) patrí do skupiny flavonoidov a v súčasnosti sa javí ako potenciálna a preventívna látka pri terapii kardiovaskulárnych ochorení. Cieľom tejto štúdie bolo sledovať aditívny účinok podávania KVE na modeli Wistar potkanov vystavených dlhodobému pôsobeniu doxorubicínu.

Metódy: V práci boli použité dospelé (11-týždňové) Wistar potkany rozdelené na kontrolnú skupinu, ktorej bol podávaný fyziologický roztok a experimentálne skupiny. Experimentálnym skupinám bol podávaný DOX (kumulatívna dávka 15 mg/kg, počas troch týždňov, i. p.) alebo kombinácia DOX+KVE (každý po tri týždne s KVE 20 mg/kg, vo forme biskvitu). Krvný tlak sa meral pletyzmograficky na chvoste zvierat. Osem týždňov po ukončení dávkovania DOX, respektíve fyziologického roztoku boli odobraté vzorky ľavej komory na následné biochemické stanovenia Western blotovou analýzou a merania enzýmovej aktivity.

Výsledky: Opakované podávanie doxorubicínu viedlo k zvýšeniu tlaku krvi, kým pri súčasnom podávaní KVE a DOX sa krvný tlak znížil a stabilizoval až na úroveň kontrolnej skupiny. K nezmeneným aktivitám MMP-2 a súčasne aj úprave SOD aktivity a hladín mitochondriálnej SOD na kontrolné hodnoty došlo v prítomnosti KVE.

Záver: Pozitívne účinky KVE sa prejavili pri normalizácii krvného tlaku, ako aj pri úprave remodelácie a zlepšení antioxidantnej odpovedi v ľavej komore zvierat vystavených dlhodobému pôsobeniu DOX. Obr. 2, Tab. 1, Lit. 11, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: tlak krvi – zlyhanie srdca – matrixové metaloproteinázy-2 – antioxidantná odpoveď a mitochondriálna SOD – doxorubicín – kvercetín

Kvercetín (KVE) je polyfenolická látka, ktorá sa vyskytuje vo viacerých druhoch potravín, najmä v zelenine, ovocí a víne (1). Tento flavonoid vykazuje množstvo biologických funkcií, vrátane antioxidantného a antiinflamačného pôsobenia (2). V súčasnosti sa KVE objavuje vo viacerých štúdiách ako preventívne pôsobiaca látka proti kardiovaskulárnym ochoreniam, kde sa pozoroval jeho priaznivý účinok na vazodilatáciu ciev, pokles krvného tlaku a pri terapiách metabolického syndrómu vyvolaných vysokotukovou diétou (3, 4, 5). DOX je antracyklínové liečivo, ktoré sa používa pri terapii rôznych druhov nádorových ochorení tak pri solídnych tumoroch, ako aj pri liečbe leukémií a lymfómov (6). Mechanizmus antiproliferatívnych a cytotoxických účinkov antracyklínov v nádorových bunkách ovplyvňuje procesy ako DNA interkalácia (inhibícia syntézy makromolekúl), tvorba voľných radikálov (lipoperoxidácia membrán, poškodenie DNA), respektíve indukcia apoptózy prostredníctvom inhibície topoizomérázy II (7). Použitie DOX má však svoje limitácie spojené s nepriaznivými kardiotoxickými účinkami (8, 9).

Pri klinickom používaní DOX u onkologických pacientov dochádza k výrazným vedľajším účinkom, ktoré poškodzujú najmä kardiovaskulárny systém, keď dochádza k indukcii patologických zmien v myokarde. Mechanizmus kardiotoxicity je multifaktoriálny (10), vzhľadom na vysoký výskyt mitochondrií v srdcovom svalu je pôsobenie DOX v srdci odlišné od pôsobenia doxorubicínu v nádorových bunkách. V práci sme sa zameriávali na sledovanie vplyvu samotného doxorubicínu a aditívneho pôsobenia flavonoidu – kvercetínu. Sledovali sme viaceré parametre kardiovaskulárneho systému (tlak, srdcová frekvencia), zmeny v remodelácii srdcovej komory a antioxidantnej odpovedi superoxiddizmutáz a mitochondriálnej SOD, ktorá zohráva dôležitú úlohu pri odbúravaní zvýšeného výskytu reaktívnych foriem kyslíka v mitochondriách srdca.

Výsledky

Zmeny v krvnom tlaku a srdcovej frekvencii. Signifikantný nárast systolického krvného tlaku o 21,2 % sa pozoroval pri DOX skupine osem týždňov po podávaní tohto liečiva. Súčasné podávanie KVE a DOX znížilo nárast krvného tlaku a viedlo k jeho stabilizácii až na úroveň kontrolnej skupiny (**tabuľka 1**). V prípade srdcovej frekvencie došlo u DOX skupiny iba k miernym zmenám (6,2 %). **Remodelácia extracelulárneho priestoru.** Zmeny v remodelácii ľavej komory sa sledovali zymografickou analýzou aktivity metaloproteinázy. Osem týždňov po dlhodobom podávaní doxorubicínu sa v ľavej komore (LK) srdca pozoroval významný nárast aktivity metaloproteinázy-2 (MMP-2, 72-kDa). Pôsobením kvercetínu sa znížila aktivita MMP-2 a upravila remodelácia LK (**obrázok 1**). Zmeny sa pozorovali iba v srdci, kým v plazme zmeny v hladinách MMP2 už detekované neboli. **Zmeny v antioxidantnej**

Tabuľka 1 Zmeny v systolickom tlaku krvi a srdcovej frekvencie u Wistar potkanov s dlhodobým podávaním DOX a dvojkombinácie DOX + KVE

Table 1 Systolic blood pressure and heart rate changes in Wistar rats after Doxorubicin long-term treatment and in combination of Doxorubicin and Quercetin

	Systolický tlak krvi (Systolic blood pressure) (mmHg)	Srdcová frekvencia (Heart rate) (údery/min) (beats/min)
Kontrola (Control)	113 ± 4	369 ± 5
DOX	137 ± 4*	392 ± 6*
DOX + KVE	118 ± 5	368 ± 9

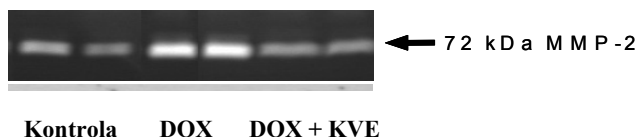
Hodnoty sú uvádzané ako priemer ± SEM. Údaje boli štatisticky vyhodnotené pomocou One-way ANOVA, * $p < 0,05$ DOX, DOX+KVE vs. Kontrola. (Values are displayed as average ± SEM. Significance * $p < 0.05$ represents DOX group or DOX + Quercetin group (DOX + KVE) vs. control group, using One-way ANOVA).

odpovedi superoxiddizmutáz (SOD) a mitochondriálnej SOD. Účinok DOX v ľavej komore sa spájal s poklesom aktivity SOD. Podávanie KVE ovplyvnilo DOX-indukovanú inhibíciu SOD a zlepšilo antioxidačnú odpoveď u pozorovanej skupiny zvierat. Pozorované zmeny v aktivite SOD u DOX-KVE zvierat pozitívne korelovali s hladinou mitochondriálnej izoformy SOD proteínu (obrázky 2a, 2b).

Diskusia

Doxorubicín (DOX) je efektívne protinádorové liečivo, avšak jeho klinické používanie má svoje limitácie spojené s nepriaznivými kardiotoxickými účinkami (8, 9). Táto štúdia poukazuje na dlhodobý účinok KVE, ktorý vykazuje pozitívne účinky proti DOX-indukovaným zmenám v srdci u experimentálnych zvierat na úrovni zmien tlaku, remodelácie srdca a antioxidačnej odpovedi. Ukazuje sa, že KVE je schopný taktiež ovplyvňovať procesy kontraktility pri ischemicko-reperúznom poškodení u zvierat vystavených pôsobeniu DOX (11). Viaceré práce poukazujú na efekt kvercetínu pri znižovaní tlaku pri rôznych modeloch hypertenzie (SHR, zvierat s metabolickým syndrómom vyvolaných vysokotukovou diétou (3, 4, 5).

Metaloproteinázy, ako MMP-2, sú jednými z enzýmov, ktoré majú dôležitú úlohu pri remodelácii extracelulárnej matrix. Ich aktivácia v srdci spôsobuje štrukturálnu dezorganizáciu extracelulárneho srdcového priestoru. Viacere práce poukazujú na to, že aktivácia myokardiálnej a cirkulujúcej MMP2 je spojená s progresiou a toxickým účinkom DOX



Obrázok 1 Zmeny v remodelácii ľavej srdcovej komory

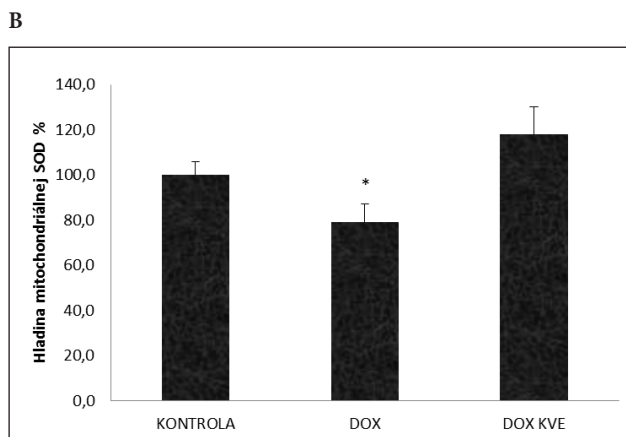
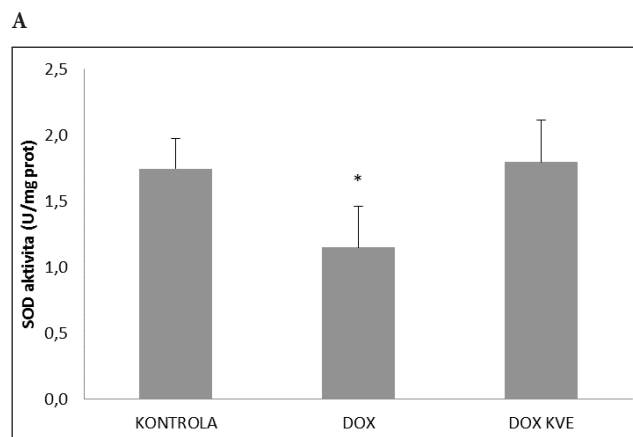
Figure 1 Changes in left ventricle remodeling

Na obrázku sú zobrazené zmeny v aktivite matrixovej 72 kDa metaloproteinázy-2 MMP-2 v ľavej komore, ktorá bola sledovaná zymografickou metódou. (Matrix metalloproteinase-2 activity in left ventricle was observed using zymographic method at 72kDa. In figure 1 are shown changes in MMP-2 activity of control (kontrola), doxorubicin (DOX) and doxorubicin + quercetin (DOX + KVE) group.

(8). Z našich experimentov vyplýva, že v myokarde bola modulovaná najmä aktivita 72-kDa formy MMP-2, ktorá je aktivovaná cez konformačné zmeny pomocou radikálov. Súčasne popri aktivácii 72-kDa MMP-2 dochádzalo u doxorubicínových zvierat aj k poklesu celkovej aktivity SOD. Podávanie KVE upravilo negatívne účinky DOX tak pri 72-kDa MMP-2 aktivácii, ako aj pri inhibícii aktivity SOD a nárastu hladiny mitochondriálnej SOD.

Záver

Experimentálne údaje poukazujú na benefičné účinky podávania KVE. Podávanie kvercetínu viedlo k normalizácii krvného tlaku, zastaveniu remodelácie a zlepšeniu antioxidačnej odpovede v ľavej komore zvierat, ktoré boli dlhodobo vystavené pôsobeniu doxorubicínu.



Obrázky 2 A, 2B SOD aktivita (A) a hladina mitochondriálneho proteínu SOD (B) u Wistar potkanov s dlhodobým podávaním DOX a dvojkombinácie DOX + KVE

Figure 2A, 2B SOD activity (A) and mitochondrial SOD level (B) in Wistar rats after doxorubicin long-term treatment and treatment with both DOX and quercetin.

Aktivitu SOD boli merané spektrofotometricky s použitím WST farbiva. Hladina mitochondriálneho proteínu SOD sa stanovila Western blotovou analýzou. Hodnoty sú uvádzané ako priemer $\pm$ SEM. Údaje boli štatisticky vyhodnotené pomocou t-testu, $*p < 0,05$ DOX, DOX + KVE vs. Kontrola. [SOD activity was measured spectrophotometrically using of WST dye. Level of mitochondrial protein SOD was determined by Western blot analysis. Values are displayed as average $\pm$ SEM. Significance $*p < 0.05$ represents DOX group or DOX + Quercetin group (DOX + KVE) vs. control group (kontrola), using t-test].

Štúdiá bola podporená grantmi APVV-0348-12 a VEGA SR 2/0108/15.

Literatúra

1. Barnes S, Prasain J, D'Alessandro T, Arabshahi A, Botting N, Lila MA, Jackson G, Janle EM, Weaver CM (2011). The metabolism and analysis of isoflavones and other dietary polyphenols in foods and biological systems. *Food & Function* 2(5):235.
2. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol.* 2008;582(2-3):325-337.
3. Sanchez M, Galisteo M, Vera R, Villar IC, Zarzuelo A, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertension* 2006;24:75-84.
4. Yamamoto Y, Oue E. Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006;70:933-939.
5. Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Rabovsky A, Symons JD, Jalili T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr.* 2007;137(11):2405-2411.
6. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 2004;56:185-229.
7. Perego P, Corna E, De Cesare M, Gatti L, Polizzi D, Pratesi G, Supino R, Zunino F. Role of apoptosis and apoptosis-related genes in cellular response and antitumor efficacy of anthracyclines. *Curr Med Chem.* 2001 Jan;8(1):31-37.
8. Ivanova M, Dovinova I, Okruhlicova L, Tribulova N, Simoncikova P, Bartekova M, Vlkovicova J, Barancik M. Chronic cardiotoxicity of doxorubicin involves activation of myocardial and circulating matrix metalloproteinases in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 2012;33:459-469.
9. Stěrba M, Popelová O, Vávrová A, Jirkovský E, Kovaříková P, Geršl V, Šimůnek T. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(8):899-929.
10. Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res.* 2000;60:1789-1792.
11. Barteková M, Šimončíková P, Fogarassyová M, Ivanová M, Okruhlicová L, Tribulová N, Dovinová I, Barančík M. Quercetin improves postischemic recovery of heart function in doxorubicin-treated rats and prevents doxorubicin-induced matrix metalloproteinase-2 activation and apoptosis induction. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16:2015.