

Molecular mechanisms of quercetin effects in rats exposed to prolonged doxorubicin administration

Molekulárne mechanizmy účinkov kvercetínu u potkanov vystavených podávaniu doxorubicínu

Barteková M^{1,2}, Šimončíková P¹, Fogarassyová M¹, Okruhlicová L¹, Tribulová N¹, Radošinská J^{1,2}, Barančík M¹

¹Ústav pre výskum srdca SAV, Bratislava, Slovenská republika

Bartekova M, Simoncikova P, Fogarassyova M, Okruhlicova L, Tribulova N, Radosinska J, Barancik M. **Molecular mechanisms of quercetin effects in rats exposed to prolonged doxorubicin administration.** Cardiology Lett. 2016;25(4):277–285

Abstract. The natural polyphenolic compound quercetin is a flavonoid that exerts various biological effects including anti-oxidative and radical-scavenging activities. Moreover, quercetin has been shown to possess some preventive actions in treatment of cardiovascular diseases. The aim of the present study was to explore the effects of prolonged administration of quercetin on changes induced by the repeated application of doxorubicin in rat hearts. We focused on the ultrastructure of myocardium, biometric parameters, Akt kinase activity, connexin-43 expression, and apoptosis induction. Our aim was also to examine the effects of quercetin on ischemic tolerance in hearts exposed to chronic effects of doxorubicin, and to determine possible mechanisms underlying the effects of quercetin. Our results showed that quercetin prevented several negative chronic effects of doxorubicin: (I) it reversed doxorubicin-induced blood pressure increase; (II) mediated improvement of deleterious effects of doxorubicin on ultrastructure of left ventricle; and (III) reversed effects of doxorubicin on apoptosis induction. Moreover, we showed that rat hearts exposed to the effects of quercetin were more resistant to ischemia/reperfusion injury. The effects of quercetin on modulation of ischemic tolerance were linked to Akt kinase activation and connexin-43 up-regulation. Taken together, these results demonstrate that prolonged treatment with quercetin prevented the negative chronic effects of doxorubicin on blood pressure, cellular damage, and apoptosis induction. Moreover, quercetin influenced myocardial responses to acute ischemic stress. These facts bring new insights into the mechanisms of quercetin action on rat hearts exposed to the chronic effects of doxorubicin. Fig. 4, Tab. 1, Ref. 29, online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: quercetin – doxorubicin – heart – ischemic tolerance – cell signaling

Barteková M, Šimončíková P, Fogarassyová M, Okruhlicová L, Tribulová N, Radošinská J, Barančík M. **Molekulárne mechanizmy účinkov kvercetínu u potkanov vystavených podávaniu doxorubicínu.** Cardiology Lett. 2016;25(4):277–285

Abstrakt. Prírodný polyfenol kvercetín patrí medzi flavonoidy – látky s viacerými biologicky významnými aktivitami. Medzi ne patrí napríklad vychytávanie voľných radikálov, významné sú aj jeho antioxidačné účinky. Okrem toho je kvercetín účinný aj v prevencii a liečbe niektorých kardiovaskulárnych ochorení. Cieľom tejto práce bolo zistiť účinky dlhodobého podávania kvercetínu na molekulárne zmeny v srdcovom tkanive pot-

Z ¹Ústavu pre výskum srdca SAV, Bratislava a ²Fyziologického ústavu LFUK, Bratislava, Slovenská republika

Do redakcie došlo dňa 11. apríla 2016; prijaté dňa 15. apríla 2016

Adresa pre korešpondenciu: RNDr. Monika Barteková, PhD., Ústav pre výskum srdca SAV, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: monika.bartekova@savba.sk

Primárna práca bola publikovaná v plnom rozsahu v: Bartekova M, Simoncikova P, Fogarassyova M, Ivanova M, Okruhlicova L, Tribulova N, Dovinova I, Barancik 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(4):8168-85. doi: 10.3390/ijms16048168.

kanov vyvolané opakovanou aplikáciou doxorubicínu. Zamerali sme sa na zmeny v ultraštruktúre myokardu, biometrické parametre, zmeny v aktivite Akt kinázy a expresii konexínu-43, ako aj indukciu apoptózy. Cieľom práce bolo tiež zistiť vplyv kvercetínu na odolnosť srdca proti ischémii u potkanov vystavených chronickým účinkom doxorubicínu, ako aj odhaliť molekulárne mechanizmy zapojené do účinkov kvercetínu. Naše výsledky ukázali, že podávanie kvercetínu zmierňuje niektoré negatívne účinky doxorubicínu: (I) zvýšený krvný tlak potkanov; (II) negatívny dopad na ultraštruktúru ľavej komory srdca; a (III) indukciu apoptózy. Okrem toho sme zistili, že srdcia potkanov boli vplyvom podávania kvercetínu odolnejšie proti ischemicko-reperfúznemu poškodeniu. Táto zvýšená odolnosť bola spojená s aktiváciou Akt kinázy a up-reguláciou konexínu-43. V súhrne naše výsledky ukázali, že kvercetín bol schopný zmierniť negatívne účinky doxorubicínu na krvný tlak, ultraštruktúru buniek, a tiež zabránil indukciu apoptózy. Navyše, kvercetín pozitívne ovplyvnil odpoveď srdca na akútny ischemický stres. Tieto skutočnosti prinášajú nový pohľad na mechanizmy pôsobenia kvercetínu pri srdciach vystavených chronickým účinkom doxorubicínu. Obr. 4, Tab. 1, Lit. 29, online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: kvercetín – doxorubicín – srdce – odolnosť proti ischémii – bunková signalizácia

Kvercetín (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavón) patrí do skupiny látok nazývaných polyfenoly, ktoré sa prirodzene vyskytujú v takých zložkách potravy, ako zelenina, ovocie, ale napríklad aj v červenom víne (1). Tento flavonoid sa vyznačuje viacerými biologicky významnými vlastnosťami, ku ktorým patria jeho antioxidačné, protizápalové, antikoagulačné efekty, ako aj schopnosť vychytávať voľné radikály (2 – 4). V ostatných rokoch sa ukázalo, že kvercetín má pozitívne účinky v prevencii a liečbe kardiovaskulárnych ochorení (5 – 11). V experimentálnych štúdiách sa zistilo, že kvercetín má vazodilatačné účinky a znižuje krvný tlak u potkanov s dedične vyvinutou hypertenziou, tzv. spontánne hypertenzných potkanov (5, 6), ako aj u potkanov kŕmených diétou s vysokým obsahom tuku a sacharózy (7). Akútna aplikácia kvercetínu pred ischémiou alebo počas reperfúzie má ochranný účinok na srdcia vystavené ischemicko-reperfúznemu poškodeniu (8, 9). V inej štúdii sa zase preukázalo, že kvercetín znižuje rozsah infarktového ložiska u normálnych aj diabetických potkanov (10). Tieto výsledky poukazujúce na schopnosť kvercetínu modulovať odolnosť srdca proti ischemicko-reperfúznemu poškodeniu u diabetických potkanov naznačujú, že kvercetín by mohol ovplyvniť aj odolnosť srdca vystavených inému dlhodobému stresovému stimulu.

Aplikácia antracyklínu doxorubicínu vyvoláva chronické patologické zmeny v tkanive srdca. Doxorubicín sa úspešne využíva v liečbe rôznych onkologických ochorení, ako sú napríklad solídne tumory, leukémie, lymfómy či sarkómy mäkkých tkanív (12). Jeho klinické použitie však značne obmedzujú jeho negatívne vedľajšie účinky na srdce. Medzi mechanizmy podieľajúce sa na kardiotoxických účinkoch doxorubicínu patrí napríklad zlyhanie činnosti mitochondrií spôsobené nahromadením vápnika a reaktívnych foriem kyslíka, čo vedie k oxidačnému stresu, nekróze a spusteniu pro-apoptotickej signalizácie (12 – 14). Aplikácia doxorubicínu tiež môže ovplyvniť citlivosť srdca na ischemické poškodenie, čo sa ukázalo v nedávnej štúdii, kde podanie doxorubicínu významne zväčšilo rozsah infarktového ložiska v dôsledku

ischémie (15). Na druhej strane, v určitých fázach svojho pôsobenia môže doxorubicín vyvolať aj adaptačné odpovede srdca (16).

Cieľom tejto práce bolo sledovať účinky dlhodobého podávania kvercetínu na zmeny, ktoré vyvoláva v srdciach potkanov opakovaná aplikácia doxorubicínu. Zamerali sme sa najmä na zmeny v ultraštruktúre srdcového tkaniva a biometrické parametre, ako aj zmeny v indukciu apoptózy. Okrem toho bolo cieľom práce otestovať vplyv kvercetínu na odolnosť srdca u zvierat, ktorým bol dlhodobo podávaný doxorubicín, proti ischémii a zmapovať molekulárne mechanizmy, podieľajúce sa na účinkoch kvercetínu.

Materiál a metódy

Experimentálny model

V štúdiu sa použili 11-týždňové potkany kmeňa Wistar, ktoré sa počas experimentu držali pri konštantnej teplote 22 – 24 °C a štandardná peletová strava a pitná voda im boli k dispozícii „ad libitum“. Potkany boli rozdelené do štyroch experimentálnych skupín: kontrolnej (C), liečenej doxorubicínom (DOX), liečenej kvercetínom (QCT) a liečenej doxorubicínom + kvercetínom (DOX-QCT). Doxorubicín bol aplikovaný intraperitoneálne v siedmich injekciách aplikovaných každý tretí deň v kumulatívnej dávke 15 mg/kg. Kontrolným zvieratám sa rovnakým spôsobom namiesto doxorubicínu podával fyziologický roztok. Kvercetín sa zvieratám podával rozpustený v etanole nakvapkaný na piškótu, kontrolné zvieratá dostávali piškótu s etanolom bez kvercetínu. Podávanie kvercetínu začalo v ten istý deň, keď potkany dostali prvú injekciu doxorubicínu (fyziologického roztoku) a pokračovalo ešte tri týždne po ukončení aplikácie doxorubicínu (spolu teda šesť týždňov). Osem týždňov po ukončení aplikácie doxorubicínu/fyziologického roztoku boli zvieratá uvedené do hlbkej anestézie s použitím tiopentalu (50 mg.kg⁻¹, i. p.). Srdcia potkanov boli vyňaté z organizmu

a použité buď na perfúziu podľa Langendorffa a testovanie odolnosti proti I/R poškodeniu, alebo na izoláciu vzoriek tkaniva ľavej komory.

Všetky experimenty na zvieratách prebehli v súlade s nariadením vlády č. 289/2003 schváleným Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR a schválené etickou komisiou Ústavu pre výskum srdca SAV, projekt č. 1873/11-221.

Meranie systolického tlaku krvi a srdcovej frekvencie

Systolický tlak krvi a srdcová frekvencia boli merané s použitím neinvazívnej metódy pomocou chvostovej manžety s využitím prístroja PowerLab 4/30. Tieto parametre sa merali dvakrát v priebehu experimentu, prvý raz pred prvým podaním doxorubicínu/fyziologického roztoku a druhý raz osem týždňov po ukončení aplikácie doxorubicínu.

Perfúzia izolovaných srdíc

Na zistenie odolnosti srdíc proti ischemicko-reperfúznemu poškodeniu boli srdcia vyňaté z organizmu zvierat a perfundované metódou podľa Langendorffa a vystavené protokolu ischemie a reperfúzie (17). Experimentálny protokol pozostával z 30-minútovej globálnej ischemie srdca navodenej zastavením prietoku perfúzneho roztoku a následnej 40-minútovej reperfúzie. Funkčné parametre srdca sa merali počas celej reperfúzie a ich postischemická obnova bola vyjadrená ako percento z predischemických hodnôt.

Príprava vzoriek srdcového tkaniva

Na konci „in vivo“ fázy experimentu boli zvieratá anestetizované pomocou tiopentalu (50 mg/kg, i. p.) a po rýchlej torakotómii sa im okamžite vyňali srdcia. Ďalšie spracovanie

tkaniva bolo prispôbené metodickým potrebám stanovenia konkrétneho parametra, zmrazením v tekutom dusíku pre biochemické analýzy alebo zafixovaním do glutaraldehydu pre elektrónovú mikroskopiu.

Transmisná elektrónová mikroskopia

Vzorky tkaniva ľavej komory srdca sa spracovali rutinným spôsobom pre elektrónovú mikroskopiu (17). Ultraštruktúra jednotlivých vzoriek tkaniva sa následne pozorovala pomocou elektrónového mikroskopu Tesla 500.

Analýza vybraných proteínov

Expresia vybraných proteínov sa stanovila metódou „Western blot“ vo vzorkách vyizolovaných zo zmrazeného tkaniva ľavej komory nami štandardne používanou izolačnou metódou (18). Proteíny obsiahnuté vo vzorkách sa rozdelili podľa molekulových hmotností pomocou gélovej elektroforézy (SDS-PAGE), preniesli metódou Western blottingu na nitrocelulózovú membránu a detegovali s využitím špecifických protilátok s následnou detekciou pomocou metódy zosilnenej chemiluminiscencie (ECL).

Štatistické vyhodnotenie údajov

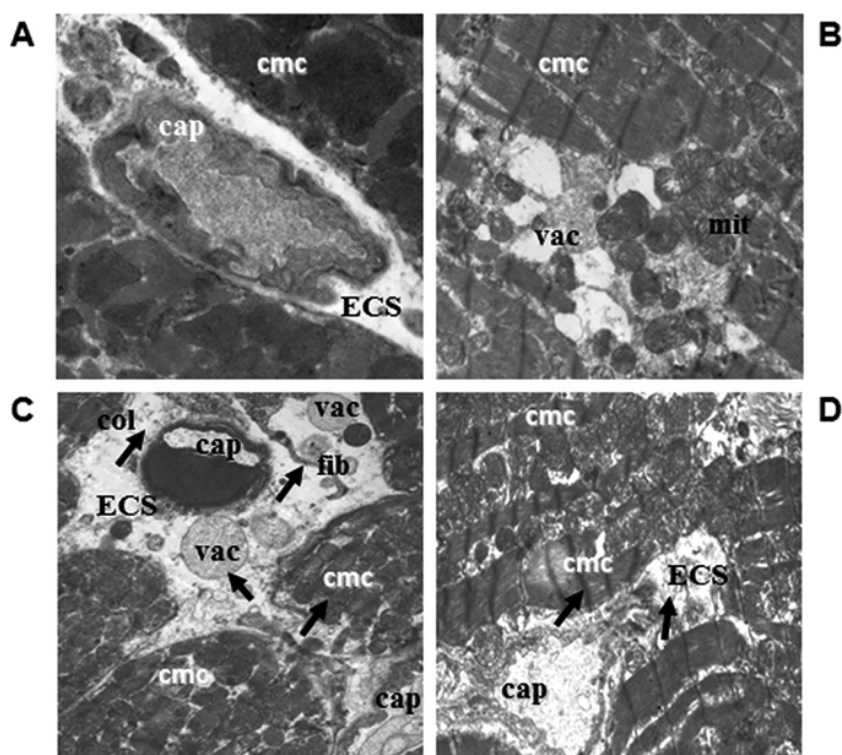
Štatisticky významné rozdiely sa vyhodnocovali vždy medzi dvoma konkrétnymi experimentálnymi skupinami: účinky DOX a/alebo QCT sa hodnotili vždy vzhľadom na kontrolnú skupinu, kombinované podanie DOX+QCT sa porovnávalo vždy so skupinou, ktorej sa aplikoval len DOX (DOX-QCT vs. DOX). Pre určenie štatisticky významných rozdielov sa použila jednocestná analýza variancie (one-way ANOVA) s následným Bonferroniho post-hoc testu alebo Studentovho

Tabuľka 1 Vplyv kvercetínu na biometrické parametre kontrolných potkanov a potkanov vystavených chronickým účinkom doxorubicínu

Table 1 Effects of quercetin on biometric parameters in normal and doxorubicin-treated rats

Parameter	C	QCT	DOX	DOX-QCT
Hmotnosť tela (Body weight (BW) (g))	432,7 ± 13,3	428,6 ± 21,3	384,6 ± 16,8^a	355,4 ± 17,1
Prírastok hmotnosti (Weight gain) (g)	154,8 ± 11,9	153,5 ± 14,4	107,2 ± 13,2^a	89,3 ± 16,3
Hmotnosť srdca (Heart weight (HW) (g))	1,43 ± 0,09	1,37 ± 0,12	1,26 ± 0,07	1,11 ± 0,06
Hmotnosť srdca/tela (HW/BW) (x100)	3,325 ± 0,196	3,162 ± 0,211	3,282 ± 0,176	3,170 ± 0,174
Hmotnosť ľavej komory (Left ventricle weight) (mg)	870,6 ± 51,3	841,7 ± 86,3	822,7 ± 39,5	740,8 ± 34,0
Systolický tlak krvi (Systolic blood pressure) (mmHg)	113 ± 4	120 ± 3	137 ± 4^a	118 ± 5^b
Srdcová frekvencia (Heart rate) (min ⁻¹)	369 ± 5	376 ± 16	392 ± 6^a	368 ± 9^b

C – kontrolné zvieratá (control rats); QCT – zvieratá, ktorým sa podával kvercetín (quercetin-treated rats); DOX – zvieratá vystavené účinkom doxorubicínu (doxorubicin-treated rats); DOX-QCT – zvieratá, ktorým sa podával doxorubicín aj kvercetín (rats treated with both doxorubicin and quercetin). Údaje sú prezentované ako priemer ± stredná chyba priemeru (SEM) (n = 12 per group). Štatistická významnosť rozdielov medzi skupinami bola posúdená s použitím jednocestnej analýzy ANOVA a následného Bonferroniho post-hoc testu. Významnosť rozdielov bola vyhodnocovaná medzi skupinami C a DOX (alebo QCT) (a), ako aj medzi skupinami DOX a DOX-QCT (b), a p < 0,05 vs. C, b p < 0,05 vs. DOX. (Data are presented as the mean ± SEM (n = 12 per group). Statistical differences: ^ap < 0.05 vs. C, ^bp < 0.05 vs. DOX. Statistically significant changes are marked in bold).



Obrázok 1 Ultraštruktúra tkaniva ľavej komory srdca vizualizovaná pomocou transmisného elektrónového mikroskopu

Figure 1 Electron microscopic images showing qualitative changes in ultrastructure of the left ventricle of rat hearts.

(A) Tkanivo srdca u zvierat z kontrolnej skupiny vykazuje normálnu štruktúru kardiomyocytov a žiadne zmeny v extracelulárnom priestore (ECS). (B) Štruktúra tkaniva srdca zo zvierat, ktorému sa podával kvercetín. (C) Zmeny v štruktúre tkaniva po podávaní doxorubicínu – zmeny štruktúry kardiomyocytov a zmeny v ECS vyznačené šípkami. (D) Ultraštruktúra tkaniva srdca po kombinovanom podaní doxorubicínu a kvercetínu. Šípkami vyznačené pozitívne zmeny oproti zvieratám po podaní samotného doxorubicínu. ECS – extracelulárny priestor; cmc – kardiomyocyty; cap – kapilára; col – kolagén; mit – mitochondria; vac – vakuola; fib – fibroblast. (A) zväčšenie $\times 8000$; (B) zväčšenie $\times 8000$; (C) zväčšenie $\times 6000$; (D) zväčšenie $\times 6000$.

(A) Electron micrograph of control rat heart showing normal architecture of cardiomyocytes and without changes in extracellular space (ECS); (B) Electron micrograph of the myocardium after treatment with quercetin; (C) Electron micrograph of the myocardium affected with doxorubicin demonstrating subcellular alterations of cardiomyocytes and extracellular space (arrows); (D) Ultrastructure of the myocardium of rats treated with both quercetin and doxorubicin. Arrows indicate improvement of some deleterious subcellular alterations induced by doxorubicin. ECS: extracellular space; cmc: cardiomyocytes; cap: capillary; col: collagen; mit: mitochondria; vac: vacuole; fib: fibroblast. (A) magnification $\times 8000$; (B) magnification $\times 8000$; (C) magnification $\times 6000$; (D) magnification $\times 6000$.

nepárového t-testu. Rozdiely boli vo všetkých testoch považované za štatisticky významné ak $P < 0,05$.

Výsledky

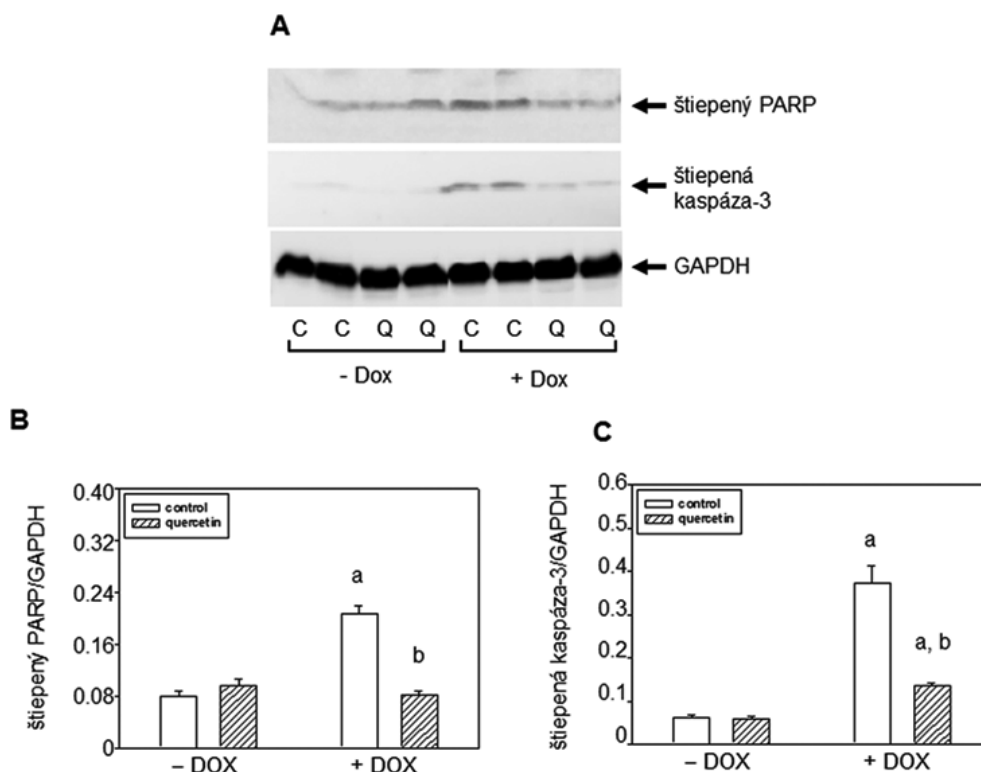
Účinky kvercetínu na biometrické parametre

Aplikácia samotného kvercetínu neovplyvnila sledované biometrické parametre a nezaznamenali sme žiadne významné rozdiely oproti kontrolnej skupine. Pozorovali sme však zníženie hmotnosť zvierat, ako aj znížený prírastok hmotnosti u potkanov, ktorým sa podával doxorubicín (tabuľka 1). Podávanie kvercetínu zvieratám vystaveným účinkom doxorubicínu nemalo vplyv na tieto parametre. Aplikácia samotného doxorubicínu, rovnako ako aplikácia samotného kvercetínu, nemala žiadny účinok na hmotnosť srdca potkanov, ani na hmotnosť ľavej komory týchto srdca. Osem týždňov po

poslednom podaní doxorubicínu sme zaznamenali zvýšený systolický krvný tlak a srdcovú frekvenciu u potkanov, ktorým sa podával samotný doxorubicín oproti kontrolnej skupine. Podávanie kvercetínu zabránilo tomuto nárastu krvného tlaku a srdcovej frekvencie, vyvolanému účinkom doxorubicínu (tabuľka 1).

Analýza ultraštruktúry tkaniva ľavej komory pomocou elektrónovej mikroskopie

Analýza vzoriek srdcového tkaniva kontrolných zvierat pomocou elektrónovej mikroskopie ukázala, že u týchto zvierat je štruktúra tkaniva intaktná, neporušená, bez známok abnormalít v extracelulárnom priestore (obrázok 1A). V ľavej komore srdca potkanov, ktorým sa podával samotný kvercetín, sme taktiež nepozorovali žiadne zmeny ultraštruktúry, ani žiadne známky poškodenia buniek či zmien v extracelulárnom priestore (obrázok 1B). Na druhej strane, aplikácia doxorubicínu



Obrázok 2 Účinky kvercetínu a doxorubicínu na markery indukcie apoptózy v ľavej komore srdca

Figure 2 Effects of quercetin and doxorubicin on markers of apoptosis induction in the left ventricle of the heart

(A) Hladiny štiepenej kaspázy-3 a štiepeného PARP-u, detegované pomocou metódy Western blotting s použitím špecifických protilátok. Nanáška proteínov vizualizovaná pomocou detekcie hladín GAPDH; (B) Kvantifikácia štiepenej kaspázy-3 normalizovaná na hladiny GAPDH; (C) Kvantifikácia štiepeného PARP-u normalizovaná na hladiny GAPDH; Údaje sú znázornené ako priemer $\pm$ stredná chyba priemeru (S.E.M.); Štatistika: ^a $p < 0,05$ vs. C; ^b $p < 0,05$ vs. DOX. (A) The protein levels of cleaved caspase-3 and cleaved PARP determined by Western blot analysis using specific antibodies. The protein loading is documented using GAPDH; (B) Quantification of cleaved caspase-3 content normalized to the GAPDH protein levels; (C) Quantification of cleaved PARP content normalized to the GAPDH protein levels. Data are presented as mean $\pm$ S.E.M. Statistics: ^a $p < 0.05$ vs. C; ^b $p < 0.05$ vs. DOX.

bicínu viedla k heterogénnym subcelulárnym abnormalitám kardiomyocytov, ako aj k remodelácii extracelulárneho priestoru (**obrázok 1C**). Tieto abnormality sa prejavili najmä zvýšenou hustotou proteínov v extracelulárnej matrix, akumuláciou perivaskulárneho kolagénu, prítomnosťou veľkých a/alebo malých vakuol a fibroblastov. Aplikácia kvercetínu u zvierat, ktorým sa podával zároveň doxorubicín, viedla k zmierneniu poškodenia ultraštruktúry srdcového tkaniva vyvolaného doxorubicínom (**obrázok 1D**).

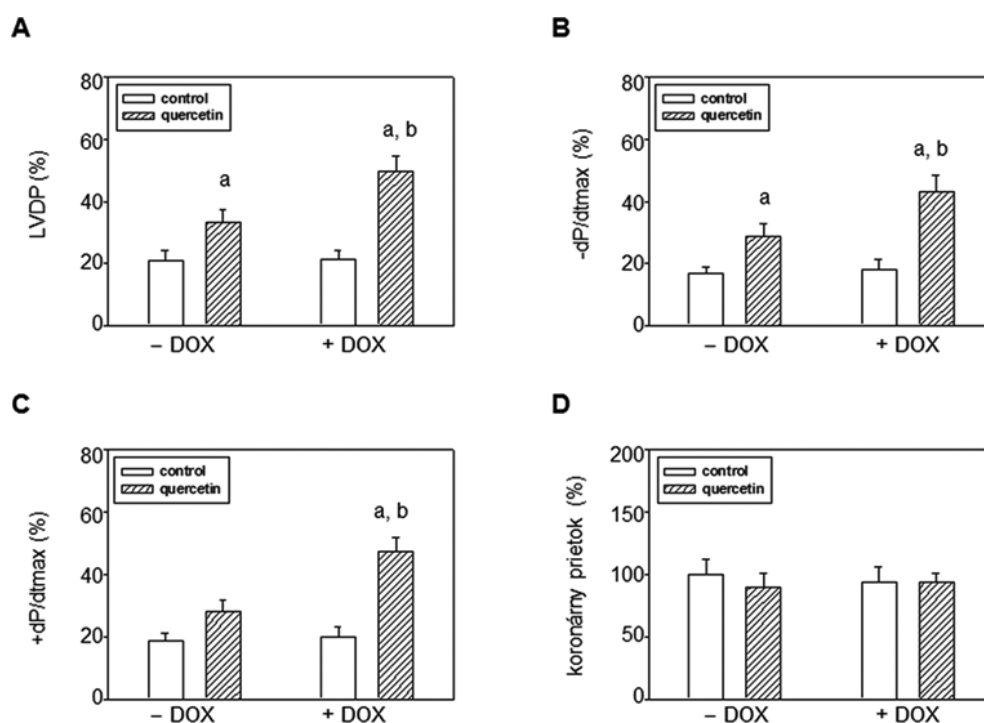
Vplyv kvercetínu na indukciu apoptózy

Použitie špecifickej protilátky proti štiepenej/aktivovanej forme PARP [„poly(Adenosine Diphosphate-Ribose) Polymerase“] ukázalo zvýšené hladiny tohto pro-apoptoticky pôsobiaceho enzýmu v tkanive ľavej komory u potkanov vystavených účinkom doxorubicínu (**obrázky 2A, 2B**). Indukcia apoptózy v dôsledku podávania doxorubicínu sa potvrdila aj zvýšenou aktiváciou pro-apoptotickej kaspázy-3 (**obrázky 2A, 2C**). Na druhej strane, kvercetín zabránil indukcii apoptózy vyvolanej

podávaním doxorubicínu, čo sa prejavilo zabránením nárastu aktívnej (štiepenej) kaspázy-3 (**obrázky 2A, 2C**), ako aj aktívneho PARP-u (**obrázky 2A, 2B**).

Vplyv kvercetínu na odolnosť srdca proti ischemii

Pred ischemiou sa funkčné parametre izolovaných srdc neodlišovali navzájom medzi skupinami, doxorubicín ani kvercetín neovplyvnili bazálne hodnoty funkčných parametrov srdca. Po vystavení srdca ischemii a následnej reperfúzií sme odolnosť srdca hodnotili ako percento obnovy funkčných parametrov proti bazálnym hodnotám. V 40. minúte reperfúzie sme zaznamenali významne zlepšenú obnovu parametrov LVDP a $-(dp/dt)_{max}$ u srdc z oboch skupín zvierat liečených kvercetínom oproti ich zodpovedajúcim kontrolným skupinám (kontrolnej, respektíve liečenej len doxorubicínom) (**obrázky 3A, 3B**). Podobnú tendenciu sme pozorovali aj pri postischemickej obnove parametra $+(dp/dt)_{max}$, rozdiel však bol významný len pri porovnaní skupín DOX-QCT a DOX (**obrázok 3C**). Počas celého experimentu



Obrázok 3 Účinky kvercetínu a doxorubicínu na ischemickú toleranciu srdca

Figure 3 Effects of quercetin and doxorubicin on ischemic tolerance of hearts

(A) Postischemická obnova LVDP; (B) Postischemická obnova $+(dP/dt)_{max}$; (C) Postischemická obnova $-(dP/dt)_{max}$; (D) Postischemická obnova koronárneho prietoku. Obnova parametrov sa merala v 40. minúte reperfúzie po 30-minútovej globálnej ischémii. Obnova všetkých parametrov je vyjadrená percentuálne oproti pred-ischemickým hodnotám. Údaje sú znázornené ako priemer $\pm$ stredná chyba priemeru (S.E.M.); Štatistika: ^a $p < 0,05$ vs. C; ^b $p < 0,05$ vs. DOX. (A) Postischemic recovery of LVDP; (B) Postischemic recovery of $+(dP/dt)_{max}$; (C) Postischemic recovery of $-(dP/dt)_{max}$; (D) Postischemic recovery of the coronary flow. The recovery of parameters was determined after 30 min lasting global ischemia followed by a 40-min reperfusion. The recovery of parameters was expressed as a percentage of pre-ischemic baseline values. Data are presented as mean $\pm$ S.E.M. Statistics: ^a $p < 0.05$ vs. C; ^b $p < 0.05$ vs. DOX.

sme nezaznamenali žiadne významné rozdiely v hodnotách koronárneho prietoku medzi experimentálnymi skupinami (obrázok 3D).

Vplyv kvercetínu na aktiváciu Akt kinázy a expresiu konexínu-43

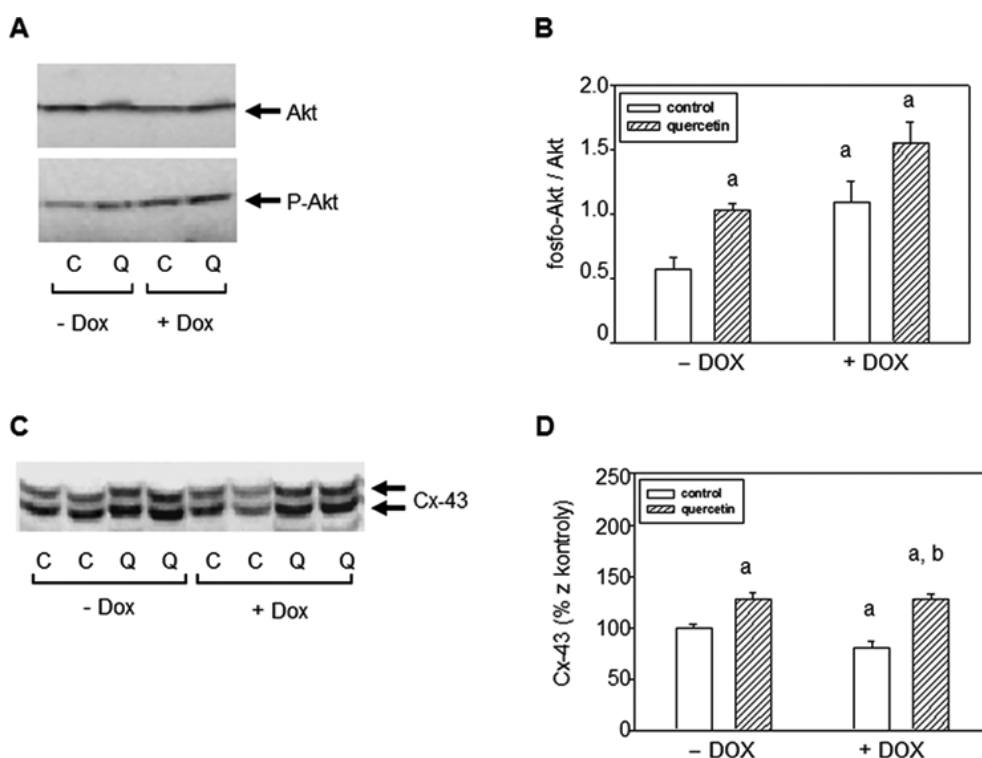
Za účelom zistenia molekulárnych mechanizmov zapojených do kardioprotektívnych účinkov kvercetínu sme sledovali zmeny v expresii a aktivácii Akt kinázy v ľavej komore srdca. Ukázalo sa, že ani vplyvom doxorubicínu ani vplyvom kvercetínu nedošlo k zmenám v celkovej hladine Akt kinázy a nezaznamenali sme žiadne významné rozdiely medzi skupinami (obrázok 4A). Detekcia fosforylovanej formy Akt kinázy pomocou fosfo-špecifickej protilátky však ukázala zvýšenú fosforyláciu Akt kinázy na seríne 473 u zvierat liečených kvercetínom oproti zvieratám, ktorým bol podávaný len fyziologický roztok, respektíve len doxorubicín (obrázok 4A). Pozorovali sme aj významne zvýšenú fosforyláciu Akt kinázy v dôsledku dlhodobého podávania samotného doxorubicínu oproti kontrolnej skupine. Z hľadiska modulácie ischemickej tolerancie srdca je dôležité zdôrazniť, že aplikácia

kvercetínu ešte potencovala túto aktiváciu. Aktivácia Akt kinázy pod vplyvom kvercetínu sa preukázala aj zvýšením pomeru fosforylovanej formy Akt kinázy oproti celkovej hladine Akt kinázy (obrázok 4B).

Expresiu konexínu-43 sme analyzovali v ľavej komore srdca s použitím špecifickej protilátky, ktorá deteguje fosforylovanú aj nefosforylovanú formu tohto proteínu. Podávanie samotného doxorubicínu viedlo k zníženiu expresie konexínu-43, no podávanie kvercetínu zabránilo tomuto zníženiu expresie (obrázok 4C, 4D). Kvercetín navyše zvyšoval expresiu konexínu-43 aj u zvierat, ktorým sa nepodával doxorubicín.

Diskusia

V tejto práci sme ukázali, že dlhodobé podávanie kvercetínu vykazuje pozitívne účinky na srdcia vystavené dlhodobým účinkom doxorubicínu, čo sa prejavilo znížením systolického krvného tlaku zvierat, zníženou mierou poškodenia ultraštruktúry tkaniva ľavej komory srdca a znížením indukcie apoptózy. Navyše sme zistili, že kvercetín



Obrázok 4 Účinky kvercetínu a doxorubicínu na Akt kinázu a konexín-43

Figure 4 Effects of quercetin and doxorubicin on Akt kinase and connexin-43

(A) Western blot poukazujujú na hladiny a špecifickú fosforyláciu Akt kinázy (Ser473); (B) Kvantifikácia fosforylácie Akt kinázy vyjadrená pomerom fosfo-Akt ku celkovej Akt; (C) Western blot hladín konexínu-43 (Cx-43): vrchný band zodpovedá vysoko fosforylovanému Cx-43, spodný band zodpovedá menej fosforylovannej forme Cx-43; (D) Kvantifikácia menej fosforylovannej formy Cx-43. Údaje sú znázornené ako priemer $\pm$ stredná chyba priemeru (S.E.M.); Štatistika: ^a $p < 0,05$ vs. C; ^b $p < 0,05$ vs. DOX. (A) Western blot records showing the changes in protein levels and specific phosphorylation of Akt kinase (Ser473); (B) The quantification of Akt kinase phosphorylation expressed as a ratio of content of phosphorylated Akt kinase to total Akt kinase; (C) Western blot analysis of protein levels of Connexin-43 (Cx-43), the upper band represents the expression of highly phosphorylated Cx-43, the lower band corresponds to Cx-43 phosphorylated to a lower degree; (D) Quantification of content of the lower phosphorylated form of Cx-43. Data are presented as mean $\pm$ S.E.M. Statistics: ^a $p < 0.05$ vs. C; ^b $p < 0.05$ vs. DOX.

zlepšuje postischemickú obnovu funkčných parametrov srdca u zvierat vystavených účinkom doxorubicínu a tieto kardioprotektívne účinky kvercetínu sú spojené s aktiváciou Akt kinázy a zvýšením expresie konexínu-43 v ľavej komore tkaniva srdca.

Naše výsledky demonštrovali, že kvercetín zabraňuje zvýšeniu krvného tlaku v dôsledku pôsobenia doxorubicínu. Je zaujímavé, že kvercetín znižoval krvný tlak len u zvierat s hypertenziou v dôsledku podávania doxorubicínu, nie u normotenzných zvierat, ktorým nebol podávaný doxorubicín. Podobný antihypertenzný účinok kvercetínu sa pozoroval u viacerých iných experimentálnych modelov hypertenzie, tento flavonoid znižoval krvný tlak napríklad u spontánne hypertenzných potkanov (5), Dahlových na soľ senzitivných potkanov (19), ako aj u potkanov kŕmených diétou s vysokým obsahom tuku a sacharózy (7). Bolo popísaných niekoľko možných mechanizmov, potenciálne zapojených do antihypertenzných účinkov kvercetínu, ako napríklad znižovanie oxidačného stresu a zlepšenie vaskulárnych funkcií, podoporené

antioxidačnými a vazodilatačnými účinkami kvercetínu na artérie potkana (20).

Je známe, že chronické účinky antracyklínov sú spojené s remodeláciou morfológie a funkcie tkaniva ľavej komory srdca, ako aj so zmenami kolagénovej siete v srdci (21). V našej práci sme zistili, že dlhodobé podávanie doxorubicínu vedie k heterogénnym subcelulárnym zmenám v tkanive ľavej komory srdca. Podávanie kvercetínu viedlo k prevencii týchto zmien, a to tak subcelulárnym, ako aj zmien v extracelulárnom priestore.

V našej práci sme ďalej zistili, že kvercetín má preventívny účinok na aktiváciu pro-apoptotickej signalizácie v tkanive srdca v dôsledku chronického podávania doxorubicínu. Kvercetín redukuje aktiváciu apoptózy spôsobenú aplikáciou doxorubicínu, čo sa prejavilo na znížení aktivácie kaspázy-3 a štiepenia PARP-u. Zistený anti-apoptotický efekt kvercetínu môže súvisieť so zmenami v aktivitách SOD (17, 22) a je v súlade s popísanými antioxidačnými a anti-apoptotickými funkciami kvercetínu, ako aj s jeho schopnosťou vychytávať voľné kyslíkové radikály (2).

Zistili sme tiež, že dlhodobá aplikácia kvercetínu má pozitívne účinky nielen na zmeny vyvolané chronickým podávaním doxorubicínu, ale navyše dokáže posilniť odolnosť srdca proti následnému akútnemu stresu vyvolanému vystavením srdca ischemii a reperfúzií. Naše výsledky ukázali, že kvercetín zvyšuje post-ischemickú obnovu funkčných parametrov srdca oproti srdciam kontrolným, respektíve vystavených účinkom doxorubicínu, čo poukazuje na zvýšenú odolnosť srdca proti ischemii v dôsledku chronického podávania kvercetínu. Tieto protektívne účinky kvercetínu sa prejavili najmä v lepšom zachovaní kontraktilnej funkcie srdca po ischemii u zvierat vystavených účinkom kvercetínu. Naše ďalšie údaje naznačujú, že ochranný účinok kvercetínu na srdcia vystavené ischemii a reperfúzií by mohol byť sprostredkovaný aj endogénnou aktiváciou Akt kinázy. Zistenie, že aplikácia kvercetínu potencuje aktiváciu Akt kinázy nielen u potkanov, ktorým bol podávaný fyziologický roztok, ale aj u potkanov vystavených účinkom doxorubicínu, je veľmi významné pre vysvetlenie faktu, že zlepšenie ischemickej tolerancie srdca bolo maximálne u skupín s kombinovanou terapiou doxorubicínom a kvercetínom. V literatúre bolo popísané, že aplikácia kvercetínu pred ischemiou („preconditioning“) alebo počas reperfúzie („postconditioning“) má ochranný účinok na srdce proti ischemicko-reperfúznemu poškodeniu (8, 9). V našej práci sme zistili, že kardioprotektívne účinky kvercetínu sa prejavili niekoľko týždňov po ukončení jeho aplikácie. Zaujímavé je tiež zistenie, že kardioprotektívne účinky kvercetínu boli ešte viac zosilnené u zvierat, ktoré boli vystavené dlhodobým účinkom doxorubicínu.

Chronické podávanie doxorubicínu malo za následok poškodenie ultraštruktúry srdcového tkaniva a stimulovalo apoptózu, nemalo však negatívny dopad na odolnosť izolovaných srdca proti ischemii. Domnievame sa, že túto diskrepanciu mohla zapríčiniť aktivácia Akt kinázy v dôsledku podávania doxorubicínu s následným ochranným účinkom na srdce počas ischemie-reperfúzie. Toto vysvetlenie je v súlade so známym faktom, že PI3/Akt signálna dráha má dôležitú úlohu pri adaptácii srdca na rôzne patologické situácie (23, 24), jej aktivácia je spojená s redukciou infarktového ložiska po ischemii (25), ako aj s prevenciou poškodenia srdca po ischemii srdca *in vivo* (26). Na základe týchto poznatkov sa domnievame, že aktivácia Akt kinázy má dôležitú úlohu v prevencii negatívnych účinkov doxorubicínu na srdce v našej práci. Táto domnienka je podporená aj zistením, že úroveň aktivácie Akt kinázy v našej práci mala úzky vzťah s úrovňou kardioprotekcie (postischemickej obnovy funkcie srdca). Tieto dva parametre boli zhodne najvyššie u zvierat s kombinovanou terapiou doxorubicínom a kvercetínom.

Naše výsledky ďalej poukázali na možnosť, že kardioprotektívne účinky kvercetínu by mohli byť spojené s moduláciou tesných spojení v kardiomyocytoch („gap junctions“) prostredníctvom konexínu-43 (Cx-43). Tento proteín zohráva kľúčovú úlohu v mnohých bunkových procesoch v srdci, ako

napríklad pri prenose vnútrobunkových signálov, kontrole bunkovej proliferácie, ako aj pri koordinácii srdcovej kontrakcie, pričom sa predpokladá, že zohráva dôležitú úlohu aj v patofyziologickom procese ischemicko-reperfúzneho poškodenia myokardu (27, 28). V našej súčasnej práci sme zistili, že kardioprotektívne účinky kvercetínu sú spojené so zvýšenou expresiou Cx-43. V súlade s našimi výsledkami sú aj zistenia iných autorov poukazujúce na indukciu Cx-43 v prípade kardioprotektívneho pôsobenia ischemického „preconditioningu“ a diazoxidu u izolovaných srdca potkana (27). Ukázali sme tiež, že dlhodobé pôsobenie doxorubicínu vedie k zníženiu exprese Cx-43 v ľavej komore srdca, pričom toto zníženie bolo inhibované podávaním kvercetínu. Negatívny účinok doxorubicínu na expresiu Cx-43 sa pozoroval aj 14 dní po podávaní doxorubicínu u myši (29), čo je v súlade s našimi výsledkami.

Záver

Výsledky našej práce ukázali, že dlhodobé podávanie kvercetínu zabránilo negatívnym účinkom chronickej aplikácie doxorubicínu na krvný tlak, ultraštruktúru srdcového tkaniva a indukciu apoptózy v tkanive ľavej komory srdca. Podávanie kvercetínu malo pozitívne účinky nielen na negatívne dopady chronického stresu vyvolaného doxorubicínom, ale viedlo aj k zvýšenej odolnosti srdca proti ischemicko-reperfúznemu poškodeniu. Naše výsledky naznačujú, že aktivácia Akt kinázy a up-regulácia konexínu-43 môžu zohrávať dôležitú úlohu v pozitívnych účinkoch kvercetínu proti negatívnym účinkom doxorubicínu, ako aj počas ischemie-reperfúzie srdca.

Podakovanie

Autori ďakujú za podporu Vedeckej grantovej agentúry ministerstva školstva SR a SAV za finančnú podporu tejto práce v podobe grantov: VEGA SR 2/0061/16 a 2/0108/15. Práca bola tiež podporená grantom APVV-0348-12.

Konflikt záujmov

Autori deklarujú, že neexistuje žiadny konflikt záujmov vo vzťahu k tejto práci.

Literatúra

1. Hertog MG, Bueno-de-Mesquita HB, Fehily AM, Sweetnam PM, Elwood PC, Kromhout D. Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the Caerphilly Study. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 1996;5:673–677.
2. Erden Inal M, Kahraman A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet and induced oxidative stress in rats. *Toxicology* 2000;154:21–29. [PubMed]
3. Wu J, Xu X, Li Y, Kou J, Huang F, Liu B, Liu K. Quercetin, luteolin and epigallocatechin gallate alleviate TXNIP and NLRP3-mediated

- inflammation and apoptosis with regulation of AMPK in endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 2014;745:59–68.
4. Yu PX, Zhou QJ, Zhu WW, Wu YH, Wu LC, Lin X, Chen MH, Qiu BT. Effects of quercetin on LPS-induced disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbits. *Thromb Res* 2013;131:270–273.
 5. Duarte J, Perez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2001;133:117–124.
 6. Sanchez M, Galisteo M, Vera R, Villar IC, Zarzuelo A, Tamargo J, Pérez-Vizcaino F, Duarte J. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2006;24:75–84.
 7. 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.
 8. Jin HB, Yang YB, Song YL, Zhang YC, Li YR. Protective roles of quercetin in acute myocardial ischemia and reperfusion injury in rats. *Mol Biol Rep* 2012;39:11005–11009.
 9. Bartekova M, Carnicka S, Pancza D, Ondrejckakova M, Breier A, Ravingerova T. Acute treatment with polyphenol quercetin improves postischemic recovery of isolated perfused rat hearts after global ischemia. *Can J Physiol Pharmacol* 2010;88:465–471.
 10. Annapurna A, Reddy CS, Akondi RB, Rao SR. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. *J Pharmacy Pharmacol* 2009;61:1365–1374.
 11. Milton Prabu S, Muthumani M, Shagirtha K. Quercetin potentially attenuates cadmium induced oxidative stress mediated cardiotoxicity and dyslipidemia in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013;17:582–595.
 12. 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.
 13. 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.
 14. Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998;339:900–905.
 15. Gharanei M, Hussain A, Janneh O, Maddock HL. Doxorubicin induced myocardial injury is exacerbated following ischaemic stress via opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013;268:149–156.
 16. Simoncikova P, Ravingerova T, Barancik M. The effect of chronic doxorubicin treatment on mitogen-activated protein kinases and heat stress proteins in rat hearts. *Physiol Res* 2008;57:S97–S102.
 17. 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(4):8168–8185.
 18. Ivanova M, Dovinova I, Okruhlicová 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.
 19. Mackraj I, Govender T, Ramesar S. The antihypertensive effects of quercetin in a salt-sensitive model of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;51:239–245.
 20. Rendig SV, Symons JD, Longhurst JC, Amsterdam EA. Effects of red wine, alcohol, and quercetin on coronary resistance and conductance arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38:219–227.
 21. Adamcova M, Potacova A, Popelova O, Sterba M, Mazurova Y, Aupperle H, Gersl V. Cardiac remodeling and MMPs on the model of chronic daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits. *Physiol Res* 2010;59:831–836.
 22. Dovinová I, Barančík M, Krátka D, Fogarassyová M, Kvandová M, Barteková M. Pathological changes in cardiovascular system in long-term doxorubicin-treated rats and effect of quercetin. *Cardiology Letters* 2015; 24: 243–246.
 23. Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: Its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2004;63:305–312.
 24. Strniskova M, Ravingerova T, Neckar J, Kolar F, Pastorekova S, Barancik M. Changes in the expression and/or activation of regulatory proteins in rat hearts adapted to chronic hypoxia. *Gen Physiol Biophys* 2006;25:25–41.
 25. Ravingerova T, Matejikova J, Neckar J, Andelova E, Kolar F. Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart. *Mol Cell Biochem* 2007;297:111–120.
 26. Matsui T, Tao J, del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M, Force TL, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A. Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation* 2001;104:330–335.
 27. Srisakuldee W, Jeyaraman MM, Nickel BE, Tanguy S, Jiang ZS, Kardami E. Phosphorylation of connexin-43 at serine 262 promotes a cardiac injury-resistant state. *Cardiovasc Res* 2009;83:672–681.
 28. Garcia-Dorado D, Rodriguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M. Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 2004;61:386–401.
 29. Zhang H, Zhang A, Guo C, Shi C, Zhang Y, Liu Q, Sparatore A, Wang C. S-diclofenac protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice via ameliorating cardiac gap junction remodeling. *PLoS ONE* 2011;6:e26441.