

lek. Aleksandra Maria Sobiborowicz-Sadowska

*Ocena roli neprylizyny i farmakologicznego zahamowania jej
aktywności w zwierzęcym modelu kardiotoksyczności antracyklin*

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska

Promotor pomocniczy: dr n. med. Katarzyna Kamińska

Katedra i Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023 r.

Słowa kluczowe:

antracykliny, ARNI, kardiotoxycznosc, NEPI, neprylizyna

Keywords:

anthracyclines, ARNI, cardiotoxicity, NEPI, neprilysin

Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania dla Promotora mojej pracy Pani Prof. Agnieszki Cudnoch-Jędrzejewskiej oraz Promotora Pomocniczego Pani Dr Katarzyny Kamińskiej, a także dla wszystkich Pracowników Katedry i Zakładu Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej za tak chętnie dzielenie się wiedzą i doświadczeniem oraz nieocenioną pomoc w przygotowaniu niniejszej rozprawy.

Dziękuję także moim bliskim, zwłaszcza Mężowi i Mamie, za bezgraniczną wiarę we mnie, zapewnienie oparcia w trudnych chwilach i nieustające wsparcie w dążeniu do celu.

Źródło finansowania badań:

Praca powstała w ramach projektu „*TIME 2 MUW doskonałość dydaktyczna szansą rozwoju Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego*” współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój na lata 2014-2020, numer umowy o dofinansowanie: POWR.03.05.00-00-Z040/18-00.

SPIS TREŚCI

SPIS TABEL I RYGIN	5
1. Spis Tabel.....	5
2. Spis Rycin	5
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	9
STRESZCZENIE	12
ABSTRACT	14
1. WSTĘP.....	16
1.1. Wprowadzenie	16
1.2. Kardiotoxycznosc antracyklin.....	17
1.2.1. Definicja kardiotoxycznosci antracyklin	17
1.2.2. Charakterystyka kardiotoxycznosci antracyklin.....	18
1.2.3. Epidemiologia kardiotoxycznosci antracyklin	19
1.2.4. Charakterystyczne dla AIC zmiany patomorfologiczne	20
1.2.5. Zwierzone modele AIC.....	22
1.2.6. Wewnatrzkomorkowe mechanizmy AIC	25
1.2.7. Czynniki ryzyka AIC	28
1.2.8. Metody zapobiegania kardiotoxycznosci antracyklin	30
1.2.9. Biomarkery kardiotoxycznosci antracyklin	33
1.3. Neprylizyna	35
1.3.1. Wplyw NEP na uk lad peptydow natriuretycznych	36
1.3.2. Wplyw NEP na RAAS	37
1.3.3. Ekspresja NEP w chorobach uk ladu krzazenia.....	37
1.3.4. Neprylizyna jako biomarker.....	38
1.3.5. Farmakologiczne zahamowanie aktywnosci NEP w HF	39
1.3.6. Farmakologiczne zahamowanie aktywnosci NEP w prewencji AIC	43
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	45

2.1.	Założenia pracy.....	45
2.2.	Cele pracy	45
3.	MATERIAŁ I METODY	47
3.1.	Ogólna charakterystyka zwierząt.....	47
3.2.	Procedury badawcze	48
3.2.1.	Przebieg badania	48
3.2.3.	Dożołądkowe podanie badanych substancji.....	53
3.2.4.	Badanie echokardiograficzne	53
3.2.5.	Badanie elektrokardiograficzne.....	57
3.2.6.	Pobranie krwi i narządów.....	57
3.2.7.	Pomiar długości kości piszczelowej.....	58
3.3.	Badania histopatologiczne	58
3.4.	Badania biochemiczne	61
3.4.1.	Badania biochemiczne z surowicy	61
3.4.2.	Badania biochemiczne lewej komory serca	62
3.4.3.	Ocena aktywności NEP i sNEP.....	62
3.5.	Badania metodami biologii molekularnej.....	63
3.5.1.	Ocena ekspresji mRNA NEP	63
3.6.	Analiza statystyczna	63
4.	WYNIKI.....	65
4.1.	Część Ia – model ostrej AIC.....	65
4.1.1.	Ogólna charakterystyka zwierząt	65
4.1.2.	Parametry echokardiograficzne.....	67
4.1.3.	Analiza histopatologiczna	70
4.1.4.	Ekspresja mRNA, poziom białka i aktywność NEP w LV	71
4.1.5.	Stężenie sNEP w surowicy.....	72
4.2.	Część Ib – model przewlekłej AIC.....	74
4.2.1.	Ogólna charakterystyka zwierząt	74

4.2.2.	Parametry echokardiograficzne	77
4.2.3.	Analiza histopatologiczna	81
4.2.4.	Ekspresja mRNA, poziom białka i aktywność NEP w LV	82
4.3.	Część II.....	87
4.3.1.	Ogólna charakterystyka zwierząt	87
4.3.2.	Parametry echokardiograficzne	90
4.3.3.	Badanie elektrokardiograficzne.....	93
4.3.4.	Analiza histopatologiczna	93
4.3.5.	Parametry biochemiczne z surowicy	94
4.3.6.	Badanie pilotażowe	95
5.	DYSKUSJA.....	98
5.1.	Część Ia – model ostrej AIC.....	99
5.1.1.	Ogólna charakterystyka zwierząt	99
5.1.2.	Parametry echokardiograficzne	100
5.1.3.	Ocena histopatologiczna	101
5.1.4.	Ekspresja mRNA, poziom białka i aktywność NEP w LV	101
5.1.5.	Stężenie sNEP w surowicy.....	103
5.2.	Część Ib – model kardiotoksyczności przewlekłej.....	104
5.2.1.	Ogólna charakterystyka zwierząt	104
5.2.2.	Parametry echokardiograficzne	105
5.2.3.	Ocena histopatologiczna	106
5.2.4.	Ekspresja mRNA, poziom białka i aktywność NEP w LV	106
5.2.5.	Stężenie sNEP w surowicy.....	107
5.3.	Część II.....	108
5.3.1.	Ogólna charakterystyka zwierząt	108
5.3.2.	Parametry echokardiograficzne	109
5.3.3.	Parametry elektrokardiograficzne	109
5.3.4.	Ocena histopatologiczna	110

5.3.5. Biochemiczne parametry z surowicy	110
5.3.6. Obserwacje z badania pilotażowego	111
6. WNIOSKI	113
PODSUMOWANIE	114
7. OGRANICZENIA PRACY	115
PIŚMIENNICTWO.....	116

SPIS TABEL I RYCIN

1. Spis Tabel

Tabela 1. Podział bezobjawowej dysfunkcji skurczowej LV związanej z terapią przeciwnowotworową.	17
Tabela 2. Stratyfikacja podstawowego ryzyka CTR-CVT u pacjentów z planowanym leczeniem onkologicznym.	29
Tabela 3. Grupy zwierząt doświadczalnych użyte w pracy doktorskiej.	48
Tabela 4. Parametry oceniane w Części Ia.	49
Tabela 5. Parametry oceniane w Części Ib.	50
Tabela 6. Parametry oceniane w Części II.	52
Tabela 7. Schematy dawkowania DOX użyte w poszczególnych częściach badania.	53
Tabela 8. Histopatologiczna ocena stopnia uszkodzenia miokardium.	61
Tabela 9. Śmiertelność zwierząt w Części Ia.	65
Tabela 10. Ocena histopatologiczna LV w Części Ia.	70
Tabela 11. Śmiertelność zwierząt w Części Ib.	74
Tabela 12. Ocena histopatologiczna LV w Części Ib.	81
Tabela 13. Śmiertelność zwierząt w Części II.	87
Tabela 14. Czas trwania zespołu QRS [ms] oraz skorygowany czas trwania odstępu QT (QTc) [ms] w grupie kontrolnej (NaCl) oraz doświadczalnej (Sac/Val).	93
Tabela 15. Ocena histopatologiczna LV w Części II.	94
Tabela 16. Parametry oceniane w badaniu pilotażowym w 1 oraz 29 dobie badania.	96
Tabela 17. Wartości parametrów ocenianych w badaniu pilotażowym (Sac) w porównaniu do grupy kontrolnej z Części II badania (NaCl <i>p.o.</i>).	97

2. Spis Rycin

Rycina 1. Schemat wewnątrzkomórkowych mechanizmów AIC.	27
Rycina 2. Schemat mechanizmu działania ARNI.	42
Rycina 3. Przebieg badania w Części Ia.	48
Rycina 4. Przebieg badania w Części Ib.	50
Rycina 5. Przebieg badania w Części II.	51
Rycina 6. Metoda pomiaru opisywanych parametrów echokardiograficznych.	55
Rycina 7. Zdjęcia preparatów histopatologicznych mięśnia sercowego.	60

Rycina 8. Długość kości piszczelowej (TL) w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	65
Rycina 9. Stosunek całkowitej masy ciała (BW) do długości kości piszczelowej (TL) w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	66
Rycina 10. Stosunek masy serca (HW) do długości kości piszczelowej (TL) w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	66
Rycina 11. A. Wymiar końcowoskurczowy lewej komory serca (LVIDs) oraz B. wymiar końcoworozkurczowy lewej komory serca (LVIDd) w 1 i 2 dobie badania w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	67
Rycina 12. A. Frakcja skracania lewej komory serca (LVFS) oraz B. frakcja wyrzutowa lewej komory serca (LVEF) w 1 i 2 dobie badania w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	68
Rycina 13. A. Rytm serca (HR), B. stosunek objętości wyrzutowej lewej komory serca (SV) do długości kości piszczelowej (TL) oraz C. stosunek pojemności minutowej serca (CO) do długości kości piszczelowej (TL) w 1 i 2 dobie badania w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	69
Rycina 14. Histopatologiczny indeks uszkodzenia miokardium (indeks HP) w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	70
Rycina 15. Ekspresja mRNA neprylizyny (NEP) w lewej komorze serca w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	71
Rycina 16. Poziom białka neprylizyny (NEP) w lewej komorze serca w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	71
Rycina 17. Aktywność enzymatyczna neprylizyny (NEP) w lewej komorze serca w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	72
Rycina 18. Stężenie wolnej neprylizyny (sNEP) w surowicy w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	73
Rycina 19. Zależność między stężeniem wolnej neprylizyny (sNEP) w surowicy a A. histopatologicznym indeksem uszkodzenia miokardium (Indeks HP) oraz B. stopniem wakuolizacji kardiomiocytów.....	73
Rycina 20. Długość kości piszczelowej (TL) w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	74
Rycina 21. Stosunek masy ciała (BW) do długości kości piszczelowej (TL) w 1 i 29 dobie badania w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	75
Rycina 22. Stosunek masy serca (HW) do długości kości piszczelowej (TL) w 1 i 29 dobie badania w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	76

Rycina 23. A. Wymiar końcowoskurczowy lewej komory serca (LVIDs) oraz B. wymiar końcoworozkurczowy lewej komory serca (LVIDd) w 1 i 29 dobie badania w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	77
Rycina 24. A. Frakcja skracania lewej komory serca (LVFS) oraz B. frakcja wyrzutowa lewej komory serca (LVEF) w 1 i 29 dobie badania w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	78
Rycina 25. A. Rytm serca (HR), B. stosunek objętości wyrzutowej lewej komory serca (SV) do długości kości piszczelowej (TL) oraz C. stosunek pojemności minutowej serca (CO) do długości kości piszczelowej (TL) w 1 i 29 dobie badania w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	80
Rycina 26. Histopatologiczny indeks uszkodzenia miokardium (Indeks HP) w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	81
Rycina 27. Ekspresja mRNA neprylizyny (NEP) w lewej komorze serca w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	82
Rycina 28. Poziom białka neprylizyny (NEP) w lewej komorze serca w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	83
Rycina 29. Aktywność enzymatyczna neprylizyny (NEP) w lewej komorze serca w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	83
Rycina 30. Stężenie wolnej neprylizyny (sNEP) w surowicy zwierząt w modelu przewlekłej AIC w grupie doświadczalnej (DOX <i>i.p.</i>) i kontrolnej (NaCl <i>i.p.</i>).....	84
Rycina 31. Zależność między stężeniem wolnej neprylizyny (sNEP) w surowicy a A. frakcją skracania lewej komory serca (LVFS) oraz B. frakcją wyrzutową lewej komory serca (LVEF) w grupie doświadczalnej w 29 dobie badania.....	85
Rycina 32. Zależność między stężeniem wolnej neprylizyny (sNEP) w surowicy a stosunkiem objętości wyrzutowej lewej komory serca (SV) do długości kości piszczelowej (TL) w 29 dobie badania w A. grupie doświadczalnej oraz B. grupie kontrolnej.....	85
Rycina 33. Zależność między stężeniem wolnej neprylizyny (sNEP) w surowicy a stosunkiem pojemności minutowej serca (CO) do długości kości piszczelowej (TL) w 29 dobie badania w A. grupie doświadczalnej oraz B. grupie kontrolnej.....	86
Rycina 34. Długość kości piszczelowej (TL) w grupie kontrolnej (NaCl <i>p.o.</i>) i doświadczalnej (Sac/Val <i>p.o.</i>).....	87
Rycina 35. Stosunek masy ciała (BW) do długości kości piszczelowej (TL) w 1 i 29 dobie badania w grupie kontrolnej (NaCl <i>p.o.</i>) i doświadczalnej (Sac/Val <i>p.o.</i>).....	88
Rycina 36. Stosunek masy serca (HW) do długości kości piszczelowej (TL) w 1 oraz 29 dobie badania w grupie kontrolnej (NaCl <i>p.o.</i>) i doświadczalnej (Sac/Val <i>p.o.</i>).....	89

Rycina 37. A. Wymiar końcowoskurczowy lewej komory serca (LVIDs) oraz B. wymiar końcoworozkurczowy lewej komory serca (LVIDd) w 1 i 29 dobie badania w grupie kontrolnej (NaCl <i>p.o.</i>) i doświadczalnej (Sac/Val <i>p.o.</i>).....	90
Rycina 38. A. Frakcja skracania lewej komory serca (LVFS) oraz B. frakcja wyrzutowa lewej komory serca (LVEF) w 1 i 29 dobie badania w grupie kontrolnej (NaCl <i>p.o.</i>) i doświadczalnej (Sac/Val <i>p.o.</i>).....	91
Rycina 39. A. Rytm serca (HR), B. stosunek objętości wyrzutowej lewej komory serca (SV) do długości kości piszczelowej (TL) oraz C. stosunek pojemności minutowej serca (CO) do długości kości piszczelowej (TL) w 1 i 29 dobie badania w grupie kontrolnej (NaCl <i>p.o.</i>) i doświadczalnej (Sac/Val <i>p.o.</i>).....	92
Rycina 40. Histopatologiczny indeks uszkodzenia miokardium (Indeks HP) w grupie kontrolnej (NaCl <i>p.o.</i>) i doświadczalnej (Sac/Val <i>p.o.</i>).....	93
Rycina 41. Stężenie A. troponiny sercowej I (cTnI) oraz B. N-końcowego propeptydu natriuretycznego typu B (NT-proBNP) w surowicy zwierząt w grupie kontrolnej (NaCl <i>p.o.</i>) i doświadczalnej (Sac/Val <i>p.o.</i>).....	94
Rycina 42. Przebieg badania pilotażowego w Części II.	95

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACE – enzym konwertujący angiotensynę

ACE2 – enzym konwertujący angiotensynę typu 2

ACEI – inhibitor enzymu konwertującego angiotensynę

Ang I – angiotensyna I

Ang II – angiotensyna II

Ang 1-7 – angiotensyna 1-7

ARB – *ang. angiotensin receptor blocker*, antagonist receptoru angiotensyny II typu 1

ARNI – *ang. angiotensin receptor neprilysin inhibitor*, antagonist receptoru angiotensyny II typu 1i inhibitor neprylizyny

AT-R1 – receptor angiotensyny II typu 1

AT-R2 – receptor angiotensyny II typu 2

A5C – projekcja koniuszkowa pięciodłowa

BB – *ang. beta-blockers*, leki beta-adrenolityczne

BNP – *ang. brain natriuretic peptide*, mózgowy peptyd natriuretyczny

BP – *ang. blood pressure*, ciśnienie tętnicze

BW – *ang. body weight*, masa ciała

CO – *ang. cardiac output*, pojemność minutowa serca

cTnI – troponina sercowa I

cTnT – troponina sercowa T

CTRCD – *ang. cancer therapy-related cardiac dysfunction*, dysfunkcja serca związana z terapią nowotworów

CTR-CVT – *ang. cancer therapy-related cardiovascular toxicity*, toksyczność sercowo-naczyniowa leczenia przeciwnowotworowego

d – doba

DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy

DOX – dokсорubicyna

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

EKG – badanie elektrokardiograficzne

ECS – *ang. European Society of Cardiology*, Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne

ET-1 – endotelina 1

FDA – *ang. Food and Drug Agency*, Agencja ds. Żywności i Leków

HER2 – *ang. human epidermal growth factor receptor 2*, receptor ludzkiego czynnika wzrostu naskórka 2

H&E – barwienie hematoksyliną i eozyną

HF – *ang. heart failure*, niewydolność serca

HFpEF – *ang. heart failure with preserved ejection fraction*, niewydolność serca z zachowaną frakcją wyrzutową

HFrEF – *ang. heart failure with reduced ejection fraction*, niewydolność serca z obniżoną frakcją wyrzutową

HIF1 α – *ang. hypoxia-inducible factor 1 α* , czynnik indukowany hipoksją 1 α

HTN – *ang. hypertension*, nadciśnienie tętnicze

HR – *ang. heart rate*, rytm serca

HW – *ang. heart weight*, masa serca

GAPDH – *ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

ICOS – *ang. International Cardio-Oncology Society*, Międzynarodowe Towarzystwo Kardioonkologiczne

IL-1 – interleukina 1

IL-6 – interleukina 6

i.p. – *lac. intraperitonealis*, podanie dootrzewnowe

IQR – *ang. interquartile range*, przedział międzykwartyłowy

LDL – *ang. low-density lipoprotein*, lipoproteiny o niskiej gęstości

LV – *ang. left ventricle*, lewa komora serca

LVEF – *ang. left ventricle ejection fraction*, frakcja wyrzutowa lewej komory serca

LVFS – *ang. left ventricle fractional shortening*, frakcja skracania lewej komory serca

LVIDd – *ang. left ventricular internal diameter end-diastole*, wymiar końcoworozkurczowy lewej komory serca

LVIDs – *ang. left ventricular internal diameter end-systole*, wymiar końcowoskurczowy lewej komory serca

LVOTd – *ang. left ventricular outflow diameter*, średnica drogi odpływu z lewej komory serca

MasR – receptor typu Mas

MHC – *ang. myosin heavy chain*, łańcuchy ciężkie miozyny

MMP – *ang. matrix metalloproteinases*, metaloproteiny macierzy pozakomórkowej

MRA – *ang. mineralocorticoid receptor antagonist*, antagonist receptoru dla mineralokortykoidów

mRNA – matrycowy kwas rybonukleinowy

NEP – neprylizyna

NEPI – inhibitor neprylizyny

NaCl – chlorek sodu
NO – tlenek azotu
NP – *ang. natriuretic peptides*, peptydy natriuretyczne
NPS – *ang. natriuretic peptides system*, układ peptydów natriuretycznych
NPR – receptor peptydów natriuretycznych
NPRA – receptor peptydów natriuretycznych typu A
NPRB – receptor peptydów natriuretycznych typu B
NPRC – receptor peptydów natriuretycznych typu C
NT-proBNP – N-końcowy propeptyd natriuretyczny typu B
NYHA – *ang. New York Heart Association*, Nowojorskie Towarzystwo Kardiologiczne
MI – *ang. myocardial infarction*, zawał mięśnia sercowego
M-mode – tryb obrazowania jednowymiarowego
ORR – *ang. objective response rate*, odsetek obiektywnych odpowiedzi
PBS – buforowana fosforanem sól fizjologiczna
PLAX – projekcja przymostkowa w osi długiej
p.o. – podanie dożołądkowe
RAAS – układ renina-angiotensyna-aldosteron
RT-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
SAX – projekcja przymostkowa w osi krótkiej
SD – *ang. standard deviation*, odchylenie standardowe
SGLT2 – *ang. sodium-glucose transport protein 2*, kotransporter sodowo-glukozowy 2
sNEP – *ang. soluble NEP*, wolna postać neprylizyny
SV – *ang. stroke volume*, objętość wyrzutowa
Top2 – topoisomeraza II
Top2 β – topoisomeraza II β
TL – *ang. tibial length* – długość kości piszczelowej
TLR2 – *ang. Toll-like receptor 2*, receptor Toll-podobny typu 2
TLR4 – *ang. Toll-like receptor 4*, receptor Toll-podobny typu 4
TNF- α – czynnik martwicy nowotworów α
vs. – *lac. versus*
VTI – całka prędkości przepływu w czasie
wg. – według
wsp. – współautorzy
2D – tryb obrazowania dwuwymiarowego

STRESZCZENIE

Wstęp: Antracykliny to grupa leków przeciwnowotworowych szeroko wykorzystywanych w praktyce klinicznej, których stosowanie wiąże się z ryzykiem wystąpienia kardi toksyczności (AIC), prowadzącej do niewydolności serca z obniżoną frakcją wyrzutową (HFrEF). Celem prewencji AIC poszukiwane są nowe terapie mające na celu ograniczenie ryzyka wystąpienia tego działania niepożądanego, a także biomarkery pozwalające na oszacowanie ryzyka AIC oraz na jego późniejsze monitorowanie. W związku z korzystnym działaniem nowego połączenia lekowego: antagonisty receptora angiotensyny II typu 1 i inhibitora neprylizyny (ARNI) wśród pacjentów z HFrEF, rola neprylizyny (NEP) oraz jej wolnej postaci (sNEP) w patogenezie chorób układu krążenia cieszy się w ostatnich latach ponownie zainteresowaniem badaczy. W badaniach w zwierzęcych modelach AIC wykazano, że zastosowanie ARNI w wysokiej dawce wykazuje działanie ochronne przed wystąpieniem dysfunkcji skurczowej lewej komory serca (LV). Nie oceniono jednak, czy działanie to pozostaje obecne przy zastosowaniu niższych dawek ARNI. Ponadto, dotychczas nie zbadano, czy w ramach AIC dochodzi do zmian aktywności, ekspresji i poziomu NEP w obrębie LV, a także czy sNEP może stanowić użyteczny biomarker ryzyka wystąpienia AIC.

Cel pracy: Pierwszym celem pracy była ocena zmian aktywności, ekspresji i poziomu NEP w obrębie LV oraz aktywności i stężenia sNEP w surowicy zwierząt doświadczalnych w modelu ostrej (Część Ia) oraz przewlekłej (Część Ib) AIC. Drugi cel pracy stanowiła ocena wpływu zastosowania ARNI w niskiej dawce w zwierzęcym modelu przewlekłej AIC.

Material i metody: W badaniu wykorzystano 12-tygodniowe szczury szczepu Sprague-Dawley (SPRD). Zwierzęta w Części Ia otrzymały jednorazową dootrzewnową (*i.p.*) iniekcję doksorubicyny (DOX) i zostały uśmiercone w ciągu 24 godzin celem pobrania LV i krwi do dalszych analiz. Zwierzęta w Części Ib oraz Części II otrzymały cztery iniekcje DOX *i.p.* w odstępach tygodniowych i zostały uśmiercone po upływie tygodnia od ostatniej iniekcji. W Części II zwierzętom codziennie podawano ponadto dożołądkowo (*p.o.*) ARNI w dawce 20 mg/kg masy ciała. W Części I badania grupy kontrolne stanowiły zwierzęta otrzymujące iniekcje 0,9% chlorku sodu (NaCl) *i.p.*, natomiast w Części II – DOX *i.p.* oraz 0,9% NaCl *p.o.* U wszystkich szczurów w 1 i ostatniej dobie doświadczenia wykonano badanie echokardiograficzne. Fragmenty LV poddane zostały ocenie histopatologicznej. W pozostałych fragmentach LV pochodzących od zwierząt z Części I zmierzono ekspresję, poziom i aktywność NEP, natomiast w surowicy – stężenie sNEP. W surowicy zwierząt z Części II oceniono dodatkowo stężenie sercowej troponiny I (cTnI) oraz N-końcowego propeptydu peptydu natriuretycznego typu B (NT-proBNP).

Wyniki: W Części I badania podanie DOX spowodowało istotne obniżenie echokardiograficznych parametrów wydolności skurczowej LV oraz wystąpienie w jej obrębie charakterystycznych dla AIC zmian patomorfologicznych. W modelu ostrej AIC w obrębie LV zaobserwowano istotnie niższą aktywność NEP, natomiast w modelu przewlekłej AIC – istotnie niższy poziom białka NEP. Nie zaobserwowano różnic w średnich wartościach stężenia sNEP w surowicy między grupą kontrolną a doświadczalną w obu modelach. W modelu ostrej AIC stężenie sNEP w surowicy wykazywało silną dodatnią korelację z nasileniem zmian degeneracyjnych kardiomiocytów w badaniu histopatologicznym. W modelu przewlekłej AIC wystąpiła silna ujemna korelacja między stężeniem sNEP w surowicy a objętością wyrzutową i pojemnością minutową serca, bez istotnych zależności z histopatologicznymi wykładnikami uszkodzenia miokardium. Zależności te nie były obserwowane w grupach kontrolnych. W Części II, w ostatniej dobie badania, u zwierząt otrzymujących ARNI zaobserwowano istotnie wyższe wartości echokardiograficznych parametrów wydolności skurczowej LV oraz istotnie mniejsze nasilenie zmian patomorfologicznych w jej obrębie, a także niższe stężenie cTnI w surowicy, w porównaniu do grupy kontrolnej.

Wnioski: DOX wywiera hamujące działanie na aktywność enzymatyczną NEP w LV w szczurzym modelu ostrej AIC oraz poziom białka NEP w szczurzym modelu przewlekłej AIC. W obu modelach zmiany te nie wydają się wpływać na stopień nasilenia AIC. W związku z obserwowanymi zależnościami między stężeniem sNEP w surowicy a nasileniem zmian degeneracyjnych kardiomiocytów (model ostrej AIC) oraz stopniem obniżenia niektórych parametrów echokardiograficznych (model przewlekłej AIC) wydaje się, że krążąca we krwi sNEP uczestniczy w procesach patofizjologicznych związanych z rozwojem AIC. Jednak w świetle braku zmian w zakresie średnich wartości stężenia sNEP w surowicy zwierząt otrzymujących DOX, sNEP nie stanowi prawdopodobnie użytecznego biomarkera w AIC. ARNI w niskiej dawce wydaje się mieć ochronne działanie przed wystąpieniem uszkodzenia mięśnia sercowego związanego z przewlekłą podażą DOX u szczurów SPRD.

Podsumowanie: W pracy doktorskiej wykazano, że neprylizyna odgrywa rolę w rozwoju zwierzęcego modelu kardiotoksyczności antracyklin. ARNI w niskiej może mieć uzasadnienie w pierwotnej profilaktyce AIC u pacjentów onkologicznych przy braku tolerancji wysokich dawek leku.

ABSTRACT

Introduction: Anthracyclines are a group of widely used anticancer drugs in clinical practice, the administration of which is associated with the risk of cardiotoxicity (AIC), leading to heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF). To prevent AIC, new therapies to reduce the risk of this side effect are sought, as well as biomarkers allowing for assessment of the risk of AIC and its subsequent monitoring. Due to the beneficial effect of the new drug combination: angiotensin II type 1 receptor antagonist and neprilysin inhibitor (ARNI) among patients with HFrEF, the role of neprilysin (NEP) and its soluble form (sNEP) in the pathogenesis of cardiovascular diseases has recently attracted the interest of researchers again. In studies in animal models of AIC the use of ARNI in high doses has been shown to have a protective effect against the occurrence of left ventricular (LV) systolic dysfunction. However, whether this effect remains present at lower ARNI doses has not been assessed. In addition, it has not yet been investigated if there are changes in the activity, expression and level of NEP within the LV in AIC and whether sNEP may be a useful biomarker for assessing the risk of AIC.

Aims: The first aim was to assess the changes in NEP activity, expression, and protein levels within the LV, as well as sNEP activity and concentration in the serum of experimental animals in acute (Part Ia) and chronic (Part Ib) AIC models. The second aim was to assess the effectiveness of low-dose ARNI in an animal model of chronic AIC.

Material and methods: 12-week-old Sprague-Dawley rats were used in the study. Animals in Part Ia received one intraperitoneal (*i.p.*) injection of doxorubicin (DOX) and were sacrificed within 24 hours for collection of LV and blood for further analysis. Animals in Part Ib and Part II received four DOX injections *i.p.* at weekly intervals and were sacrificed after a week of the last injection. Animals in Part II additionally received ARNI at a dose of 20 mg/kg of body weight by gastric gavage (*p.o.*), daily. In Part I of the study, the control animals received *i.p.* injections of 0.9% sodium chloride (NaCl), while in Part II – DOX *i.p.* and 0.9% NaCl *p.o.* Echocardiography was performed in all animals on the first and last day of the experiment. LV fragments were subjected to histopathological evaluation. In the remaining LV fragments from animals from Part I, NEP expression, activity and protein levels were measured, while in their serum concentration of sNEP was assessed. In the serum of animals from Part II, the concentrations of cardiac troponin I (cTnI) and the N-terminal propeptide of B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) were measured.

Results: In Part I of the study the administration of DOX resulted in a significant decrease in echocardiographic parameters of LV systolic function and the occurrence of pathomorphological changes characteristic of AIC. In the acute AIC model, significantly lower

NEP activity was observed within the LV, while in the chronic AIC model - significantly lower NEP protein levels. There were no differences in mean serum sNEP concentrations between the control and experimental groups in both models. In the acute AIC model, the serum concentration of sNEP showed a strong positive correlation with the severity of degenerative changes of cardiomyocytes in the histopathological examination. In the chronic AIC model, there was a strong negative correlation between serum sNEP concentration and stroke volume and cardiac output. These were not observed in the control groups. In Part II, on the last day of the study, animals receiving ARNI had significantly higher values of echocardiographic parameters of LV systolic function and significantly lower degree of pathomorphological changes within LV, as well as lower serum cTnI concentrations compared to the control group.

Conclusions: DOX has an inhibitory effect on NEP activity in the LV in a rat model of acute AIC and NEP protein levels in the LV in a rat model of chronic AIC. In both models, these changes do not seem to affect the severity of AIC. Due to the observed relationships between the concentration of sNEP in the serum and the severity of degenerative changes in cardiomyocytes (acute AIC model) and the degree of decrease in some echocardiographic parameters (chronic AIC model), it seems that sNEP participates in the pathophysiological processes associated with the development of AIC. However, given the lack of change in mean sNEP concentrations in the serum of DOX-treated animals, sNEP is likely not a useful biomarker in AIC. Low-dose ARNI appears to be protective against the myocardial injury associated with chronic DOX administration in SPRD rats.

Summary: In this study, it was shown that neprilysin plays a role in the development of an animal model of anthracycline cardiotoxicity. Low-dose ARNI may be justified in the primary prevention of AIC in oncological patients who are intolerant to high doses of the drug.

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Antracykliny to grupa leków o działaniu przeciwnowotworowym, wprowadzona do praktyki klinicznej w połowie XX wieku i szeroko stosowana we współczesnej chemioterapii nowotworów [1]. Wśród antracyklin wyróżnia się substancje takie jak daunorubicyna, epirubicyna, idarubicyna, mitoksantron czy doksorubicyna (DOX) [1]. Leki te wchodzą w skład schematów chemioterapeutycznych stosowanych w terapii licznych nowotworów litych - raka piersi [2], pęcherza moczowego [3], mięsaków kości [4] i tkanek miękkich [5], a także chłoniaków [6-9] czy ostrej białaczki limfoblastycznej [10]. Ze względu na swój profil działania, antracykliny są również powszechnie wykorzystywane w onkologii i hematologii dziecięcej [11, 12]. Co trzecia osoba leczona na nowotwór złośliwy w dzieciństwie otrzymała chemioterapię opartą na antracyklinach [13]. Zastosowanie antracyklin wiąże się jednak z występowaniem poważnych działań niepożądanych, w tym charakterystycznej dla tej grupy leków kardiotoksyczności (AIC), która obejmuje szereg powikłań dotyczących układu krążenia [14]. W swojej typowej postaci AIC prowadzi do postępującej dysfunkcji skurczowej komór serca i w efekcie do niewydolności serca z obniżoną frakcją wyrzutową (HFrEF), istotnie ograniczając czas przeżycia pacjentów po zakończonym leczeniu onkologicznym [14]. W świetle poprawy skuteczności metod leczenia onkologicznego i rosnącej populacji pacjentów z historią terapii antracyklinami w przeszłości, problem AIC stanowi poważne wyzwanie kliniczne będące obiektem zainteresowania kardiologii.

W celu ograniczenia częstości występowania AIC prowadzone są liczne badania doświadczalne i kliniczne mające na celu bliższe poznanie mechanizmów jej patogenezы oraz opracowania skutecznych metod prewencji jej rozwoju. Szczególne zainteresowanie budzi możliwość zastosowania leków o właściwościach kardioprotekcyjnych, celowanych w patofizjologiczne procesy leżące u podstawy AIC, celem obniżenia ryzyka wystąpienia tego działania niepożądanego. W ostatniej dekadzie, na podstawie pozytywnych wyników badania klinicznego PARADIGM-HF [15], nowa grupa leków - antagonisty receptora angiotensyny II typu 1 i inhibitor neprylizyny (ARNI) - włączona została do standardów postępowania w HFrEF [16, 17]. ARNI, poza zahamowaniem działania angiotensyny II (Ang II), powoduje także obniżenie aktywności neprylizyny (NEP), enzymu uczestniczącego w proteolizie szeregu peptydów wazoaktywnych, w tym peptydów natriuretycznych (NP) [17]. Wykazane w badaniach doświadczalnych oraz klinicznych kardioprotekcyjne działanie ARNI wzbudziło zainteresowanie potencjalną przydatnością tego połączenia lekowego także w pierwotnej prewencji AIC.

1.2. Kardiotoksyczność antracyklin

1.2.1. Definicja kardiotoksyczności antracyklin

Międzynarodowe Towarzystwo Kardioonkologiczne (International Cardio-Oncology Society, ICOS) opublikowało w 2022 roku konsensus w sprawie ujednoczenia definicji toksyczności sercowo-naczyniowej związanej z terapią przeciwnowotworową (CTR-CVT) [18]. Wśród powikłań terapii onkologicznej dotyczących układu krążenia wyróżniono pięć grup zaburzeń: zapalenie mięśnia sercowego, zaburzenia rytmu serca, toksyczność naczyniową, nadciśnienie tętnicze (HTN) oraz dysfunkcję serca związaną z terapią nowotworów (CTRCD) [18]. Termin CTRCD obejmuje objawową niewydolność serca (HF) oraz bezobjawową dysfunkcję skurczową lewej komory serca (LV) związaną z chemioterapią, którą na podstawie wartości frakcji wyrzutowej lewej komory serca (LVEF) dzieli się dalej na trzy stopnie zaawansowania, jak przedstawiono w Tabeli 1 [18]. Zgodnie z kardioonkologicznymi wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (European Society of Cardiology, ESC) z 2022 r. preferowaną metodą obrazowania w procesie diagnostycznym CTRCD jest trójwymiarowa echokardiografia przezklatkowa [19].

Tabela 1. Podział bezobjawowej dysfunkcji skurczowej LV związanej z terapią przeciwnowotworową. Opracowano na podstawie wytycznych ESC (2022) [19] oraz ICOS (2022) [18].

Stopień	Charakterystyka
Ciężka	Nowe obniżenie LVEF do wartości <40%
Umiarkowana	Nowe obniżenie LVEF $\geq 10\%$ do wartości 40-49% LUB Nowe obniżenie LVEF <10% do wartości 40-49% wraz z >15% redukcją GLS LV lub nowym wzrostem stężenia cTn i/lub BNP i/lub NT-proBNP
Łagodna	Wartości LVEF $\geq 50\%$ ORAZ >15% redukcja GLS LV w stosunku do wartości wyjściowych lub nowy wzrost stężenia cTn i/lub BNP i/lub NT-proBNP

BNP – mózgowy peptyd natriuretyczny, cTn – troponiny sercowe, GLS – globalne skurczowe odkształcenie podłużne, LV – lewa komora serca, LVEF – frakcja wyrzutowa lewej komory serca, NT-proBNP – N-końcowy propeptyd natriuretyczny typu B.

W oparciu o wymienione wytyczne ICOS (2022), AIC zdefiniować należy jako CTRCD lub inne formy toksyczności sercowo-naczyniowej (zapalenie mięśnia sercowego, zaburzenia rytmu serca) związane z podaniem chemioterapii opartej o antracykliny. Powikłania te mogą objawić się klinicznie w trakcie lub po zakończeniu leczenia onkologicznego, a w przypadku CTRCD, występować także w postaci bezobjawowej, wykrytej podczas planowych badań obrazowych.

1.2.2. Charakterystyka kardiotoxyczności antracyklin

Kardiotoxyczność antracyklin wystąpić może po podaniu pierwszej dawki leku, w trakcie trwania chemioterapii lub po zakończeniu leczenia onkologicznego [14, 20]. Co szczególnie dla tego działania niepożądanego, objawy uszkodzenia mięśnia sercowego mogą pojawić się również nawet kilkadziesiąt lat od zakończenia terapii przeciwnowotworowej [21]. W związku z tym, AIC klasycznie dzieli się na dwie kategorie, w zależności od czasu jej wystąpienia. Wyróżnia się postać ostrą, która typowo pojawia się w ciągu kilku dni od podania antracyklin w formie ostrej HF, zapalenia mięśnia sercowego, zapalenia osierdza, bądź zaburzeń rytmu serca [14, 22]. Postać przewlekła, występująca po zakończeniu leczenia onkologicznego, przyjmuje zwykle formę CTRCD, jako stopniowo narastające ograniczenie funkcji skurczowej LV [14, 23]. Wyróżnia się przewlekłą AIC o wczesnym początku, występującą w ciągu pierwszego roku od zakończenia leczenia, oraz przewlekłą AIC o późnym początku, która wystąpić może wiele lat po zakończeniu chemioterapii [20]. W badaniach przeprowadzonych wśród pacjentów którzy otrzymali chemioterapię z udziałem antracyklin, poddanych wieloletniemu monitorowaniu LVEF, wykazano, że u większości z nich CTRCD występuje już w trakcie pierwszego roku od zakończenia leczenia [23-26]. W dalszym przebiegu przewlekłej AIC dochodzi do przebudowy toksycznie uszkodzonego mięśnia sercowego i pogłębienia zaburzeń kurczliwości, prowadząc do wystąpienia kardiomiopatii rozstrzeniowej i HFrEF [20, 27]. Aktualnie podkreśla się zatem, że podział AIC oparty o czas jej wystąpienia jest podziałem sztucznie narzuconym, nie odzwierciedlającym przebiegu zmian patofizjologicznych zachodzących w obrębie mięśnia sercowego [14].

Ryzyko wystąpienia CTRCT związanej z podaniem antracyklin różni się w zależności od rodzaju zastosowanej substancji czynnej. W retrospektywnym badaniu przeprowadzonym w grupie ponad 28 tysięcy dorosłych leczonych w dzieciństwie na nowotwór złośliwy wykazano, że najwyższym potencjałem kardiotoxycznym, także po uwzględnieniu różnic w stosowanych klinicznie dawkach tych chemioterapeutyków, charakteryzuje się mitoksantron, którego podanie 10-krotnie zwiększa ryzyko wystąpienia AIC w porównaniu od najpowszechniej stosowanej w tej grupie pacjentów doksorubicyny [13]. W badaniu tym

wykazano również, że ryzyko AIC było podobne dla epirubicyny i DOX, a najniższe dla daunorubicyny, z czego ta ostatnia cechowała się jednak niższą skutecznością działania przeciwnowotworowego w niektórych badaniach klinicznych [28, 29].

1.2.3. Epidemiologia kardiotoksyczności antracyklin

Wiedza na temat częstości z jaką występuje kardiotoksyczność antracyklin uległa w ostatnich dekadach znacznemu pogłębieniu, dzięki zwiększonej dostępności metod rutynowego monitorowania funkcji skurczowej LV u pacjentów otrzymujących leczenie onkologiczne oraz wprowadzeniu do praktyki klinicznej nowoczesnych metod obrazowania, takich jak rezonans magnetyczny serca. W jednym z pierwszych retrospektywnych badań dotyczących problemu AIC, przeprowadzonym przez Von Hoff i wsp. (1979), częstość występowania tego działania niepożądanego, definiowanego jako wystąpienie objawów HF, oszacowana została na poziomie 2,2% pacjentów [30]. Retrospektywna analiza opublikowana wiele lat później przez Swaina i wsp. (2003) wykazała, że w grupie uczestników trzech badań klinicznych, otrzymujących chemioterapię opartą na antracyklinach, częstość występowania CTRCD była wyższa i wynosiła około 5,1% chorych [31]. W badaniach przeprowadzonych w ostatnich latach przez Cardinale i wsp. (2016) oraz Khan i wsp. (2017) dotyczących częstości występowania CTRCD u pacjentów poddanych leczeniu antracyklinami wskazano natomiast, że dysfunkcja skurczowa LV, oceniana za pomocą echokardiografii przezklatkowej, występowała u 10-12% [24, 25]. W metaanalizie uwzględniającej 18 prac dotyczących toksyczności chemioterapii z udziałem antracyklin Qiu i wsp. (2021) określili częstość występowania AIC na poziomie 14% wszystkich chorych [32]. Z kolei w pracy Nakayama i wsp. (2020), uwzględniającej przede wszystkim pacjentów starszych (mediana wieku 71 lat), AIC występowała z częstotliwością 21%, przy czym 12% pacjentów posiadało objawy HF [26]. Niedawno opublikowane badania przeprowadzone na niewielkich grupach chorych z wykorzystaniem obrazowania za pomocą rezonansu magnetycznego serca sugerują jednak, że AIC może dotyczyć nawet połowy pacjentów leczonych antracyklinami [33, 34].

Problem kardiotoksyczności antracyklin szczególnie dotkliwie dotyka populacji pediatrycznych pacjentów onkologicznych. Ogromny postęp w leczeniu nowotworów wieku dziecięcego w ostatnich dekadach spowodował pojawienie się rosnącej populacji pacjentów z wywiadem terapii antracyklinami w dzieciństwie, obciążonych podwyższonym ryzykiem powikłań sercowo-naczyniowych na wiele lat po zakończeniu leczenia [35, 36]. W retrospektywnej analizie przeprowadzonej przez Mulrooney i wsp. (2009) w grupie ponad 14 tysięcy dzieci leczonych onkologicznie wykazano, że posiadają one znacznie podwyższone ryzyko wystąpienia HF, zawału mięśnia sercowego (MI), zapalenia osierdzia lub patologii

w obrębie zastawek serca w porównaniu z nieleczonym rodzeństwem [37]. W badaniu tym zapadalność na HF po 30 latach od postawienia rozpoznania onkologicznego wyniosła 4,1% i była sześciokrotnie wyższa niż u nieleczzonego rodzeństwa [37]. Jednocześnie, w opisanej kohorcie, dzieci które były leczone antracyklinami posiadały względne ryzyko wystąpienia HF 2-5 razy większe w porównaniu do pacjentów, którzy nie otrzymali leków z tej grupy [37]. W przeprowadzonych w ostatnich dwóch latach badaniach retrospektywnych częstość występowania AIC u dzieci leczonych antracyklinami oszacowano na poziomie 6-7% [38, 39], przy czym czas od zakończenia leczenia do wystąpienia dysfunkcji skurczowej LV wynosił średnio od 1 do 4 lat, ale skrajne przypadki sięgały nawet 15 lat od zakończenia terapii [39]. Jednocześnie, w obu opisanych badaniach, dzieci u których wystąpiła AIC wykazywały wyższe ryzyko zgonu, zarówno z powodu kardiotoksyczności, jak i choroby podstawowej [38, 39].

W odróżnieniu do wymienionych badań o charakterze retrospektywnym, w 2011 r. przeprowadzono obserwacyjne badanie przekrojowe uwzględniające pacjentów z historią leczenia onkologicznego w dzieciństwie w macierzystym ośrodku badaczy, od czasu którego upłynęło co najmniej 10 lat [40]. Mulrooney i wsp. (2016) w ramach wymienionego badania dokonali oceny częstości występowania chorób układu krążenia wśród jego uczestników, których mediana wieku w momencie włączenia do badania wynosiła 31 lat, a 82% z nich otrzymało chemioterapię z uwzględnieniem antracyklin [41]. Dysfunkcja skurczowa LV (definiowana jako LVEF <50%) występowała z częstością 7,4%, przy czym znaczna większość z uczestników pozostawała bezobjawowa. Grupa ta charakteryzowała się jednak częstszym występowaniem obniżonej tolerancji wysiłku w teście sześciominutowego marszu. Co ważne, spośród osób kwalifikujących się do udziału w badaniu, grupa pacjentów która została w nim ostatecznie uwzględniona charakteryzowała się niższą całkowitą otrzymaną dawką antracyklin, co może powodować zaniżenie obserwowanej w badaniu częstotliwości AIC. Ponadto, w związku z opisywaną wśród pacjentów u których wystąpiła AIC wyższą śmiertelnością z jakiegokolwiek przyczyny i długim czasem od zakończenia leczenia onkologicznego, badanie to obarczone było najprawdopodobniej błędem związanym z nieuwzględnieniem w analizie pacjentów, którzy zmarli przed jego rozpoczęciem.

1.2.4. Charakterystyczne dla AIC zmiany patomorfologiczne

Dostępne w przeglądzie literatury opisy histopatologicznych wykładników toksycznego uszkodzenia mięśnia sercowego związanego z podaniem antracyklin u ludzi pochodzą z badań wykonanych *post-mortem* [42, 43] oraz z biopsji endomiokardialnych [44-48]. Prace te przeprowadzone zostały wiele lat temu, na niewielkich grupach pacjentów, co związane jest

przede wszystkim z trudnością otrzymania materiału do analizy wynikającą z inwazyjnego charakteru badania histopatologicznego.

W badaniach wykonanych *post-mortem* opisywano poszerzenie komór serca, makroskopowe zaburzenia struktury tkanki w postaci utraty sprężystości i jej odbarwienia, czemu mikroskopowo towarzyszyła zaznaczona atrofia kardiomiocytów [42, 43]. Opisane w tych pracach zaburzenia są spójne z obserwacjami opublikowanych w ostatnich latach badań, w których przy pomocy rezonansu magnetycznego serca wykazano spadek masy LV u pacjentów poddanych leczeniu antracyklinami [49, 50]. W badaniach histopatologicznych opisywana jest również hipertrofia kardiomiocytów, która może stanowić główne obserwowane odchylenie [46], lub współistnieć z jednoczesnymi zmianami atroficznymi [43].

Wśród innych charakterystycznych zjawisk patomorfologicznych opisywane są zmiany degeneracyjne kardiomiocytów w postaci wakuolizacji ich cytoplazmy, zaburzenia struktury jąder komórkowych i utraty organizacji miofibryli [44, 46]. Zaburzeniom tym towarzyszy rozplem tkanki śródmiąższowej i jej ogniskowe zwłóknienie [42, 43, 48]. W pracach opisywano również pogrubienie i zwłóknienie wsierdzia, szczególnie w obrębie LV [43, 46]. Zastosowanie mikroskopii elektronowej ujawniło także subkomórkowe zmiany związane z podaniem antracyklin, przede wszystkim zwiększenie liczby, obrzęk i zaburzenie struktury wewnętrznej mitochondriów z nagromadzeniem wtrętów i zanikiem grzebieni mitochondrialnych, obrzęk siateczki sarkoplazmatycznej czy dezorganizację struktury miofibryli [42, 43, 46]. W pracy Cove-Smith i wsp. (2014) z wykorzystaniem zwierzęcego modelu AIC wykazano, że wymienione degeneracyjne zmiany na poziomie subkomórkowym mogą być obecne już po pierwszym dożylnym podaniu DOX, przede wszystkim w postaci uszkodzenia mikrostruktury mitochondriów [51].

W badaniu przeprowadzonym przez Bouhour i wsp. (1983) w grupie 28 pacjentów z historią leczenia DOX wykazano, że nasilenie zmian degeneracyjnych kardiomiocytów wykazuje dodatnią korelację z całkowitą otrzymaną dawką leku, czego nie zaobserwowano w przypadku zwłóknienia śródmiąższowego [48]. W dwóch innych badaniach, Bristow i wsp. (1981) oraz Ewer i wsp. (1984) na materiale pochodzącym z biopsji endomiokardialnych pobranych od stosunkowo dużej liczby pacjentów (odpowiednio: 158 oraz 84 uwzględnionych osób) wykazali, że nasilenie zmian histopatologicznych wykazywało wyraźną dodatnią zależność z całkowitą otrzymaną przez nich dawką antracyklin [45, 47]. Jednocześnie, Ewer i wsp. (1984) nie zaobserwowali korelacji między nasileniem zmian patomorfologicznych a stopniem dysfunkcji skurczowej LV [45].

1.2.5. Zwierzęce modele AIC

Badania doświadczalne wykorzystujące zwierzęce modele patologii występujących u ludzi zapewniają dogodne warunki do pogłębienia wiedzy dotyczącej ich patofizjologii. Jest to szczególnie istotne w kontekście badań translacyjnych dotyczących patologii serca, ponieważ uzyskanie tkanek do analizy histopatologicznej i metodami biologii molekularnej za pomocą biopsji endomiokardialnej u ludzi ograniczone jest względami etycznymi związanymi z inwazyjnym charakterem procedury. Ponadto, wykorzystanie modelu zwierzęcego zapewnia możliwość ścisłego kontrolowania warunków doświadczalnych, podania badanych substancji aktywnych oraz uzyskania stosunkowo obszernego materiału tkankowego do analizy. W celu modelowania chorób układu krążenia w badaniach podstawowych szczególnie często wykorzystuje się świnię, króliki, myszy oraz szczury, przy czym każdy z gatunków charakteryzuje się specyficznymi dla niego ograniczeniami i zaletami [52]. Prawidłowe zastosowanie zwierzęcych modeli w badaniach translacyjnych wymaga dogłębnego zrozumienia podobieństw i różnic w funkcjonowaniu poszczególnych układów tkankowych między ludźmi a badanym gatunkiem.

Ze względu na niskie koszty i łatwość hodowli, wysoki potencjał rozrodczy i szybkie osiągnięcie wieku dojrzałego, gryzonie – przede wszystkim myszy i szczury, od lat stanowią chętnie wykorzystywane modele badawcze chorób układu krążenia [53]. Mechanizmy pobudliwości, sprzężenia elektromechanicznego, skurczu i relaksacji kardiomiocytów związane z wewnątrzkomórkowym metabolizmem wapnia, aktywnością fosfolambanu i sarkoendoplazmatycznej ATPazy wapniowej u małych gryzoni i ludzi wykazują wiele podobieństw i obie te grupy charakteryzują się ekspresją białek o podobnych funkcjach i rolach [54]. Przy wykorzystaniu rezonansu magnetycznego serca wykazano również, że proces rozwoju embrionalnego serca u myszy jest zbliżony do tego obserwowanego u ludzi, z niewielkimi różnicami dotyczącymi głównie embriogenezy przedsionków serca i wpływu żył płucnych [55]. Małe gryzonie charakteryzują się jednak znacznie szybszym podstawowym rytmem serca (HR) i jednocześnie niewielkimi możliwościami zwiększenia pojemności minutowej serca (CO) w odpowiedzi na wysiłek fizyczny [56]. Serca dużych ssaków, w tym ludzi, wykazują możliwość ponad dwukrotnego zwiększenia częstotliwości HR [57], czemu towarzyszy nawet trzykrotny wzrost siły skurczu mięśnia sercowego [56]. Szczytowe wartości HR u małych ssaków pozostają jedynie ok. 40% wyższe od rytmu podstawowego, a jednoczesny wzrost siły skurczu serca jest słabiej wyrażony [56]. W związku z tym, podczas gdy w odpowiedzi na wysiłek fizyczny CO u człowieka może wzrosnąć nawet 6-10 krotnie, u myszy może on zostać co najwyżej podwojony [56]. Ponadto, u dużych ssaków czas relaksacji

mięśniówki serca ulega wyraźnemu skróceniu wraz ze wzrostem rytmu serca, co jest wyraźnie słabiej zaznaczone w przypadku małych gryzoni [56].

W związku z wysokim podstawowym rytmem serca, małe gryzonie posiadają mechanizmy adaptacyjne umożliwiające gwałtowny skurcz i rozkurcz mięśniówki serca [54]. Potencjał czynnościowy kardiomiocytów gryzoni charakteryzuje się szybką repolaryzacją, bez zaznaczonej fazy plateau występującej u człowieka [58]. Różnice dotyczą także białek wchodzących w skład filamentów miozynowych – komory serca gryzoni wykazują ekspresję izoformy α łańcuchów ciężkich miozyny (MHC), podczas gdy komory dużych ssaków, w tym ludzi, wykazują przewagę ekspresji MHC β [59]. Izoformy te różnią się od siebie przede wszystkim aktywnością miejsc wiążących aktynę oraz miejsc hydrolizy adenozyno-5'-trifosforanu (ATP) [59]. Serca gryzoni wykazują również ekspresję innych form tityny [60]. Pomimo wymienionych różnic, gryzonie pozostają szeroko wykorzystywanym modelem badawczym chorób układu krążenia, takich jak miażdżycy, MI, HTN, nadciśnienie płucne, HFrEF, HFpEF, reumatyczna choroba serca, czy zapalenie mięśnia sercowego [53, 61].

Myszy oraz szczury szczepów Sprague-Dawley (SPRD) i Wistar, stanowią także najpowszechniej stosowane modele zwierzęce w badaniach dotyczących AIC [62]. Antracykliną powszechnie wykorzystywaną celem indukcji AIC u zwierząt doświadczalnych jest doksorubicyna [63]. Stosowane drogi podania leku obejmują, w kolejności od najczęstszej do najrzadszej, podanie dootrzewnowe (*i.p.*), iniekcję dożylną, oraz podanie doustne z paszą [63]. Podanie DOX w formie iniekcji dożylnej zapewnia wierne odtworzenie drogi podania leku stosowanej w praktyce klinicznej. U gryzoni jest to jednak utrudnione ze względu na niewielki rozmiar dostępnych obwodowo żył, drażniący charakter podawanej substancji mogący prowadzić do zapalenia, zakrzepicy i utraty drożności naczynia, oraz wysokie ryzyko wynaczynienia, które związane jest z poważnymi powikłaniami, np. w postaci martwicy okolicznych tkanek [64]. Iniekcja dootrzewnowa jest mniej wymagająca technicznie, szczególnie w przypadku planowanego podania serii dawek w trakcie trwania badania [65]. Jednocześnie metoda ta nie pozostaje wolna od powikłań w postaci podrażnienia otrzewnej, podania dojelitowego czy dopęcherzowego [65]. Ponadto, substancje podane *i.p.* są wchłaniane do krążenia wrotnego i ulegają metabolizmowi wątrobowemu przed osiągnięciem krążenia systemowego, stąd farmakokinetyka tej formy podania różni się od stosowanego klinicznie podania dożylnego [66]. W przeprowadzonym wiele lat temu przez Johansen i wsp. (1981) badaniu wykazano jednak, że stężenie DOX w osoczu myszy osiągnięte w ciągu dwóch godzin od podania pozostają zbliżone zarówno dla drogi dootrzewnowej jak i dożylnej, natomiast pole pod krzywą stężenia leku w sercu jest dwukrotnie niższe dla podania *i.p.* [67]. Zapewniając wystarczającą biodostępność DOX w sercu do uzyskania jego toksycznego uszkodzenia,

iniekcje dootrzewnowe stanowią formę podania leku najczęściej wykorzystywaną w badaniach dotyczących AIC w modelach zwierzęcych [63].

Stosowane przez badaczy schematy podania DOX mające na celu wywołanie ostrej postaci AIC u szczura uwzględniają najczęściej jednorazową iniekcję leku w wysokiej dawce 15-20 mg/kg masy ciała (BW) [68-71]. Z kolei prace, których celem jest modelowanie przewlekłej AIC, charakteryzują się znaczną różnorodnością, zarówno pod względem częstotliwości podań, jak i całkowitej dawki leku [62]. Dostępne w przeglądzie literatury badania doświadczalne przeprowadzone na szczurzych modelach przewlekłej AIC wykorzystują schematy podania DOX w dawce od 1 do 5 mg/kg BW podawane w odstępach 2-7 dni w czasie od 2 do 12 tygodni, do całkowitej dawki od 3 do 25 mg/kg BW, przy czym najbardziej powtarzalnie stosowane schematy uwzględniają podanie 4-6 dawek w wysokości 2-5 mg/kg BW w odstępach cotygodniowych [62, 63].

Obserwowane w sercu gryzoni zmiany histopatologiczne związane z podaniem antracyklin w znacznym zakresie odpowiadają tym opisywanym w badaniach przeprowadzonych na materiale pochodzącym od ludzi. W toksycznie uszkodzonym przez antracykliny mięśniu sercowym tych zwierząt obserwowane są zmiany zwyrodnieniowe kardiomiocytów, ich hipertrofia oraz ogniska apoptozy i nekrozy [51, 72]. Na poziomie subkomórkowym obserwuje się przede wszystkim zaburzenia struktury mitochondriów, poszerzenie kanalików T, rozdęcie siateczki sarkoplazmatycznej oraz dezorganizację jąder komórkowych [51]. Podobnie jak u człowieka, w przebiegu AIC u gryzoni dochodzi również do przebudowy mięśnia sercowego, poszerzenia światła jam serca, rozplemu fibroblastów i zwłóknienia tkanki śródmiąższowej [51]. Jedyną różnicą w histopatologicznym obrazie AIC u gryzoni jest częstsze występowanie wykładników ostrej odpowiedzi zapalnej w postaci nacieków neutrofilowych [72] lub przewlekłej odpowiedzi zapalnej w postaci nacieków makrofagów i limfocytów [51], które typowo nie były opisywane w tkankach pochodzenia ludzkiego [42, 44, 46].

Toksyczne uszkodzenie mięśnia sercowego pod wpływem antracyklin u gryzoni, podobnie jak u człowieka, odzwierciedlone jest również wystąpieniem zaburzeń kurczliwości lewej komory serca [63]. Ważnym ograniczeniem dla badań translacyjnych dotyczących substancji powodujących ograniczenie kurczliwości LV w modelach zwierzęcych jest brak jednolitych definicji wyznaczających krytyczne wartości LVEF umożliwiające rozpoznanie wystąpienia dysfunkcji skurczowej u tych zwierząt. W przeprowadzonym przez Georgiadis i wsp. (2020) przeglądzie systematycznym badań wykorzystujących szczurze modele AIC wykazano jednak, że w wyniku podania DOX w ponad 70% prac obserwowano obniżenie LVEF w zakresie od 10 do 40% wartości wyjściowych [63].

Opracowanie zwierzęcych modeli AIC pozwoliło na znaczne pogłębienie zrozumienia komórkowych mechanizmów prowadzących do wystąpienia uszkodzenia mięśnia sercowego pod wpływem podania tych leków, które to opisano w dalszej części pracy.

1.2.6. Wewnątrzkomórkowe mechanizmy AIC

Antracykliny wykazują działanie przeciwnowotworowe związane przede wszystkim z ich zdolnością wiązania i uszkodzania kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) [73]. Struktura molekularna antracyklin umożliwia ich interkalację między pary zasad budujących DNA, uniemożliwiając prawidłowy przebieg procesów replikacji i transkrypcji [73]. Ponadto, antracykliny posiadają zdolność wiązania wewnątrzjądrowego białka topoizomerazy II (Top2) ulegającej ekspresji przede wszystkim w tkankach intensywnie proliferujących [74]. Top2, poprzez indukowanie kontrolowanych podwójnych pęknięć nici DNA, zapobiega ich splątaniu podczas podziałów komórkowych, utrzymując prawidłową architekturę chromatyny w komórkach dzielących się [75]. Zahamowanie Top2 w wyniku interakcji z antracyklinami prowadzi do poważnych zaburzeń struktury wewnątrzjądrowej, w efekcie wyzwalając szlak apoptozy [74]. Jedną z izoform Top2, topoizomeraza II β (Top2 β), ulega jednak ekspresji również w komórkach postmitotycznych, takich jak kardiomiocyty, i jak wykazano, myszy z inaktywowanym genem dla Top2 β charakteryzują się mniejszą podatnością na występowanie AIC [76]. Stąd interakcja Top2 β z antracyklinami uznawana jest za jeden z podstawowych mechanizmów kardiotoksyczności tych leków.

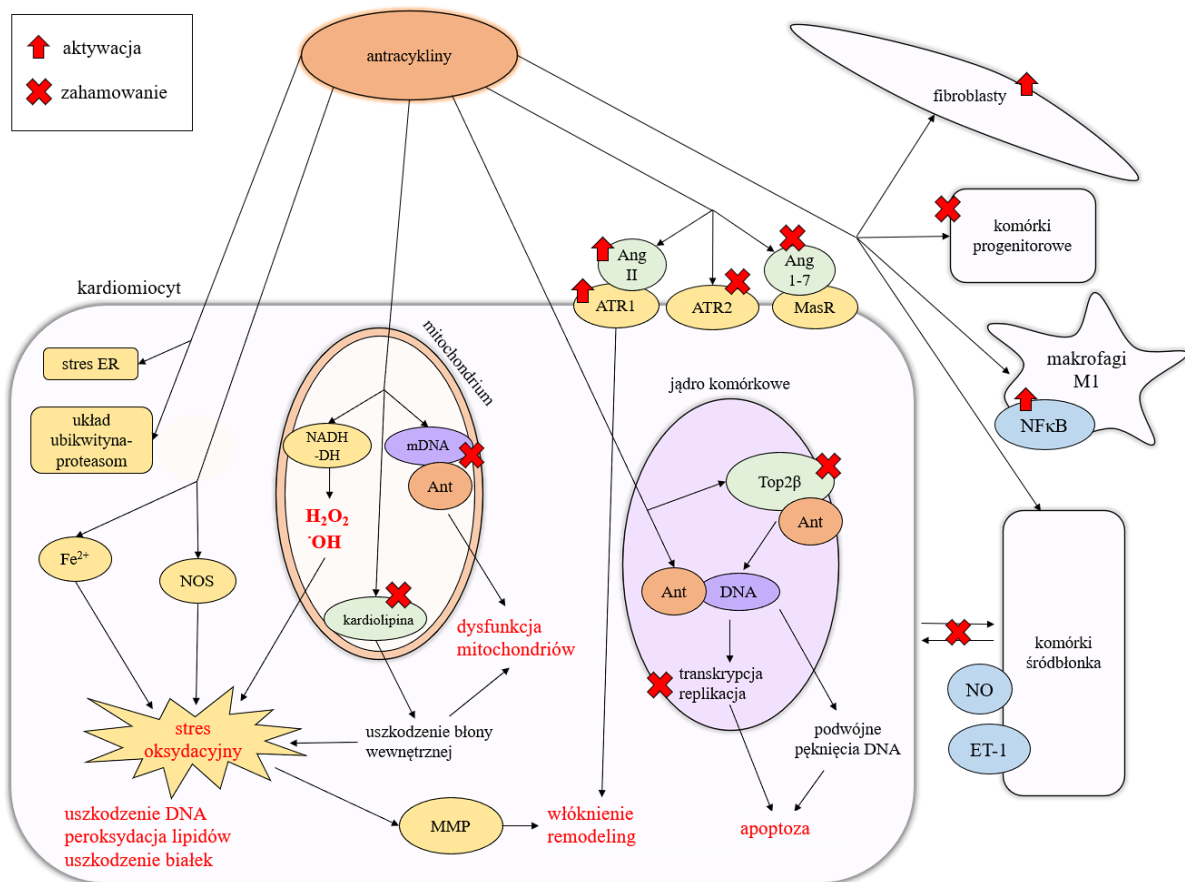
Ponadto, cytotoksyczne działanie antracyklin związane jest z indukowaną przez nie zwiększoną mitochondrialną syntezą reaktywnych form tlenu i wolnych rodników, prowadząc do nasilenia stresu oksydacyjnego przekraczającego możliwości kompensacyjne komórek [73]. Stres oksydacyjny, prowadząc do uszkodzenia DNA, strukturalnych modyfikacji białek i peroksydacji lipidów wewnątrzkomórkowych, jest uznanym czynnikiem biorącym udział w patogenezie przerostu mięśnia sercowego, uszkodzenia reperfuzyjnego, czy HF [77]. Antracykliny, poprzez interakcję z dehydrogenazą dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, zaburzają prawidłowy przebieg łańcucha oddechowego prowadząc do powstawania nadmiaru nadtlenu wodoru oraz rodników hydroksylowych, powodując uszkodzenie wewnętrznej błony mitochondrialnej [73]. Nasilenie stresu oksydacyjnego jest również potęgowane w wyniku interakcji między antracyklinami a kardiolipliną, glicerolofosfolipidem stanowiącym ważny element strukturalny wewnętrznej błony mitochondrialnej, prowadząc do dalszego jej uszkodzenia [78]. Ponadto, antracykliny indukują syntezę wolnych rodników poprzez interakcję z syntazą tlenu azotu [79] i jonami żelaza [80]. Uszkodzenie mitochondriów pod wpływem oddziaływania antracyklin wykracza jednak poza mechanizmy związane ze stresem

oksydacyjnym. Leki te powodują także bezpośrednie uszkodzenie mitochondrialnego DNA oraz zahamowanie fuzji mitochondrialnej, procesu mającego na celu ochronę tych organelli przed nagromadzeniem mutacji somatycznych [81, 82]. Antracykliny powodują zatem ograniczenie puli prawidłowych mitochondriów w obrębie kardiomiocytów, poważnie zaburzając bilans energetyczny tych komórek [82].

Poza wymienionymi mechanizmami, AIC została także powiązana z zaburzeniem aktywności układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS). Wykazano, że antracykliny zmieniają profil ekspresji genów wchodzących w skład RAAS, pobudzając niekorzystne działanie szlaków sygnałowych związanych z Ang II i receptorem angiotensyny II typu 1 (AT-R1), jednocześnie hamując szlaki związane z receptorem angiotensyny II typu 2 (AT-R2) o właściwościach kardioprotekcyjnych [83]. Ponadto, podanie DOX powiązane zostało z obniżonym stężeniem krążącej angiotensyny 1-7 (Ang 1-7), będącej produktem oddziaływania enzymu konwertującego angiotensynę typu 2 (ACE2) na angiotensynę I (Ang I), oraz obniżoną ekspresją receptora typu Mas (MasR) w mięśniu sercowym, które wspólnie stanowią oś ACE2/Ang 1-7/MasR uważaną za kardioprotekcyjne ramię RAAS [83].

Inne mechanizmy powiązane z AIC obejmują stres siateczki śródplazmatycznej [84], wzrost aktywności metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMP) w mięśniu sercowym [70, 85], zaburzenie homeostazy wapniowej [86], aktywację proteolizy za pośrednictwem systemu ubikwityna-proteasom [87], autofagię i mitofagię [88] oraz przyspieszone starzenie kardiomiocytów [89]. Ponadto, w ostatnich latach podkreśla się także udział innych typów komórek budujących mięsień sercowy w patogenezie AIC. Wykazano, że DOX nasila proliferację oraz zwiększa przeżywalność fibroblastów [90], a także powoduje zmniejszenie puli komórek progenitorowych w mięśniu sercowym zwierząt doświadczalnych [91]. Podanie DOX wiąże się także z uszkodzeniem połączeń komórkowych występujących między komórkami śródbłonna naczyń wieńcowych oraz zaburzeniem komunikacji między nimi a kardiomiocytami, poprzez zmianę profilu syntetyzowanych przez nie cytokin – przede wszystkim ograniczenie ilości uwalnianego tlenku azotu (NO), prostaglandyny I₂, neureguliny 1 oraz endoteliny 1 (ET-1) [92]. Ponadto, pomimo braku obecności wyraźnie zaznaczonych nacieków komórek zapalnych w przeprowadzonych wiele lat temu badaniach histopatologicznych u pacjentów z AIC, rozwój odpowiedzi zapalnej w odpowiedzi na toksyczne uszkodzenie mięśnia sercowego uznaje się aktualnie za jeden z jej elementów [93]. Trofenciuć i wsp. (2020) w niewielkiej grupie pacjentów otrzymujących DOX w terapii nowotworów układu krwiotwórczego wykazali, że wyższe osoczowe stężenie receptora Toll-podobnego typu 4 (TLR4), odgrywającego kluczową rolę w nieswoistej odpowiedzi odpornościowej, wiązało się z wyższym ryzykiem wystąpienia CTRCD [94]. W zwierzęcym

modelu AIC wykazano natomiast, że w mięśniu sercowym poddanym wpływowi DOX dochodzi do zwiększenia ekspresji receptora Toll-podobnego typu 2 (TLR2) [84], a inaktywowanie genu dla TLR2 powiązane ze znaczną redukcją reakcji zapalnej w odpowiedzi na podanie antracykliny [95]. W badaniach doświadczalnych AIC powiązane również ze zwiększoną ekspresją jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB i pobudzeniem aktywności makrofagów M1 [96, 97]. Omówione komórkowe mechanizmy AIC zostały schematycznie podsumowane na Rycinie 1.



Rycina 1. Schemat wewnątrzkomórkowych mechanizmów AIC. Na podstawie: Sobiborowicz-Sadowska i wsp. (2023) [98]. Ant – antracykliny, Ang 1-7 – angiotensyna 1-7, Ang II – angiotensyna II, ATR1 – receptor angiotensyny II typu 1, ATR2 – receptor angiotensyny II typu 2, DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy, mDNA – mitochondrialne DNA, ER – siateczka śródplazmatyczna, ET-1 – endotelina 1, MasR – receptor typu Mas, MMP – metaloproteiny macierzy pozakomórkowej, NADH-DH – dehydrogenaza dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, NO – tlenek azotu, NOS – syntaza tlenku azotu, Top2β - topoisomeraza II β.

1.2.7. Czynniki ryzyka AIC

Podstawową metodą prewencji wystąpienia kardiotoksyczności antracyklin zalecaną w wytycznych ESC z 2022 r. jest kontrola czynników ryzyka występujących u pacjentów przed i w trakcie leczenia onkologicznego [19]. Uznane przez Asocjację Niewydolności Serca (ang. Heart Failure Association, HFA) ESC czynniki ryzyka AIC występujące u pacjenta przed rozpoczęciem chemioterapii przedstawiono w Tabeli 2 [99]. Obecność wymienionych czynników decyduje o przynależności pacjenta do jednej z czterech wyróżnionych przez ESC (2022) grup ryzyka wystąpienia CTR-CVT w trakcie zaplanowanej terapii onkologicznej [19].

Najistotniejszym czynnikiem ryzyka wystąpienia AIC związanym z zastosowaną terapią jest całkowita przyjęta przez pacjenta dawka leku [100]. W wymienionym wcześniej retrospektywnym badaniu przeprowadzonym przez Von Hoff i wsp. (1979), odsetek pacjentów u których doszło do pojawienia się objawów HF znacząco różnił się w zależności od całkowitej dawki DOX jaką otrzymali – przy dawce w wysokości 400 mg/m² wynosił 3%, wzrósł do 7% przy dawce 550 mg/m² i odpowiednio do 18% przy dawce 700 mg/m² [30]. Silną dodatnią korelację między dawką DOX a ryzykiem wystąpienia dysfunkcji skurczowej LV potwierdzono w kilku kolejnych badaniach, w których zaobserwowano gwałtowny wzrost ryzyka dysfunkcji skurczowej LV wraz ze wzrostem dawki otrzymanego leku [31, 101, 102]. W populacji pediatrycznej wykazano, że otrzymanie całkowitej dawki DOX ≥ 250 mg/m² ponad dwukrotnie zwiększa szansę wystąpienia u tych pacjentów kardiomiopatii w przyszłości, czego nie obserwowano dla niższych dawek całkowitych [37, 41]. W wytycznych ESC (2022) określono, że zaplanowanie przyjęcia przez pacjenta dawki DOX ≥ 250 mg/m² (lub równoważnej dawki innej antracykliny) stanowi niezależny czynnik wysokiego ryzyka wystąpienia AIC [19]. Do innych czynników ryzyka AIC związanych z zastosowaną terapią zalicza się także jednoczesne podanie innych substancji czynnych o właściwościach kardiotoksycznych, np. innej antracykliny [103], taksanów i cytostatyków alkilujących [104] czy przeciwciała monoklonalnego wiążącego receptor ludzkiego czynnika wzrostu naskórka 2 (HER2) – trastuzumabu [105, 106], oraz zastosowanie radioterapii [103, 104, 107].

Tabela 2. Stratyfikacja podstawowego ryzyka CTR-CVT u pacjentów z planowanym leczeniem onkologicznym. Opracowano na podstawie wytycznych ESC (2022) [19].

Poziom ryzyka	Czynnik ryzyka
Bardzo wysokie	HF Kardiomiopatia CTRCD
Wysokie	Zaplanowana całkowita dawka DOX ≥ 250 mg/m ² Wada zastawkowa o wysokim stopniu zaawansowania Choroba wieńcowa Leczenie rewaskularyzacyjne w wywiadach MI w wywiadach LVEF <50% Wiek ≥ 80 lat Chemioterapia z antracyklinami w wywiadach Radioterapia śródpiersia lub lewej strony klatki piersiowej w wywiadach
Średnie	LVEF 50-54%
2 punkty	Wiek 65-74 lat
Średnie	Cukrzyca
1 punkt	HTN CKD Podwyższone stężenie cTn we krwi Podwyższone stężenie BNP lub NT-proBNP we krwi Chemioterapia bez antracyklin w wywiadach Nikotynizm BMI >30 kg/m ²

Kategorie ryzyka:

Bardzo wysokie: obecność jakiegokolwiek czynnika bardzo wysokiego ryzyka

Wysokie: 5 punktów przyznanych za średnie czynniki ryzyka LUB obecność jakiegokolwiek czynnika wysokiego ryzyka

Pośrednie: 2-4 punkty przyznane za średnie czynniki ryzyka

Niskie: Brak czynników ryzyka bądź jeden punkt przyznany za średni czynnik ryzyka

BMI – wskaźnik masy ciała, BNP – mózgowy peptydu natriuretyczny, CKD – przewlekła choroba nerek, cTn – troponiny sercowe, CTRCD – dysfunkcja serca związana z terapią nowotworów, DOX – doksorubicyna, HF – niewydolność serca, LVEF – frakcja wyrzutowa lewej komory serca, NT-proBNP – N-końcowy propeptyd natriuretyczny typu B.

1.2.8. Metody zapobiegania kardiotoxyczności antracyklin

Metody prewencji AIC obejmują profilaktykę pierwotną, stosowaną przed i w trakcie leczenia onkologicznego, mającą na celu zapobiegać uszkodzeniu kardiomiocytów u pacjentów bez chorób serca w wywiadzie, jak i profilaktykę wtórną, której celem jest zapobieganie progresji chorób układu krążenia występujących u pacjentów przed rozpoczęciem chemioterapii oraz, jeżeli wystąpi CTRCD, ograniczenie narastania jej nasilenia w czasie [108].

Zgodnie z kardiatoonkologicznymi wytycznymi ESC z 2022 r. podstawą pierwotnej profilaktyki CTR-CVT jest modyfikacja czynników ryzyka chorób układu krążenia występujących przed rozpoczęciem terapii przeciwnowotworowej, takich jak podwyższone stężenie lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) we krwi, HTN, nikotynizm, cukrzyca czy nadwaga [19, 109]. Ograniczanie czynników ryzyka sercowo-naczyniowego należy kontynuować również w trakcie leczenia onkologicznego, a pacjenci powinni być zachęceni do umiarkowanego wysiłku fizycznego oraz ograniczenia spożycia alkoholu etylowego do 100 g tygodniowo [110].

U wszystkich pacjentów przed rozpoczęciem terapii przeciwnowotworowej zalecane jest również przeprowadzenie badania elektrokardiograficznego (EKG) oraz badania przedmiotowego ukierunkowanego na obecność objawów chorób układu krążenia. Ponadto, u każdego chorego, u którego planowane jest zastosowanie leczenia onkologicznego o znanych właściwościach kardiotoxycznych, takiego jak chemioterapia oparta o antracykliny, zalecane jest określenie przynależności do grupy ryzyka wystąpienia CTR-CVT na podstawie obecności czynników ryzyka omówionych wyżej i przedstawionych w Tabeli 2 [19, 99]. Wyróżniane są grupy niskiego, pośredniego, wysokiego oraz bardzo wysokiego ryzyka, przy czym każdy pacjent, u którego planowane jest podanie DOX w dawce ≥ 250 mg/m², kwalifikowany jest do grupy co najmniej wysokiego ryzyka i powinien zostać skierowany do specjalisty kardiologa przed rozpoczęciem leczenia. U wszystkich chorych przed rozpoczęciem chemioterapii z udziałem antracyklin wykonać należy także przezklatkowe badanie echokardiograficzne, oraz pomiar stężenia troponin sercowych (cTn), mózgowego peptydu natriuretycznego (BNP) lub N-końcowego propeptydu natriuretycznego typu B (NT-proBNP) we krwi [19].

Celem dalszego zapobiegania wystąpieniu AIC, u pacjentów z grup wysokiego i bardzo wysokiego ryzyka CTR-CVT rozważyć należy zastosowanie liposomalnej postaci DOX, która poprzez ograniczone przenikanie przez prawidłowy śródbłonek ulega preferencyjnie akumulacji w tkankach nowotworowych, wykazując niższe ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych [19, 111, 112]. W wymienionych grupach chorych dopuszczane jest również zastosowanie szczególnego rodzaju prewencji pierwotnej, jakim jest podanie substancji

czynnych ukierunkowanych na przeciwdziałanie patofizjologicznym procesom leżącym u podstaw toksycznego uszkodzenia kardiomiocytów [19]. Jedynym lekiem zatwierdzonym przez Agencję ds. Żywności i Leków (Food and Drug Agency, FDA) oraz Europejską Agencję Leków do pierwotnej profilaktyki AIC jest deksrazoksan [19]. Kardioprotekcyjne działanie deksrazoksanu obserwowano zarówno w badaniach przedklinicznych, jak i klinicznych [108]. W metaanalizach potwierdzono statystycznie istotną korzyść ze stosowania deksrazoksanu w trakcie terapii antracyklinami w porównaniu z brakiem środków zapobiegawczych, wykazując względne ryzyko wystąpienia HF między 0,21 a 0,31 [113-115]. Ochronne działanie deksrazoksanu związane jest z kilkoma wewnątrzkomórkowymi mechanizmami. Wykazano, że wiąże on Top2 β , ograniczając zahamowanie aktywności tego enzymu pod wpływem antracyklin i w efekcie częściowo zapobiega uszkodzeniu DNA kardiomiocytów [116, 117]. Ponadto, jako chelator jonów żelaza, deksrazoksan zapobiega ich interakcji z antracyklinami, a tym samym zmniejsza nasilenie stresu oksydacyjnego [118]. W jednym z badań klinicznym, w którym oceniono zastosowanie deksrazoksanu u pacjentek otrzymujących chemioterapię opartą na antracyklinach z powodu raka piersi zaobserwowano rzadsze występowanie obiektywnej odpowiedzi na leczenie onkologiczne (ORR) w grupie otrzymującej deksrazoksan - ORR wyniosła 46,8% dla deksrazoksanu oraz 60,5% dla placebo [119]. W badaniu tym nie zaobserwowano jednak różnic w całkowitym czasie przeżycia pacjentek oraz w czasie wolnym od progresji choroby, a inne badania kliniczne i metaanalizy nie wykazały wpływu deksrazoksanu na odpowiedź na leczenie przeciwnowotworowe [113-115].

Szeroko badane pod kątem użyteczności w pierwotnej prewencji AIC są również leki będące antagonistami szlaków neurohormonalnych o ugruntowanej pozycji w terapii HFrEF [120]. Wyniki licznych badań doświadczalnych przeprowadzonych na zwierzęcych modelach AIC wykazały, że inhibitory ACE (ACEI), antagoniści receptora angiotensyny II typu 1 (ARB) oraz antagoniści receptora dla mineralokortykoidów (MRA) mogą zapobiegać wystąpieniu lub zmniejszać nasilenie dysfunkcji skurczowej LV [83, 108]. Wyniki te zostały następnie potwierdzone w badaniach klinicznych, w których wykazano, że ACEI: ramipryl [121] i enalapryl [122, 123], ARB: kandesartan [124] i walsartan [125] oraz MRA spironolakton [126] stosowane jednocześnie z chemioterapią opartą na antracyklinach wykazują działanie kardioprotekcyjne, zapobiegając przede wszystkim zaburzeniom kurczliwości LV obserwowanym w przekłatkowym badaniu echokardiograficznym [83, 108]. Ponadto, również zastosowanie leków beta-adrenolitycznych (BB) – karwedilolu i nebiwololu – wykazało w badaniach klinicznych potencjalną skuteczność w pierwotnej prewencji AIC [122, 127-129]. W związku z tym, kardioonkologiczne wytyczne ESC (2022) dopuszczają możliwość zastosowania ACEI, ARB oraz BB w pierwotnej prewencji AIC u pacjentów z grup wysokiego

i bardzo wysokiego ryzyka CTR-CVT [19]. Możliwość zastosowania leków blokujących wymienione układy jest jednak w pewnym stopniu ograniczona przez działania niepożądane takiej farmakoterapii, przede wszystkim ryzyko wystąpienia hipotensji, które w populacji pacjentów leczonych onkologicznie, podatnych na niedożywienie i odwodnienie, może być szczególnie wysokie [108, 130-132].

Zgodnie z wytycznymi ESC u pacjentów z grup wysokiego i bardzo wysokiego ryzyka wystąpienia AIC rozważyć można także zastosowanie inhibitorów reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutrylo koenzymu A [19], których potencjalną skuteczność wykazano w kilku badaniach kohortowych oraz klinicznych [133-137].

Obecnie dostępne metody pierwotnej profilaktyki AIC nie rozwiązały jednak problemu jej występowania. W świetle poważnego rokowania związanego z występowaniem kardiomiopatii poantracyklinowej, która wiązana jest z ponad 50% śmiertelnością w ciągu pięciu lat od diagnozy [138], nacisk kładzie się na rozwój nowych, skutecznych metod pierwotnej prewencji AIC.

W ramach wtórnej prewencji AIC podstawowe znaczenie ma odpowiednio częste monitorowanie pacjentów poddanych chemioterapii z wykorzystaniem antracyklin, ukierunkowane na wczesne wykrycie CTRCD oraz wdrożenie interwencji mających na celu zahamowanie jej dalszej progresji, a nawet jej częściowe lub całkowite odwrócenie [19]. Metodą obrazowania zalecaną zarówno przez ESC (2022) oraz Europejskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej (European Society for Medical Oncology, ESMO); (2020) jest trójwymiarowe przezklatkowe badanie echokardiograficzne, a gdy zastosowanie tej metody nie jest dostępne, zalecane jest wykonanie dwuwymiarowego przezklatkowego badania echokardiograficznego lub rezonansu magnetycznego serca [19, 139, 140]. Zastosowanie wentrykulografii radioizotopowej ogranicza się ze względu na narażenie pacjenta na promieniowanie jonizujące [140]. Zalecenia dotyczące optymalnych punktów czasowych wykonania badania obrazowego różnią się między medycznymi towarzystwami naukowymi. ESC zaleca, aby u wszystkich pacjentów otrzymujących chemioterapię opartą na antracyklinach wykonać przezklatkowe badanie echokardiograficzne po 12 miesiącach od jej zakończenia [19]. Ponadto, u pacjentów z grup wysokiego i bardzo wysokiego ryzyka CTR-CVT wskazane jest aby badanie to wykonać dodatkowo przy co drugim cyklu chemioterapii oraz w ciągu 3 miesięcy od zakończenia leczenia onkologicznego. Z kolei ESMO opiera swoje zalecenia o całkowitą dawkę otrzymanej przez pacjenta DOX (lub równoważną w zakresie kardiotoxyczności dawkę innej antracykliny) [139]. Zgodnie z tymi zaleceniami, ocenę LVEF należy powtórzyć po otrzymaniu przez pacjenta całkowitej dawki DOX $>250 \text{ mg/m}^2$, następnie po każdej dodatkowej dawce 100 mg/m^2 , oraz po zakończeniu leczenia onkologicznego.

W przypadku wykrycia CTRCD zaleca się zastosowanie farmakoterapii zgodnej z wytycznymi ESC dotyczącymi postępowania w HFrEF (2021) [16], w postaci ACEI, ARB, MRA, BB, ARNI czy inhibitora kotransportera sodowo-glukozowego 2 (SGLT2) [19]. W obserwacyjnym badaniu przeprowadzonym przez Jensen i wsp. (2002) w niewielkiej grupie pacjentów wykazano, że wśród chorych z AIC u których zastosowano enalapryl, wartości LVEF uległy poprawie o co najmniej 15 punktów procentowych u 88% z nich w ciągu dziewięciu miesięcy od włączenia leczenia [141]. Jednocześnie, wśród pacjentów którzy nie otrzymali żadnego leczenia, odsetek osób u których doszło do spontanicznej poprawy LVEF wyniósł jedynie 8%. Z kolei w badaniu klinicznym przeprowadzonym przez Cardinale i wsp. (2010) wykazano, że u pacjentów u których występowało obniżenie LVEF do wartości $\leq 40\%$ związane z terapią antracyklinami, zastosowanie ACEI wraz z BB wiązało się z powrotem LVEF do prawidłowych wartości $>50\%$ u 42% [142]. U kolejnych 13% pacjentów uzyskano poprawę wartości LVEF o co najmniej 10 punktów procentowych, przy czym wartości te nie osiągnęły $>50\%$. Poza zastosowaniem odpowiedniej farmakoterapii, wczesne wykrycie CTRCD i niezwłoczne włączenie leczenia jest szczególnie istotne - w wymienionym badaniu przeprowadzonym przez Cardinale i wsp. (2010) wykazano, że wraz z wydłużaniem czasu od podania antracykliny do rozpoczęcia leczenia, odsetek osób które odpowiedziały na leczenie ulegał znacznemu obniżeniu i osiągał 0% gdy czas ten wynosił 6 miesięcy lub więcej.

W ramach wtórnej prewencji AIC u pacjentów z ciężką objawową postacią CTRCD zaleca się również zaprzestania leczenia onkologicznego opartego na antracyklinach [19]. Z kolei u pacjentów, u których CTRCD występuje w postaci objawowej umiarkowanej lub bezobjawowej ciężkiej i umiarkowanej, zastosowanie antracyklin należy odroczyć do czasu powrotu LVEF do wartości prawidłowych [19].

W monitorowaniu wystąpienia AIC w wytycznych ESC (2022) [19] dopuszcza się także zastosowanie biomarkerów takich jak cTn, BNP czy NT-proBNP, które omówione zostały w kolejnym rozdziale.

1.2.9. Biomarkery kardiotoxyczności antracyklin

W świetle poważnego rokowania pacjentów z HF związaną z podaniem antracyklin oraz możliwości skutecznego jej zapobiegania u znacznego odsetka chorych w przypadku odpowiednio wczesnego wdrożenia adekwatnego postępowania, poszukiwane są czułe i specyficzne metody wykrywania i monitorowania AIC u pacjentów aktualnie otrzymujących chemioterapię opartą na antracyklinach, oraz u tych, którzy takie leczenie otrzymali w przeszłości [143, 144]. Jest to szczególnie istotne w kontekście dostępnych w przeglądzie literatury danych dotyczących wyższego odsetka pozytywnej odpowiedzi na wcześniej

rozpoczęte leczenie [142]. Wczesne wykrycie CTRCD daje więc unikalną okazję do zatrzymania jej progresji do nieodwracalnej postaci, co określić można mianem strategii wczesnej interwencji. Uzyskanie powrotu LVEF do wartości prawidłowych zapewnia również możliwość kontynuacji zaplanowanego leczenia onkologicznego z wykorzystaniem antracyklin, które pozostaje złotym standardem w wielu wymienionych wcześniej typach nowotworów złośliwych.

Przedstawione wcześniej zalecane w wytycznych ESC (2022) oraz ESMO (2020) konwencjonalne strategie monitorowania wystąpienia AIC poprzez kilkukrotne wykonanie przezklatkowego badania echokardiograficznego jest jednak kosztowne i w przypadku badania wykonywanego ambulatoryjnie - również o ograniczonej dostępności [145]. Ponadto odtwarzalność jego wyników w dużym stopniu zależy od doświadczenia osoby wykonującej badanie [146]. Dodatkowo, zgodna z wytycznymi ESC (2022) ocena LVEF w ciągu roku od zakończenia chemioterapii może nie być wystarczająca do uchwycenia CTRCD rozwijającej się z nawet kilkuletnim opóźnieniem [147]. W opisaney powyżej pracy przeprowadzonej przez Mulrooney i wsp. (2016) w grupie dorosłych pacjentów z historią nowotworu złośliwego w dzieciństwie, spośród 7,4% chorych u których występowała CTRCD, ponad połowa przypadków nie została wykryta przed udziałem w badaniu [41]. Celem zmniejszenia odsetka pacjentów z wywiadem onkologicznym z niezdiagnozowaną CTRCD, rozwijane są modele predykcyjne mające umożliwić precyzyjne scharakteryzowanie chorych o najwyższym ryzyku wystąpienia CTRCD i objęcie ich spersonalizowanym schematem monitorowania LVEF [148, 149]. Poszukiwane są również tańsze i łatwo dostępne metody umożliwiające częstsze i długotrwałe monitorowanie wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych u pacjentów, którzy otrzymali chemioterapię opartą na antracyklinach. Zainteresowaniem badaczy cieszą się w związku z tym potencjalne biomarkery oznaczane we krwi, których ocena pozwoliłaby przewidzieć rozwijającą się dysfunkcję skurczową LV, przy wykorzystaniu stosunkowo niewielkich środków finansowych [143, 144, 150, 151]. Aktualnie, wytyczne ESC (2022) oraz ESMO (2020) dopuszczają zastosowanie okresowego oznaczania stężenia cTn, BNP lub NT-proBNP celem monitorowania wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych u pacjentów leczonych onkologicznie [19, 139, 152].

Najlepiej poznanymi biomarkerami AIC są troponina sercowa T (cTnT) oraz troponina sercowa I (cTnI). W szczyrim modelu przewlekłej AIC zaobserwowano, że stężenia cTnI we krwi zwierząt wykazywały dodatnią korelację z wykładnikami kardiotoksyczności w rezonansie magnetycznym serca, stopniem nasilenia histopatologicznych cech uszkodzenia miokardium oraz dysfunkcją rozkurczową LV w badaniu echokardiograficznym [51]. W przeprowadzonej przez Michel i wsp. (2020) obszernej metaanalizie obejmującej 61 badań

klinicznych wykazano, że wystąpienie podwyższonego stężenia cTn we krwi pacjentów podczas chemioterapii z udziałem leków kardi toksycznych, w tym antracyklin, wiązało się z istotnie wyższym ryzykiem pojawienia się CTRCD [153]. W pracy tej nie dokonano jednak oceny zależności między stężeniem cTn a ryzykiem późniejszej hospitalizacji z powodu HF czy zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych. W prospektywnym obserwacyjnym badaniu przeprowadzonym przez Demissei i wsp. (2020), nieuwzględnionym w wymienionej metaanalizie, podwyższone stężenie cTnT we krwi w dniu zakończenia chemioterapii z zastosowaniem antracyklin wiązało się z dwukrotnie wyższym ryzykiem późniejszego wystąpienia CTRCD [154]. Dostępne w przeglądzie literatury dane są jednak w pewnym zakresie niespójne, ponieważ w niedawno opublikowanym przez Diaz-Anton i wsp. (2022) badaniu obserwacyjnym przeprowadzonym w grupie pacjentek otrzymujących chemioterapię opartą na antracyklinach z powodu raka piersi, wyższe stężenie cTnT we krwi nie wiązało się z podwyższonym ryzykiem powikłań sercowo-naczyniowych w ciągu 14 miesięcy od rozpoczęcia leczenia [150].

Kolejnym biomarkerem szeroko badanym w kontekście AIC jest NT-proBNP, uznany marker prognostyczny u pacjentów z HF [155-157]. Wydaje się jednak, że jego użyteczność w przewidywaniu wystąpienia AIC jest niewielka – w wymienionej wyżej metaanalizie przeprowadzonej przez Michel i wsp. (2020), podwyższone stężenie NT-proBNP we krwi nie wiązało się z wyższym ryzykiem wystąpienia CTRCD [153]. Podobnie, we wspomnianym badaniu Diaz-Anton i wsp. (2022), stężenie NT-proBNP we krwi nie wykazywało korelacji z ryzykiem wystąpienia CTRCD u pacjentek leczonych z powodu nowotworu złośliwego piersi [150].

Inne biomarkery badane pod kątem możliwości ich wykorzystania do przewidywania wystąpienia AIC w materiale uzyskanym od pacjentów w ramach badań klinicznych obejmują, między innymi, Top2 β , mieloperoksydazę, MMP oraz interleukinę 6 (IL-6) [143], hemoglobinę [158], C-końcowy propeptyd kolagenu typu I [159], kaspazę 3 [160], czy wybrane cząsteczki mikroRNA [143, 161, 162]. Biomarkerem dotychczas nie badanym pod kątem użyteczności w przewidywaniu AIC, ale budzącym zainteresowanie jako nowy marker w chorobach układu krążenia, jest neprylizyna [163].

1.3. Neprylizyna

Neprylizyna (NEP, CD10, neutralna endopeptydaza) to cynkozależna metaloproteinaza ulegająca ekspresji w licznych ludzkich układach i tkankach, w tym w układzie moczowo-płciowym, pokarmowym, oddechowym, krążenia, mózgu, nadnerczach i łożysku [164, 165]. NEP wykazuje również ekspresję na powierzchni limfocytów B i jako CD10 stanowi jeden

z markerów wykorzystywanych w diagnostyce ostrej białaczki limfoblastycznej metodą cytometrii przepływową [166]. NEP jest enzymem związanym z błoną komórkową, a jej miejsce aktywne ulokowane jest w przestrzeni pozakomórkowej, dzięki czemu uczestniczy ona w degradacji licznych substratów znajdujących się w środowisku zewnątrzkomórkowym [167]. Poprzez proteolizę szeregu aktywnych biologicznie cząsteczek do peptydów najczęściej pozbawionych aktywności, NEP zaangażowana jest w regulację wielu układów hormonalnych, przede wszystkim na poziomie tkankowym. Wśród poznanych substratów NEP wyróżnia się peptydy natriuretyczne (NP), Ang I, Ang II, ET-1 czy bradykininę, a także glukagon, glukagonopodobny peptyd 1, substancję P, oksytocynę, peptyd β -amyloidu, adrenomedulinę, oraz somatostatynę [165]. Ponadto, w ostatnich latach wykazano, że do polipeptydów podlegających proteolizie przez NEP należy także apelina wchodząca w skład układu apelinergicznego [168].

1.3.1. Wpływ NEP na układ peptydów natriuretycznych

Peptydy natriuretyczne pełnią w układzie krążenia rolę przeciwstawną do wiodących szlaków neurohormonalnych biorących udział w patogenezie HF – RAAS, układu wazopresynergicznego oraz współczulnego układu nerwowego. Wyróżnia się przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP), BNP, peptyd natriuretyczny typu C (CNP), peptyd natriuretyczny Dendroaspis (DNP), czy uroguanilinę [169]. NP oddziałują na komórki poprzez wiązanie z transbłonowymi receptorami peptydów natriuretycznych (NPR) - NPR typu A (NPRA) oraz NPR typu B (NPRB), których domena wewnątrzkomórkowa aktywuje cyklazę guanylową syntezującą drugorzędowy przekaźnik w formie cyklicznego monofosforanu guanozyny, który z kolei aktywuje kinazę białkową G [169]. Interakcja NP z NPR typu C (NPRC) prowadzi natomiast do internalizacji kompleksu peptyd-receptor i dalej wewnątrzkomórkowej degradacji peptydu, stąd NPRC stanowi jeden z mechanizmów obniżenia aktywności biologicznej NP [170].

Poszczególne NP różnią się miejscem syntezy, aktywnością we krwi, okresem połowicznego półtrwania i powinowactwem do wymienionych wyżej receptorów. Głównym źródłem ANP występującego we krwi są przedsionki serca, a bodźcem do jego uwolnienia jest przede wszystkim zwiększenie stopnia rozciągnięcia ich ścian [171]. ANP w porównaniu do innych NP charakteryzuje się najwyższą aktywnością we krwi, przy jednocześnie najkrótszym okresie półtrwania [170]. Drugim NP silnie związanym z hormonalną regulacją układu krążenia jest BNP, wydzielany przez kardiomiocyty komór serca pod wpływem zwiększonego naprężenia ścian komór w warunkach patofizjologicznych [172]. BNP charakteryzuje się niższymi stężeniami jakie osiąga we krwi, przy jednocześnie długim okresie półtrwania [170].

Peptydy natriuretyczne, przede wszystkim ANP i BNP, charakteryzują się szerokim zakresem oddziaływań kardioprotekcyjnych – nasilają diurezę i natriurezę, pobudzają wazodylatację oraz wykazują bezpośrednie działanie hamujące RAAS poprzez zmniejszenie syntezy reniny [173-175]. Ponadto, peptydy te, oddziałując bezpośrednio w obrębie mięśnia sercowego, wykazują działanie ochronne przed hipertrofią kardiomiocytów, rozplemem fibroblastów i włóknieniem śródmiąższowym [173-175]. W badaniach doświadczalnych z wykorzystaniem modeli zwierzęcych wykazano, że zarówno ANP, jak i BNP, poprzez interakcję z NPRA hamują hipertrofię kardiomiocytów i proliferację fibroblastów indukowaną przez RAAS [176].

Oddziaływanie NEP na peptydy natriuretyczne stanowi główny mechanizm ich dezaktywacji [176]. Ze względu na budowę miejsca aktywnego, NEP wykazuje różny stopień powinowactwa do NP: najwyższe powinowactwo dotyczy ANP oraz CNP, podczas gdy powinowactwo względem BNP jest względnie niskie [165]. Zgodnie z tym wykazano, że zahamowanie aktywności NEP u ludzi związane jest ze zwiększeniem aktywności krążących NP, przede wszystkim ANP [177, 178].

1.3.2. Wpływ NEP na RAAS

Neprylizyna wykazuje wysokie powinowactwo wobec Ang II, powodując jej proteolizę do nieaktywnych peptydów [165]. U zdrowych ochotników poddanych infuzji Ang II, z których część przyjmowała jednocześnie inhibitor neprylizyny (NEPI) – kandoksatril, w grupie otrzymującej NEPI zaobserwowano istotnie wyższe osoczowe stężenia Ang II oraz nasilenie odpowiedzi presyjnej w postaci wzrostu wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego (BP) [179]. NEP stanowi zatem ważny element ograniczający nadmierną aktywność szkodliwego ramienia RAAS: ACE/Ang II/AT-R1. Ponadto, NEP, podobnie jak ACE2, oddziałuje także na Ang I, a efektem tego oddziaływania jest synteza Ang 1-7, wchodzącej w skład kardioprotekcyjnego ramienia RAAS: Ang-1-7/MasR [180]. W związku z powyższymi zależnościami, wpływ NEP na układy hormonalne biorące udział w regulacji układu krążenia uznaje się za dwukierunkowy, ponieważ enzym ten prowadzi do obniżenia biodostępności kardioprotekcyjnych peptydów natriuretycznych, jednocześnie ograniczając niepożądane w chorobach układu krążenia oddziaływanie RAAS.

1.3.3. Ekspresja NEP w chorobach układu krążenia

Ekspresja neprylizyny w mięśniu sercowym jest w warunkach fizjologicznych względnie niska, w porównaniu do układu moczowo-płciowego czy pokarmowego [163]. Dane literaturowe dotyczące zmian ekspresji i aktywności NEP w chorobach układu krążenia

pozostają znacznie ograniczone i niespójne, i pochodzą przede wszystkim z badań przeprowadzonych w modelach zwierzęcych. Knecht i wsp. (2002) w szczurzym modelu HFrEF zaobserwowali istotne zwiększenie tkankowej ekspresji matrycowego kwasu rybonukleinowego (mRNA), poziomu białka oraz aktywności enzymatycznej NEP w nerkach zwierząt doświadczalnych [181]. Abassi i wsp. (1995) w szczurzym modelu HFrEF zaobserwowali obniżenie ekspresji mRNA i aktywności enzymatycznej NEP w tkance płucnej zwierząt ze zdekompensowaną HF, przy jednoczesnym braku zmian w zakresie tych parametrów w nerkach zwierząt doświadczalnych [182]. Z kolei Pavo i wsp. (2020) u świń z pozawałową HFrEF zaobserwowali ogólnoustrojowe obniżenie ekspresji mRNA, poziomu białka i aktywności enzymatycznej NEP, które było szczególnie zaznaczone w obrębie kory czołowej, dwunastnicy oraz nerek [183]. W mięśniu sercowym zwierząt zaobserwowano natomiast obniżenie aktywności i poziomu białka NEP, bez istotnych różnic w zakresie ekspresji jej mRNA. Z kolei w badaniu przeprowadzonym na niewielkiej grupie pacjentów z idiopatyczną kardiomiopatią rozstrzeniową i obniżoną LVEF, Arrigo i wsp. (2018) zaobserwowali 1,5-krotne zwiększenie ekspresji mRNA NEP w obrębie tkanek LV [184].

1.3.4. Neprylizyna jako biomarker

Neprylizyna, występująca przede wszystkim w postaci związanej z błoną komórkową, ulega również złuszczeniu z powierzchni komórek przy udziale dezintegryny i metaloproteazy 17 [185] oraz obecna jest w uwalnianych przez komórki egzosomach [183]. W takiej, tak zwanej rozpuszczalnej postaci (sNEP), która pozostaje aktywna enzymatycznie, występuje ona we krwi, moczu i płynie wewnątrzstawowym [167]. Badanie przeprowadzone przez Arrigo i wsp. (2018) na niewielkiej grupie pacjentów z HF dostarczyło dowodów, że u pacjentów z HFrEF komory serca stanowią główne źródło sNEP we krwi [184]. W pracy tej wykazano bowiem, że u tych chorych aktywność enzymatyczna oraz stężenie sNEP we krwi pobranej z zatoki wieńcowej było trzykrotnie wyższe niż we krwi uzyskanej z żyły łokciowej, czego nie obserwowano w przypadku pacjentów z HFpEF. Ponadto, w pracy uwzględniono opis dwóch przypadków pacjentów poddanych wszczepieniu sztucznego serca, u których po usunięciu komór serca zaobserwowano gwałtowne obniżenie stężenia sNEP we krwi, które w ciągu kolejnych 6 tygodni uległo jedynie częściowemu wzrostowi. Vodovar i wsp. (2015) wykazali natomiast, że chorzy ze zdekompensowaną HF charakteryzowali się niższym stężeniem sNEP niż ci ze stabilną chorobą [186]. Jednocześnie, również aktywność enzymatyczna sNEP była u tych pacjentów istotnie niższa, co autorzy powiązali z hamującym oddziaływaniem wysokich stężeń BNP na aktywność tego enzymu.

W ostatnich latach opublikowanych zostało kilka badań dotyczących roli sNEP jako biomarkera w chorobach układu krążenia, przedstawiających rozbieżne wyniki. Bayes-Genis i wsp. (2015) w grupie ponad tysiąca pacjentów z HFrEF wykazali, że wyższe stężenie sNEP we krwi stanowiło czynnik ryzyka hospitalizacji z powodu zaostrzenia choroby podstawowej oraz śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych [187]. W badaniu nie zaobserwowano jednak korelacji między stężeniem sNEP a wartościami LVEF, nasileniem objawów w klasyfikacji wg. Nowojorskiego Towarzystwa Kardiologicznego (NYHA), czy stężeniem NT-proBNP we krwi. W badaniu przeprowadzonym przez Nunez i wsp. (2017) w grupie 1021 pacjentów z HF (87,6% HFrEF) wykazano, że wyższe stężenie sNEP we krwi związane było ze zwiększonym ryzykiem hospitalizacji z jakiegokolwiek przyczyny [188]. Stężenie sNEP nie było jednak skorelowane z ciężkością dysfunkcji skurczowej LV.

W badaniu przeprowadzonym u pacjentów z HFpEF, stężenie sNEP nie było istotnie powiązane z ryzykiem hospitalizacji z powodu choroby podstawowej, ryzykiem zgonu, czy stopniem wydolności czynnościowej pacjentów [189]. Podobnie, w grupie pacjentów z MI z uniesieniem odcinka ST nie wykryto różnic w stężeniu sNEP we krwi między wczesną fazą zawału a miesiąc po reperfuzji oraz nie stwierdzono związku między stężeniem sNEP wynikiem leczenia po roku od MI [190]. W grupie 694 pacjentów z chorobą wieńcową poddanych przezskórnej interwencji wieńcowej stężenia sNEP nie były związane z długoterminową śmiertelnością ani wystąpieniem poważnych incydentów sercowo-naczyniowych [191]. Jednak w badaniu tym w podgrupie pacjentów z LVEF < 40% stężenie sNEP we krwi było pozytywnie skorelowane z wyższym ryzykiem zgonu z jakiegokolwiek przyczyny. W badaniu przeprowadzonym w grupie pacjentów z pozaszpitalnym zatrzymaniem krążenia wyższe stężenie sNEP we krwi wiązało się z wyższym ryzykiem zgonu [192]. W obejmującym ponad 1500 uczestników badaniu przeprowadzonym przez Reggy i wsp. (2019) w populacji ogólnej zaobserwowano, że u osób z czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego takimi jak nikotynizm, dyslipidemia, HTN czy dysfunkcja rozkurczowa LV występowały niższe stężenia sNEP we krwi [193]. Nie wykazano jednak istotnej korelacji między sNEP a ryzykiem wystąpienia HF bądź zgonu.

1.3.5. Farmakologiczne zahamowanie aktywności NEP w HF

W badaniach klinicznych przeprowadzonych z udziałem pacjentów z HFrEF obserwowano korzystny wpływ infuzji peptydów natriuretycznych na nasilenie natriurezy, wyrównanie bilansu płynów, ograniczenie występowania objawów HF oraz poprawę parametrów hemodynamicznych takich jak objętość wyrzutowa lewej komory serca (SV), czy ciśnienie zaklinowania w tętnicy płucnej [194-196]. W związku z omówionym wyżej

hamującym wpływem NEP na aktywność NP, podjęto badania dotyczące możliwości zastosowania NEPI celem poprawy biodostępności peptydów natriuretycznych u pacjentów z HF. W przeprowadzonych wiele lat temu licznych badaniach doświadczalnych w zwierzęcych modelach HF pod wpływem podania NEPI u zwierząt obserwowano oczekiwane zwiększenie aktywności ANP oraz BNP we krwi, zwiększenie stężenia cGMP w moczu oraz nasilenie natriurezy [197-203]. W dalszych badaniach doświadczalnych wykazano korzystny wpływ podania NEPI na ograniczenie spadku pojemności minutowej serca (CO) i zahamowanie wzrostu wewnątrzkomorowego ciśnienia końcoworozkurczowego w szczurzym modelu pozawałowej HFrEF [204], ograniczenie hipertrofii mięśnia sercowego u szczurów spontanicznie nadciśnieniowych (SHR) [205, 206] oraz organicznie hipertrofii i przebudowy mięśnia sercowego u szczurów z HF związaną z przeciążeniem objętościowym serca w wyniku obecności przetoki między aortą a żyłą główną [207].

Badania kliniczne fazy I potwierdziły następnie zwiększenie aktywności NP u pacjentów z ciężką HF przyjmujących NEPI: kandoksatrylat [208], racekadotryl [209] oraz ekadotryl [210], przy akceptowalnym profilu działań niepożądanych. W wymienionych badaniach nie obserwowano istotnych korzyści klinicznych z zastosowanej terapii. Randomizowane, kontrolowane placebo badanie kliniczne dotyczące zastosowania ekadotrylu u pacjentów z HFrEF, do którego zrekrutowano 279 chorych, zostało przedwcześnie przerwane z powodu braku ewidentnych korzyści klinicznych z zastosowanej terapii, w zestawieniu z wystąpieniem u pacjentów w grupie otrzymującej ekadotryl siedmiu zgonów, przy czym dwa z nich spowodowane były wystąpieniem pancytopenii [211]. Ze względu na zniechęcające wyniki badań klinicznych oraz podejrzenie występowania nieakceptowalnego profilu działań niepożądanych, dalsze badania nad zastosowaniem NEPI w monoterapii w HF zostały zarzucone. Niepowodzenie zastosowania monoterapii NEPI w HF wiąże się aktualnie z przeciwstawnym wpływem NEP na układy hormonalne regulujące układ krążenia i niezamierzoną nadmierną aktywacją osi ACE/Ang II/AT-R1 u przyjmujących te leki chorych [212].

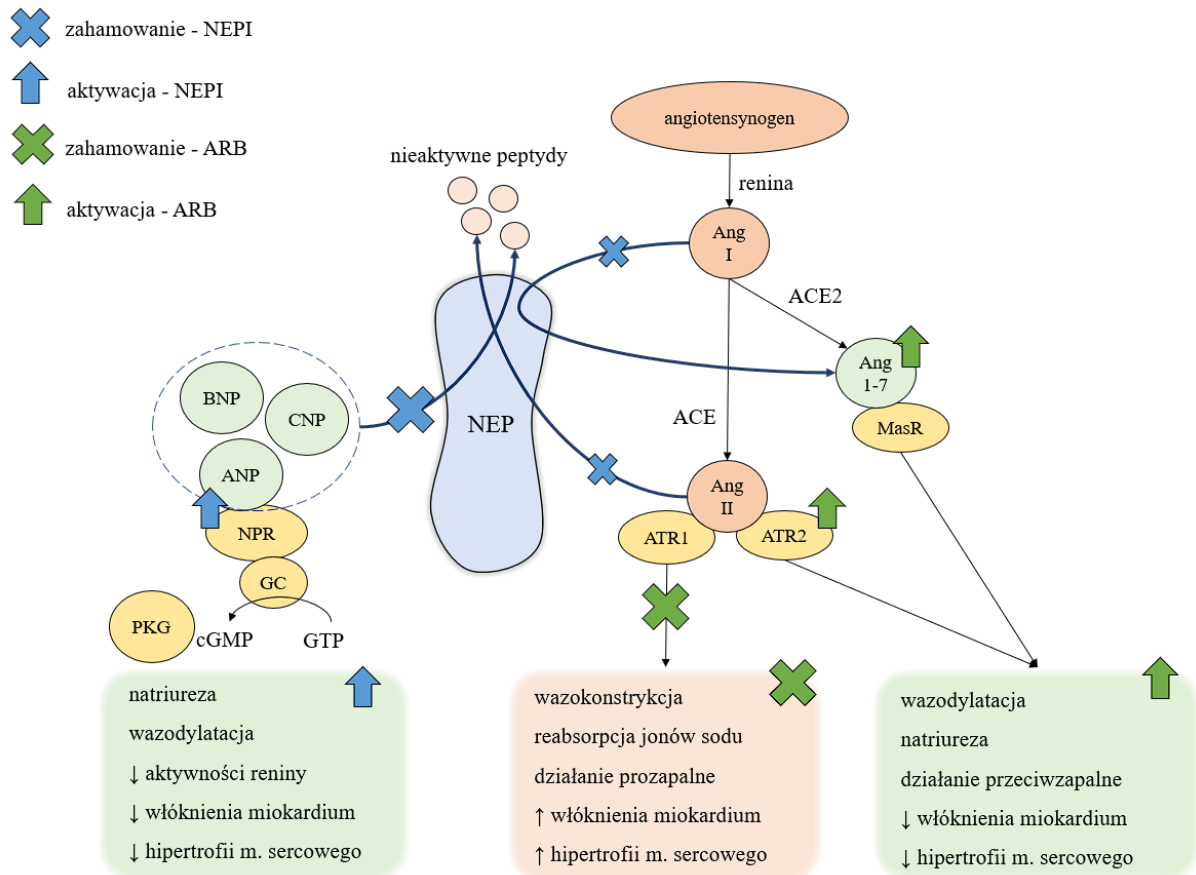
Celem ograniczenia aktywacji RAAS, w dalszych badaniach klinicznych oceniono zastosowanie omapatrilatu, jednoczesnego inhibitora NEP oraz ACE. W randomizowanym badaniu klinicznym IMPRESS wykazano, że w porównaniu do ACEI lisinoprylu, zastosowanie omapatrilatu u pacjentów z HFrEF wiązało się niższym ryzykiem wystąpienia złożonego punktu końcowego w postaci zgonu, hospitalizacji lub zakończenia udziału w badaniu ze względu na zaostrzenie HF [213]. Z kolei badanie kliniczne OVERTURE nie wykazało wyższości terapii z zastosowaniem omapatrilatu nad ACEI enalaprylem, a w grupie pacjentów otrzymujących omapatrilat odnotowano częstsze występowanie obrzęku naczynioruchowego [214]. Podobnie,

w badaniu klinicznym OCATVE, porównującym zastosowanie omapatrilatu do enalaprylu u pacjentów z dotychczas nieleczonym bądź słabo kontrolowanym HTN, w grupie chorych otrzymujących omapatrilat wykazano istotnie wyższe ryzyko wystąpienia obrzęku naczyniowego [215]. Częstsze występowanie wymienionego działania niepożądanego uznaje się za związane ze zwiększoną aktywnością bradykininy, która ulega metabolizmowi pod wpływem zarówno ACE, jak i NEP [216, 217]. W związku z niekorzystnym profilem działań niepożądanych i niejasnymi wynikami badań dotyczącymi korzyści klinicznej z jego zastosowania, omapatrilat nie uzyskał zatwierdzenia przez FDA [218].

Kolejnym ocenionym w badaniach klinicznych połączeniem lekowym było ARNI (połączenie NEPI oraz ARB), w przypadku którego oczekiwano niższego ryzyka wystąpienia obrzęku naczynioruchowego ze względu na brak jednoczesnego hamowania aktywności NEP i ACE. ARNI wprowadzono do standardów postępowania u pacjentów z HFrEF w oparciu o wymienione wyżej badanie kliniczne PARADIGM-HF, w którym porównano zastosowanie ARNI i enalaprylu u pacjentów z HFrEF NYHA II, III lub IV [15]. Badanie zostało zakończone przedwcześnie ze względu na obserwowaną wyraźną wyższością ARNI nad enalaprylem w obniżaniu ryzyka hospitalizacji z powodu zaostrzenia HF oraz ryzyka zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych. Jednocześnie, ARNI charakteryzowało się w tym badaniu korzystniejszym od enalaprylu profilem działań niepożądanych (niższe ryzyko wystąpienia przewlekłego kaszlu, wzrostu stężenia kreatyniny we krwi oraz hiperkaliemii, porównywalne ryzyko wystąpienia obrzęku naczynioruchowego), z wyjątkiem objawowej hipotensji, która występowała w grupie pacjentów przyjmujących ARNI istotnie częściej. Aktualnie jedynym stosowanym klinicznie przedstawicielem grupy ARNI jest sakubitryl/walsartan [17]. Podsumowanie mechanizmu działania ARNI przedstawiono schematycznie na Rycinie 2.

W związku z sukcesem zastosowania ARNI u chorych z HFrEF, prowadzone są liczne badania dotyczące potencjalnych korzyści z zastosowania tego połączenia lekowego w innych jednostkach chorobowych. Rola ARNI w HFpEF, pomimo zachęcających wyników badań przeprowadzonych na zwierzęcych modelach [219-222], pozostaje niejasna, ponieważ duże, wielośrodkowe badanie kliniczne PARAGON-HF, porównujące zastosowanie ARNI do ARB u pacjentów z HFpEF, nie wykazało różnic w zakresie ryzyka hospitalizacji lub zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych pomiędzy grupami [223]. W innych badaniach doświadczalnych wykorzystujących zwierzęce modele wykazywano potencjalną korzyść z zastosowania ARNI w zapaleniu mięśnia sercowego [224], przewlekłej chorobie nerek [225], migotaniu przedsionków [226, 227] oraz MI [228-238]. Ponadto, w związku z obserwowanym w badaniach doświadczalnych i klinicznych kardioprotekcyjnym działaniem ARNI, w ciągu

ostatnich kilku lat przeprowadzono szereg badań dotyczących zastosowania tego połączenia lekowego w pierwotnej prewencji AIC, które zostały opisane w dalszej części niniejszej pracy.



Rycina 2. Schemat mechanizmu działania ARNI. Przygotowano na podstawie: Sobiborowicz-Sadowska i wsp. (2023) [44]. ACE – enzym konwertujący angiotensynę, ACE2 – enzym konwertujący angiotensynę typu 2, Ang 1-7 – angiotensyna 1-7, Ang I – angiotensyna I, Ang II – angiotensyna II, ANP – przedsionkowy peptyd natriuretyczny, ARB – antagonist receptoru angiotensyny II, ATR1 – receptor angiotensyny II typu AT₁, ATR2 – receptora angiotensyny II typu AT₂, BNP – mózgowy peptyd natriuretyczny, cGMP – cykliczny monofosforan guanozyny, CNP – peptyd natriuretyczny typu C, GC – cyklaza guanylowa, GTP – trójfosforan guanozyny, m. – mięśnia, MasR – receptor typu Mas, NEP – neprylizyna, NEPI – inhibitor neprylizyny, NPR – receptor peptydów natriuretycznych, PKG – kinaza białkowa G, ↑ – zwiększenie, ↓ – zmniejszenie.

1.3.6. Farmakologiczne zahamowanie aktywności NEP w prewencji AIC

Dostępne w przeglądzie literatury dane dotyczące zastosowania ANRI w pierwotnej prewencji AIC pochodzą z badań doświadczalnych przeprowadzonych w modelach zwierzęcych, przede wszystkim szczurzych i mysich. W pierwszym dostępnym doniesieniu, Xia i wsp. (2017) w mysim modelu przewlekłej AIC wykazali ograniczenie dysfunkcji skurczowej i zwłóknienia mięśnia sercowego związanych z podaniem DOX u zwierząt otrzymujących ARNI, co jak wykazano związane było przede wszystkim z ograniczeniem toksycznego uszkodzenia mitochondriów w obrębie kardiomiocytów [239]. Ochronny wpływ ARNI przed obniżeniem LVEF związanym z podaniem DOX potwierdzono w kolejnych badaniach doświadczalnych [95, 240], a Boutagy i wsp. (2020) w szczurzym modelu przewlekłej AIC wykazali, że podanie ARNI w pierwotnej profilaktyce AIC było skuteczniejsze od monoterapii walsartanem [241]. W przeciwieństwie do opisanych badań, Miyoshi i wsp. (2022) nie potwierdzili ochronnego wpływu zarówno ARNI, jak i walsartanu, przed spadkiem LVEF u szczurów otrzymujących DOX [242]. W grupie zwierząt, którym podawano ARNI, zaobserwowano jednak niższe stężenie sercowej troponiny C i NT-proBNP we krwi oraz ograniczenie stresu oksydacyjnego i zwłóknienia śródmiąższowego w obrębie LV. W mysim modelu przewlekłej AIC wykazano także korzystny wpływ podania ARNI na związane z podaniem DOX zmiany w EKG, takie jak wydłużenie czasu trwania zespołu QRS i wydłużenie czasu trwania odstępu QT, czemu towarzyszył spadek nasilenia stresu oksydacyjnego i wzrost całkowitej aktywności enzymów przeciwutleniających w obrębie LV, a także obniżenie tkankowego poziomu cytokin prozapalnych takich jak czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α), interleukina 1 (IL-1), czy IL-6 [243].

We wszystkich z wymienionych badań doświadczalnych wykorzystujących mysi bądź szczury model AIC zastosowano farmakoterapię ARNI w dawkach w zakresie 60-80 mg/kg masy ciała (BW)/d, które jak wykazano w badaniu oceniającym właściwości farmakodynamiczne ARNI u szczurów szczepu SPRD, powodują długotrwałe obniżenie średniego ciśnienia tętniczego [244]. W związku z tendencją pacjentów poddanych chemioterapii do niskich wartości BP, możliwość podania leków o właściwościach hipotensyjnych może być w tej grupie chorych ograniczona. Wśród osób przyjmujących ARNI z powodu HFrEF, objawową hipotensję odnotowuje się wśród 19 – 26% pacjentów [245, 246], w związku z czym podejmowane są badania dotyczące możliwości zastosowania niskodawkowej terapii celem poprawy tolerancji leczenia [247-249]. Mając na uwadze to ograniczenie, Kim i wsp. (2022) przeprowadzili badanie w mysim modelu AIC z zastosowaniem ARNI w niższej dawce (34 mg/kg BW/d) w zestawieniu z jednoczesnym

podaniem inhibitora SGLT2 [250]. W badaniu wykazano skuteczność tego połączenia lekowego w ograniczeniu nasilenia AIC oraz śmiertelności zwierząt. Ponieważ w grupie zwierząt otrzymujących ARNI bez inhibitora SGLT2 zastosowano jednak standardową, wyższą dawkę 68 mg/kg BW/d, praca ta nie dostarczyła danych dotyczących efektów niskodawkowej terapii ARNI w pierwotnej prewencji AIC. Yu i wsp. (2021) w króliczym modelu AIC, stosując niższe niż standardowe dla królików dawki ARNI (odpowiednio 5 oraz 10 mg/kg BW/d vs. 20 mg/kg BW/d) [227, 229], wykazali ochronny wpływ zastosowanej farmakoterapii na wystąpienie charakterystycznych dla AIC zmian w badaniu EKG, a także zwiększenie tkankowej aktywności enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza nadtlenkowa i katalaza w obrębie LV [251]. W omówionym badaniu nie wykonano jednak badania echokardiograficznego, nie dostarczając zatem danych dotyczących wpływu zastosowanej terapii na kurczliwość LV.

Aktualnie przeprowadzane jest wieloośrodkowe, randomizowane badanie kliniczne fazy 2 PRADAII mające na celu ocenę skuteczności zastosowania ARNII jednocześnie z chemioterapią z użyciem antracyklin u chorych z rakiem piersi w ramach pierwotnej prewencji AIC [252]. Jednym z kryteriów wyłączenia pacjentów z badania jest występowanie hipotensji przed rozpoczęciem leczenia. Oczekiwany czas zakończenia badania szacuje się na koniec 2025 r.

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

2.1. Założenia pracy

Pogłębienie wiedzy dotyczącej zjawisk patofizjologicznych towarzyszących toksycznemu uszkodzeniu mięśnia sercowego pod wpływem antracyklin stanowi podstawę do rozwoju nowych metod prewencji AIC oraz poszukiwania biomarkerów pomocnych w określeniu ryzyka wystąpienia tego działania niepożądanego oraz monitorowania postępu choroby. Z przeprowadzonego na potrzeby niniejszej pracy doktorskiej przeglądu literatury wynika, że wpływ zastosowania antracyklin na ekspresję mRNA, poziom białka i aktywność enzymatyczną NEP w obrębie mięśnia sercowego nie został dotychczas oceniony. Nie badano również, czy pod wpływem podania antracyklin dochodzi do zmian stężenia i aktywności sNEP we krwi. W świetle zainteresowania sNEP jako biomarkerem w chorobach układu krążenia, zbadanie korelacji między stężeniem sNEP a nasileniem uszkodzenia mięśnia sercowego pod wpływem podania antracyklin pozwolić może na wyciągnięcie wniosków na temat potencjalnej przydatności tej substancji jako biomarkera w AIC.

Przeprowadzone dotychczas badania w modelach zwierzęcych dotyczące zastosowania ARNI w pierwotnej prewencji AIC wskazują na skuteczne, kardioprotekcyjne działanie tego połączenia lekowego. W dostępnych w przeglądzie literatury badaniach wykorzystano jednak wysokie dawki ARNI, powodujące przedłużone obniżenie ciśnienia tętniczego. Jak wskazują dane kliniczne, podanie ARNI wiązać się może z wystąpieniem objawowej hipotensji u znacznego odsetka pacjentów, co w przypadku populacji chorych poddanych chemioterapii może być szczególnie silnie wyrażone. Przeprowadzone dotychczas badania doświadczalne dotyczące niskodawkowej terapii ARNI w pierwotnej prewencji AIC nie dostarczają jednoznacznych danych na temat jej działania kardioprotekcyjnego.

2.2. Cele pracy

Przeprowadzone badania zostały podzielone na dwie części. Celem Części I badania była ocena wpływu podania DOX na ekspresję mRNA, poziom białka i aktywność enzymatyczną NEP w obrębie LV oraz na stężenie i aktywność sNEP w surowicy w zwierzęcym modelu ostrej (Część Ia) i przewlekłej (Część Ib) AIC, a także ocena występowania zależności pomiędzy tymi parametrami a nasileniem kardiotoxyczności. Celem Części II badania była ocena wpływu farmakoterapii z zastosowaniem ARNI w niskiej dawce na stopień nasilenia kardiotoxyczności w zwierzęcym modelu przewlekłej AIC.

Cele szczegółowe rozprawy w Części Ia:

1. Zbadanie wpływu podania DOX na ekspresję mRNA, poziom białka i aktywność enzymatyczną NEP w LV zwierząt doświadczalnych w modelu ostrej AIC.
2. Zbadanie wpływu podania DOX na stężenie i aktywność enzymatyczną sNEP w surowicy zwierząt doświadczalnych w modelu ostrej AIC.
3. Ocena występowania zależności między ekspresją mRNA, poziomem białka i aktywnością enzymatyczną NEP w LV zwierząt doświadczalnych a stopniem nasilenia zmian w badaniu echokardiograficznym i histopatologicznym związanych z podaniem DOX w modelu ostrej AIC.
4. Ocena występowania zależności między stężeniem i aktywnością enzymatyczną sNEP w surowicy zwierząt doświadczalnych a stopniem nasilenia zmian w badaniu echokardiograficznym i histopatologicznym związanych z podaniem DOX w modelu ostrej AIC.

Cele szczegółowe rozprawy w Części Ib:

1. Zbadanie wpływu podania DOX na ekspresję mRNA, poziom białka i aktywność enzymatyczną NEP w LV zwierząt doświadczalnych w modelu przewlekłej AIC.
2. Zbadanie wpływu podania DOX na stężenie i aktywność enzymatyczną sNEP w surowicy zwierząt doświadczalnych w modelu przewlekłej AIC.
3. Ocena występowania zależności między ekspresją mRNA, poziomem białka i aktywnością enzymatyczną NEP w LV zwierząt doświadczalnych a stopniem nasilenia zmian w badaniu echokardiograficznym i histopatologicznym związanych z podaniem DOX w modelu przewlekłej AIC.
4. Ocena występowania zależności między stężeniem i aktywnością enzymatyczną sNEP w surowicy zwierząt doświadczalnych a stopniem nasilenia zmian w badaniu echokardiograficznym i histopatologicznym związanych z podaniem DOX w modelu ostrej AIC.

Cele szczegółowe rozprawy w Części II:

1. Zbadanie wpływu dożyłkowego podania sakubitrylu/walsartanu w niskiej dawce na stopień nasilenia biochemicznych, echokardiograficznych, elektrokardiograficznych oraz histopatologicznych wykładników kardiotoksyczności w modelu przewlekłej AIC.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Ogólna charakterystyka zwierząt

Celem uzyskania zwierzęcego modelu kardiotoksyczności antracyklin, w niniejszej pracy doktorskiej zdecydowano się na wykorzystanie szczurów wędrownych szczepu SPRD, które obok myszy i innych szczepów szczura stanowią jeden z najczęściej wykorzystywanych modeli zwierzęcych w badaniach doświadczalnych dotyczących AIC [62, 63]. Wykorzystanie modelu szczurzego umożliwia pozyskanie większej objętości krwi i materiału tkankowego do badań histopatologicznych, biochemicznych i metodami biologii molekularnej w porównaniu z modelem mysim [253]. Ponadto, większe u szczura niż u myszy rozmiary struktur wewnętrznych serca zapewniają lepsze warunki do wykonania badania echokardiograficznego.

Badania przeprowadzone zostały na 12-tygodniowych samcach szczura szczepu SPRD. Doświadczenia przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Unii Europejskiej dotyczącymi opieki i wykorzystania zwierząt laboratoryjnych (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r.) i uzyskały one zgodę II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (Uchwała nr WAW2/031/2021). Wszystkie zwierzęta pochodziły z Centralnego Laboratorium Zwierząt Doświadczalnych w Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego przy ul. Stefana Banacha 1B w Warszawie.

Zwierzęta przebywały w pomieszczeniu z wentylacją mechaniczną, regulowaną dobą świetlną (12h/12h), regulowaną temperaturą (20-24 °C) i wilgotnością 55% ($\pm 10\%$). Szczury utrzymywane były po cztery osobniki w standardowych klatkach plastikowych z metalowymi pokrywami, ze swobodnym dostępem do wody pitnej oraz standardowej paszy dla zwierząt laboratoryjnych. We wszystkich klatkach znajdowały się wzbogacenia środowiska w postaci plastikowych czerwonych, transparentnych domków dla szczurów oraz papierowych rurek.

W Tabeli 3. przedstawiono podział wykorzystanych w niniejszej pracy doktorskiej grup zwierząt. Liczebność osobników w grupach doświadczalnych oraz kontrolnych ustalono w oparciu o modelowanie w programie G*Power 3.1. Do wykonania obliczeń przyjęto średnią wartość LVEF wynoszącą $60\% \pm 7\%$ w grupie kontrolnej i zmianę o 15% jako zmianę istotną statystycznie dla dwuczynnikowej analizy wariancji z powtarzanymi pomiarami wewnątrz grupy, przy założeniach: wielkość efektu $f = 0,25$; poziom $\alpha = 0,05$; moc testu $= 0,9$.

Tabela 3. Grupy zwierząt doświadczalnych użyte w pracy doktorskiej.

Część badania	Grupa	Liczebność	Interwencja różnicująca
Ia	Doświadczalna	$n=8$	DOX <i>i.p.</i>
	Kontrolna	$n=8$	NaCl <i>i.p.</i>
Ib	Doświadczalna	$n=8$ (+3 dodatkowe)	DOX <i>i.p.</i>
	Kontrolna	$n=8$	NaCl <i>i.p.</i>
II	Doświadczalna	$n=8$	Sakubitryl/walsartan <i>p.o.</i>
	Kontrolna	$n=8$	NaCl <i>p.o.</i>

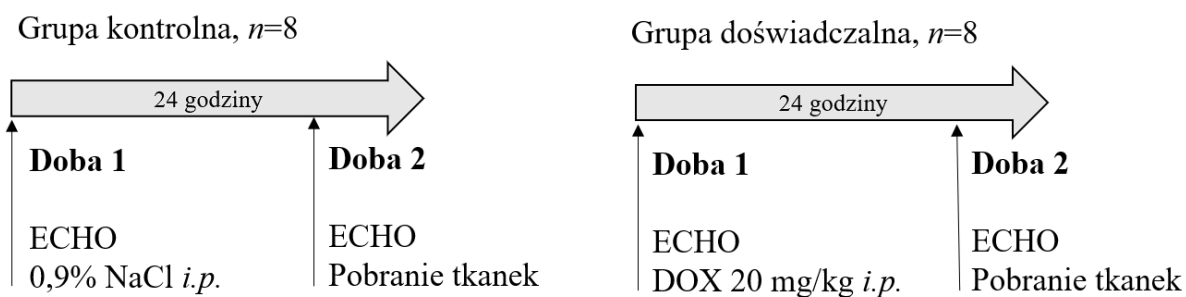
DOX – dokсорubicyna, *i.p.* – dootrzewnowo, NaCl – chlorek sodu, *p.o.* - dożołądkowo

3.2. Procedury badawcze

3.2.1. Przebieg badania

3.2.1.1. Część Ia - model ostrej AIC

Przebieg badania w Części Ia przedstawiony został schematycznie na Rycinie 3. W pierwszej dobie badania zwierzęta poddane zostały badaniu echokardiograficznemu w znieczuleniu ogólnym poprzez dootrzewnowe podanie ketaminy w dawce 75 mg/kg BW wraz z ksylazyną w dawce 7 mg/kg BW. Następnie osobniki z grupy kontrolnej otrzymały iniekcję 0,9% chlorku sodu (NaCl) *i.p.*, natomiast osobniki z grupy doświadczalnej – iniekcję DOX *i.p.* w dawce 20 mg/kg BW. Po upływie doby od iniekcji zwierzęta poddane zostały ponownemu badaniu echokardiograficznemu w znieczuleniu ogólnym, a następnie uśmiercone celem pobrania tkanek do oceny histopatologicznej oraz analizy biochemicznej i metodami biologii molekularnej. Podsumowanie parametrów ocenianych w Części Ia przedstawiono w Tabeli 4.



Rycina 3. Przebieg badania w Części Ia. DOX – dokсорubicyna; ECHO – badanie echokardiograficzne, *i.p.* – dootrzewnowo, n – liczebność osobników, NaCl – chlorek sodu.

Tabela 4. Parametry oceniane w Części Ia.

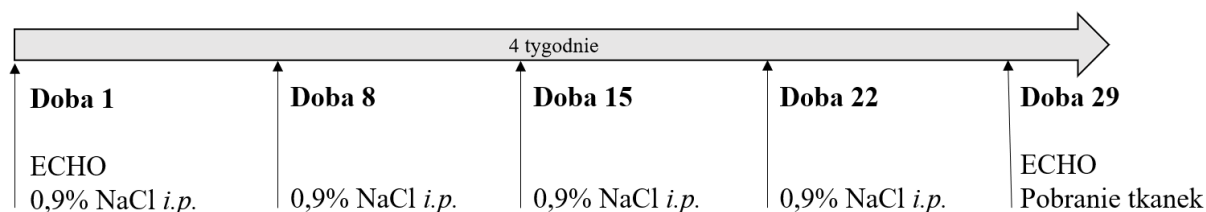
Etap oceny	Metoda oceny	Struktura/ tkanka	Oceniane parametry
Przyżyciowo, 1 oraz 2 doba	Badanie echokardiograficzne	LV	LVIDd, LVIDs, LVFS, LVEF, HR, SV, CO
	Waga laboratoryjna	Serce	HW
Pobrane tkanki	Suwmiarka	Kość piszczelowa	TL
	Badanie histopatologiczne	LV	Indeks uszkodzenia miokardium
	ELISA	LV	Poziom białka NEP
		Surowica	Stężenie sNEP
	RT-PCR	LV	Ekspresja mRNA NEP
	Fluorometryczny test enzymatyczny	Surowica	Aktywność enzymatyczna NEP
LV			

CO – pojemność minutowa serca, ELISA – test immunoenzymatyczny, HR – rytm serca, HW – masa serca, LVEF – frakcja wyrzutowa lewej komory serca, LVFS – frakcja skracania lewej komory serca, LV – lewa komora serca, LVIDs – wymiar końcowoskurczowy lewej komory serca, LVIDd – wymiar końcoworozkurczowy lewej komory serca, mRNA – matrycowy kwas rybonukleinowy, NEP – neprylizyna, RT-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym, sNEP – wolna neprylizyna, SV – objętość wyrzutowa lewej komory serca, TL – długość kości piszczelowej.

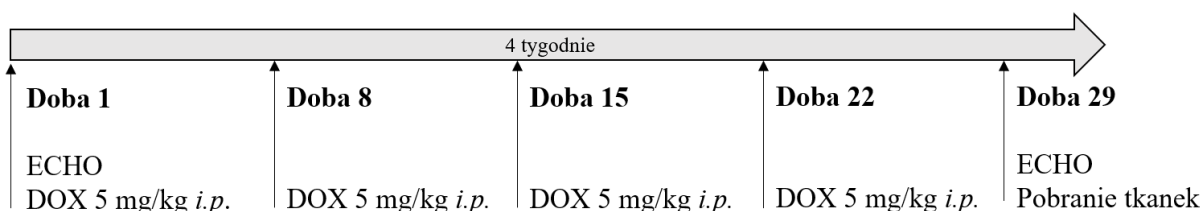
3.2.1.2. Część Ib - model przewlekłej AIC

Przebieg badania w Części Ib przedstawiony został schematycznie na Rycinie 4. W związku z występującą w grupie doświadczalnej wysoką śmiertelnością zwierząt, do grupy tej włączono dodatkowe trzy osobniki, do całkowitej liczby 11 zwierząt. W pierwszej dobie badania zwierzęta poddane zostały badaniu echokardiograficznemu w znieczuleniu ogólnym poprzez dootrzewnowe podanie ketaminy w dawce 75 mg/kg BW wraz z ksylazyną w dawce 7 mg/kg BW. Następnie osobniki z grupy kontrolnej otrzymały iniekcję 0,9% NaCl *i.p.*, natomiast osobniki z grupy doświadczalnej – iniekcję DOX *i.p.* w dawce 5 mg/kg BW. Iniekcje powtarzane były w odstępach tygodniowych, do całkowitej liczby czterech iniekcji. Po upływie siedmiu dni od ostatniej iniekcji zwierzęta poddane zostały ponownemu badaniu echokardiograficznemu w znieczuleniu ogólnym, a następnie uśmiercone celem pobrania tkanek do oceny histopatologicznej oraz analizy biochemicznej i metodami biologii molekularnej. Podsumowanie parametrów ocenianych w Części Ib przedstawiono w Tabeli 5.

Grupa kontrolna, $n=8$



Grupa doświadczalna, $n=11$



Rycina 4. Przebieg badania w Części Ib. *DOX* – dokсорubicyna; *ECHO* – badanie echokardiograficzne, *i.p.* – dootrzewnowo, *n* – liczebność osobników, *NaCl* – chlorek sodu.

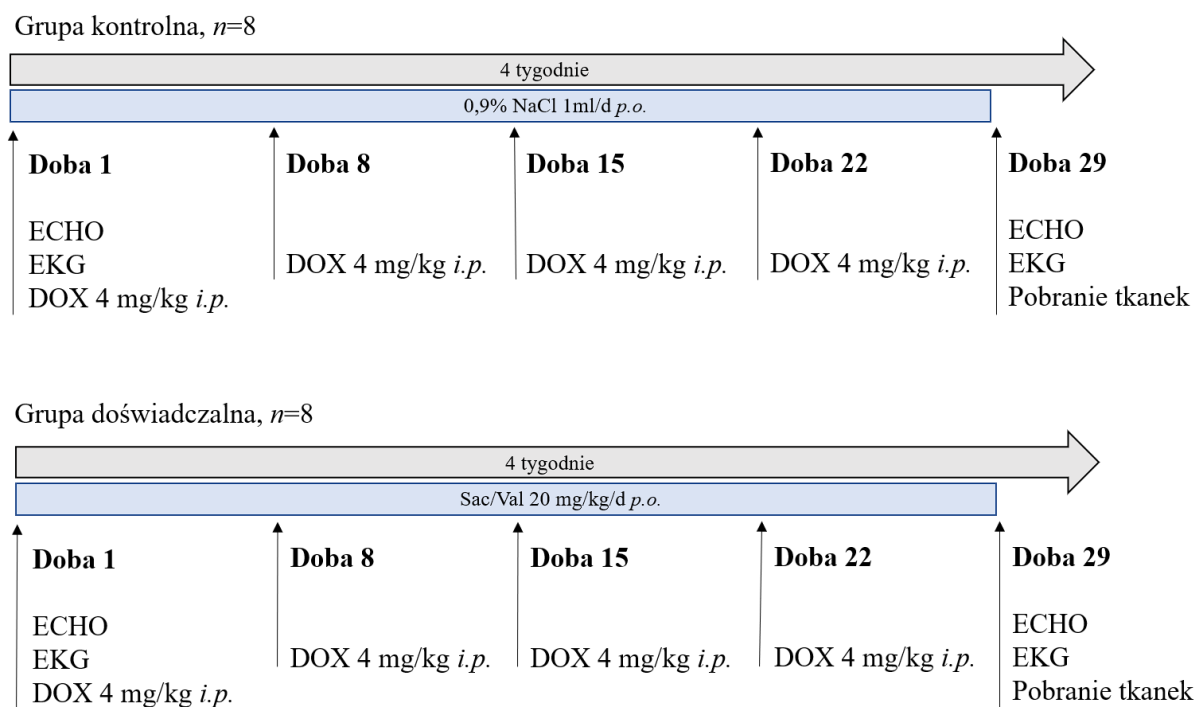
Tabela 5. Parametry oceniane w Części Ib.

Etap oceny	Metoda oceny	Struktura/ tkanka	Oceniane parametry
Przyżyciowo, 1 oraz 29 doba	Badanie echokardiograficzne	LV	LVIDd, LVIDs, LVFS, LVEF, HF, SV, CO
Pobrane tkanki	Waga laboratoryjna	Serce	HW
	Suwmiarka	Kość piszczelowa	TL
	Badanie histopatologiczne	LV	Indeks uszkodzenia miokardium
	ELISA	LV	Poziom białka NEP
		Surowica	Stężenie sNEP
	RT-PCR	LV	Ekspresja mRNA NEP
	Fluorometryczny test enzymatyczny	Surowica LV	Aktywność enzymatyczna NEP

CO – pojemność minutowa serca, *ELISA* – test immunoenzymatyczny, *HR* – rytm serca, *HW* – masa serca, *LV* – lewa komora serca, *LVEF* – frakcja wyrzutowa lewej komory serca, *LVFS* – frakcja skracania lewej komory serca, *LVIDs* – wymiar końcowoskurczowy lewej komory serca, *LVIDd* – wymiar końcoworozkurczowy lewej komory serca, *mRNA* – matrycowy kwas rybonukleinowy, *NEP* – neprylizyna, *RT-PCR* – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym, *sNEP* – wolna neprylizyna, *SV* – objętość wyrzutowa lewej komory serca, *TL* – długość kości piszczelowej.

3.2.1.3. Przebieg badania w Części II

Przebieg badania w Części II przedstawiony został schematycznie na Rycinie 5. W pierwszej dobie zwierzęta poddane zostały badaniu echokardiograficznemu oraz elektrokardiograficznemu w znieczuleniu ogólnym poprzez dootrzewnowe podanie ketaminy w dawce 75 mg/kg BW wraz z ksylazyną w dawce 7 mg/kg BW. Następnie osobniki z wszystkich grup otrzymały iniekcję DOX *i.p.* w dawce 4 mg/kg BW. Iniekcje powtarzane były następnie w odstępach tygodniowych, do całkowitej liczby czterech iniekcji. Ponadto, od pierwszej doby doświadczenia zwierzęta otrzymywały raz dziennie przez zgłębnik dożołądkowy: 0,9% NaCl w przypadku grupy kontrolnej lub sakubitryl/walsartan w dawce 20 mg/kg BW w przypadku grupy doświadczałnej. Po upływie siedmiu dni od ostatniej iniekcji doksorubicyny zwierzęta poddane zostały ponownemu badaniu echokardiograficznemu i elektrokardiograficznemu w znieczuleniu ogólnym, a następnie uśmiercone celem pobrania tkanek do oceny histopatologicznej oraz analizy biochemicznej i metodami biologii molekularnej. Podsumowanie parametrów ocenianych w Części II badania przedstawiono w Tabeli 6.



Rycina 5. Przebieg badania w Części II. DOX – doksorubicyna; ECHO – badanie echokardiograficzne, EKG – badanie elektrokardiograficzne, *i.p.* – dootrzewnowo, *n* – liczebność osobników, *p.o.* – dożołądkowo, Sac/Val – sakubitryl/walsartan.

Tabela 6. Parametry oceniane w Części II.

Etap oceny	Metoda oceny	Struktura/ tkanka	Oceniane parametry
Przyżyciowo, 1 oraz 29 doba	Badanie echokardiograficzne	LV	LVIDd, LVIDs, LVFS, LVEF, HR, SV, CO
	Badanie elektrokardiograficzne	Układ bodźcoprzewodzący	QRS, QTc
Pobrane tkanki	Waga laboratoryjna	Serce	HW
	Suwmiarka	Kość piszczelowa	TL
	Badanie histopatologiczne	LV	Indeks uszkodzenia miokardium
	ELISA	Surowica	Stężenie cTnI i NT-proBNP

CO – pojemność minutowa serca, cTnI – troponina sercowa I, ELISA – test immunoenzymatyczny, HR – rytm serca, HW – masa serca, LV – lewa komora serca, LVEF – frakcja wyrzutowa lewej komory serca, LVFS – frakcja skracania lewej komory serca, LVIDs – wymiar końcowoskurczowy lewej komory serca, LVIDd – wymiar końcoworozkurczowy lewej komory serca, NT-proBNP – N-końcowy propeptyd natriuretyczny typu B, SV – objętość wyrzutowa lewej komory serca, TL – długość kości piszczelowej.

3.2.2. Dootrzewnowe iniekcje DOX

Zwierzęta z grup doświadczalnych z Części I badania oraz grup doświadczalnych i kontrolnych z Części II badania otrzymywały dootrzewnowe iniekcje chlorowodoru doksorubicyny (MedChemExpress, Nr. Kat. HY-15142). Lek w postaci proszku zawieszany był w wodzie destylowanej w stosunku: 10 mg chlorowodoru doksorubicyny na 1 ml wody destylowanej. Następnie odmierzoną objętość sporządzonego roztworu dopełniano 0,9% NaCl do całkowitej objętości 1 ml. Zgodnie z metodologią iniekcji dootrzewnowych u gryzoni opisaną przez Morton i wsp. (2001) oraz Coria-Avila i wsp. (2007), podczas iniekcji szczury przytrzymywane były w pozycji na grzbiecie z głową ułożoną poniżej poziomu jamy brzusznej, a iniekcje podawano w okolice prawego dołu biodrowego celem ograniczenia ryzyka zdarzeń niepożądanych w postaci dojelitowego bądź dopęcherzowego podania leku, bądź uszkodzenia ciągłości jelita grubego [65, 254].

Zastosowane schematy podania DOX, przedstawione w Tabeli 7, ustalono na podstawie opisanych w literaturze protokołów stosowanych przez innych badaczy celem uzyskania modelu ostrej AIC w Części Ia oraz modelu przewlekłej AIC w Części Ib oraz Części II badania. W związku z wysoką śmiertelnością zwierząt zaobserwowaną w Części Ib, w Części II zdecydowano redukcji dawki DOX o 20%.

Tabela 7. Schematy dawkowania DOX użyte w poszczególnych częściach badania.

Część badania	Dawka w jednej iniekcji	Liczba iniekcji	Odstęp pomiędzy iniekcjami	Dawka całkowita
Część Ia	20 mg/kg BW	1	-	20 mg/kg BW
Część Ib	5 mg/kg BW	4	7 dni	20 mg/kg BW
Część II	4 mg/kg BW	4	7 dni	16 mg/kg BW

BW – masy ciała

3.2.3. Dożołądkowe podanie badanych substancji

W Części II badania zwierzęta doświadczalne otrzymywały raz dziennie substancje badane podane dożołądkowo przez zgłębnik. Wymienioną formę podania wybrano celem dokładnej kontroli dawki leku otrzymanej przez każdego z osobników. Pierwszego dnia doświadczenia podanie substancji badanych wykonano przed iniekcją DOX *i.p.* Podawana substancja czynna zależała od przynależności osobnika do grupy - zwierzęta w grupie kontrolnej otrzymywały 1 ml 0,9% NaCl bez substancji czynnej, zwierzęta w grupie doświadczalnej - sakubitryl/walsartan w dawce 20 mg/kg BW/d zawieszony w 1 ml 0,9% NaCl, a w badaniu pilotażowym - sakubitryl w dawce 9,7 mg/kg BW/d zawieszony w 1 ml 0,9% NaCl. Doboru dawki sakubitrylu/walsartanu dokonano na podstawie badania przeprowadzonego przez Gu i wsp. (2010), w którym oceniono właściwości farmakodynamiczne tego leku u szczurów szczepu SPRD [244]. W przytoczonej pracy wykazano, że podanie sakubitrylu/walsartanu w dawce 20 mg/kg BW/d powodowało istotny wzrost aktywności ANP we krwi zwierząt, jednocześnie wiążąc się ze słabszym i mniej długotrwałym działaniem hipotensyjnym, w porównaniu do standardowo stosowanej dawki 60 mg/kg BW/d. Dawka sakubitrylu w badaniu pilotażowym została dobrana tak, aby była równoważna pod kątem zawartości sakubitrylu podawanego zwierzętom w grupie doświadczalnej Części II - sakubitryl i walsartan w preparacie złożonym występują proporcjach molowych 1:1, co przy niewielkiej różnicy masy molowej daje stosunek masy substancji czynnych równy 0,97:1 [255].

3.2.4. Badanie echokardiograficzne

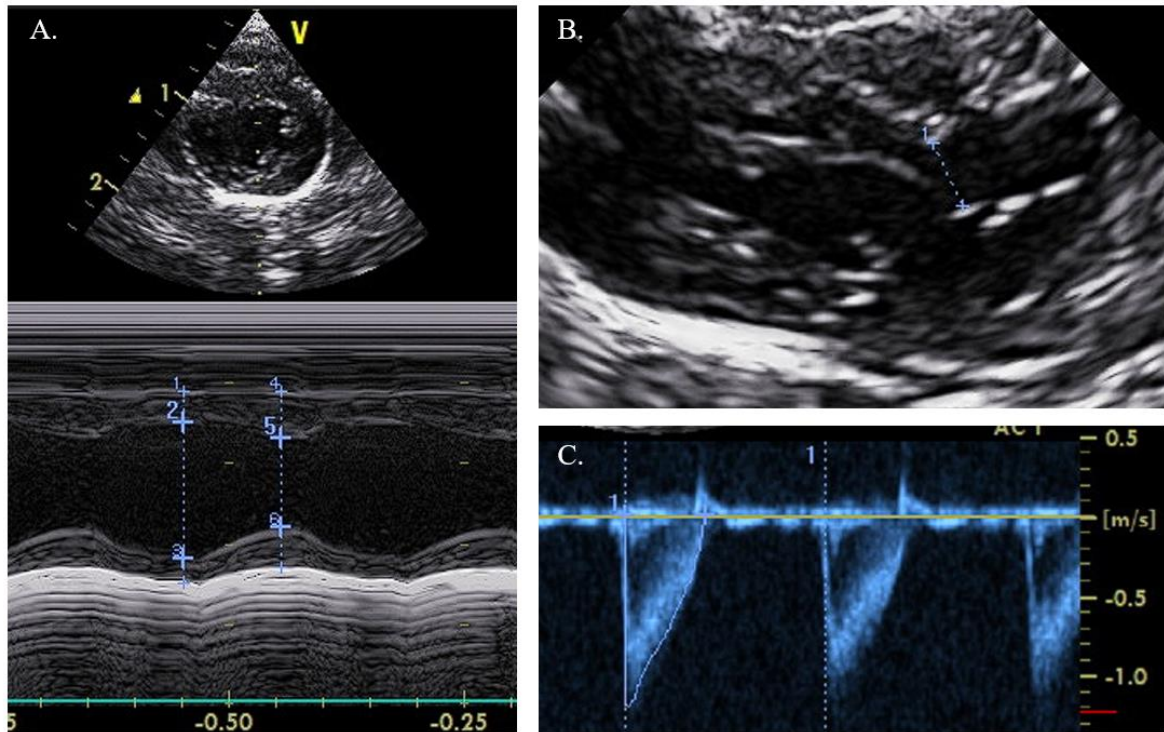
Przezkatkowe badanie echokardiograficzne przeprowadzone zostało u zwierząt doświadczalnych w pierwszej oraz ostatniej dobie każdej z części badania. Bezpośrednio przed badaniem szczury poddane zostały znieczuleniu ogólnemu poprzez dootrzewnowe podanie ketaminy w dawce 75 mg/kg BW wraz z ksylazyną w dawce 7 mg/kg BW. Oczy zwierząt

zabezpieczane były żelem nawilżającym Vidisic (Dr Mann Pharma). Następnie powierzchnię klatki piersiowej golono za pomocą maszynki elektrycznej celem zapewnienia optymalnego przylegania sondy echokardiograficznej do skóry. Zwierzęta do badania układane były na macie grzewczej na grzbiecie, z lewą kończyną przednią wyprostowaną i skierowaną dogłowowo. Badanie wykonywane było przy użyciu aparatu Vivid i (GE Medical Systems) zaopatrzonego w głowicę sektorową o częstotliwości 12 MHz (Biosense Webster Inc., Irvine, CA, US). Protokół badania echokardiograficznego utworzony został w oparciu o technikę przedstawioną w pracy Sztechman i wsp. (2020) [256]. Sonda echokardiograficzna przed badaniem pokrywana była żelem do badań ultrasonograficznych. Obrazy rejestrowane były w projekcji przymostkowej w osi długiej (PLAX) w trybie obrazowania dwuwymiarowego (2D), w projekcji przymostkowej w osi krótkiej (SAX) w trybie obrazowania jednowymiarowego (M-mode) oraz w projekcji koniuszkowej pięciojamowej (A5C) z wykorzystaniem echokardiografii dopplerowskiej z użyciem Dopplera pulsacyjnego. Badanie wykonane było przez badacza posiadającego duże doświadczenie w dziedzinie echokardiografii zwierząt laboratoryjnych.

Na podstawie uzyskanych zapisów, z wykorzystaniem oprogramowania Vivid q N BT11 (GE Medical Systems), dokonano pomiaru następujących parametrów:

- a) PLAX, 2D:
 - średnica drogi odpływu lewej komory (LVOTd),
- b) SAX, M-mode:
 - wymiar końcoworozkurczowy lewej komory (LVIDd),
 - wymiar końcowoskurczowy lewej komory (LVIDs),
- c) A5C z użyciem Dopplera pulsacyjnego:
 - całka prędkości przepływu w czasie (VTI) w drodze odpływu lewej komory,
 - HR.

Metodę pomiaru opisanych parametrów przedstawiono na Rycinie 6. Każdy parametr zmierzony został w trzech następujących po sobie cyklach pracy serca, a za wartość właściwą uznawano wartość uśrednioną.



Rycina 6. Metoda pomiaru opisywanych parametrów echokardiograficznych: A – projekcja w osi krótkiej w trybie M-mode z wyznaczonymi: wymiarem końcoworozkurczowym lewej komory (LVIDd) jako odcinkiem ograniczonym punktami oznaczonymi cyframi „2” i „3”, oraz wymiarem końcowoskurczowym lewej komory (LVIDs) jako odcinkiem ograniczonym punktami oznaczonym cyframi „5” i „6”; B – projekcja w osi długiej z wyznaczoną średnicą drogi odpływu z lewej komory serca (LVOTd); C – pomiar całki prędkości przepływu w czasie (VTI) w drodze odpływu z lewej komory serca przy użyciu Dopplera pulsacyjnego.

Następnie, w oparciu o zalecenia Zacchigna i wsp. (2021) dotyczące echokardiograficznej oceny funkcji skurczowej LV u szczurów [257], wykonano następujące obliczenia celem wyznaczenia:

a) frakcji skracania lewej komory serca (LVFS):

$$LVFS = \frac{(LVIDd - LVIDs)}{LVIDd} \times 100$$

gdzie: FS – frakcja skracania lewej komory serca, LVIDd – wymiar końcoworozkurczowy lewej komory serca, LVIDs – wymiar końcowoskurczowy lewej komory serca.

b) objętości końcoworozkurczowej LV:

$$LVEDV = \frac{7}{2,4 + LVIDd} \times LVIDd^3$$

gdzie: LVEDV – objętość końcoworozkurczowa lewej komory serca, LVIDd – wymiar końcoworozkurczowy lewej komory serca.

c) objętości końcowoskurczowej LV:

$$LVESV = \frac{7}{2,4 + LVIDs} \times LVIDs^3$$

gdzie: LVESV – objętość końcowoskurczowa lewej komory serca, LVIDs – wymiar końcowoskurczowy lewej komory serca.

d) LVEF:

$$LVEF = \frac{(LVEDV - LVESV)}{LVEDV} \times 100$$

gdzie: LVEF – frakcja wyrzutowa lewej komory serca, LVEDV – objętość końcoworozkurczowa lewej komory serca, LVESV – objętość końcowoskurczowa lewej komory serca.

e) SV:

$$SV = VTI \times \pi \left(\frac{LVOTd}{2} \right)^2$$

gdzie: SV – objętość wyrzutowa lewej komory serca, VTI – całka prędkości przepływu w czasie przez drogę odpływu z lewej komory serca, LVOTd – średnica drogi odpływu z lewej komory serca.

f) CO:

$$CO = SV \times HR$$

gdzie: CO – pojemność minutowa serca, SV – objętość wyrzutowa lewej komory serca, HR – rytm serca.

3.2.5. Badanie elektrokardiograficzne

Badanie elektrokardiograficzne wykonano u wszystkich zwierząt z Części II w pierwszej oraz ostatniej dobie badania. Podczas EKG zwierzęta pozostawały w znieczuleniu ogólnym uzyskanym przed wykonaniem badania echokardiograficznego. Szczury układane były na grzbiecie, a ich łapy zwilżane 0,9% NaCl celem zapewnienia optymalnego przewodnictwa między skórą zwierząt a elektrodami. Elektrody odprowadzeń kończynowych podłączane były do łap zwierząt za pomocą metalowych zacisków. Badanie wykonano za pomocą elektrokardiografu BTL-08 (BTL Polska). Zapis EKG rejestrowano przy wykorzystaniu oprogramowania CardioPoint (BTL Polska). Dla każdego osobnika rejestrowano dwa zapisy elektrokardiograficzne trwające po 10 sekund.

Na uzyskanych zapisach dokonano pomiarów przy pomocy oprogramowania CardioPoint (BTL Polska), zgodnie z metodologią oceny zapisu EKG u szczurów opisaną przez Konopelskiego i wsp. (2016) [258]. Analizie poddano zapis odprowadzenia kończynowego dwubiegunowego II. Ocenie poddano następujące parametry: czas trwania odstępu RR, czas trwania zespołu QRS oraz czas trwania odstępu QT. Dla każdego osobnika analizowano oba uzyskane zapisy, a za wartość właściwą uznano wartość uśrednioną.

Na podstawie uzyskanych parametrów wyznaczono skorygowany czas trwania odstępu QT, zgodnie ze wzorem Bazetta zmodyfikowanym dla potrzeb EKG wykonywanego u szczurów – Kmecova i wsp. (2010) [259]:

$$QTc = \frac{QT}{\sqrt{\frac{RR}{150 \text{ ms}}}}$$

gdzie: QTc – skorygowany czas trwania odstępu QT, QT – czas trwania odstępu QT, RR – czas trwania odstępu RR.

3.2.6. Pobranie krwi i narządów

Po wykonaniu zaplanowanych badań echokardiograficznych i EKG, zwierzęta pozostające w znieczuleniu ogólnym układano na grzbiecie i przez II-III międzyżebrze wprowadzano igłę do prawej komory serca celem pobrania krwi żyłnej. Krew żylną w objętości 5 ml pobierano do probówek zawierających dwutlenek krzemu celem przyspieszenia procesu wykrzepiania. Po około 15 minutach krew odwirowywano a surowicę zbierano i przechowywano w zamrażarce głębokiego mrożenia (-80 °C) do czasu przeprowadzenia

oznaczeń biochemicznych. O wykorzystaniu w niniejszej pracy doktorskiej surowicy zdecydowano ze względu na fakt, że stosowany w probówkach do uzyskania osocza antykoagulant, kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), poprzez wiązanie jonów metali stanowi inhibitor enzymów typu metaloproteinaz, do których należy NEP [260].

Po pobraniu krwi żyłnej zwierzęta uśmiercano poprzez iniekcję Morbitalu *i.p.* w dawce 2 ml/kg BW. Następnie poprzez podłużne nacięcie w linii przymostkowej lewej otwierano klatkę piersiową, serca wyłaniano, przepłukiwano w 0,9% NaCl, ważono i umieszczano na szalce Petriego celem podziału na fragmenty. Serca dzielono poprzecznym cięciem w połowie odległości między podstawą a koniuszkiem. Fragment koniuszkowy umieszczano w 10% formalinie buforowanej celem utrwalenia do badania histopatologicznego. Pozostały, podstawny fragment serca dzielono następnie na lewą i prawą komorę, które zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w zamrażarce głębokiego mrożenia (-80 °C) do czasu wykonania badań biochemicznych oraz metodami biologii molekularnej.

3.2.7. Pomiar długości kości piszczelowej

Długość kości piszczelowej (TL) oraz BW są parametrami powszechnie wykorzystywanymi do oceny przerostu mięśnia sercowego oraz normalizacji pomiarów echokardiograficznych w badaniach doświadczalnych w modelach szczurzych [253, 261]. BW podlega jednak wahaniom dobowym związanym ze spożyciem pokarmu, defekacją czy mikcją, a ponadto w zwierzęcych modelach AIC ulega odchyleniom związanym z pojawieniem się kacheksji oraz wodobrzusza. W przeciwieństwie do BW, po osiągnięciu przez zwierzę dojrzałości TL pozostaje parametrem stałym i stabilnym w czasie. Z tego względu w niniejszej pracy doktorskiej zdecydowano o wykorzystaniu TL do normalizacji następujących parametrów: BW, masy serca (HW), SV lewej komory serca oraz CO. W celu pomiaru TL, po zakończeniu pobrania tkanek preparowano odcinek proksymalny i dystalny kości piszczelowej poprzez otwarcie stawu kolanowego od strony więzadła rzepki oraz stawu skokowego od strony ścięgna piętowego. Pomiaru długości kości dokonywano przy pomocy suwmiarki.

3.3. Badania histopatologiczne

Badania histopatologiczne przeprowadzone zostały we współpracy z Katedrą i Zakładem Patomorfologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Fragmenty serca utrwalano w 10% zbuforowanej formalinie i przeprowadzano do bloczków parafinowych w sposób rutynowy. Wycinki płukano w wodzie bieżącej i przeprowadzono przez roztwory alkoholu o stężeniu 70% oraz 96%, alkohol absolutny, alkohol z ksylenem oraz szereg

ksylenów. Wycinki zatapiano w bloczki parafinowe w temperaturze 56 °C, a następnie krojono na mikrotomie na skrawki grubości około 4 µm, które były następnie barwione:

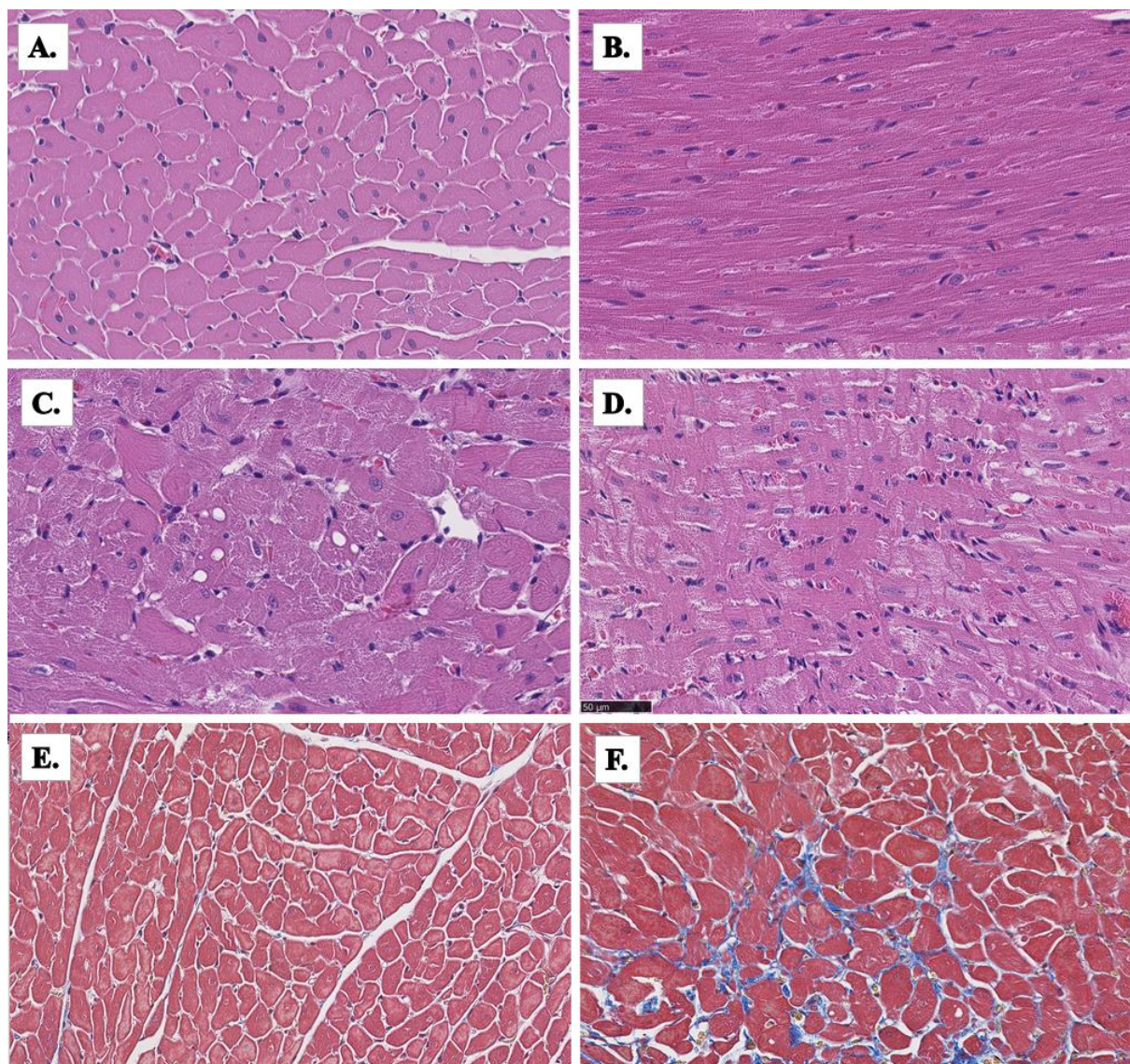
- a) hematoksyliną i eozyną (H&E) – celem oceny morfologii kardiomiocytów oraz obecności tkankowych nacieków komórek jednojądrzastych.
- b) barwieniem trójbarwnym wg. Massona – celem oceny zwłóknienia śródmiąższowego.

W procedurze wykonania barwienia H&E skrawki umieszczano w roztworze hematoksyliny (Marfour) na 5 minut, a następnie odbarwiono poprzez zanurzenie w zakwaszonym alkoholu etylowym. Następnie preparaty spłukiwano pod bieżącą wodą i umieszczano w 1% roztworze eozyny (Marfour) na 1 minutę, a następnie oczyszczono w wodzie destylowanej i zabezpieczono szkiełkiem nakrywkowym.

Do wykonania barwienia trójbarwnego według Massona wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw Masson Trichrome with Aniline Blue (Bio-Optica). Barwienia przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Barwienie rozpoczynano od naniesienia na preparaty hematoksyliny żelazowej Weigherta celem wybarwienia jąder komórkowych. Po dziesięciominutowej inkubacji nadmiar barwnika odsączało przy pomocy bibuły, a na preparaty nanoszono roztwór alkoholowy kwasu pikrynowego. Następnie, po upływie czterech minut, preparaty spłukiwano w wodzie destylowanej i pokrywano kwaśną fuksyną Ponceau Mallory'ego celem wybarwienia cytoplazmy. Po czterech minutach preparaty spłukiwano w wodzie destylowanej i nanoszono na nie roztwór kwasu fosfomolibdenowego. Po dziesięciominutowej inkubacji preparaty odsączało przy pomocy bibuły i pokrywano błękitem anilinowym celem wybarwienia tkanki łącznej. Po 5 minutach preparaty odwadniano w alkoholu absolutnym, a następnie oczyszczono w ksylenie i zabezpieczono szkiełkiem nakrywkowym.

Wszystkie preparaty zostały zeskanowane z wykorzystaniem skanera NanoZoomer 2.0-HT firmy Hamamatsu, a następnie oceniane z użyciem oprogramowania NDP.view2. Preparaty ocenione zostały przez doświadczonego patomorfologa. Skrawki zostały najpierw ocenione pod małym powiększeniem (powiększenie skanowania 1× do 2×), a następnie szczegółowo analizowane pod średnim powiększeniem (powiększenie skanowania x20). W obrębie każdego preparatu oceniano strefę podnasierdziową, środkową oraz podwsierdziową. W każdej ze stref oddzielnie oceniono stopień ciężkości uszkodzenia mięśnia sercowego na podstawie obecności trzech parametrów: wakuolizacji cytoplazmy kardiomiocytów, nacieków komórek jednojądrzastych oraz zwłóknienia śródmiąższowego (Rycina 7), stosując kryteria podsumowane w Tabeli 8, zaadaptowane z prac Boutagy i wsp. (2020) oraz Zeiss i wsp. (2019) [241, 262]. Maksymalna liczba punktów możliwa do przyznania dla jednego z kryterium

wynosiła dziewięć punktów (po trzy punkty dla każdej ze stref). Liczby punktów przyznane dla każdego z parametrów u danego osobnika były następnie sumowane celem uzyskania sumarycznego indeksu stopnia uszkodzenia miokardium, którego maksymalna wartość wynosić mogła 27 punktów.



Rycina 7. Zdjęcia preparatów histopatologicznych mięśnia sercowego. A – H&E, prawidłowy obraz, przekrój poprzeczny, B – H&E, prawidłowy obraz, przekrój podłużny, C – H&E, wakuolizacja cytoplazmy kardiomiocytów, D – H&E, naciek komórek jednojądrzastych, E – barwienie wg. Massona, prawidłowy obraz, F – barwienie wg. Massona, obecność zwłóknienia śródmiąższowego. Powiększenie skanowania x20.

Tabela 8. Histopatologiczna ocena stopnia uszkodzenia miokardium.

Oceniany parametr	Stopień nasilenia	Przyznawane punkty
Nasilenie wakuolizacji kardiomiocytów	Prawidłowy obraz histologiczny	0
	1-2 zwakuolizowane włókna w p.w.	1
	3-4 zwakuolizowane włókna w p.w.	2
	>4 zwakuolizowane włókna w p.w.	3
Nasilenie nacieku komórek jednojądrzastych	Prawidłowy obraz histologiczny	0
	1 zgrupowanie w p.w.	1
	2 zgrupowania w p.w.	2
	>2 zgrupowania w p.w.	3
Nasilenie zwłóknienia śródmiąższowego	Prawidłowy obraz histologiczny	0
	1 ognisko w p.w.	1
	2 ogniska w p.w.	2
	> 2 ogniska w p.w.	3

w p.w. – w polu widzenia przy średnim powiększeniu (powiększenie skanowania x20)

3.4. Badania biochemiczne

3.4.1. Badania biochemiczne z surowicy

Oznaczeń parametrów biochemicznych z surowicy zwierząt doświadczalnych dokonywano za pomocą komercyjnie dostępnych zestawów testów immunoenzymatycznych. W surowicy uzyskanej od zwierząt z Części I badania dokonano pomiaru stężenia sNEP (Rat Nephilysin ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory), natomiast w surowicy uzyskanej od zwierząt z Części II badania dokonano pomiaru stężenia cTnI (Rat Troponin I Type 3, Cardiac ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory) oraz NT-proBNP (Rat N-terminal pro-brain natriuretic peptide ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory). Pomiaru stężenia cTnI w niniejszej pracy dokonano ze względu na wyższe stężenia tego markera obserwowane w surowicy szczurów przy uszkodzeniu mięśnia sercowego o różnej etiologii w porównaniu do cTnT [263].

Pomiarów dokonywano zgodnie z zaleceniami producenta. Surowica zwierząt w objętości 40 µL oraz roztwory wzorcowe o znanym stężeniu nanoszone były w duplikatach

na płytkę 96-dółkową pokrytą przeciwciałem pierwszorzędowym specyficznym wiążącym oznaczany peptyd. Następnie do każdego z dołków dodawano biotynylowane przeciwciała wiążące oznaczany peptyd oraz streptawidynę skoniugowaną z peroksydazą chrzanową. Po godzinnej inkubacji w temperaturze 37 °C płytkę przepłukiwano pięciokrotnie za pomocą aparatu Bio-Plex Pro Wash Station (BioRad). Następnie do każdego z dołków dodawano substrat peroksydazy chrzanowej i poddawano dziesięciominutowej inkubacji w ciemności w temperaturze 37 °C. W ostatnim etapie do dołków dodawano roztwór o kwasowym odczynie zatrzymujący reakcję i dla każdego dołka odczytywano poziom absorbancji za pomocą aparatu Imark Microplate Absorbance Reader (BioRad). Przy wykorzystaniu krzywej standardowej dokonywano przeliczenia wartości absorbancji dla każdego z dołków na odpowiadające stężenie badanego peptydu.

3.4.2. Badania biochemiczne lewej komory serca

Pomiaru poziomu białka NEP w obrębie LV zwierząt doświadczalnych z Części I badania dokonywano za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu testów immunoenzymatycznych (Rat Neprilysin ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory). Pomiarów dokonywano zgodnie z zaleceniami producenta. Fragmenty LV homogenizowano za pomocą automatycznego homogenizatora Tissue Lyser LT (Qiagen) w buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS) z dodatkiem inhibitorów proteaz (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich) w stosunku 100 mg tkanki na 900 µL PBS. Tak przygotowany homogenat był następnie wykorzystywany do wykonania oznaczeń, zgodnie z metodyką opisaną powyżej.

3.4.3. Ocena aktywności NEP i sNEP

Celem pomiaru tkankowej aktywności NEP wykorzystano komercyjnie dostępny fluorometryczny test enzymatyczny (Neprilysin Activity Assay Kit, MAK350, Sigma-Aldrich). Pomiarów aktywności NEP w obrębie LV dokonywano zgodnie z zaleceniami producenta dołączonymi do zestawu. Fragmenty tkanki o masie 100 mg zhomogenizowano za pomocą homogenizatora Tissue Lyser LT (Qiagen) w 800 µL dołączonego do zestawu buforu NEP Assay Buffer wzbogaconym o inhibitory proteaz (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich) oraz fluorek fenylometanosulfonylu (Sigma-Aldrich). Tak przygotowane homogenaty w objętości 10 µl oraz roztwory wzorcowe o znanym poziomie fluorescencji nanoszone były w duplikatach na czarną płytkę 96-dółkową o nieprzezroczystym dnie. Objętość dołków uzupełniana była buforem w temperaturze 37 °C do objętości 90 µL. Następnie do każdego z dołków zawierającego badaną próbkę homogenatu dodawano substrat neprylizyny i płytkę umieszczano niezwłocznie w czytniku FLUOstar Omega (BMG Labtech), w którym

utrzymywano stałą temperaturę 37°C. Pomiaru fluorescencji w trybie kinetycznym dokonywano co trzy minuty w czasie dwóch godzin. Poziom aktywności NEP odczytywano jako funkcję przyrostu intensywności fluorescencji w czasie, w oparciu o krzywą standardową.

Zgodnie z informacją uzyskaną od producenta, wymieniony fluorometryczny test enzymatyczny (Neprilysin Activity Assay Kit, MAK350, Sigma-Aldrich) nie został przez niego oceniony pod kątem przydatności do oznaczenia aktywności sNEP w surowicy, podobnie jak inne dostępne komercyjnie zestawy. W porozumieniu z producentem podjęto próbę pomiaru aktywności sNEP w surowicy zwierząt doświadczalnych, zgodnie z opisanym powyżej schematem. Jednak w związku z wymienionymi ograniczeniami, pomimo podjęcia licznych prób, w niniejszej pracy nie udało się uzyskać pomiaru aktywności enzymatycznej sNEP w surowicy zwierząt.

3.5. Badania metodami biologii molekularnej

3.5.1. Ocena ekspresji mRNA NEP

We fragmentach tkankowych LV uzyskanych od zwierząt z Części I badania dokonano oceny ekspresji mRNA NEP za pomocą techniki reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR). Fragmenty serca o masie 100 mg zhomogenizowano w QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) za pomocą homogenizatora Tissue Lyser LT (Qiagen). Następnie dokonano izolacji mRNA z zastosowaniem komercyjnie dostępnego zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen) zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Ilość uzyskanego mRNA mierzono za pomocą spektrofotometru (BioRad). Następnie przeprowadzono reakcje multipleksowe umożliwiające określenie ekspresji genu badanego (NEP) w odniesieniu do genu referencyjnego (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, GAPDH) w jednej próbie – tak zwana metoda względna (Relative Quantification). Mieszanina reakcyjna zawierała: TaqMan RNA-to-CT 1-Steep Kit, startery dla genu NEP wyznakowane barwnikiem reporterowym FAM (TaqMan Gene Expression Assay), startery dla GAPDH znakowane barwnikiem reporterowym VIC (Applied Biosystem), wyizolowane od zwierząt mRNA oraz wodę wolną od nukleaz traktowaną pirowęglanem dietylu. Objętość końcową mieszaniny reakcyjnej wynoszącą 50 µL poddano namnażaniu w aparacie Viia 7 (Life Technologies) w następujących warunkach: 15 sekund w -90 °C oraz 1 minuta w 60 °C przez 40 cykli.

3.6. Analiza statystyczna

Analizie statystycznej poddano dane pochodzące od zwierząt, u których nie wystąpiła przedwczesna śmiertelność i u których wykonano wszystkie zaplanowane dla danej grupy

badania. Założenia normalności rozkładu zmiennych ciągłych oceniano przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Charakterystyki statystyczne zmiennych o rozkładzie normalnym przedstawiano w postaci średnich arytmetycznych wraz z ich odchyleniem standardowym (SD). W przypadku braku równości rozkładu zmiennych, charakterystyki statystyczne przedstawiano w postaci mediany wraz z ich rozstępem międzykwartylowym (IQR). Zmienne poddane pomiarowi w jednym punkcie czasowym o rozkładzie normalnym poddano ocenie za pomocą testu t Studenta dla prób niezależnych, natomiast te o rozkładzie odbiegającym od normalnego – za pomocą nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. Zmienne poddane pomiarowi w dwóch punktach czasowych o rozkładzie normalnym analizowano przy pomocy testu dwuczynnikowej analizy wariancji (two-way ANOVA). Jeżeli test ten wykazywał istotność statystyczną, dokonywano następnie analizy post-hoc za pomocą testu HSD Tukeya. Jednorodność wariancji sprawdzano za pomocą testu Levene'a. Zmienne poddane pomiarowi w dwóch punktach czasowych o rozkładzie innym od normalnego porównywano w danym punkcie czasowym pomiędzy grupami za pomocą nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. Korelację danych analizowano za pomocą oceny współczynnika korelacji liniowej Pearsona dla danych o rozkładzie normalnym, natomiast dla tych, o rozkładzie innym od normalnego, za pomocą korelacji rang Spearmana. Za próg istotności statystycznej przyjęto wartość $\alpha=0,05$.

4. WYNIKI

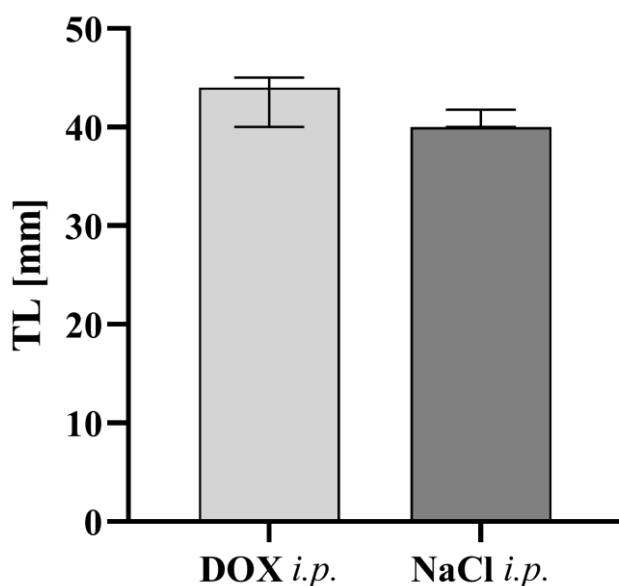
4.1. Część Ia – model ostrej AIC

4.1.1. Ogólna charakterystyka zwierząt

Jak przedstawiono w Tabeli 9, śmiertelność zwierząt w grupie doświadczalnej wyniosła 12,5%, natomiast w grupie kontrolnej - 0%. W grupie doświadczalnej jedno zwierzę padło przed wykonaniem procedur z doby 2 i nie zostało z tego powodu uwzględnione w dalszej analizie, do której włączonych zostało siedem osobników z grupy doświadczalnej oraz osiem osobników z grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano różnic w zakresie mediany TL między grupą doświadczalną a kontrolną (mediana TL odpowiednio: 44 mm vs. 40 mm); (Rycina 8).

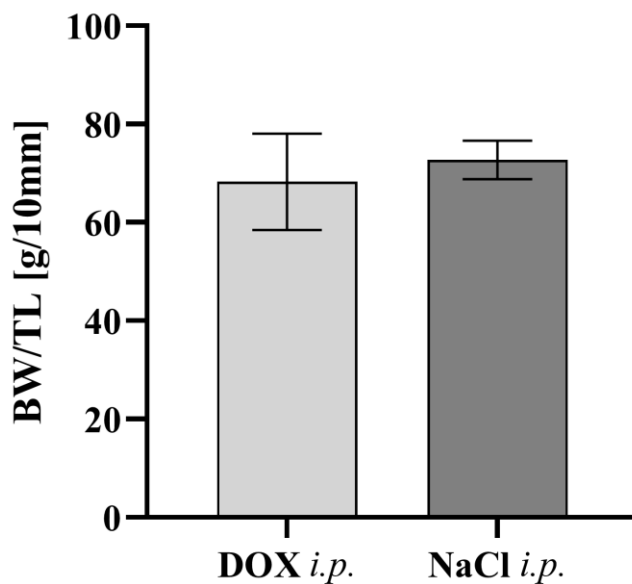
Tabela 9. Śmiertelność zwierząt w Części Ia.

Grupa	Osobniki włączone do badania	Osobniki o przedwczesnej śmiertelności	Osobniki włączone do analizy	Śmiertelność w grupie
Doświadczalna	<i>n</i> =8	<i>n</i> =1	<i>n</i> =7	12,5%
Kontrolna	<i>n</i> =8	<i>n</i> =0	<i>n</i> =8	0%

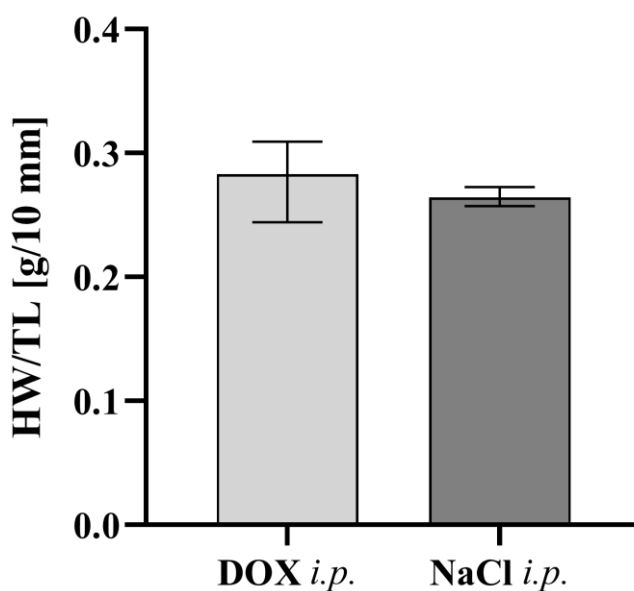


Rycina 8. Długość kości piszczelowej (TL) w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako medianę ± IQR

Podobnie, między grupą doświadczalną a kontrolną nie występowały różnice w zakresie średniej wartości stosunku BW do TL, który wyniósł odpowiednio: 68,27 g/10 mm vs. 72,73 g/10 mm (Rycina 9), oraz mediany stosunku HW do TL, który wyniósł odpowiednio: 0,28 g/10 mm vs. 0,26 g/10 mm (Rycina 10).



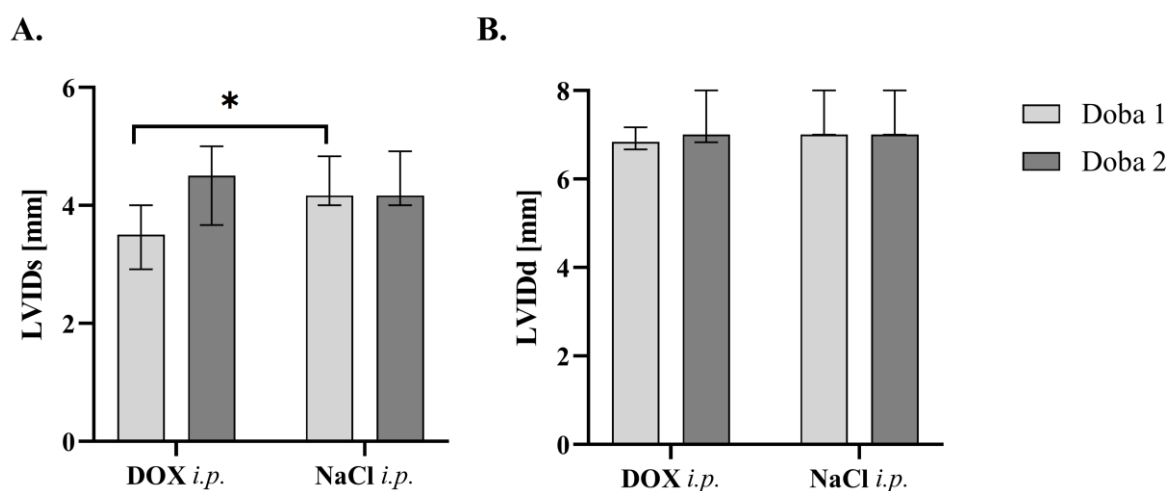
Rycina 9. Stosunek całkowitej masy ciała (BW) do długości kości piszczelowej (TL) w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD



Rycina 10. Stosunek masy serca (HW) do długości kości piszczelowej (TL) w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako medianę \pm IQR.

4.1.2. Parametry echokardiograficzne

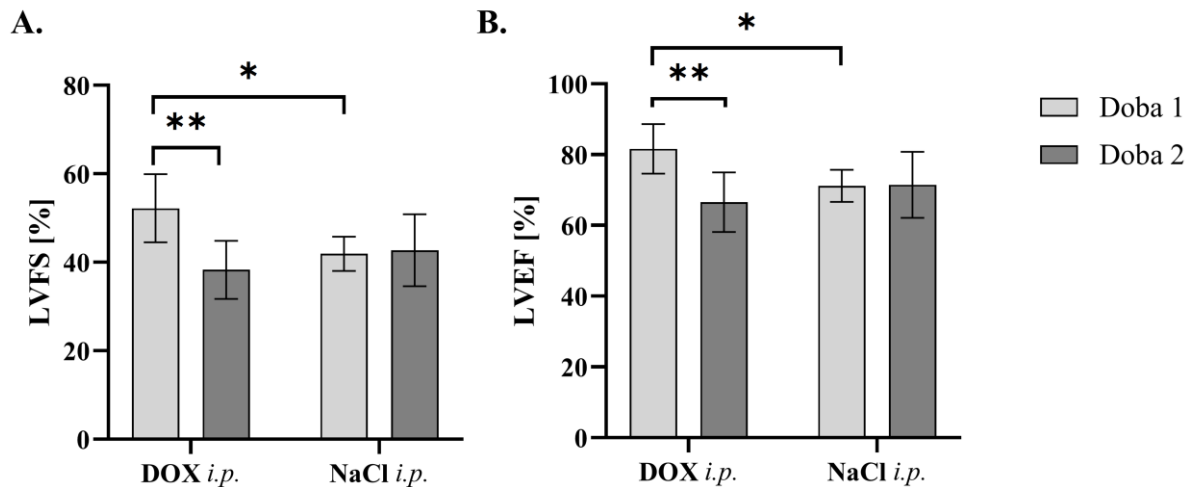
W 1 dobie badania w grupie doświadczalnej LVIDs był istotnie niższy niż w grupie kontrolnej (mediana LVIDs odpowiednio: 3,5 mm vs. 4,17 mm, $p < 0,05$); (Rycina 11.A). W 2 dobie badania nie zaobserwowano różnic w zakresie tego parametru między grupami (mediana LVIDs w 2 dobie 4,5 mm w grupie doświadczalnej vs. 4,17 mm w grupie kontrolnej). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w zakresie LVIDd między grupą doświadczalną a kontrolną (mediana LVIDd w 1 dobie odpowiednio: 6,83 mm vs. 7 mm, w 2 dobie odpowiednio: 7 mm vs. 7 mm); (Rycina 11.B).



Rycina 11. A. Wymiar końcowoskurczowy lewej komory serca (LVIDs) oraz B. wymiar końcoworozkurczowy lewej komory serca (LVIDd) w 1 i 2 dobie badania w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*): Dane przedstawiono jako medianę \pm IQR. * $p < 0,05$

Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotną różnicę w zakresie zmian średnich wartości LVFS ($F(1,13) = 10,041$, $p < 0,01$) oraz LVEF ($F(1,13) = 10,612$, $p < 0,01$) w trakcie trwania badania (Rycina 12). W 1 dobie zaobserwowano różnicę w zakresie wartości tych parametrów między grupą doświadczalną a kontrolną (średnia LVFS odpowiednio: 52,19% vs. 41,89%, $p < 0,05$; średnia LVEF odpowiednio: 81,6% vs. 71,15%, $p < 0,05$). Po upływie 24 godzin w grupie doświadczalnej nastąpił istotny spadek średnich wartości obu parametrów – LVFS uległa obniżeniu o 21,95%, natomiast LVEF o 14,29% (średnia LVFS w 1 oraz 2 dobie odpowiednio: 52,19% vs. 38,28%, $p < 0,01$; średnia LVEF w 1 oraz 2 dobie odpowiednio: 81,6% vs. 66,54%, $p < 0,01$). W grupie kontrolnej parametry te nie uległy

zmianom (średnia LVFS w 1 oraz 2 dobie odpowiednio: 41,89% vs. 42,68%, średnia LVEF w 1 oraz 2 dobie odpowiednio: 71,15% vs. 71,48%).

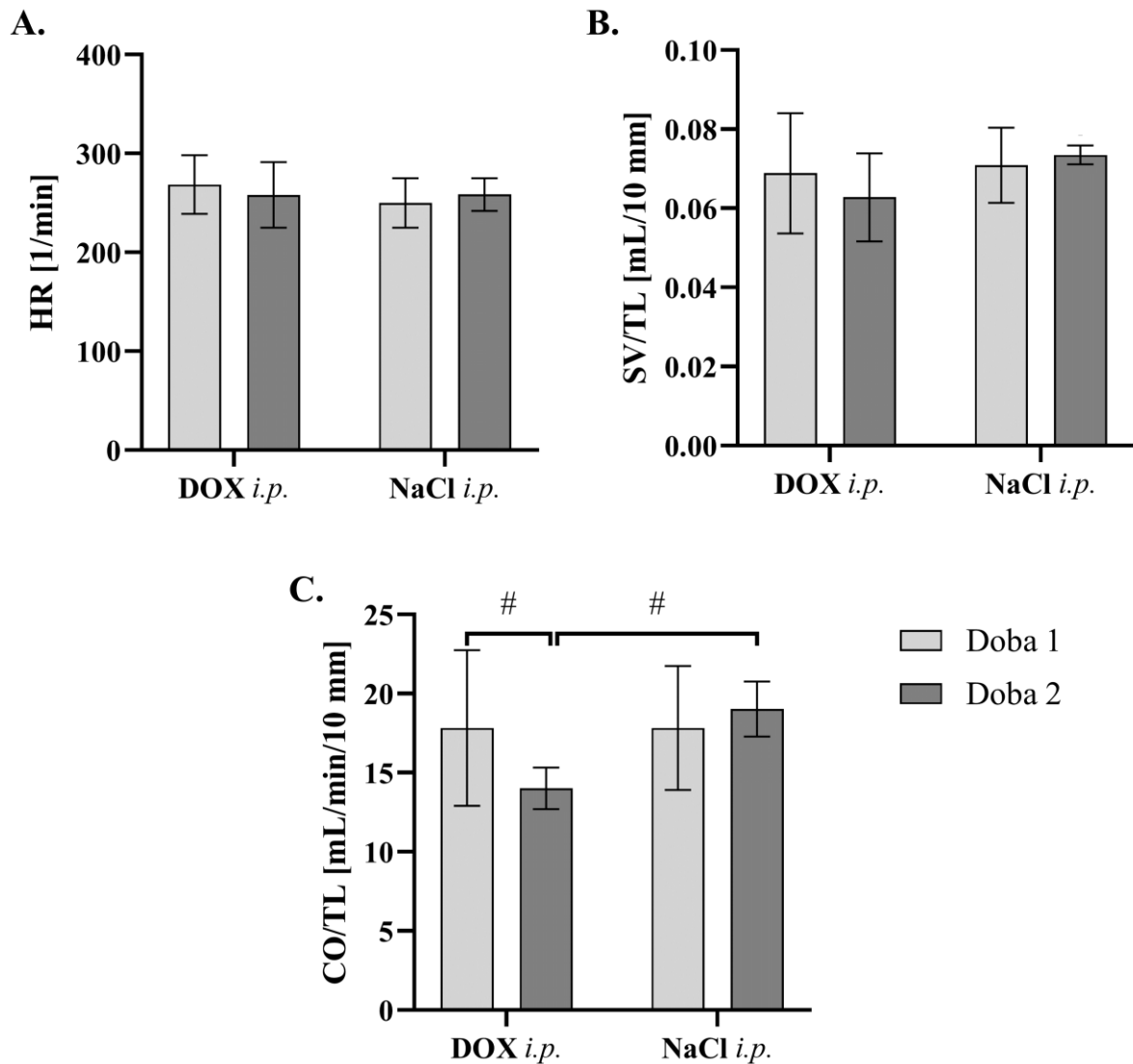


Rycina 12. A. Frakcja skracania lewej komory serca (LVFS) oraz B. frakcja wyrzutowa lewej komory serca (LVEF) w 1 i 2 dobie badania w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Nie zaobserwowano istotnych różnic w zakresie zmian średnich wartości HR (Rycina 13.A) oraz stosunku SV do TL (Rycina 13.B) pomiędzy grupami. Średnia HR w grupie doświadczalnej i kontrolnej w 1 dobie badania wyniosła odpowiednio: 268,5/min vs. 249,9/min, natomiast w dobie 2 odpowiednio: 258/min vs. 258,5/min. Średnie wartości SV/TL w grupie doświadczalnej i kontrolnej w 1 dobie wynosiły odpowiednio: 0,066 ml/10 mm vs. 0,071 ml/10 mm, podczas gdy w 2 dobie: 0,06 ml/10 mm vs. 0,074 ml/10 mm.

Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała natomiast istotną różnicę w zakresie zmian średnich wartości stosunku CO do TL ($F(1,12) = 5,581$, $p < 0,05$) w trakcie trwania badania (Rycina 13.C). W 1 dobie nie zaobserwowano istotnych różnic w zakresie średnich wartości tego parametru między grupą doświadczalną a kontrolną (średnia CO/TL odpowiednio: 17,82 ml/min/10 mm vs. 17,82 ml/min/10 mm). W ciągu 24 godzin od podania DOX w grupie doświadczalnej nastąpił istotny spadek CO/TL o 21,38% (średnia CO/TL w 1 oraz 2 dobie odpowiednio: 17,82 ml/min/10 mm vs. 14,01 ml/min/10 mm, $p < 0,05$). W grupie kontrolnej nie zaobserwowano istotnych różnic między 1 oraz 2 dobą badania (średnia CO/TL odpowiednio: 17,82 ml/min/10 mm vs. 19,02 ml/10 mm). W 2 dobie średnie wartości stosunku CO/TL były

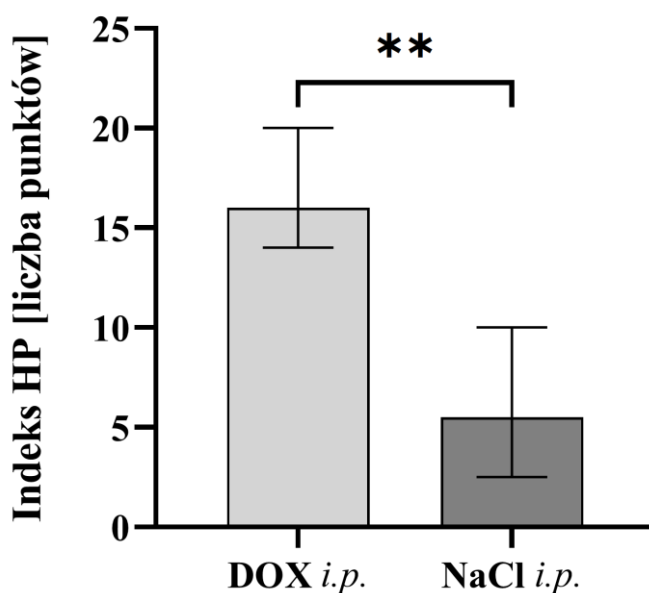
istotnie wyższe w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy doświadczalnej (średnia CO/TL odpowiednio: 19,02 ml/10 mm vs. 14,01 ml/min/10 mm, $p < 0,05$).



Rycina 13. A. Rytm serca (HR), B. stosunek objętości wyrzutowej lewej komory serca (SV) do długości kości piszczelowej (TL) oraz C. stosunek pojemności minutowej serca (CO) do długości kości piszczelowej (TL) w 1 i 2 dobie badania w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD. # $p < 0,05$ w analizie post-hoc za pomocą testu najmniejszych istotnych różnic.

4.1.3. Analiza histopatologiczna

Pomiędzy grupą doświadczalną a kontrolną zaobserwowano istotne statystycznie różnice w zakresie mediany histopatologicznego indeksu uszkodzenia miokardium (mediana liczby przyznanych punktów wyniosła odpowiednio: 16 vs. 5,5, $p < 0,01$); (Rycina 14). Wśród osobników z grupy doświadczalnej zaobserwowano szczególne nasilenie zwyrodnienia wodniczkowego kardiomiocytów (mediana przyznanych punktów - 8), podczas gdy nacieki komórek jednojądrzastych oraz zwłóknienie śródmiąższowe występowały w mniejszym nasileniu (mediana przyznanych punktów odpowiednio: 5 oraz 4); (Tabela 10).



Rycina 14. Histopatologiczny indeks uszkodzenia miokardium (indeks HP) w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako medianę \pm IQR. ** $p < 0,01$

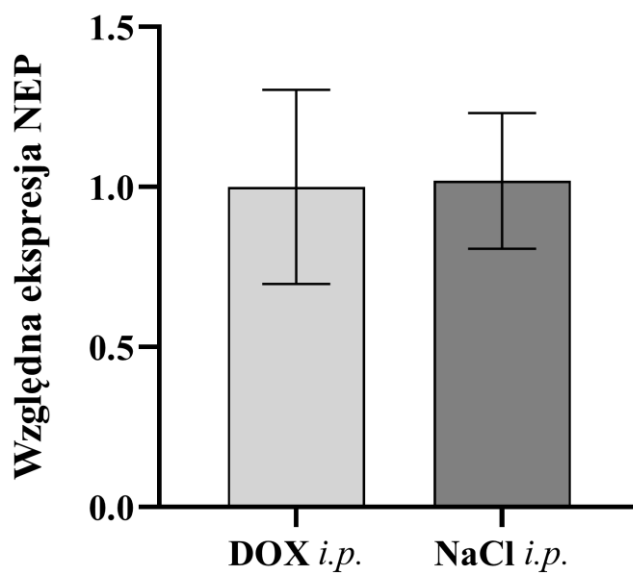
Tabela 10. Ocena histopatologiczna LV w Części Ia.

Grupa	Wakuolizacja kardiomiocytów	Naciek komórek jednojądrzastych	Zwłóknienie śródmiąższowe	Suma
Doświadczalna	8 (6,5-8,5)	5 (3,5-8)	4 (3-4,5)	16 (15-18,5)
Kontrolna	2,5 (1,75-3,25)	1 (1-1,75)	1,5 (0,75-2,5)	5,5 (3,5-8)

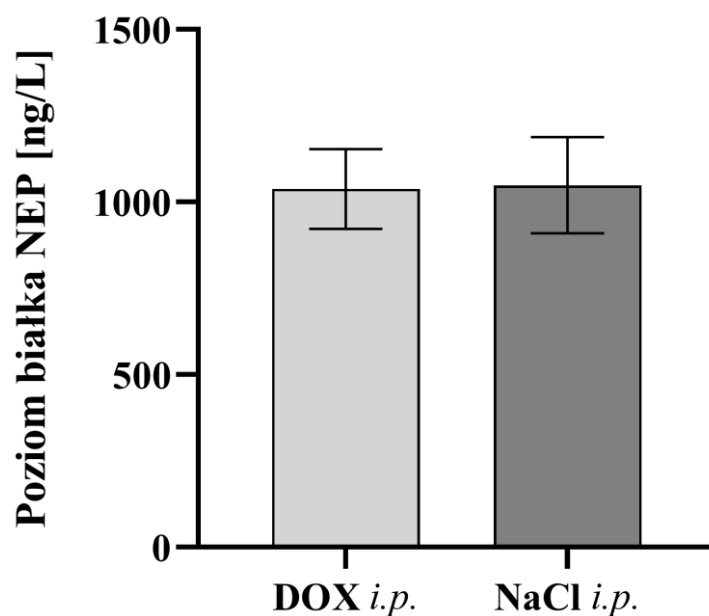
Dane przedstawiono jako medianę \pm IQR. LV – lewa komora serca.

4.1.4. Ekspresja mRNA, poziom białka i aktywność NEP w LV

Pomiędzy grupami nie zaobserwowano istotnych różnic w zakresie zarówno ekspresji mRNA NEP (względna ekspresja w grupie doświadczalnej 1 vs. 1,02 w grupie kontrolnej); (Rycina 15), jak i poziomu białka NEP w obrębie LV (średni poziom w grupie doświadczalnej 1037,6 ng/L vs. 1048,53 ng/L w grupie kontrolnej) (Rycina 16).

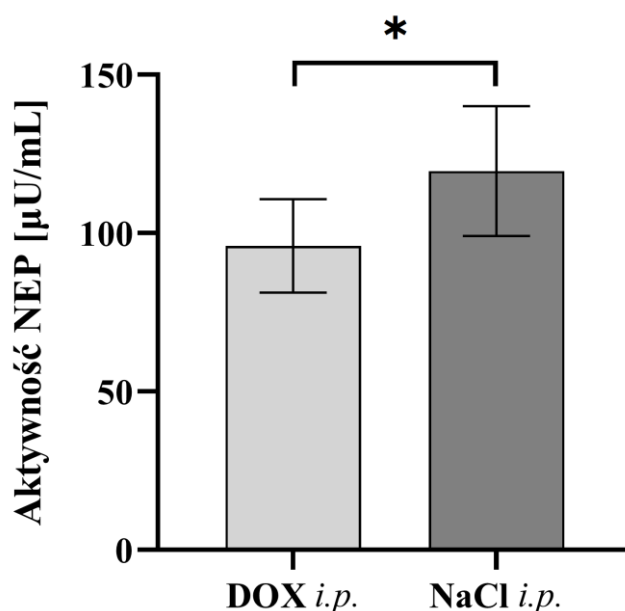


Rycina 15. Ekspresja mRNA neprylizyny (NEP) w lewej komorze serca w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD.



Rycina 16. Poziom białka neprylizyny (NEP) w lewej komorze serca w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD.

Natomiast, jak przedstawiono na Rycinie 17, średnia tkankowa aktywność enzymatyczna NEP w obrębie LV była istotnie niższa w grupie doświadczalnej (średnia aktywność w grupie doświadczalnej 95,92 $\mu\text{U}/\text{mL}$ vs. 119,51 $\mu\text{U}/\text{mL}$ w grupie kontrolnej, $p < 0,05$).

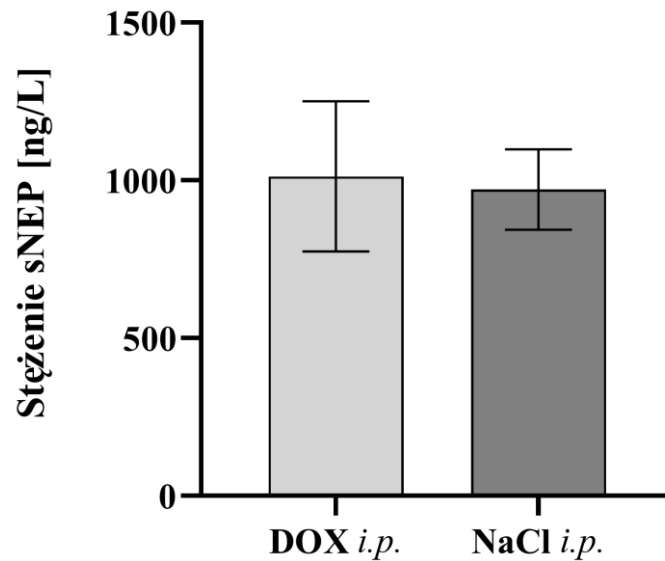


Rycina 17. Aktywność enzymatyczna neprylizyny (NEP) w lewej komorze serca w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD. * $p < 0,05$

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zależności między ekspresją mRNA NEP, tkankowym poziomem białka NEP i aktywnością enzymatyczną NEP a wartościami parametrów echokardiograficznych (LVEF, LVFS, SV/TL, CO/TL) w 2 dobie badania (dane nieprzedstawione). Nie występowały także istotne zależności między ekspresją mRNA NEP, tkankowym poziomem białka NEP i aktywnością enzymatyczną NEP a histopatologicznym indeksem uszkodzenia miokardium (dane nieprzedstawione).

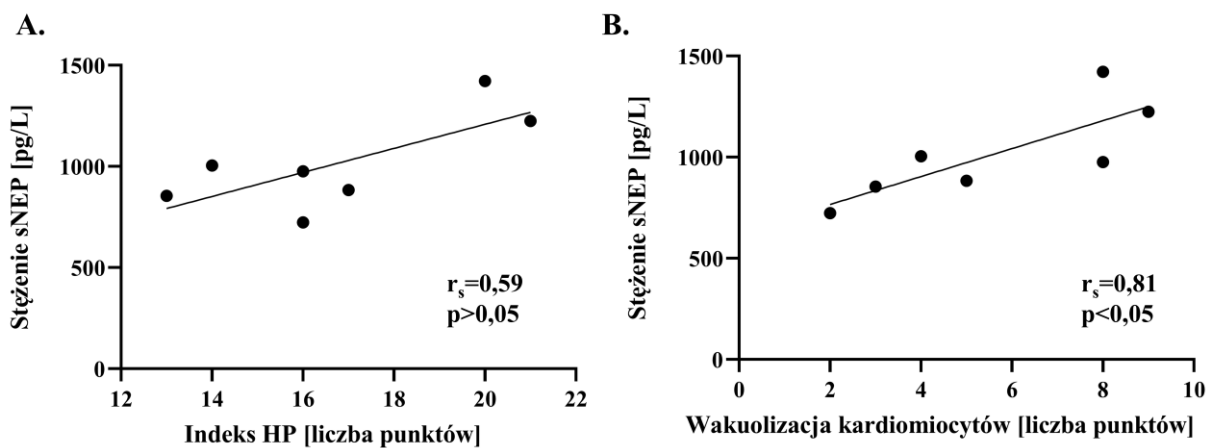
4.1.5. Stężenie sNEP w surowicy

Nie zaobserwowano istotnych różnic w zakresie stężenia sNEP w surowicy zwierząt pomiędzy grupami (średnie stężenie w grupie doświadczalnej 1012,44 ng/L vs. 970,76 ng/L w grupie kontrolnej); (Rycina 18).



Rycina 18. Stężenie wolnej neprylizyny (sNEP) w surowicy w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD.

Nie zaobserwowano istotnych zależności między stężeniem sNEP w surowicy zwierząt doświadczalnych a wartościami parametrów echokardiograficznych (LVEF, LVFS, SV/TL, CO/TL) w 2 dobie badania (dane nieprzedstawione). Nie występowały także istotne zależności między stężeniem sNEP a histopatologicznym indeksem uszkodzenia miokardium (Rycina 19.A). W grupie doświadczalnej zaobserwowano natomiast silnie dodatnią istotną statystycznie korelację między stężeniem sNEP a nasileniem zwyrodnienia wodniczki kardiomiocytów ($r_s=0,81$, $p<0,05$); (Rycina 19.B).



Rycina 19. Zależność między stężeniem wolnej neprylizyny (sNEP) w surowicy a A. histopatologicznym indeksem uszkodzenia miokardium (Indeks HP) oraz B. stopniem wakuolizacji kardiomiocytów. r_s – współczynnik korelacji rang Spearmana.

4.2. Część Ib – model przewlekłej AIC

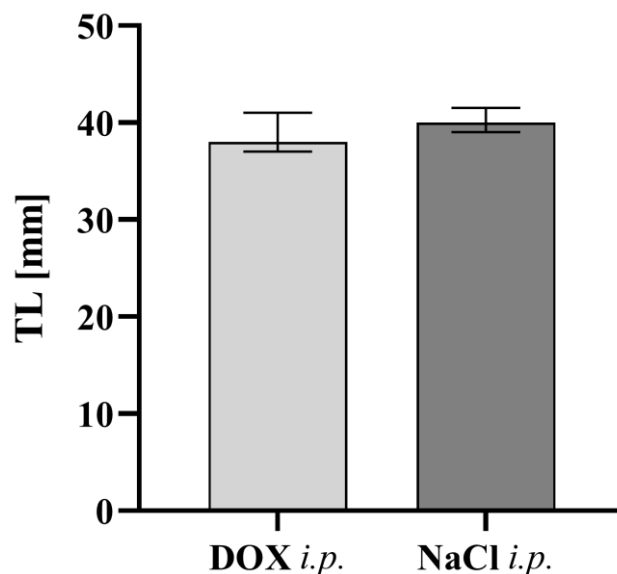
4.2.1. Ogólna charakterystyka zwierząt

Jak przedstawiono w Tabeli 11, śmiertelność zwierząt w grupie doświadczalnej wyniosła 36,36%, natomiast w grupie kontrolnej - 0%. W grupie doświadczalnej cztery osobniki padły przed wykonaniem procedur z 29 doby badania i nie zostały z tego powodu uwzględnione w dalszej analizie, do której włączonych zostało siedem osobników z grupy doświadczalnej, oraz osiem osobników z grupy kontrolnej.

Tabela 11. Śmiertelność zwierząt w Części Ib.

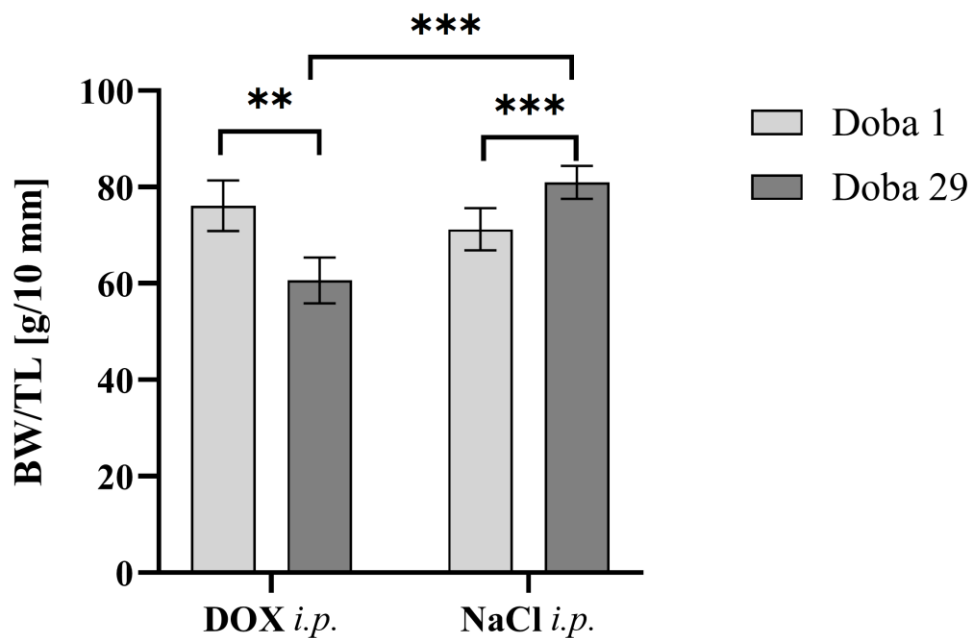
Grupa	Osobniki włączone do badania	Osobniki o przedwczesnej śmiertelności	Osobniki włączone do analizy	Śmiertelność w grupie
Doświadczalna	$n=11$	$n=4$	$n=7$	36,36%
Kontrolna	$n=8$	$n=0$	$n=8$	0%

Jak przedstawiono na Rycinie 20, nie zaobserwowano różnic w zakresie mediany TL między grupą doświadczalną a kontrolną (mediana TL odpowiednio: 38 mm vs. 40 mm).



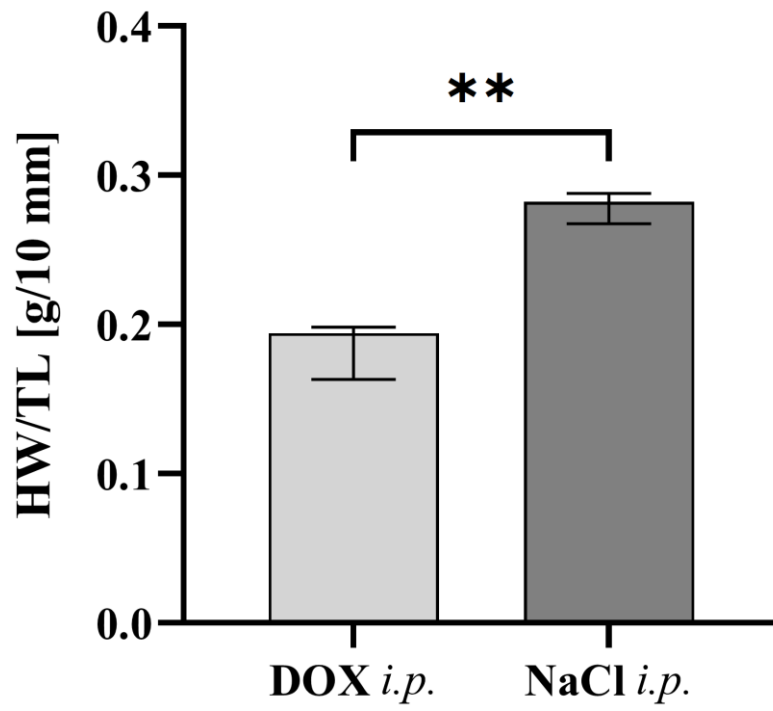
Rycina 20. Długość kości piszczelowej (TL) w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako medianę \pm IQR.

Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotne różnice w zakresie zmian średnich wartości stosunku BW/TL między grupami w trakcie trwania badania ($F(1,13) = 164,74$, $p < 0,001$); (Rycina 21). W 1 dobie badania między grupą doświadczalną a kontrolną nie występowały różnice średniej wartości BW/TL (odpowiednio: 76,15 g/10 mm vs. 71,24 g/10 mm). W trakcie trwania badania u zwierząt z grupy doświadczalnej wystąpił istotny spadek BW/TL o 21,33 % (BW/TL w 1 i 29 dobie odpowiednio: 76,15 g/10 mm vs. 60,62 g/10 mm, $p < 0,01$), podczas gdy średnie wartości BW/TL zwierząt z grupy kontrolnej wzrosły o 14,08% (71,24 g/10 mm vs. 80,94 g/10 mm, $p < 0,001$).



Rycina 21. Stosunek masy ciała (BW) do długości kości piszczelowej (TL) w 1 i 29 dobie badania w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

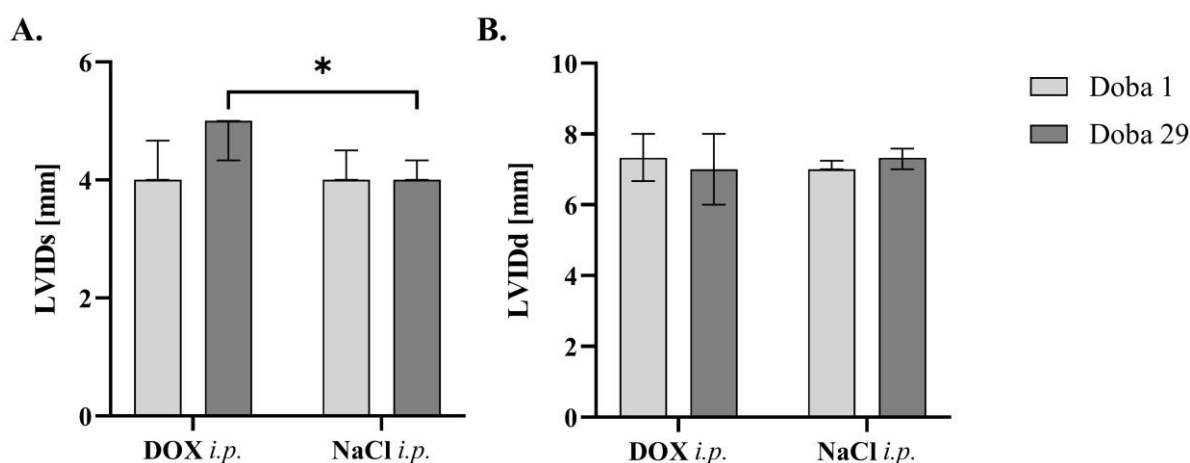
Ponadto, w ostatniej dobie badania zaobserwowano istotną statystycznie różnicę w medianie wartości stosunku HW/TL między grupami – mediana HW/TL w grupie kontrolnej wyniosła 0,282 g/10mm, podczas gdy w grupie doświadczalnej - 0,194 g/10mm, $p < 0,01$ (Rycina 22).



Rycina 22. Stosunek masy serca (HW) do długości kości piszczelowej (TL) w 1 i 29 dobie badania w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako medianę \pm IQR. ** $p < 0,01$

4.2.2. Parametry echokardiograficzne

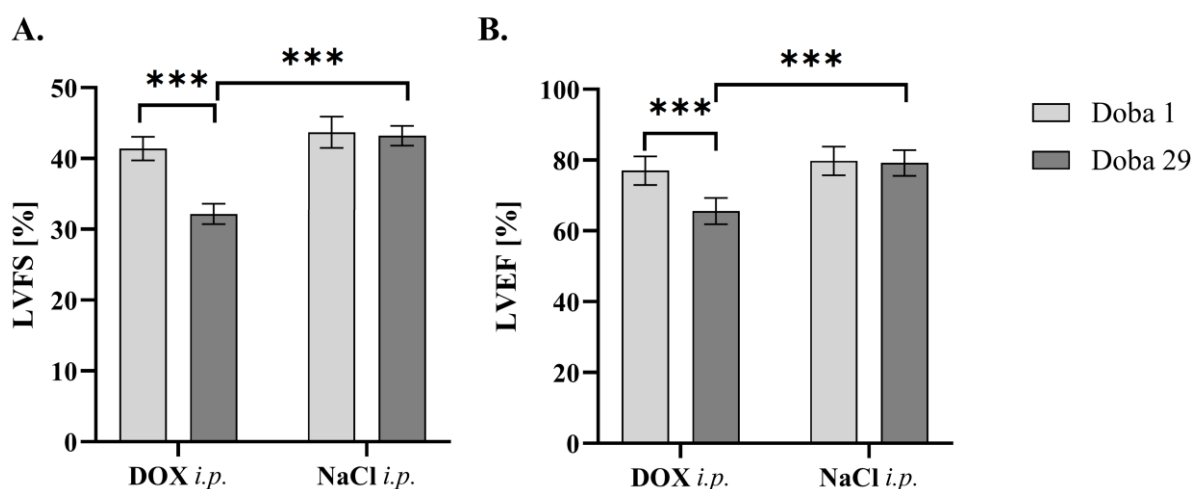
W 1 dobie badania grupa doświadczalna i kontrolna nie różniły się od siebie w zakresie LVIDd oraz LVIDs (mediana LVIDd odpowiednio: 7,34 mm vs. 7 mm, mediana LVIDs odpowiednio: 4 mm vs. 4 mm); (Rycina 23). W ostatniej dobie badania w grupie doświadczalnej zaobserwowano istotnie wyższą wartość LVIDs (mediana LVIDs w grupie doświadczalnej: 5 mm vs. 4 mm w grupie kontrolnej, $p < 0,05$), natomiast grupy nie różniły się w zakresie LVIDd (mediana LVIDd w grupie doświadczalnej 7 mm vs. 7,34 mm w grupie kontrolnej).



Rycina 23. A. Wymiar końcowoskurczowy lewej komory serca (LVIDs) oraz B. wymiar końcoworozkurczowy lewej komory serca (LVIDd) w 1 i 29 dobie badania w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako medianę \pm IQR. * $p < 0,05$

Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotną różnicę w zakresie zmian średnich wartości LVFS ($F(1,13) = 20,814$, $p < 0,001$) oraz LVEF ($F(1,13) = 22,158$, $p < 0,001$) pomiędzy grupami w trakcie trwania badania (Rycina 24). W 1 dobie nie zaobserwowano istotnych różnic w zakresie średnich wartości obu parametrów między grupą doświadczalną a kontrolną (średnia LVFS odpowiednio: 41,19% vs. 43,46%, średnia LVEF odpowiednio: 77% vs. 79,75%). W czasie trwania badania w grupie doświadczalnej nastąpił istotny spadek obu parametrów – średnie wartości LVFS uległy obniżeniu o 22,77%, natomiast LVEF o 14,71% (średnia LVFS w 1 i 29 dobie odpowiednio: 41,19% vs. 31,81%, $p < 0,001$; średnia LVEF w 1 i 29 dobie odpowiednio: 77% vs. 65,67%, $p < 0,001$). W grupie kontrolnej parametry te nie uległy istotnym zmianom (średnia LVFS w 1 i 29 dobie odpowiednio: 43,46% vs. 43,04%, średnia LVEF w 1 i 29 dobie odpowiednio: 79,75% vs. 79,17%, $p > 0,05$). W ostatniej dobie badania między grupami występowały istotne różnice w zakresie obu tych parametrów (średnia LVFS w grupie

doświadczalnej 31,81% vs. 43,04% w grupie kontrolnej, $p < 0,001$; średnia LVEF w grupie doświadczalnej: 65,67% vs. 79,17% w grupie kontrolnej, $p < 0,001$).



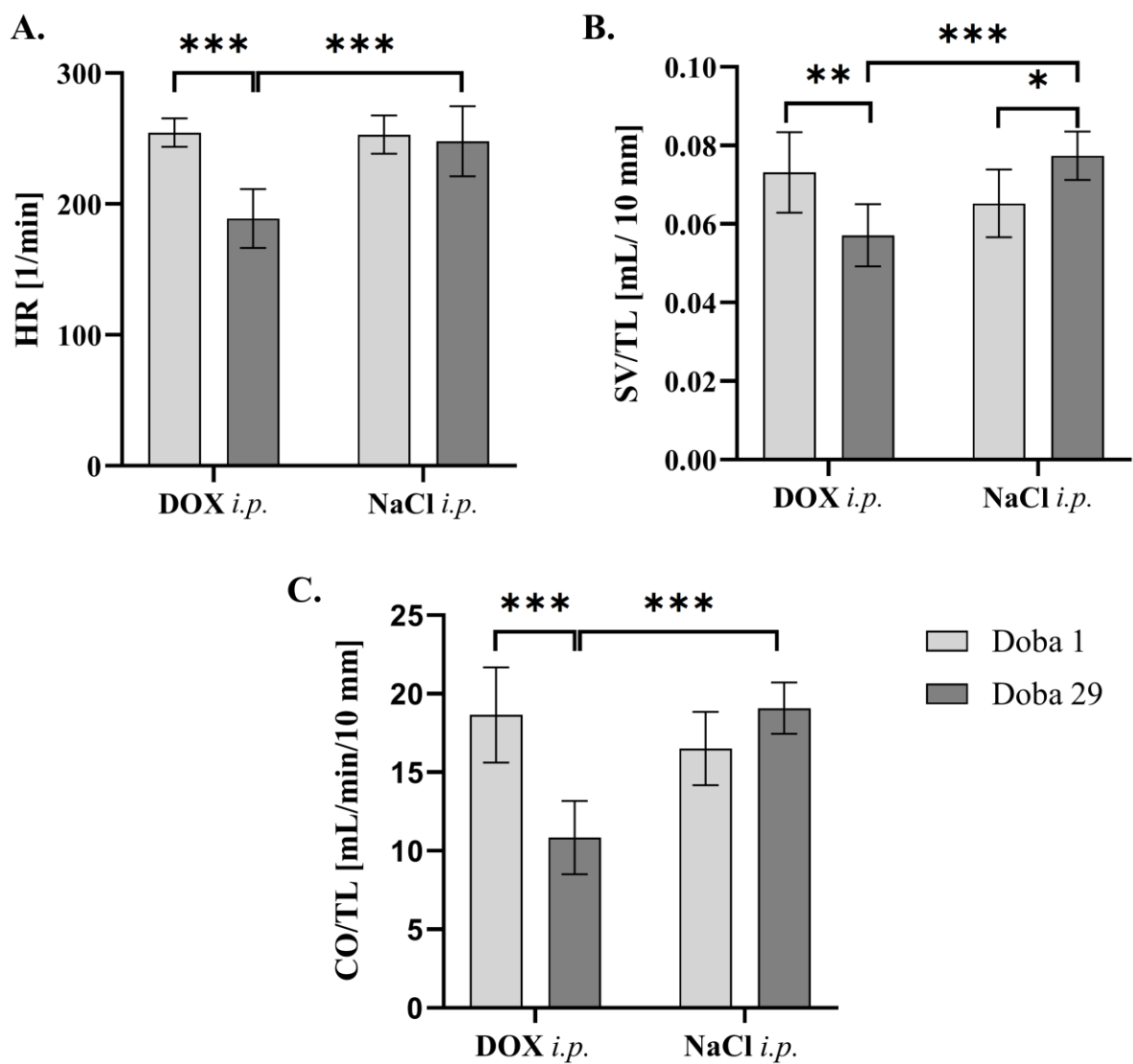
Rycina 24. A. Frakcja skracania lewej komory serca (LVFS) oraz B. frakcja wyrzutowa lewej komory serca (LVEF) w 1 i 29 dobie badania w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*) Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD. *** $p < 0,001$

Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała również istotną różnicę w zakresie zmian średnich wartości HR ($F(1,13) = 25,39$, $p < 0,01$) w trakcie trwania badania (Rycina 25.A). W 1 dobie nie występowały istotne różnice tego parametru między grupą doświadczalną a kontrolną (średnia wartość HR odpowiednio: 254,43/min vs. 252,96/min). W ostatniej dobie badania w grupie doświadczalnej zaobserwowano istotnie niższe średnie wartości HR o 25,81% (średnia HR w 1 i 29 dobie odpowiednio: 254,43/min vs. 188,76/min, $p < 0,001$). W grupie kontrolnej w ostatniej dobie nie odnotowano różnicy w średnich wartościach HR w porównaniu do wartości wyjściowych (średnia w 1 i 29 dobie odpowiednio: 252,96/min vs. 247,96/min). W ostatniej dobie doświadczenia średnia wartość HR w grupie doświadczalnej była istotnie niższa w porównaniu do grupy kontrolnej (średnia HR odpowiednio: 247,96/min vs. 188,76/min, $p < 0,001$).

Podobnie, dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotną różnicę w zakresie zmian średnich wartości stosunku SV/TL ($F(1,13) = 28,323$, $p < 0,001$) pomiędzy grupami w czasie trwania badania (Rycina 25.B). W 1 dobie nie obserwowano istotnych różnic tego parametru między grupą doświadczalną a kontrolną (średnia SV/TL odpowiednio: 0,073 mL/10 mm vs. 0,065 mL/10 mm). W czasie trwania badania w grupie doświadczalnej nastąpił istotny spadek

wartości SV/TL o 21,92% (średnia SV/TL w 1 i 29 dobie odpowiednio: 0,073 mL/10 mm vs. 0,057 mL/10 mm, $p < 0,01$). Natomiast w grupie kontrolnej w ostatniej dobie badania zanotowano wyższe wartości SV/TL w porównaniu do wartości wyjściowych (średnia SV/TL w 1 i 29 dobie odpowiednio: 0,065 mL/10 mm vs. 0,077 mL/10 mm, $p < 0,05$). W ostatniej dobie średnie wartości SV/TL były istotnie niższe w grupie doświadczalnej w porównaniu do kontrolnej (średnia SV/TL odpowiednio: 0,057 mL/10 mm vs. 0,077 mL/10 mm, $p < 0,001$).

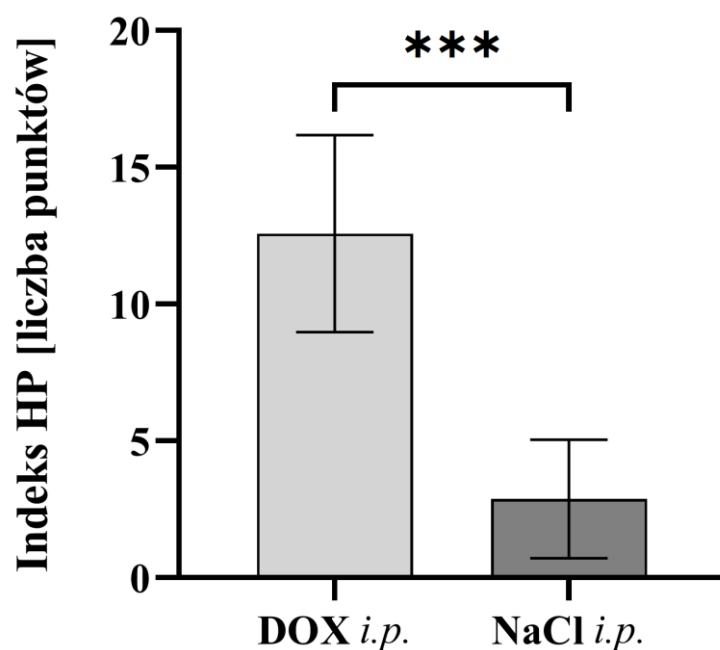
Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała również istotną różnicę w zakresie zmian średnich wartości CO/TL ($F(1,13) = 45,834$, $p < 0,001$) pomiędzy grupami w czasie trwania badania (Rycina 25.C). W 1 dobie badania nie zaobserwowano istotnych różnic w średnich wartościach tego parametru między grupą doświadczalną a kontrolną (średnia CO/TL odpowiednio: 19 mL/min/10 mm vs. 17 mL/min/10 mm). W czasie trwania badania w grupie doświadczalnej nastąpił istotny spadek średniej wartości CO/TL o 42,1% (średnia CO/TL w 1 i 29 dobie odpowiednio: 19 mL/min/10 mm vs. 11 mL/min/10 mm, $p < 0,001$). W grupie kontrolnej w ostatniej dobie badania nie odnotowano różnicy w średnich wartościach CO/TL w porównaniu do wartości wyjściowych (średnia CO/TL w 1 i 29 dobie odpowiednio: 17 mL/min/10 mm vs. 19 mL/min/10 mm). W ostatniej dobie badania średnie wartości CO/TL były istotnie niższe w grupie doświadczalnej w porównaniu do grupy kontrolnej (średnia CO/TL odpowiednio: 11 mL/min/10 mm vs. 19 mL/min/10 mm, $p < 0,001$).



Rycina 25. A. Rytm serca (HR), B. stosunek objętości wyrzutowej lewej komory serca (SV) do długości kości piszczelowej (TL) oraz C. stosunek pojemności minutowej serca (CO) do długości kości piszczelowej (TL) w 1 i 29 dobie badania w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.2.3. Analiza histopatologiczna

Pomiędzy grupą doświadczalną a kontrolną zaobserwowano istotne różnice w wartości histopatologicznego indeksu uszkodzenia miokardium (mediana liczby przyznanych punktów wyniosła odpowiednio: 14 vs. 3, $p < 0,001$); (Rycina 26). Jak przedstawiono w Tabeli 12, wśród punktów przyznanych podczas oceny preparatów pochodzących z grupy doświadczalnej główne znaczenie miały nacieki komórek jednojądrzastych oraz zwłóknienie śródmiąższowe (mediana przyznanych punktów w obu parametrach wyniosła 5), podczas gdy wakuolizację kardiomiocytów oceniono na mniej nasiloną (mediana przyznanych punktów wyniosła 3).



Rycina 26. Histopatologiczny indeks uszkodzenia miokardium (Indeks HP) w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD. *** $p < 0,001$

Tabela 12. Ocena histopatologiczna LV w Części Ib.

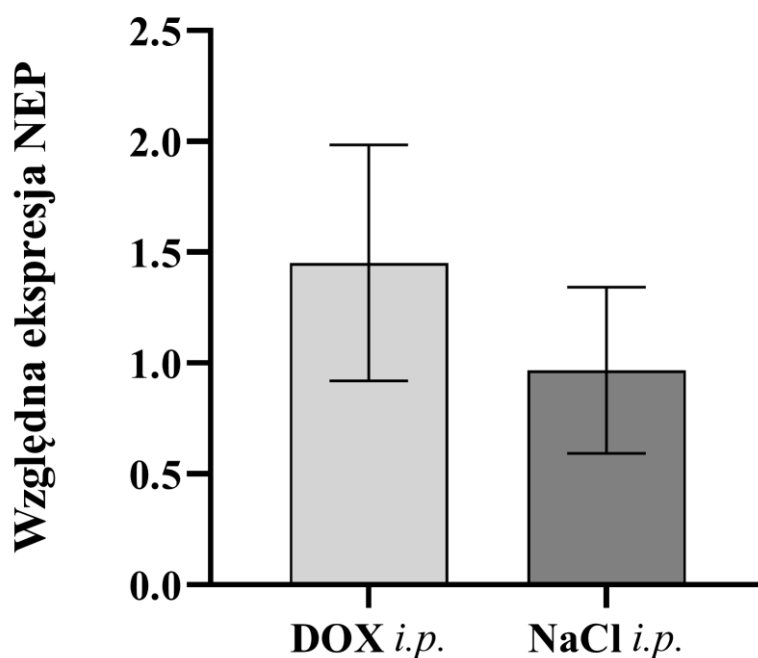
Grupa	Wakuolizacja kardiomiocytów	Naciek komórek jednojądrzastych	Zwłóknienie śródmiąższowe	Suma
Doświadczalna	3 (2,5-3)	5 (4-5,5)	5 (3,5-6)	14 (9-14,5)
Kontrolna	0 (0-0,5)	1 (0-2)	0,5 (0-2,25)	3 (1-4,25)

Dane przedstawiono jako medianę \pm IQR. LV – lewa komora serca.

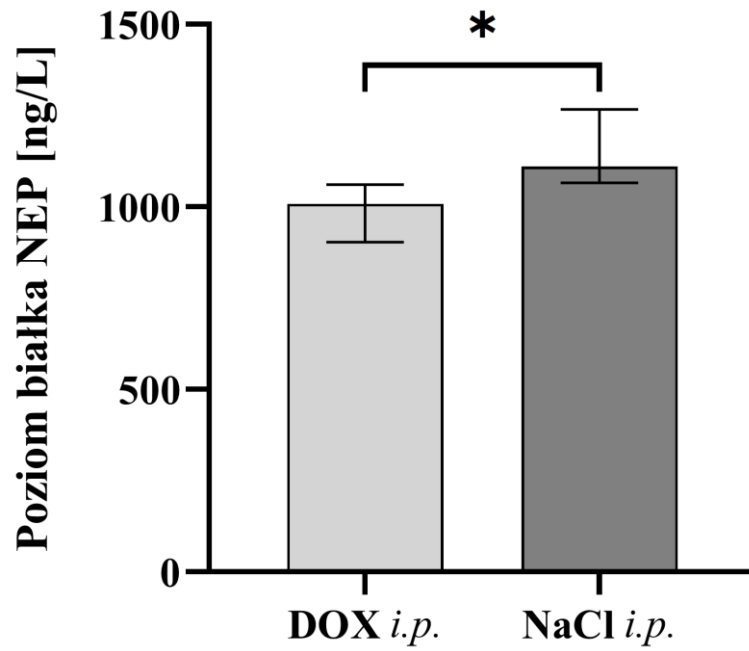
4.2.4. Ekspresja mRNA, poziom białka i aktywność NEP w LV

Pomiędzy grupami nie zaobserwowano istotnych różnic w zakresie ekspresji mRNA NEP (względna ekspresja w grupie doświadczalnej 1,45 vs. 0,97 w grupie kontrolnej); (Rycina 27). Jak przedstawiono na Rycinie 28, poziom białka NEP w obrębie LV był natomiast istotnie niższy w grupie doświadczalnej (mediana w grupie doświadczalnej 1007,55 ng/L vs. 1110,75 ng/L w grupie kontrolnej, $p < 0,05$). Nie zaobserwowano różnic w zakresie tkankowej aktywności enzymatycznej NEP w LV (średnia aktywność w grupie doświadczalnej 81,83 $\mu\text{U/mL}$ vs. 81,18 $\mu\text{U/mL}$ w grupie kontrolnej); (Rycina 29).

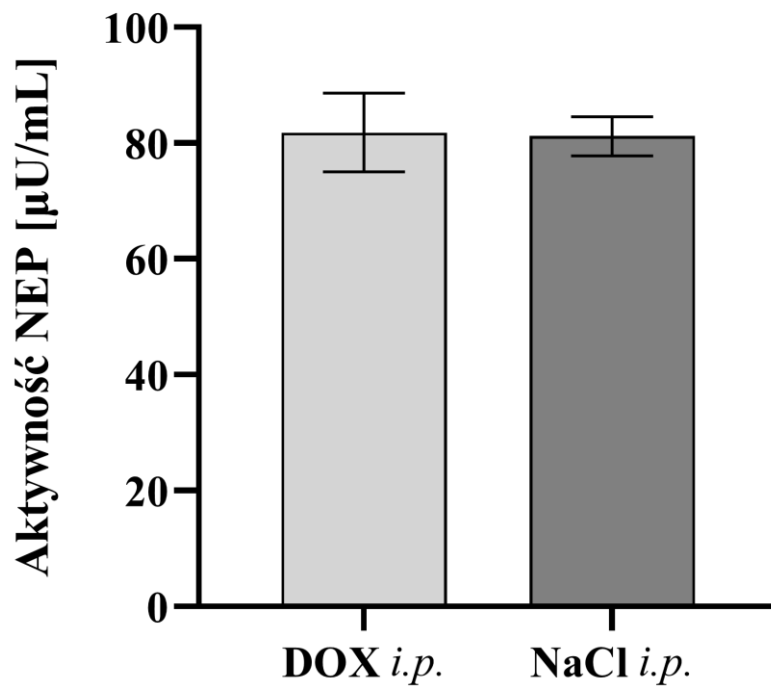
Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zależności między ekspresją mRNA NEP, tkankowym poziomem ekspresji białka NEP i aktywnością enzymatyczną NEP a wartościami parametrów echokardiograficznych (LVEF, LVFS, SV/TL, CO/TL) w ostatniej dobie badania (dane nieprzedstawione). Nie występowały także istotne zależności między ekspresją mRNA NEP, tkankowym poziomem ekspresji białka NEP i aktywnością enzymatyczną NEP a histopatologicznym indeksem uszkodzenia miokardium (dane nieprzedstawione).



Rycina 27. Ekspresja mRNA neprylizyny (NEP) w lewej komorze serca w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD.



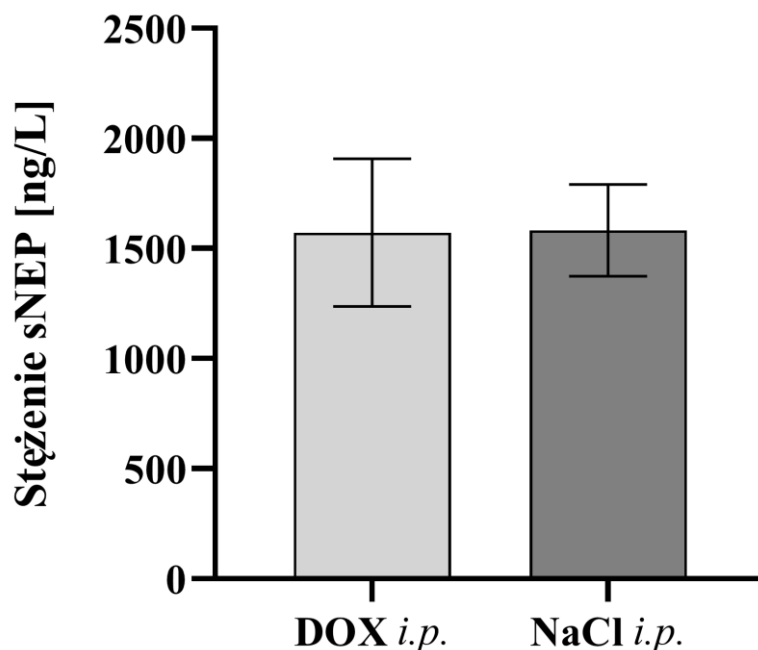
Rycina 28. Poziom białka neprylizyny (NEP) w lewej komorze serca w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako medianę \pm IQR. * $p < 0,05$



Rycina 29. Aktywność enzymatyczna neprylizyny (NEP) w lewej komorze serca w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD.

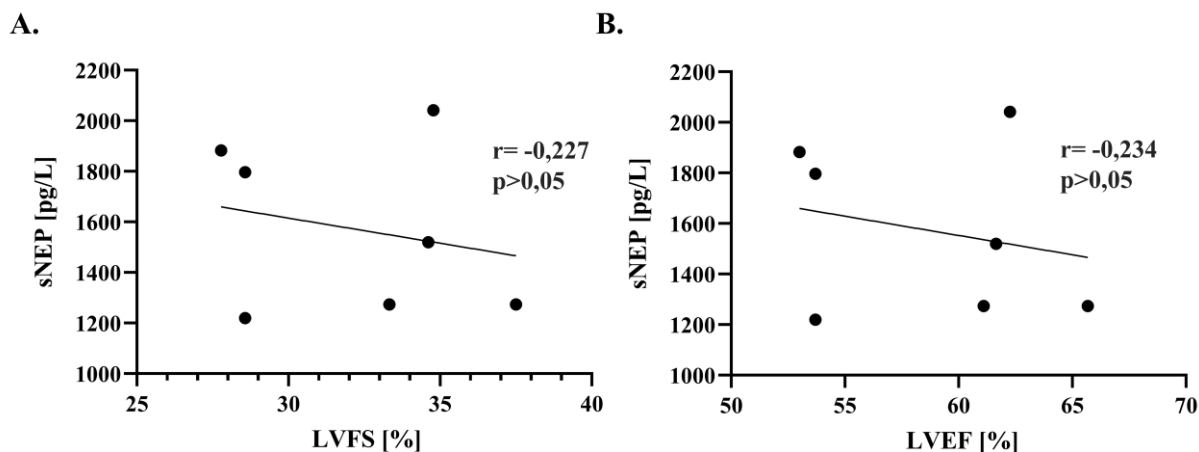
4.2.5. Stężenie sNEP w surowicy

Pomiędzy grupami nie zaobserwowano istotnych różnic w zakresie stężenia sNEP w surowicy (średnia grupie doświadczalnej 1571,95 ng/L vs. 1582,63 ng/L w grupie kontrolnej); (Rycina 30).

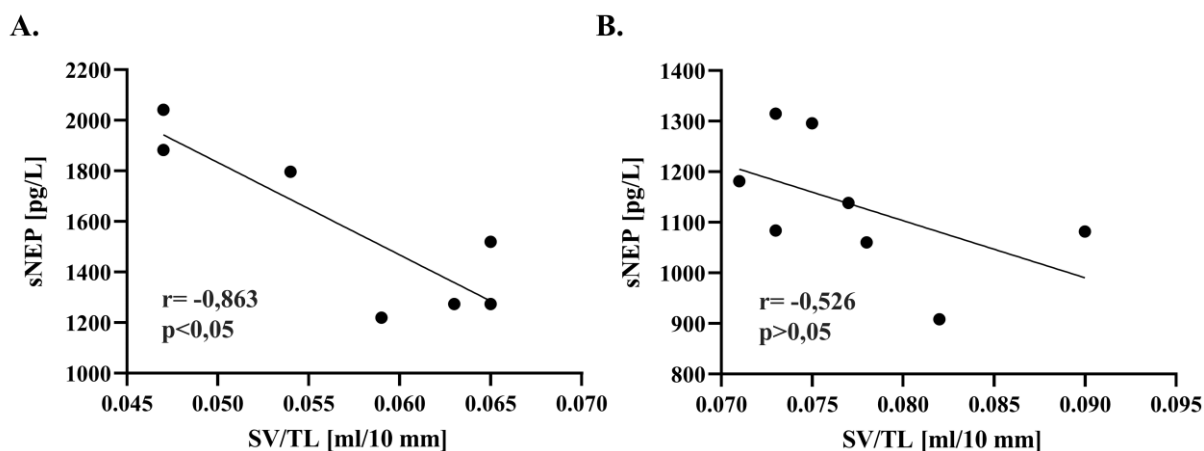


Rycina 30. Stężenie wolnej neprylizyny (sNEP) w surowicy zwierząt w modelu przewlekłej AIC w grupie doświadczalnej (DOX *i.p.*) i kontrolnej (NaCl *i.p.*). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD.

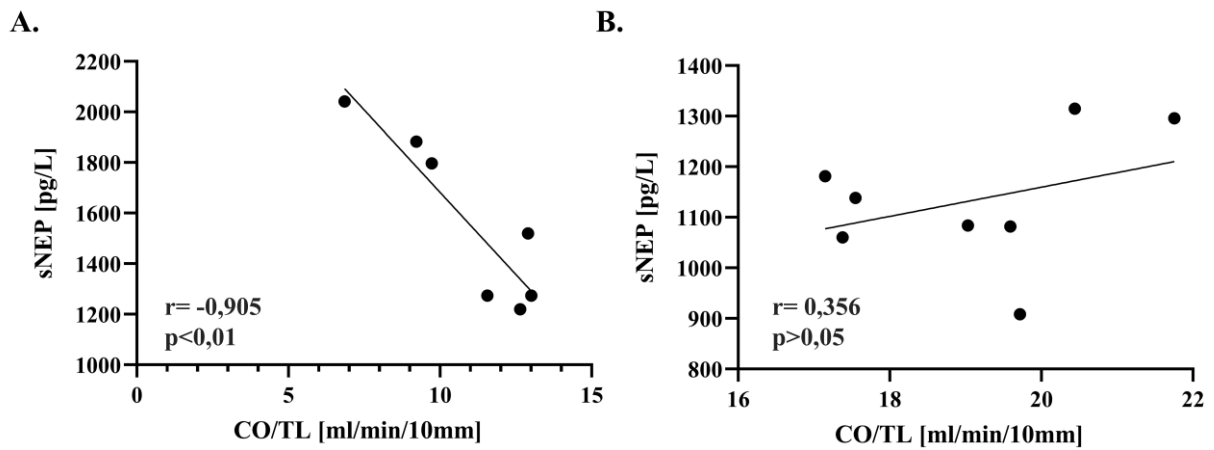
Nie zaobserwowano istotnych zależności między stężeniem sNEP w surowicy a histopatologicznym indeksem uszkodzenia miokardium (dane nieprzedstawione). Nie występowały również istotne zależności między stężeniem sNEP a LVFS oraz LVEF w ostatniej dobie badania – zarówno w grupie doświadczalnej (Rycina 31), jak i w grupie kontrolnej (dane nieprzedstawione). W grupie doświadczalnej wystąpiła natomiast silna ujemna korelacja między stężeniem sNEP w surowicy zwierząt a wartością stosunku SV/TL ($r=-0,863$, $p<0,05$); (Rycina 32.A), której nie zaobserwowano w grupie kontrolnej (Rycina 32.B). Podobnie, w grupie doświadczalnej zaobserwowano silną ujemną korelację między stężeniem sNEP w surowicy zwierząt a wartościami stosunku CO/TL ($r=-0,905$, $p<0,01$); (Rycina 33.A), która nie występowała w grupie kontrolnej (Rycina 33.B).



Rycina 31. Zależność między stężeniem wolnej neprylizyny (sNEP) w surowicy a A. frakcją skracania lewej komory serca (LVFS) oraz B. frakcją wyrzutową lewej komory serca (LVEF) w grupie doświadczalnej w 29 dobie badania. r – współczynnik korelacji Pearsona.



Rycina 32. Zależność między stężeniem wolnej neprylizyny (sNEP) w surowicy a stosunkiem objętości wyrzutowej lewej komory serca (SV) do długości kości piszczelowej (TL) w 29 dobie badania w A. grupie doświadczalnej oraz B. grupie kontrolnej. r – współczynnik korelacji Pearsona.



Rycina 33. Zależność między stężeniem wolnej neprylizyny (sNEP) w surowicy a stosunkiem pojemności minutowej serca (CO) do długości kości piszczelowej (TL) w 29 dobie badania w A. grupie doświadczalnej oraz B. grupie kontrolnej. r – współczynnik korelacji Pearsona.

4.3. Część II

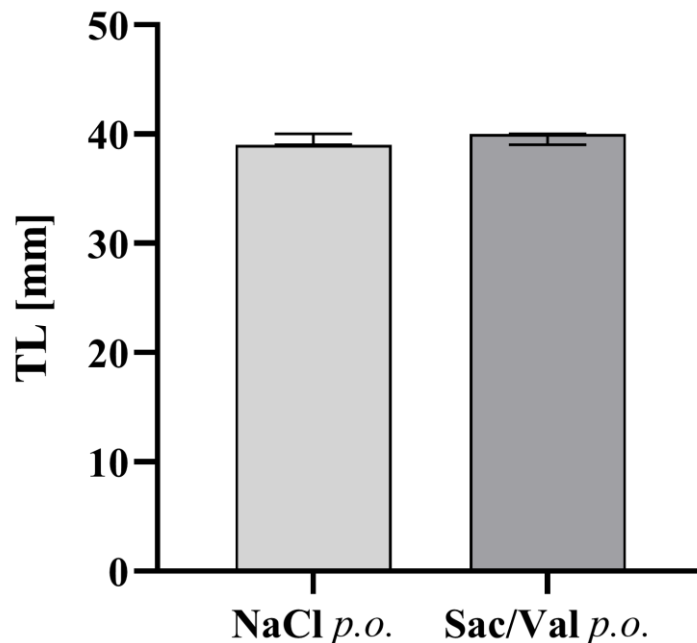
4.3.1. Ogólna charakterystyka zwierząt

Jak przedstawiono w Tabeli 13, śmiertelność zwierząt w grupie zarówno doświadczalnej jak i kontrolnej wyniosła 12,5%. W obu grupach jeden osobnik padł przed wykonaniem procedur z 29 doby i nie został z tego powodu uwzględniony w dalszej analizie, do której włączonych zostało po siedem osobników z każdej z grup.

Tabela 13. Śmiertelność zwierząt w Części II.

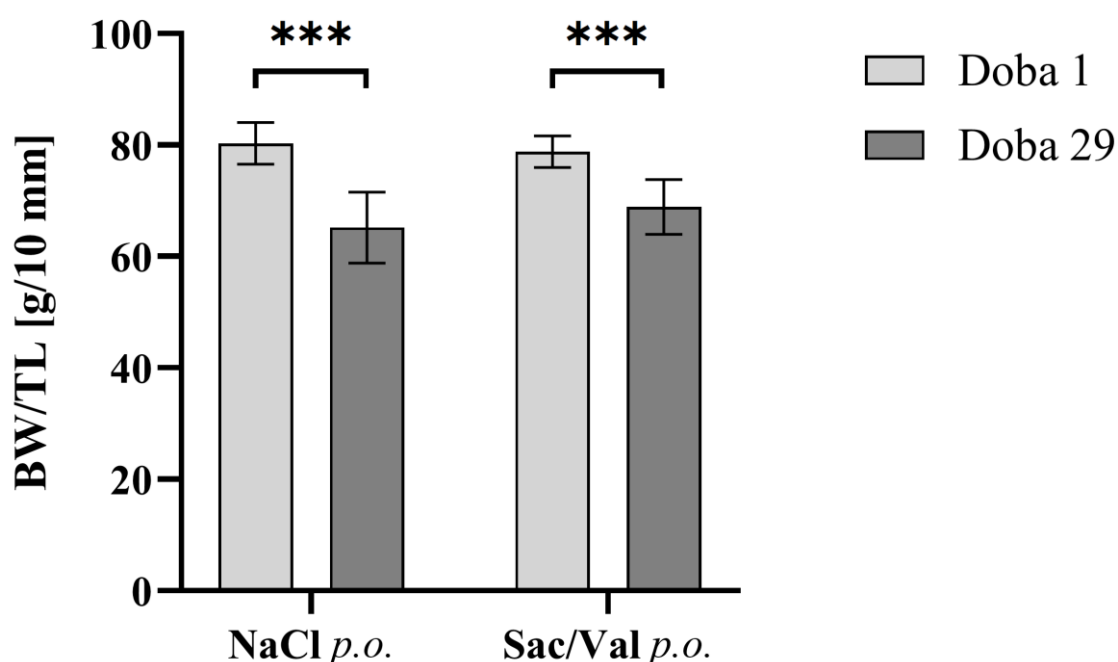
Grupa	Osobniki włączone do badania	Osobniki o przedwczesnej śmiertelności	Osobniki włączone do analizy	Śmiertelność w grupie
Doświadczalna	$n=8$	$n=1$	$n=7$	12,5%
Kontrolna	$n=8$	$n=1$	$n=7$	12,5%

Jak przedstawiono na Rycinie 34, między grupami nie zaobserwowano różnic w zakresie mediany TL (mediana w grupie doświadczalnej: 40 mm vs. 39 mm w grupie kontrolnej).



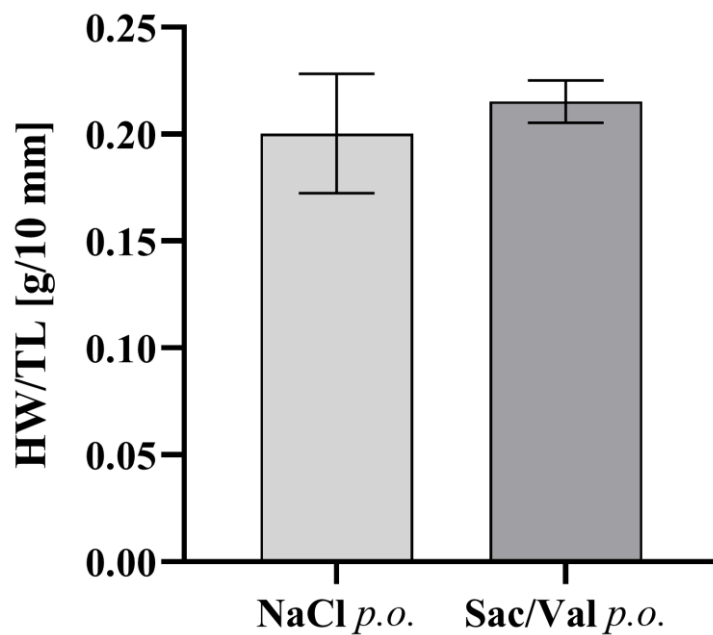
Rycina 34. Długość kości piszczelowej (TL) w grupie kontrolnej (NaCl p.o.) i doświadczalnej (Sac/Val p.o.). Dane przedstawiono jako medianę \pm IQR.

Dwuczynnikowa analiza wariancji nie wykazała istotnych różnic w zakresie zmian średniej wartości stosunku BW/TL w trakcie trwania badania między grupami (Rycina 35). W 1 dobie zwierzęta w grupie doświadczalnej i kontrolnej nie różniły się pod kątem tego parametru (średnia BW/TL odpowiednio 78,80 g/10 mm vs. 80,31 g/10 mm). U zwierząt z zarówno grupy kontrolnej jak i doświadczalnej wystąpił spadek średnich wartości BW/TL o odpowiednio 18,84% i 12,59% (grupa kontrolna: BW/TL w 1 dobie 80,31 g/10 mm vs. 65,18 g/10 mm w dobie 29, $p < 0,01$; grupa doświadczalna: 78,80 g/10 mm vs. 68,88 g/10 mm, $p < 0,05$).



Rycina 35. Stosunek masy ciała (BW) do długości kości piszczelowej (TL) w 1 i 29 dobie badania w grupie kontrolnej (NaCl p.o.) i doświadczalnej (Sac/Val p.o.). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD. *** $p < 0,001$

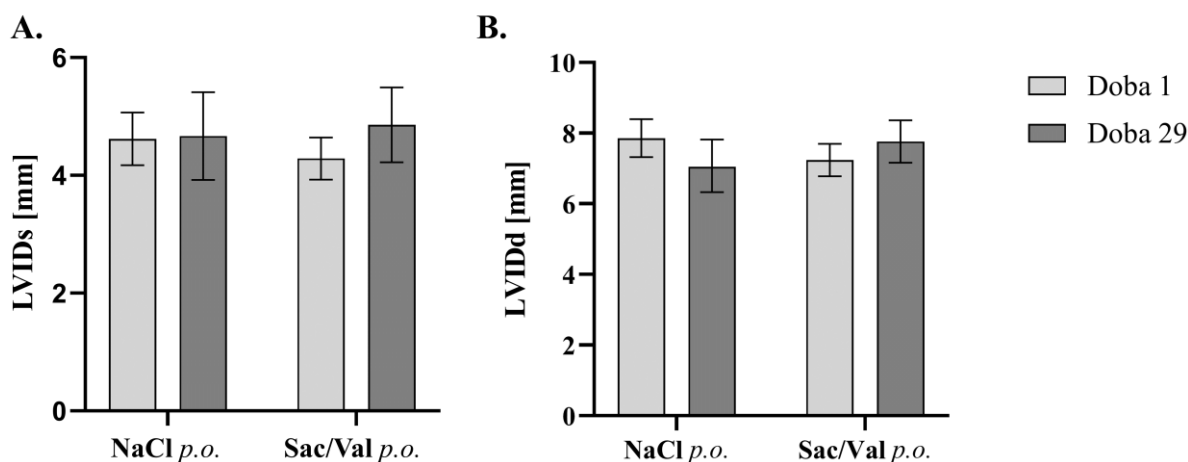
Podobnie, w ostatniej dobie badania nie zaobserwowano różnic w zakresie średnich wartości stosunku HW/TL między grupami (średnia HW/TL w grupie doświadczalnej: 0,215 g/10 mm, vs. 0,200 g/10 mm w grupie kontrolnej); (Rycina 36).



Rycina 36. Stosunek masy serca (HW) do długości kości piszczelowej (TL) w 1 oraz 29 dobie badania w grupie kontrolnej (NaCl *p.o.*) i doświadczalnej (Sac/Val *p.o.*). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD.

4.3.2. Parametry echokardiograficzne

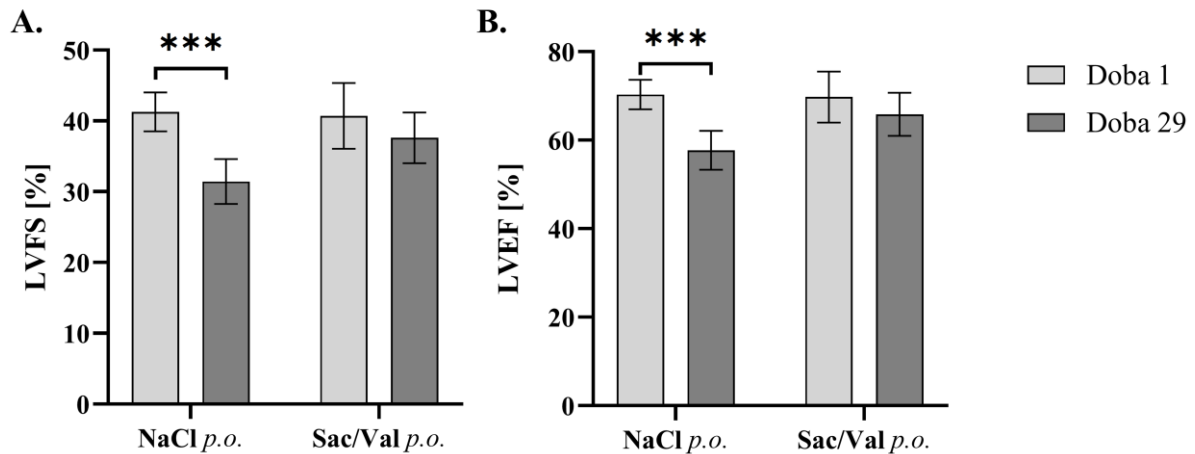
Nie zaobserwowano istotnych różnic w zakresie średnich wartości LVIDs pomiędzy grupami (mediana LVIDs w grupie kontrolnej oraz doświadczalnej w 1 dobie odpowiednio 4,61 mm vs. 4,25 mm, w 29 dobie odpowiednio: 4,67 mm vs. 4,75 mm); (Rycina 37.A). Dwuczynnikowa analiza wariancji nie wykazała także istotnych różnic w zakresie zmian średnich wartości LVIDd (mediana LVIDd w grupie kontrolnej oraz doświadczalnej w 1 dobie odpowiednio 7,86 mm vs. 7,21 mm, w 29 dobie odpowiednio: 7,05 mm vs. 7,71 mm); (Rycina 37.B).



Rycina 37. A. Wymiar końcowoskurczowy lewej komory serca (LVIDs) oraz B. wymiar końcoworozkurczowy lewej komory serca (LVIDd) w 1 i 29 dobie badania w grupie kontrolnej (NaCl p.o.) i doświadczalnej (Sac/Val p.o.): Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną ± SD. * $p < 0,05$

Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała natomiast wystąpienie istotnych różnic w zakresie zmian średnich wartości LVFS ($F(1,11) = 5,589$, $p < 0,05$) oraz LVEF ($F(1,11) = 5,295$, $p < 0,05$) pomiędzy grupami w czasie trwania badania (Rycina 38). W 1 dobie pomiędzy grupami nie występowały istotne różnice w zakresie wartości obu tych parametrów (średnia LVFS w grupie kontrolnej oraz doświadczalnej odpowiednio: 41,27% vs. 40,97%, średnia LVEF odpowiednio: 70,31% vs. 70,10%). W czasie trwania badania w grupie kontrolnej nastąpił istotny spadek średnich wartości obu parametrów – LVFS uległa obniżeniu o 23,82%, natomiast LVEF o 17,92% (średnia LVFS w 1 i 29 dobie odpowiednio: 41,27% vs. 31,44%, $p < 0,001$; średnia LVEF w 1 i 29 dobie odpowiednio: 70,31% vs. 57,71%, $p < 0,001$). Natomiast w grupie doświadczalnej parametry te nie uległy istotnym zmianom w czasie trwania badania

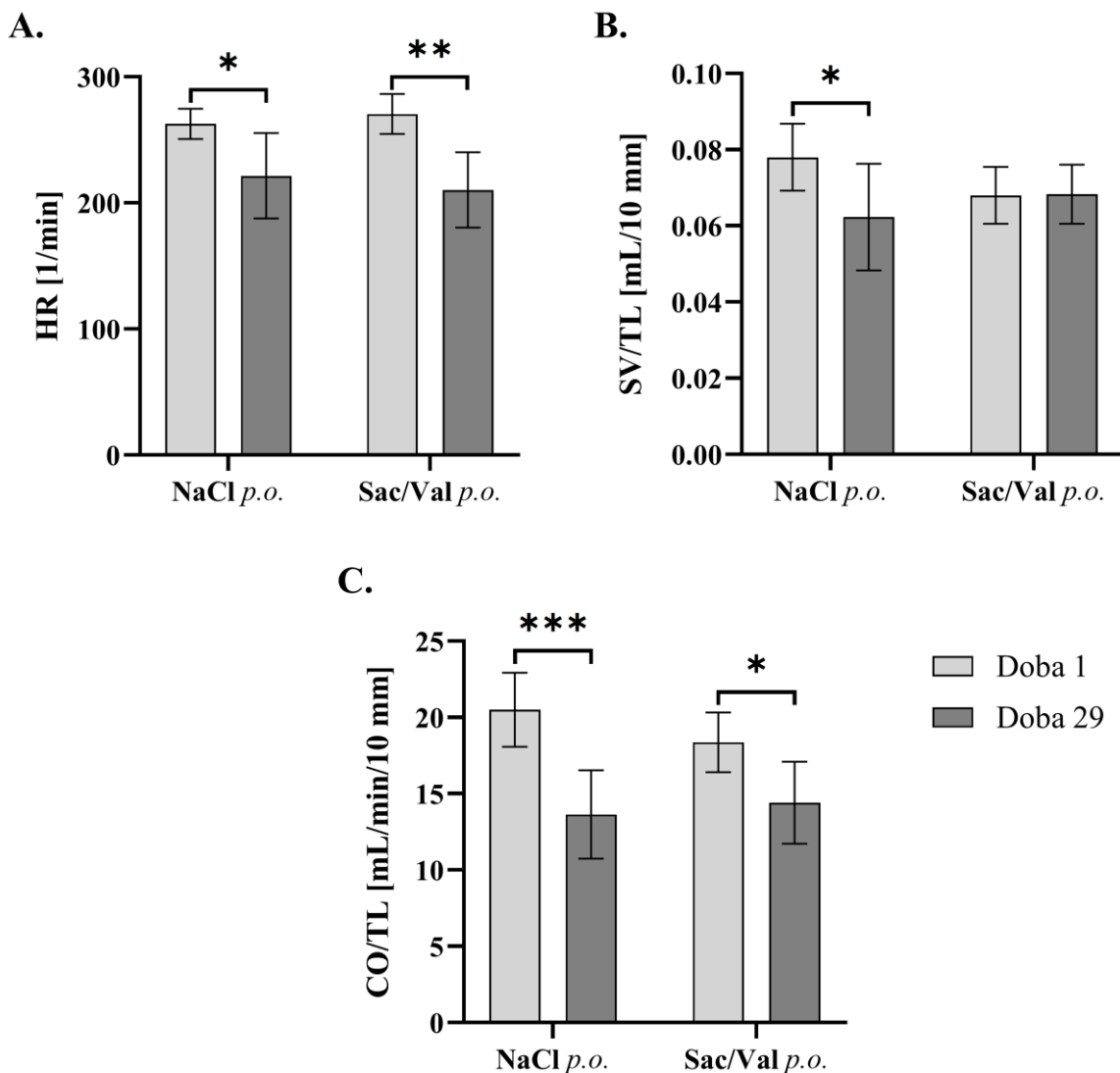
(średnia LVFS w 1 i 29 dobie odpowiednio: 40,97% vs. 38,60%, średnia LVEF w 1 i 29 dobie odpowiednio: 70,10% vs. 67,00%).



Rycina 38. A. Frakcja skracania lewej komory serca (LVFS) oraz B. frakcja wyrzutowa lewej komory serca (LVEF) w 1 i 29 dobie badania w grupie kontrolnej (NaCl p.o.) i doświadczalnej (Sac/Val p.o.). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Dwuczynnikowa analiza wariancji nie wykazała istotnych różnic w zakresie zmian średnich wartości HR pomiędzy grupami w czasie trwania badania (Rycina 39.A). W 1 dobie grupy nie różniły się pod kątem tego parametru (średnia HR w grupie kontrolnej oraz doświadczalnej odpowiednio: 262,62/min vs. 270,48/min). W ostatniej dobie badania w obu grupach odnotowano istotnie niższe wartości HR w porównaniu do wartości wyjściowych (średnia HR w 1 i 29 dobie w grupie kontrolnej odpowiednio: 262,62/min vs. 221,43/min, $p < 0,05$; w grupie doświadczalnej odpowiednio: 270,48/min vs. 210,14/min, $p < 0,01$). Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała natomiast wystąpienie istotnych różnic w zakresie zmian średnich wartości stosunku SV/TL pomiędzy grupami ($F(1,12) = 5,645$, $p < 0,05$); (Rycina 39.B). W 1 dobie badania pomiędzy grupami nie występowały różnice w zakresie tego parametru (średnia SV/TL w grupie kontrolnej oraz doświadczalnej odpowiednio: 0,078 mL/10 mm vs. 0,068 mL/10 mm). W czasie trwania badania w grupie kontrolnej nastąpił istotny spadek wartości SV/TL o 20,51% (średnia SV/TL w 1 i 29 dobie odpowiednio: 0,078 mL/10 mm vs. 0,062 mL/10 mm, $p < 0,05$). Średnia wartość stosunku SV/TL nie uległa natomiast zmianie w grupie doświadczalnej (średnia SV/TL w 1 i 29 dobie odpowiednio: 0,068 mL/10 mm vs. 0,068 mL/10 mm).

Dwuczynnikowa analiza wariancji nie wykazała istotnych różnic w zakresie zmian średnich wartości stosunku CO/TL w czasie badania (Rycina 39.C). W 1 dobie grupy nie różniły się pod kątem tego parametru (średnia w grupie kontrolnej i doświadczalnej odpowiednio: 20,51 mL/min/10 mm vs. 18,36 mL/min/10 mm). W czasie trwania badania w obu grupach nastąpił istotny spadek średniej wartości CO/TL, o 20,51% w grupie kontrolnej (średnia CO/TL w 1 i 29 dobie odpowiednio: 20,51 mL/min/10 mm vs. 13,63 mL/min/10 mm, $p < 0,001$) oraz o 21,51 % w grupie doświadczalnej (średnia CO/TL w 1 i 29 dobie odpowiednio: 18,36 mL/min/10 mm vs. 14,41 mL/min/10 mm, $p < 0,05$).



Rycina 39. A. Rytm serca (HR), B. stosunek objętości wyrzutowej lewej komory serca (SV) do długości kości piszczelowej (TL) oraz C. stosunek pojemności minutowej serca (CO) do długości kości piszczelowej (TL) w 1 i 29 dobie badania w grupie kontrolnej (NaCl p.o.) i doświadczalnej (Sac/Val p.o.). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

4.3.3. Badanie elektrokardiograficzne

Jak przedstawiono w Tabeli 14, zarówno w 1 jak i ostatniej dobie badania nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami oraz wewnątrz grup w zakresie czasu trwania zespołu QRS oraz skorygowanego czasu trwania odstępu QT.

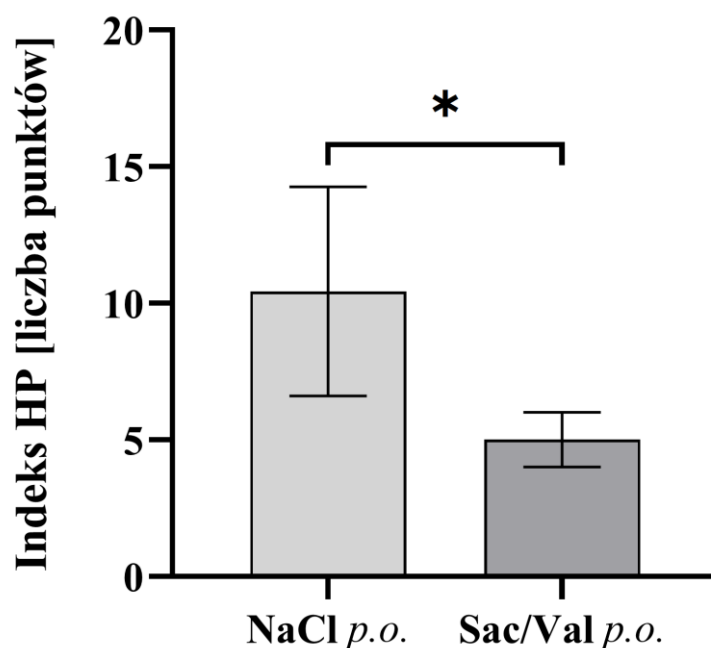
Tabela 14. Czas trwania zespołu QRS [ms] oraz skorygowany czas trwania odstępu QT (QTc) [ms] w grupie kontrolnej (NaCl) oraz doświadczalnej (Sac/Val).

Grupa	QRS		QTc	
	Doba 1	Doba 29	Doba 1	Doba 29
NaCl	27 (24-28)	28 (26-32,5)	62,15 (60,84-66,98)	68,69 (67,29-69,32)
Sac/Val	24 (23-26)	26,5 (25,25-27,5)	63,72 (62,28-69,6)	73,75 (66,09-74,06)

Dane przedstawiono jako medianę ± IQR.

4.3.4. Analiza histopatologiczna

Jak przedstawiono na Rycinie 40, histopatologiczny indeks uszkodzenia miokardium był istotnie niższy w grupie doświadczalnej w porównaniu do grupy kontrolnej (mediana przyznanych punktów odpowiednio 5 vs. 10, $p < 0,05$).



Rycina 40. Histopatologiczny indeks uszkodzenia miokardium (Indeks HP) w grupie kontrolnej (NaCl p.o.) i doświadczalnej (Sac/Val p.o.). Dane przedstawiono jako medianę ± IQR. * $p < 0,05$

Zarówno w grupie kontrolnej i doświadczalnej najwięcej punktów przyznano za stopień nasilenia wakuolizacji kardiomiocytów (mediana punktów odpowiednio 4 oraz 3); (Tabela 15). W grupie kontrolnej zaobserwowano także wysoki stopień nasilenia nacieków komórek jednojądrzastych oraz zwłóknienia śródmiąższowego (mediana punktów wyniosła 3 w przypadku obu parametrów). W grupie doświadczalnej zmiany te występowały w niewielkim stopniu nasilenia (mediana punktów wyniosła 1 w przypadku obu parametrów).

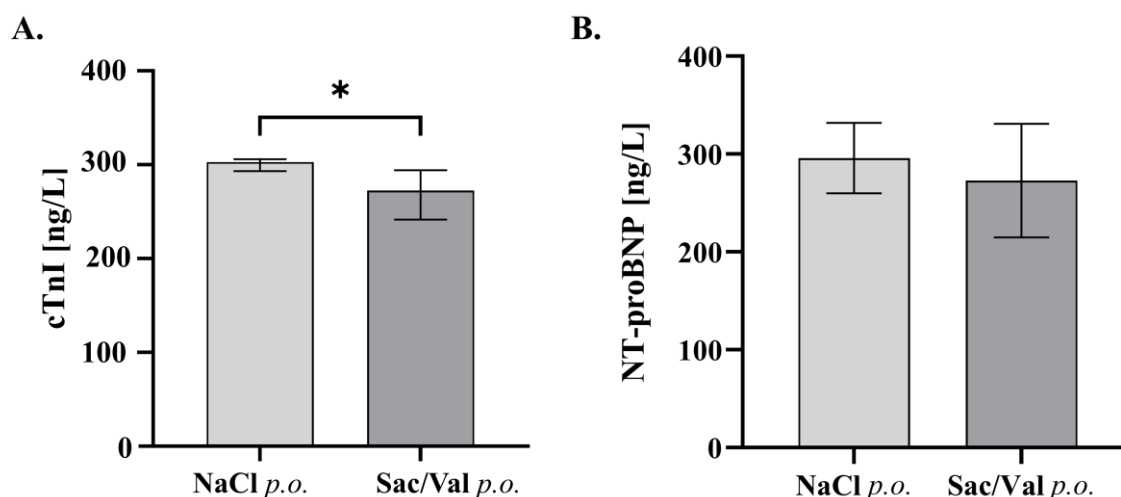
Tabela 15. Ocena histopatologiczna LV w Części II.

Grupa	Wakuolizacja kardiomiocytów	Naciek komórek jednojądrzastych	Zwłóknienie śródmiąższowe	Suma
Doświadczalna	3 (2,5-3)	1 (2-3)	1 (0-1,5)	5 (5-5,5)
Kontrolna	4 (2,5-5,5)	3 (3-5)	3 (2-3,5)	10 (9-13)

Dane przedstawiono jako medianę \pm IQR. LV – lewa komora serca.

4.3.5. Parametry biochemiczne z surowicy

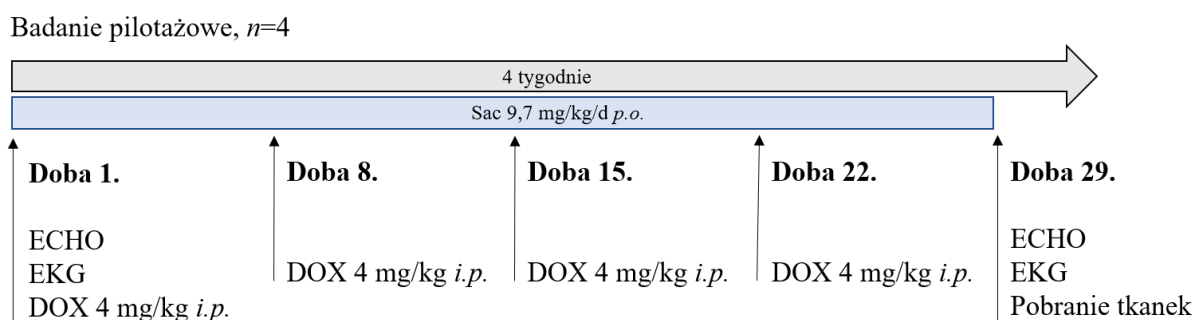
W grupie doświadczalnej stężenie cTnI w surowicy było istotnie niższe w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio: 272,55 ng/l vs. 302,7 ng/l, $p < 0,05$); (Rycina 41.A). Pomiedzy grupą doświadczalną a kontrolną nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic w zakresie stężenia NT-proBNP w surowicy (odpowiednio: 272,91 ng/l vs. 295,87ng/l); (Rycina 41.B).



Rycina 41. Stężenie A. troponiny sercowej I (cTnI) oraz B. N-końcowego propeptydu natriuretycznygo typu B (NT-proBNP) w surowicy zwierząt w grupie kontrolnej (NaCl p.o.) i doświadczalnej (Sac/Val p.o.). Dane przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SD. * $p < 0,05$

4.3.6. Badanie pilotażowe

W ramach Części II badania przeprowadzono także badanie pilotażowe w niewielkiej grupie czterech zwierząt doświadczalnych, którym poza cotygodniowymi iniekcjami DOX *i.p.* w dawce 4 mg/kg BW podawano sakubitryl *p.o.* w dawce 9,7 mg/kg BW/d, zgodnie ze schematem przedstawionym na Rycinie 6. W związku z niewielką liczebnością zwierząt wykorzystanych w badaniu pilotażowym, uzyskanych w nim wyników nie poddano analizie statystycznej i przedstawiono w formie osobnego opracowania.



Rycina 42. Przebieg badania pilotażowego w Części II. DOX – dokсорubicyna; ECHO – badanie echokardiograficzne, EKG – badanie elektrokardiograficzne, *i.p.* – dootrzewnowo, n – liczebność osobników, NaCl – chlorek sodu, *p.o.* – dożołądkowo, Sac – sakubitryl.

Spośród czterech włączonych do badania pilotażowego osobników, jeden padł przed wykonaniem procedur z doby 29 i nie został z tego powodu uwzględniony w dalszej analizie. Mediana TL badanych zwierząt wyniosła 40 (39-40,25) mm, natomiast mediana HW/TL – 0,28 (0,27-0,29) g/10 mm. Porównanie wartości parametrów ocenianych u zwierząt w 1 oraz 29 dobie badania przedstawiono w Tabeli 16. Natomiast porównanie parametrów z 29 doby badania uzyskanych w badaniu pilotażowym do parametrów obserwowanych w grupie kontrolnej Części II przedstawiono w Tabeli 17. Badanie histopatologiczne wykazało wyraźnie niski stopień nasilenia histopatologicznego uszkodzenia śródsierdzia - mediana sumy przyznanych punktów wyniosła 2 (1,5-2,5). Najczęściej obserwowanym wykładnikiem uszkodzenia miokardium był naciek komórek jednojądrzastych o niewielkim nasileniu (mediana przyznanych punktów - 2). Wakuolizacja kardiomiocytów występowała na najniższym stopniu nasilenia (1 punkt) jedynie u jednego z badanych osobników, u pozostałych dwóch nie zaobserwowano wymienionych zmian. Podobnie, zwłóknienie śródmiąższowe występowało na najniższym stopniu nasilenia (1 punkt) jedynie u jednego, innego osobnika, a u pozostałych dwóch nie zaobserwowano występowania wymienionych zmian.

Tabela 16. Parametry oceniane w badaniu pilotażowym w 1 oraz 29 dobie badania.

Parametr	Doba 1	Doba 29
BW/TL [g/10mm]	81,25 (78,16-83,78)	78,25 (76,56-79,81)
LVIDs [mm]	4 (4-4)	4 (4-4,5)
LVIDd [mm]	7 (7-7,17)	7,33 (7-7,67)
LVFS [%]	42,86 (42,86-44,16)	40,00 (38,75-42,73)
LVEF [%]	72,59 (72,59-73,96)	69,40 (67,54-72,36)
SV/TL [mL/10mm]	0,071 (0,071-0,079)	0,07 (0,063-0,076)
CO/TL [mL/10mm]	21,52 (21,23-23,74)	16,68 (15,62-18,68)
HR [1/min]	305 (296,17-310)	242,67 (241,17-248)
QRS [ms]	26,75 (26,38-27,13)	28 (27,5-28,5)
QTc [ms]	65,24 (63,93-66,73)	65,51 (63,99-68)

Dane przedstawiono jako medianę \pm IQR. *BW* – masa ciała, *CO* – pojemność minutowa serca, *HR* – rytm serca, *HW* – masa serca, *LVEF* – frakcja wyrzutowa lewej komory serca, *LVFS* – frakcja skracania lewej komory serca, *LVIDd* – wymiar późnorozkurczowy lewej komory serca, *LVIDs* – wymiar późnoskurczowy lewej komory serca, *QTc* – skorygowany czas trwania odstępu *QT*, *SV* – objętość wyrzutowa lewej komory serca, *TL* - długość kości piszczelowej.

Tabela 17. Wartości parametrów ocenianych w badaniu pilotażowym (Sac) w porównaniu do grupy kontrolnej z Części II badania (NaCl *p.o.*).

Parametr	Grupa	
	Sac	NaCl <i>p.o.</i>
TL [mm]	40 (39-40,25)	39 (39-40)
BW/TL w 29 dobie [g/10mm]	78,25 (76,56-79,81)	66,5 (60,55-69,73)
HW [g/10mm]	0,28 (0,27-0,29)	0,21 (0,19-0,22)
LVIDs w 29 dobie [mm]	4 (4-4,5)	5 (4,83-5)
LVIDd w 29 dobie [mm]	7,33 (7-7,67)	7 (7-7,33)
LVFS w 29 dobie [%]	40,00 (38,75-42,73)	33,33 (28,57-34,70)
LVEF w 29 dobie [%]	69,40 (67,54-72,36)	60,59 (53,71-62,27)
SV/TL w 29 dobie [mL/10mm]	0,07 (0,063-0,076)	0,06 (0,053-0,072)
CO/TL w 29 dobie [mL/10mm]	16,68 (15,62-18,68)	13,60 (12,65-15,28)
HR w 29 dobie [1/min]	242,67 (241,17-248)	213,67 (204,67-248)
QRS w 29 dobie [ms]	28 (27,5-28,5)	28 (26-32,5)
QTc w 29 dobie [ms]	65,51 (63,99-68)	68,69 (67,29-69,32)
Indeks HP	2 (1,5-2,5)	10 (9-13)

Dane przedstawiono jako medianę \pm IQR. *BW* – masa ciała, *CO* – pojemność minutowa serca, *HR* – rytm serca, *HW* – masa serca, *LVEF* – frakcja wyrzutowa lewej komory serca, *LVFS* – frakcja skracania lewej komory serca, *LVIDd* – wymiar późnorozkurczowy lewej komory serca, *LVIDs* – wymiar późnoskurczowy lewej komory serca, *QTc* – skorygowany czas trwania odstępu *QT*, *SV* – objętość wyrzutowa lewej komory serca, *TL* - długość kości piszczelowej.

5. DYSKUSJA

Analiza danych pochodzących z badań przeprowadzonych na zwierzęcych modelach AIC, szczególnie w przypadku modeli kardi toksyczności przewlekłej, utrudniona jest przez znaczną różnorodność stosowanych przez badaczy schematów indukcji kardi toksyczności oraz brak jednolitych definicji umożliwiających definitywne stwierdzenie wystąpienia zaburzeń kurczliwości LV. W nawiązaniu do wytycznych ICOS (2022) i ESC (2022) definiujących wystąpienie CTRCD w praktyce klinicznej, u zwierząt doświadczalnych nie ustalono krytycznych wartości LVEF, które umożliwiłyby rozpoznanie dysfunkcji skurczowej LV wywołanej podaniem antracyklin. W związku z obserwowanymi u zdrowych szczurów w spoczynku wartościami LVEF znacznie przekraczającymi spoczynkowe wartości LVEF występujące fizjologicznie u człowieka [257], zastosowanie wytycznych określających wystąpienie CTRCD u ludzi nie pozwoliłoby na adekwatne rozpoznanie wystąpienia dysfunkcji skurczowej LV u szczura.

We wspomnianym wyżej przeglądzie systematycznym przeprowadzonym przez Georgiadis i wsp. (2020) wykazano, że w znacznej większości badań doświadczalnych wykorzystujących szczurzy model AIC, pod wpływem podania DOX uzyskuje się spadek LVEF o 10-40% względem wartości wyjściowych [63]. W przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej doświadczeniach, we wszystkich grupach zwierząt otrzymujących DOX, z wyłączeniem grup poddanych dodatkowo dożołądkowej terapii substancjami o właściwościach kardioprotekcyjnych, osiągnięto obniżenie średnich wartości LVEF zgodne z wymienionym zakresem. Uzasadnionym wydaje się zatem stwierdzenie, że wykorzystane w niniejszej pracy doktorskiej modele zwierzęce, zarówno kardi toksyczności ostrej jak i przewlekłej, pozwoliły na uzyskanie adekwatnego efektu kardi toksycznego, zgodnego z tym opisywanym w pracach innych badaczy.

Warto podkreślić jednak, że wykorzystany w niniejszej pracy doktorskiej sposób oszacowania LVEF, stosowany szeroko przez innych badaczy w zwierzęcych modelach chorób układu krążenia, pozostaje pomiarem obciążonym niedokładnością [257]. W związku z utrudnionymi warunkami badania związanymi z niewielkim rozmiarem szczurzych serc i wysokimi spoczynkowymi wartościami HR, oszacowania tego dokonano na podstawie wymiarów wewnętrznych LV uzyskanych w projekcji przymostkowej w osi krótkiej w trybie obrazowania M-mode. Sposób ten rejestruje skurcz serca jedynie w jednej płaszczyźnie przestrzennej w osi krótkiej, bez udziału skurczu podłużnego. Ponadto, obliczenia opierają się na założeniach geometrycznych, że forma przestrzenna LV jest zmodyfikowaną elipsoidą, co może nie stanowić dokładnego przybliżenia. Przybliżenie to jest jednak szczególnie

niedokładne w przypadku odcinkowych zaburzeń kurczliwości LV, które nie występują typowo w AIC i nie były obserwowane u zwierząt doświadczalnych wykorzystanych w niniejszej pracy. Celem zwiększenia dokładności charakterystyki funkcji skurczowej LV, w zestawieniu z LVEF oceniono także szereg innych parametrów: LVFS, SV/TL oraz CO/TL [257], których pomiar obciążony jest mniejszym błędem i które w pracy własnej wykazywały trendy spójne i analogiczne do tych obserwowanych w przypadku LVEF.

5.1. Część Ia – model ostrej AIC

W Części Ia niniejszej pracy doktorskiej zastosowano zwierzęcy model AIC, który celem zapewnienia porównywalnych warunków doświadczalnych uzyskano zgodnie z powszechnie opisywanymi w literaturze schematami indukcji ostrej postaci AIC u szczurów [68-70]. Celem oceny zjawisk zachodzących w obrębie mięśnia sercowego w bezpośrednim następstwie toksycznego uszkodzenia, badacze wykorzystują krótkie okresy obserwacji od czasu podania DOX (24-48 godziny od podania leku) [68-70, 264]. Zgodnie z tym, w niniejszej pracy doktorskiej zwierzęta doświadczalne poddano uśmierceniowi po upływie doby od iniekcji DOX *i.p.* w wysokiej dawce 20 mg/kg BW.

5.1.1. Ogólna charakterystyka zwierząt

Wykorzystane w niniejszej pracy doktorskiej zwierzęta w modelu ostrej postaci AIC w grupie doświadczalnej i kontrolnej były do siebie podobne w zakresie podstawowych parametrów - nie wykazywały różnic w zakresie TL (Rycina 8) oraz BW/TL (Rycina 9). Śmiertelność zwierząt w grupie doświadczalnej wyniosła 12,5% (Tabela 9) - zbliżone wartości raportowane były również przez innych badaczy stosujących podobny model, sięgając od około 3% do 25% [265, 266].

W Części Ia niniejszej pracy pomiędzy grupami zwierząt nie zaobserwowano różnic w zakresie HW/TL (Rycina 10), co wiązać można z zastosowanym w badaniu krótkim okresem obserwacji, nie pozostawiającym czasu na dokonanie się zmian atroficznych i przebudowy mięśnia sercowego pod wpływem jego toksycznego uszkodzenia. Dane literaturowe dotyczące zmian masy serca w ciągu krótkiego okresu obserwacji wydają się potwierdzać tę obserwację. Zgodnie z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy doktorskiej, w badaniach przeprowadzonych przez Polegato i wsp. (2015) oraz Carvalho i wsp. (2016) nie zaobserwowano zmian masy LV w czasie 48 godzin od iniekcji antracykliny [69, 267]. Podobnie, Wang i wsp. (2015) nie zaobserwowali istotnych zmian w zakresie masy LV zmierzonej podczas przekłatkowego badania echokardiograficznego wykonanego w ciągu trzech dni od iniekcji DOX [268]. Natomiast Mantawy i wsp. (2014) w czasie 48 godzin od

podania DOX w dawce 15 mg/kg BW zaobserwowali istotnie niższe średnie wartości całkowitej masy serca [269]. Z kolei Mathias i wsp. (2019) zaobserwowali niższe bezwzględne wartości masy LV po 24 godzinach od iniekcji DOX i jednocześnie wyższe wartości stosunku masy LV do BW [68]. Ta ostatnia zależność wynikała prawdopodobnie z niższej masy ciała zwierząt otrzymujących DOX, u których obserwowano ograniczone przyjmowanie płynów i paszy w trakcie badania.

5.1.2. Parametry echokardiograficzne

Wykorzystane w niniejszej pracy doktorskiej zwierzęta w modelu ostrej AIC w 1 dobie badania nie różniły się pomiędzy grupami w zakresie LVIDd (Rycina 11.B), HR (Rycina 13.A) oraz stosunku SV/TL (Rycina 13.B) i CO/TL (Rycina 13.C). W grupie doświadczalnej w 1 dobie badania zaobserwowano jednak niższe wartości LVIDs (Rycina 11.A), co przełożyło się na obserwowane w tej grupie wyższe wartości LVFS oraz LVEF (Rycina 12) w porównaniu do grupy kontrolnej. W obu grupach wartości tych parametrów pozostawały jednak w zakresie normy obserwowanej w badaniach echokardiograficznych przeprowadzonych u zdrowych szczurów [63, 257], stąd w świetle podobieństwa pod względem innych wymienionych parametrów (SV/TL, CO/TL), obserwowane rozbieżności wynikały najprawdopodobniej z chwilowych różnic w napięciu współczulnej części układu nerwowego zwierząt, nie stanowiąc o istnieniu zasadniczych różnic w funkcji skurczowej LV między grupami.

W niniejszej pracy doktorskiej podanie DOX w formie jednokrotnej iniekcji *i.p.* w ciągu 24 godzin spowodowało istotne obniżenie echokardiograficznych wykładników kurczliwości LV. W drugiej dobie badania w grupie doświadczalnej odnotowano istotne obniżenie średnich wartości LVFS o 21,95% oraz LVEF o 14,29%. Ponadto, pomimo braku istotnych różnic w zakresie stosunku SV/TL i HR, w grupie doświadczalnej zaobserwowano istotne obniżenie wartości stosunku CO/TL o 21,38%. Obserwacje te pozostają spójne z danymi literaturowymi dotyczącymi ostrego wpływu podania wysokiej dawki DOX na echokardiograficzne wykładniki wydolności skurczowej LV serca u szczurów. Wielu badaczy odnotowało gwałtowne zmiany wartości tych parametrów w ciągu kilkudziesięciu godzin od iniekcji DOX. Mathias i wsp. (2019) zaobserwowali istotne zwiększenie LVIDs przy zachowanym LVIDd oraz obniżenie LVEF w ciągu 48 godzin od jednorazowej iniekcji DOX w dawce 20 mg/kg BW [68]. Podobnie, Polegato i wsp. (2015) odnotowali istotne obniżenie LVFS, LVEF i CO u zwierząt doświadczalnych w ciągu 48 godzin od jednorazowej iniekcji DOX w dawce 20 mg/kg BW [70]. Zbliżone obserwacje uzyskali także Wang i wsp. (2015) w 3 dobie od iniekcji DOX w dawce 15 mg/kg BW [268]. W przeciwieństwie do przytoczonych badań, Carvalho

i wsp. (2016) nie zaobserwowali istotnych zmian LVEF i LVFS u szczurów w ciągu 48h od iniekcji DOX w dawce 20 mg/kg BW [69]. Zaobserwowano jedynie obniżenie LVIDd, co powiązano ze słabym wypełnieniem łożyska naczyniowego zwierząt, u których występowało obniżone przyjmowanie płynów i paszy.

5.1.3. Ocena histopatologiczna

W niniejszej pracy doktorskiej w materiale tkankowym uzyskanym w ciągu 24 godzin od podania DOX, w badaniu histopatologicznym zaobserwowano wysoki stopień nasilenia zwyrodnienia kardiomiocytów w postaci wakuolizacji ich cytoplazmy, przy mniejszym znaczeniu nacieków zapalnych i zwłóknienia śródmiąższowego (Rycina 14; Tabela 10). Wyniku takiego oczekiwano w związku z zastosowanym w badaniu krótkim okresem obserwacji, nie zapewniającym czasu na pojawienie się odpowiedzi zapalnej i przebudowy mięśnia sercowego. Wyniki te zgodne są z danymi literaturowymi, wskazującymi że jednym z najwcześniejszych mikroskopowych objawów wystąpienia AIC jest zaburzenie struktury komórkowej kardiomiocytów z ich wakuolizacją i zanikiem miofibrili [51]. Obserwacje płynące z prac innych badaczy, w których dokonano oceny histopatologicznej śródserdca po jednokrotnej iniekcji DOX w wysokiej dawce, potwierdzają obserwację, że zmiany te mogą dokonać się już w ciągu kilkudziesięciu godzin od podania leku [264, 266, 269].

5.1.4. Ekspresja mRNA, poziom białka i aktywność NEP w LV

W niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy oceniono zmiany dotyczące tkankowej ekspresji mRNA, poziomu białka i aktywności enzymatycznej NEP w obrębie lewej komory mięśnia sercowego w zwierzęcym modelu ostrej AIC. W badaniu własnym w materiale tkankowym uzyskanym po upływie doby od iniekcji DOX nie zaobserwowano istotnych zmian w zakresie tkankowej ekspresji mRNA (Rycina 15) oraz poziomu białka NEP (Rycina 16) w obrębie LV. Podanie DOX wiązało się jednak z istotnym obniżeniem aktywności enzymatycznej NEP w tej tkance (Rycina 17).

Aktywność enzymatyczna NEP regulowana może być przez szereg modyfikacji potranslacyjnych, takich jak glikozylacja [270], fosforylacja [271, 272], N-mirystylacja [273] czy sialilacja [274]. W szerokim zakresie układów tkankowych wykazano również, że aktywność NEP regulowana jest także przez warunki hipoksji. NEP bierze udział w odpowiedzi chemoreceptorów kłębków szyjnych na obniżenie ciśnienia parcjalnego tlenu we krwi tętniczej poprzez hydrolizę substancji P [275, 276]. Carpenter i wsp. (2001) zaobserwowali obniżoną aktywność enzymatyczną NEP w płucach oraz nerkach szczurów szczepu SPRD poddanych wpływowi hipoksji [277]. W wymienionym badaniu obniżenie aktywności enzymatycznej NEP

oraz zahamowanie ekspresji jej mRNA w obrębie tkanki płucnej obserwowano już w ciągu 24 godzin od zaistnienia warunków hipoksemicznych.

Obniżoną aktywność NEP zaobserwowano również w badaniu przeprowadzonym *in vitro* w linii komórkowej nerwiaka zarodkowego współczulnego NB-7, szczurzych neuronach korowych oraz szczurzych astrocytach poddanych wpływowi hipoksji oraz stresu oksydacyjnego [278]. Wang i wsp. (2011) zaobserwowane w warunkach hipoksji obniżenie aktywności NEP w mysich neuronach korowych powiązali ze zwiększonym stopniem metylacji oraz obniżonym stopniem acetylacji białek histonowych w okolicy promotora genu NEP [279]. W innym badaniu przeprowadzonym w linii komórkowej nerwiaka zarodkowego współczulnego SH-SY5Y wykazano jednak, że komórki poddane wpływowi przewlekłej hipoksji wykazywały obniżoną aktywność enzymatyczną NEP również przy braku zmian ekspresji jej genu [280]. Z kolei Mitra i wsp. (2013) zaobserwowali obniżoną aktywność NEP w warunkach hipoksji w linii komórkowej raka prostaty, co powiązano z oddziaływaniem czynnika indukowanego hipoksją 1 (HIF1 α) z trzema elementami odpowiedzi na hipoksję ulokowanymi w pobliżu promotora genu NEP [281].

Warunki hipoksji, szczególnie w przypadku umiarkowanie ograniczonej dostępności tlenu, wiążą się z nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu i wolnych rodników, a w efekcie do pojawienia się nasilonego stresu oksydacyjnego [282]. Z tego względu można domniemywać, że odpowiedź komórkowa na warunki hipoksji może być zbliżona do odpowiedzi na inne czynniki wywołujące stres oksydacyjny w odrębnym mechanizmie. Stres oksydacyjny uważany jest za jeden z podstawowych mechanizmów toksycznego uszkodzenia kardiomiocytów w wyniku podania antracyklin. Zgodnie z tym, istnieją doniesienia o zwiększonej aktywności HIF1 α w kardiomiocytach myszy oraz szczurów poddanych wpływowi DOX [283, 284]. Ponadto, w szczurzym modelu ostrej AIC wykazano, że nasilony stres oksydacyjny w obrębie mięśnia sercowego występuje już w ciągu kilkudziesięciu godzin od podania leku [269]. Prawdopodobnym wydaje się zatem, że zaobserwowane w niniejszej pracy doktorskiej obniżenie aktywności NEP w obrębie mięśnia sercowego w odpowiedzi na toksyczne uszkodzenie pod wpływem podania DOX może być powiązane z obserwowaną w innych tkankach i komórkach odpowiedzią na stan hipoksji. Pogłębienie zrozumienia tego zjawiska wymaga dalszych badań w tym zakresie.

Ponadto, aktywność enzymatyczna NEP, jako enzymu błonowego, ulegać może zmianom związanym z zaburzeniem struktury błony komórkowej kardiomiocytów pod wpływem toksycznego działania DOX, związanego z nasilonymi zmianami degeneracyjnymi w obrębie tych komórek obserwowanymi w badaniu histopatologicznym [285].

Obniżenie tkankowej aktywności NEP w obrębie mięśnia sercowego związane z podaniem antracyklin może wiązać się z kardioprotekcyjnym efektem zwiększonej biodostępności peptydów natriuretycznych. W niniejszej pracy doktorskiej, w modelu ostrej AIC, nie zaobserwowano jednak istotnych zależności między aktywnością enzymatyczną, poziomem białka i ekspresją mRNA NEP w LV a stopniem nasilenia zmian obserwowanych w badaniu histopatologicznym i echokardiograficznym. Obniżenie tkankowej aktywności enzymatycznej NEP w obrębie mięśnia sercowego w ciągu pierwszych kilkunastu godzin od podania DOX nie wydaje się mieć zatem istotnego wpływu ochronnego przed ostrym toksycznym uszkodzeniem miokardium.

5.1.5. Stężenie sNEP w surowicy

W niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy oceniono zmiany stężenia sNEP w surowicy zwierząt w modelu ostrej postaci AIC. W pracy nie zaobserwowano wpływu podania DOX na stężenie sNEP w surowicy szczurów z grupy doświadczalnej (Rycina 18). Nie wykryto również istotnych korelacji między stężeniem sNEP a echokardiograficznymi wykładnikami kurczliwości LV oraz sumarycznym indeksem histopatologicznego uszkodzenia śródsierdza, uwzględniającego nasilenie zmian degeneracyjnych, stopień zwłóknienia śródmiąższowego oraz obecność nacieków komórek jednojądrzastych (Rycina 19.A). Natomiast w grupie zwierząt otrzymujących DOX zaobserwowano silną dodatnią korelację między stężeniem sNEP w surowicy a stopniem nasilenia zmian degeneracyjnych kardiomiocytów w postaci wakuolizacji ich cytoplazmy (Rycina 19.B), które stanowiły główny wykładnik histopatologicznego uszkodzenia śródsierdza obserwowany w tym punkcie czasowym. Zaobserwowana korelacja wskazuje na prawdopodobną rolę tej formy enzymu w procesach patofizjologicznych związanych z AIC. Krążąca we krwi sNEP posiada aktywność enzymatyczną, podobnie jak forma związana z błoną komórkową, prowadząc do ograniczenia biodostępności peptydów natriuretycznych [286]. Wymieniona zależność może wynikać zatem z zaostżenia toksycznego wpływu DOX na mięsień sercowy przy obniżonej aktywności NP, o uznanym działaniu kardioprotekcyjnym.

Dane literaturowe dotyczące zmian stężenia sNEP we krwi w ostrej fazie chorób układu krążenia i korelacji tego parametru z ciężkością uszkodzenia śródsierdza pozostają znacznie ograniczone. Bernelin i wsp. (2019) nie zaobserwowali różnic w stężeniu sNEP we krwi pacjentów we wczesnej fazie zawału mięśnia sercowego z uniesieniem odcinka ST w porównaniu do jednego miesiąca po MI [190]. Nie stwierdzono również związku między stężeniem sNEP a rozległością MI, nasileniem wykładników stanu zapalnego (stężenie białka C-reaktywnego, IL-6, liczba leukocytów we krwi), a także wynikami leczenia w ciągu roku od

MI. Z kolei Zelniker i wsp. (2020) wykazali, że wyższe stężenie sNEP we krwi pacjentów po pozaszpitalnym nagłym zatrzymaniu krążenia zmierzone przy przyjęciu do szpitala wiązało się z wyższym ryzykiem zgonu z jakiegokolwiek przyczyny [192].

5.2. Część Ib – model kardiotoksyczności przewlekłej

W Części Ib niniejszej pracy doktorskiej, celem oceny zjawisk zachodzących w obrębie mięśnia sercowego w następstwie długotrwałego narażenia na DOX, zastosowano zwierzęcy model przewlekłej postaci AIC. Aby zapewnić porównywalne warunki doświadczalne, w pracy wykorzystano jeden z chętnie stosowanych przez innych badaczy schematów indukcji przewlekłej AIC poprzez cotygodniowe iniekcje DOX *i.p.* [287-293].

5.2.1. Ogólna charakterystyka zwierząt

Wykorzystane w niniejszej pracy doktorskiej zwierzęta w modelu przewlekłej postaci AIC w grupie doświadczalnej i kontrolnej były do siebie zbliżone w zakresie podstawowych parametrów - nie wykazywały różnic pod kątem TL (Rycina 20) oraz BW/TL (Rycina 21) w 1 dobie badania. Śmiertelność zwierząt w grupie doświadczalnej, poddanej cotygodniowym iniekcjom DOX, wyniosła 36,36% (Tabela 11). Dane literaturowe pochodzące z prac wykorzystujących szczurzy model przewlekłej AIC wskazują na szeroki zakres obserwowanej śmiertelności zwierząt, która opisywana była na poziomie od około 14% do nawet 45% zwierząt [294-300].

W badaniu własnym w grupie zwierząt otrzymujących DOX w trakcie trwania badania zaobserwowano istotny spadek stosunku BW/TL o 21,33% (Rycina 21). Inni badacze stosujący modele przewlekłej AIC opisywali wyraźny spadek BW zwierząt w trakcie trwania doświadczenia w zbliżonym zakresie od 19% do ok. 33% [51, 298, 301-303]. Obserwacja ta jest powszechnie wiązana z wyniszczeniem zwierząt związanym z postępującą niewydolnością serca, niewydolnością wątroby oraz toksycznością jelitową występującymi pod wpływem podania DOX.

W niniejszej pracy doktorskiej w grupie zwierząt otrzymujących DOX zaobserwowano także istotnie niższe wartości stosunku HW/TL w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 22). Dane literaturowe pochodzące z badań stosujących zbliżony zwierzęcy model przewlekłej AIC są zróżnicowane, natomiast większość z nich potwierdza obserwacje z pracy doktorskiej. Miyoshi i wsp. (2022) oraz Sacco i wsp. (2001) zaobserwowali istotny statystycznie spadek bezwzględnej wartości HW pod wpływem przewlekłego podania DOX [242, 289]. Z kolei Xiang i wsp. (2009) odnotowali stałe wartości stosunku HW/BW, co przy jednocześnie opisanym istotnym obniżeniu wartości BW pozwala wnioskować o towarzyszącemu temu

spadkowi HW [296]. W nieco odmiennym modelu przewlekłej AIC, w którym zwierzęta otrzymywały DOX w niższej dawce w codziennych iniekcjach przez okres 10 dni, a następnie podane zostały kilkutygodniowej obserwacji, Medeiros-Lima i wsp. (2019) zaobserwowali istotne obniżenie stosunku masy LV do TL już w ciągu tygodnia od ostatniej iniekcji DOX [301]. Obserwacje te najczęściej wiązano z ogólnym wyniszczeniem i kacheksją zwierząt poddanych wpływowi DOX, u których, podobnie jak w niniejszej pracy doktorskiej, obserwowano istotny spadek BW. Obserwowane obniżenie HW związane z podaniem antracyklin wiąże się także najprawdopodobniej z postępującą atrofią toksycznie uszkodzonych kardiomiocytów [304]. Inni badacze u zwierząt poddanych cotygodniowym iniekcjom DOX zaobserwowali jednak wzrost stosunku HW/TL [302, 305], czy wzrost stosunku masy LV do masy prawej komory serca [306], a różnice w obserwacjach powiązać można najprawdopodobniej z wystąpieniem obrzęku toksycznie uszkodzonych tkanek mięśnia sercowego w pracach przeprowadzonych przez tych badaczy.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej pozostają spójne z obserwacjami płynącymi z badań przeprowadzonych z wykorzystaniem badania rezonansu magnetycznego serca u pacjentów poddanych chemioterapii opartej o antracykliny, u których wykazano istotne obniżenie masy LV w populacji zarówno dorosłych [307, 308], jak i pediatrycznej [309].

5.2.2. Parametry echokardiograficzne

Wykorzystane w niniejszej pracy doktorskiej zwierzęta w modelu przewlekłej AIC nie wykazywały różnic w zakresie wymiarów wewnętrznych LV (LVIDs, LVIDd); (Rycina 23), LVFS i LVEF (Rycina 24) oraz HR, SV/TL i CO/TL (Rycina 25) w 1 dobie badania. W ostatniej dobie w grupie zwierząt otrzymujących DOX zaobserwowano istotne wyższe wartości LVIDs w porównaniu do grupy kontrolnej, przy zachowanej wartości LVIDd (Rycina 23). Zmiany te przełożyły się na odnotowane w tej grupie istotne obniżenie średnich wartości LVFS o 22,77% oraz LVEF o 14,71% (Rycina 24). Obserwacje te pozostają spójne z danymi literaturowymi dotyczącymi przewlekłego wpływu podania DOX na echokardiograficzne wykładniki funkcji skurczowej LV u szczurów [300, 302, 303, 306]. W niektórych z badań wykorzystujących zwierzęcy model przewlekłej AIC obserwowano także istotne zwiększenie LVIDd [296, 300], wskazujące na rozwój poantracyklinowej kardiomiopatii rozstrzeniowej. Z kolei inni badacze u zwierząt otrzymujących DOX zaobserwowali istotnie niższe wartości LVIDd [306], które wiązać można z obniżeniem całkowitej objętości krwi krążącej z powodu ich odwodnienia i niedożywienia [310]. Prawdopodobnym jest zatem, że obserwowany w pracy własnej brak zmian LVIDd związanych z podaniem DOX wynikać może z jednoczesnego wystąpienia obu tych zjawisk.

W niniejszej pracy doktorskiej u zwierząt poddanych wpływowi DOX zaobserwowano także istotne obniżenie średnich wartości stosunku SV/TL o 21,92% oraz HR o 25,81%, w efekcie czego wystąpiło także znaczne obniżenie CO/TL o 42,1% w porównaniu do 1 doby badania (Rycina 25). Wyniki te dodatkowo potwierdzają wystąpienie dysfunkcji skurczowej toksycznie uszkodzonego miokardium i zgodne są z danymi literaturowymi dotyczącymi wpływu podania antracyklin na wymienione parametry u szczurów [51, 296].

5.2.3. Ocena histopatologiczna

W Części Ib niniejszej pracy doktorskiej wyniki badania histopatologicznego wykazały wystąpienie istotnego uszkodzenia miokardium związanego z przewlekłą ekspozycją na DOX (Rycina 26). W pracy obserwowano przede wszystkim wysoki stopień nasilenia zwłóknienia śródmiąższowego oraz nacieków komórek jednojądrzastych, przy mniejszym nasileniu zmian degeneracyjnych kardiomiocytów (Tabela 12). W przeprowadzonym przez Cove-Smith i wsp. (2014) szeroko zakrojonym badaniu dotyczącym histopatologicznej charakterystyki serc szczurów poddanych przewlekłemu wpływowi DOX odnotowano stopniowy wzrost nasilenia nacieków komórek zapalnych począwszy od 4 tygodnia od pierwszej iniekcji DOX, natomiast ogniska zwłóknienia śródserdza obserwowano od 2 miesiąca badania [51]. Zgodnie z wynikami pracy własnej, dane uzyskane przez innych badaczy wskazują jednak, że zwłóknienie śródmiąższowe śródserdza związane z podaniem antracyklin zaobserwować można wcześniej, już w ciągu trzech bądź czterech tygodni od pierwszego podania leku [302, 305, 306]. Różnice w czasie wystąpienia wymienionych odchyleń w badaniu patomorfologicznym powiązać można z wykorzystaniem w wymienionych badaniach różnych schematów podania DOX.

5.2.4. Ekspresja mRNA, poziom białka i aktywność NEP w LV

W niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy oceniono zmiany dotyczące tkankowej ekspresji mRNA, poziomu białka i aktywności NEP w obrębie LV w zwierzęcym modelu przewlekłej AIC. W badaniu nie zaobserwowano istotnych zmian w zakresie tkankowej ekspresji mRNA (Rycina 27) oraz aktywności enzymatycznej NEP (Rycina 29) w obrębie LV. Przewlekła ekspozycja na DOX wiązała się jednak z istotnie obniżonym tkankowym poziomem białka NEP w obrębie LV (Rycina 28).

Tkankowa ekspresja NEP podlega wpływowi szeregu czynników takich jak estrogeny [311], androgeny [312], somatostatyna [313], witamina D₃ [314], czy opisany wyżej stan hipoksji. Dane literaturowe dotyczące zmian ekspresji NEP w obrębie mięśnia sercowego w chorobach układu krążenia pozostają ograniczone do dwóch badań. W badaniu

przeprowadzonym przez Arrigo i wsp. (2018) w materiale pobranym od pacjentów z idiopatyczną kardiomiopatią rozstrzeniową i HFrEF wykazano 1,5-krotne zwiększenie ekspresji mRNA NEP w obrębie LV. Z kolei Pavo i wsp. (2020) dokonali oceny zmian ekspresji i aktywności NEP w zwierzęcym modelu pozawałowej HF [183]. W badaniu zastosowano model HFrEF, uzyskany dzięki indukcji rozległego zawału LV u świń, i oceniono różnice w ekspresji mRNA, poziomie białka oraz aktywności enzymatycznej NEP w szerokim zakresie tkanek, w tym mięśniu sercowym, korze czołowej, nerkach i dwunastnicy. Autorzy zaobserwowali ogólnoustrojowe obniżenie ekspresji mRNA, poziomu białka i aktywności NEP w warunkach pozawałowej HF, szczególnie zaznaczone w obrębie kory czołowej, dwunastnicy oraz nerki. W obrębie LV zaobserwowano natomiast obniżenie aktywności enzymatycznej i poziomu białka NEP przy braku znaczących różnic w zakresie ekspresji mRNA enzymu, co zgodne jest z obserwacjami uzyskanymi w niniejszej pracy doktorskiej. Co istotne, opisane wyżej badania dotyczyły HF o innej etiologii, co może być przyczyną uzyskania w nich rozbieżnych obserwacji.

W świetle wielu poznanych czynników oddziałujących na tkankową ekspresję, poziom i aktywność enzymatyczną NEP, zaobserwowane przez Pavo i wsp. (2020) ogólnoustrojowe zmniejszenie aktywności i ekspresji NEP w pozawałowej HF, w zestawieniu z wynikami pracy własnej, świadczą o możliwym istnieniu potencjalnie kardioprotekcyjnego zjawiska mającego na celu zwiększenie dostępności peptydów natriuretycznych w kontekście rozwijającej się HF. HF w swojej istocie prowadzi do dysproporcji między zapotrzebowaniem tkanek na tlen a jego podażą z krwią, związanej z obniżoną pojemnością minutową serca [315]. Możliwe jest zatem, że rozwijająca się na tym tle tkankowa hipoksja i wynikający z niej stres oksydacyjny prowadzi do ogólnoustrojowego zahamowania ekspresji NEP w warunkach HF, w tym w obrębie LV.

W niniejszej pracy doktorskiej, w modelu przewlekłej AIC, nie zaobserwowano jednak istotnych zależności między aktywnością enzymatyczną, poziomem białka i ekspresją mRNA NEP w LV a stopniem nasilenia zmian obserwowanych w badaniu histopatologicznym i echokardiograficznym. Obniżenie tkankowego poziomu NEP w obrębie mięśnia sercowego związanego z przewlekłą ekspozycją na DOX nie wydaje się mieć zatem istotnego wpływu ochronnego przed uszkodzeniem miokardium.

5.2.5. Stężenie sNEP w surowicy

W niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy oceniono zmiany stężenia sNEP w surowicy zwierząt w modelu przewlekłej postaci AIC. W badaniu nie zaobserwowano różnic w stężeniu sNEP w surowicy zwierząt doświadczalnych pomiędzy grupami (Rycina 30). Nie zaobserwowano również korelacji między stężeniem sNEP a histopatologicznym stopniem

uszkodzenia mięśnia sercowego, ani żadnej z ocenianych składowych. W kontekście obserwacji dokonanych w Części Ia badania, w modelu ostrej AIC, stężenie sNEP w surowicy wydaje się korelować jedynie ze stopniem nasilenia zmian degeneracyjnych kardiomiocytów w początkowych etapach rozwoju AIC. Wraz z upływem czasu, gdy zmiany te tracą na znaczeniu w porównaniu do pozostałych wykładników uszkodzenia miokardium, korelacja ta prawdopodobnie zanika.

W badaniu własnym w grupie zwierząt otrzymujących DOX wykazano natomiast obecność silnej ujemnej korelacji między stężeniem sNEP we krwi a wartościami stosunku SV/TL (Rycina 32) oraz CO/TL (Rycina 32). Istotnych korelacji nie zaobserwowano jednak między stężeniem sNEP w surowicy a wartościami LVEF i LVFS (Rycina 31). Wyniki te wydają się spójne z tymi uzyskanymi przez innych badaczy w badaniach przeprowadzonych na kohortach pacjentów z HFrEF. Bayes-Genis i wsp. (2015) wykazali, że wyższe stężenie sNEP we krwi chorych z HFrEF stanowiło czynnik ryzyka hospitalizacji oraz śmierci z przyczyn sercowo-naczyniowych, jednocześnie bez istotnych korelacji ze stopniem obniżenia LVEF [187]. Podobnie, Nunez i wsp. (2017) w grupie pacjentów z HFrEF opisali podwyższone stężenie sNEP we krwi jako czynnik ryzyka hospitalizacji z jakiegokolwiek przyczyny, przy braku korelacji między stężeniem sNEP a ciężkością dysfunkcji skurczowej LV [188].

Zaobserwowana w niniejszej pracy doktorskiej korelacja stężenia sNEP w surowicy z niektórymi parametrami echokardiograficznymi wskazuje na prawdopodobną rolę tej formy enzymu w procesach patofizjologicznych związanych z AIC. Wymieniona zależność może wynikać zatem z zaostrzenia dysfunkcji mięśnia sercowego związanej z przewlekłą ekspozycją na DOX obniżonej aktywności peptydów natriuretycznych, o uznanym działaniu kardioprotekcyjnym.

5.3. Część II

W niniejszej pracy doktorskiej oceniono efekty zastosowania sakubitrylu/walsartanu w niskiej dawce (20 mg/kg BW) na nasilenie echokardiograficznych, elektrokardiograficznych, histopatologicznych i biochemicznych wykładników uszkodzenia mięśnia sercowego u szczura w modelu przewlekłej AIC. Indukcję przewlekłej AIC wykonano zgodnie ze schematem zastosowanym w Części Ib niniejszej pracy. Celem ograniczenia przedwczesnej śmiertelności zwierząt w Części II zdecydowano o redukcji dawki DOX o 20% do 4 mg/kg BW/tydzień.

5.3.1. Ogólna charakterystyka zwierząt

Wykorzystane w Części II niniejszej pracy doktorskiej zwierzęta nie różniły się pomiędzy grupami w zakresie podstawowych parametrów takich jak TL (Rycina 34) oraz

BW/TL (Rycina 35) w 1 dobie badania. W trakcie trwania badania nie zaobserwowano wpływu podania sakubitrylu/walsartanu na przeżycie zwierząt - śmiertelność wyniosła 12,5% zarówno w grupie doświadczalnej jak i kontrolnej (Tabela 13). Ponadto, podanie sakubitrylu/walsartanu w niskiej dawce nie zapobiegło utracie masy ciała związanej z ekspozycją na DOX (Rycina 35). Brak efektu nie jest jednak prawdopodobnie związany z zastosowaniem w niniejszej pracy niższej dawki leku, ponieważ obserwacja ta zgodna jest z wynikami uzyskanymi przez Miyoshi i wsp. (2022) w szczurzym modelu AIC z zastosowaniem tego leku w standardowej dawce [242].

W pracy własnej nie zaobserwowano również różnic w zakresie HW/TL pomiędzy grupami (Rycina 36). Podobnie, Kim i wsp. (2022) nie zaobserwowali różnic w zakresie stosunku HW do BW między zwierzętami otrzymującymi i nie otrzymującymi sakubitrylu/walsartanu [316]. Z kolei Miyoshi i wsp. (2022) odnotowali, że bezwzględna wartość HW oraz stosunek HW/BW w grupie otrzymującej sakubitrylu/walsartanu były niższe niż w grupie zwierząt otrzymujących jedynie DOX [242].

5.3.2. Parametry echokardiograficzne

W Części II niniejszej pracy doktorskiej nie zaobserwowano zmian w zakresie wymiarów wewnętrznych LV w trakcie trwania badania w żadnej z grup zwierząt (Rycina 37). Jest to wynik odmienny od uzyskanego w Części Ib, najprawdopodobniej związany z redukcją dawki DOX zastosowanej w tej części badania. W grupie kontrolnej zaobserwowano istotny statystycznie spadek wartości zarówno LVFS jak i LVEF (Rycina 38) oraz SV/TL i CO/TL (Rycina 39). Dożołądkowe podanie sakubitrylu/walsartanu w niskiej dawce w grupie doświadczalnej zapobiegło obniżeniu średnich wartości wymienionych parametrów echokardiograficznych, z wyjątkiem CO/TL (Rycina 38; Rycina 39). Jednakże, przy zachowanej wartości SV/TL, obserwowane w tej grupie obniżenie pojemności minutowej serca wynikało przede wszystkim z istotnie niższego rytmu serca obserwowanego u tych zwierząt w ostatniej dobie badania (Rycina 39). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy są spójne z obserwacjami płynącymi z badań przeprowadzonych na zwierzęcych modelach AIC, wskazujących na ochronny wpływ zastosowania sakubitrylu/walsartanu w wysokiej dawce przed wystąpieniem objawów skurczowej dysfunkcji LV w badaniu echokardiograficznym [95, 241, 250].

5.3.3. Parametry elektrokardiograficzne

Zmiany obserwowane w badaniu elektrokardiograficznym u szczurów poddanych wpływowi DOX typowo obejmują wydłużenie odstępu QT oraz poszerzenie zespołu QRS

[317]. W niniejszej pracy doktorskiej, pomimo tendencji w tym kierunku, nie zaobserwowano istotnego statystycznie wydłużenia skorygowanego czasu trwania odstępu QT oraz poszerzenia zespołu QRS w żadnej z grup zwierząt otrzymujących DOX (Tabela 14). W przeglądzie literatury dostępne są dwa badania dotyczące wpływu zastosowania sakubitrylu/walsartanu na zmiany w badaniu elektrokardiograficznym obserwowane w zwierzęcych modelach AIC [243, 251]. Dindas i wsp. (2021) w mysim modelu wykazali, że obserwowane wśród zwierząt otrzymujących DOX zmiany w EKG – wydłużenie odstępu QT, wydłużenie odstępu PQ oraz poszerzenie zespołu QRS – nie występowały u zwierząt otrzymujących jednocześnie sakubitryl/walsartan [243]. Podobnie, Yu i wsp. (2021), w króliczym modelu AIC, zaobserwowali brak wydłużenia odstępu QT i poszerzenia zespołu QRS u zwierząt otrzymujących sakubitryl/walsartan [251].

5.3.4. Ocena histopatologiczna

W niniejszej pracy doktorskiej dożołądkowe podanie sakubitrylu/walsartanu związane było z istotnie statystycznie niższymi wartościami histopatologicznego indeksu uszkodzenia miokardium w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej (Rycina 40). Efekt ten wyrażony był przede wszystkim poprzez znaczne ograniczenie stopnia zwłóknienia śródmiąższowego miokardium oraz nacieków komórek jednojądrzastych (Tabela 15). Wyniki badań przeprowadzonych na zwierzęcych modelach AIC spójnie wskazują na ochronny wpływ zastosowania farmakoterapii z zastosowaniem sakubitrylu/walsartanu w standardowej dawce przed wystąpieniem histopatologicznych wykładników przewlekłego uszkodzenia śródsierdzia takich jak zmiany degeneracyjne kardiomiocytów czy zwłóknienie śródmiąższowe [95, 239, 241, 242, 250, 318]. Ponadto, w badaniach doświadczalnych na modelach zwierzęcych wykazano działanie ochronne tego połączenia lekowego przed rozwojem reakcji zapalnej w obrębie miokardium, w formie obniżenia tkankowego poziomu cytokin prozapalnych takich jak TNF- α , IL-1 czy IL-6 [95, 243] oraz ograniczenia występowania nacieków komórek jednojądrzastych stwierdzanych w badaniu histopatologicznym [241].

5.3.5. Biochemiczne parametry z surowicy

W niniejszej pracy doktorskiej dożołądkowe podanie sakubitrylu/walsartanu związane było z istotnie niższymi wartościami stężenia cTnI w surowicy zwierząt doświadczalnych w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 41.A). Obserwacje innych badaczy potwierdzają występowanie istotnie niższych wartości stężenia troponin sercowych u zwierząt w przewlekłym modelu AIC przy jednoczesnym zastosowaniu farmakoterapii sakubitrylem/walsartanem. Kim i wsp. (2022) zaobserwowali niższe wartości stężenia cTnI

w surowicy zwierząt doświadczalnych otrzymujących sakubitryl/walsartan w standardowej dawce w modelu przewlekłej AIC [316]. Podobnie, Miyoshi i wsp. (2022) odnotowali niższe wartości stężenia cTnT w surowicy zwierząt doświadczalnych otrzymujących sakubitryl/walsartan w standardowej dawce [242].

W pracy własnej pomiędzy grupami nie zaobserwowano natomiast różnic w zakresie stężenia NT-proBNP w surowicy (Rycina 41.B). Inni badacze wykazali występowanie istotnie niższych wartości stężenia NT-proBNP we krwi u zwierząt w przewlekłym modelu AIC przy jednoczesnym zastosowaniu farmakoterapii sakubitrylem/walsartanem w standardowej dawce [243, 250, 251, 316], czego nie zaobserwowano w pracy własnej. W opublikowanej w ostatnim roku metaanalizie uwzględniającej dane pochodzące z 61 badań przeprowadzonych wśród pacjentów przyjmujących chemioterapię opartą na antracyklinach wykazano jednak, że podwyższone stężenie troponin sercowych, a nie BNP czy NT-proBNP, wykazuje korelację z ryzykiem późniejszego wystąpienia CTRCD i jest aktualnie uznawane za podstawowy biomarker ryzyka AIC [106].

5.3.6. Obserwacje z badania pilotażowego

W ramach badania pilotażowego uwzględnionego w Części II doświadczenia dokonano wstępnej oceny potencjalnych efektów zastosowania sakubitrylu w monoterapii na stopień nasilenia zmian w badaniu echokardiograficznym i w zwierzęcym modelu przewlekłej AIC. Zgodnie z przeglądem literatury, jest to pierwszy dostępny opis zastosowania NEPI w pierwotnej prewencji AIC. W związku z ograniczoną liczbą uwzględnionych osobników, nie podejmowano jednak analizy statystycznej uzyskanych w tej grupie wyników.

Wartości stosunku BW/TL u zwierząt z tej grupy w 1 oraz ostatniej dobie badania pozostawały zbliżone (Tabela 16). Ponadto obserwowane wartości stosunku HW/TL u zwierząt były zbliżone do tych obserwowanych u osobników z grupy kontrolnej Części Ib, nie otrzymujących DOX. Uzyskane w tej grupie wyniki wskazują także na zbliżone wartości LVEF, LVFS, oraz SV/TL uzyskanych w 1 oraz ostatniej dobie doświadczenia u zwierząt otrzymujących sakubitryl w monoterapii. Ponadto, w badaniu histopatologicznym fragmentów LV zaobserwowano wyraźnie niskie nasilenie wykładników toksycznego uszkodzenia śródsierdza.

Obserwowane w niniejszej pracy efekty podania sakubitrylu w monoterapii wzbudzają zainteresowanie potencjalną rolą NEPI w pierwotnej prewencji AIC. Szczególnie interesujące wydają się obserwowane efekty monoterapii sakubitrylem na BW/TL i HW/TL, których nie obserwowano w przypadku zastosowania połączenia lekowego ARNI w grupie doświadczalnej w Części II. Próby zastosowania NEPI w HF czy innych patologich układu krążenia

zahamowane zostały zniechęcającymi wynikami opisanych we wstępie niniejszej pracy doktorskiej badań klinicznych [210, 211]. Jednakże aktualnie inny lek z grupy NEPI – racekadotril – znajduje zastosowanie wśród pacjentów leczonych onkologicznie w ramach terapii biegunki związanej z chemioterapią [319, 320]. W świetle dokonanych w niniejszej pracy doktorskiej obserwacji zasadnym wydaje się zatem podjęcie dalszych badań dotyczących efektywności NEPI w pierwotnej prewencji AIC.

6. WNIOSKI

Część Ia:

1. Jednokrotne podanie DOX wywiera hamujące działanie na aktywność enzymatyczną NEP w obrębie LV w ciągu 24 godzin od iniekcji leku u szczura.
2. Obniżenie aktywności enzymatycznej NEP w obrębie LV związane z podaniem DOX nie wydaje się wpływać na stopień nasilenia zmian w badaniu echokardiograficznym i histopatologicznym spowodowanych toksycznym uszkodzeniem mięśnia sercowego u szczura w modelu ostrej AIC.
3. Wydaje się, że krążąca we krwi sNEP uczestniczy w procesach patofizjologicznych związanych z rozwojem kardiotoxyczności wkrótce po podaniu DOX, w związku z obserwowaną w pracy silną dodatnią korelacją między stężeniem sNEP w surowicy a nasileniem zmian degeneracyjnych kardiomiocytów w badaniu histopatologicznym.
4. W związku z brakiem zmian w zakresie średnich wartości stężenia sNEP w surowicy zwierząt otrzymujących DOX w porównaniu do grupy kontrolnej, sNEP nie stanowi prawdopodobnie użytecznego biomarkera w ostrej postaci AIC.

Część Ib:

1. Przewlekła ekspozycja na DOX wykazuje hamujący wpływ na poziom białka NEP w obrębie LV u szczura.
2. Obniżenie poziomu białka NEP w obrębie LV związane z przewlekłą ekspozycją DOX nie wydaje się wpływać na stopień nasilenia zmian w badaniu echokardiograficznym i histopatologicznym spowodowanych toksycznym uszkodzeniem mięśnia sercowego u szczura w modelu przewlekłej AIC.
3. Wydaje się, że krążąca we krwi sNEP uczestniczy w procesach patofizjologicznych związanych z rozwojem kardiotoxyczności wkrótce po podaniu DOX, w związku z obserwowaną w pracy silną ujemną korelacją między stężeniem sNEP w surowicy a wartościami SV/TL oraz CO/TL u szczura.
4. W związku z brakiem zmian w zakresie średnich wartości stężenia sNEP w surowicy zwierząt otrzymujących DOX w porównaniu do grupy kontrolnej, sNEP nie stanowi prawdopodobnie użytecznego biomarkera w przewlekłej postaci AIC.

Część II:

1. Sakubitryl/walsartan w dawce 20 mg/kg BW/d wydaje się mieć ochronne działanie przed wystąpieniem uszkodzenia mięśnia sercowego w szczurzym modelu przewlekłej AIC, w związku z obserwowanym w niniejszej pracy ograniczeniem zmian w badaniu echokardiograficznym, histopatologicznym oraz niższym stężeniem cTnI w grupie zwierząt otrzymujących lek.

PODSUMOWANIE

W pracy doktorskiej wykazano, że neprylizyna odgrywa rolę w rozwoju zwierzęcego modelu kardiotoksyczności antracyklin. ARNI w niskiej może mieć uzasadnienie w pierwotnej profilaktyce AIC u pacjentów onkologicznych przy braku tolerancji wysokich dawek leku. W związku z zachęcającymi wynikami badania pilotażowego przeprowadzonego w ramach niniejszej pracy, ocena roli monoterapii NEPI w pierwotnej prewencji AIC wymaga dalszych badań w tym zakresie

7. OGRANICZENIA PRACY

Niniejsza praca doktorska charakteryzuje się kilkoma ograniczeniami. W związku z ograniczeniami technicznymi związanymi z wykorzystaniem szczurzego modelu, celem indukcji kardiotoxyczności antracyklin zastosowano podanie doksorubicyny drogą dootrzewnową, która odbiega od tej stosowanej w praktyce klinicznej. Jest to jednak droga podania powszechnie wykorzystywana przez innych badaczy w zwierzęcych modelach AIC, zapewniająca wystarczającą biodostępność leku w obrębie tkanek mięśnia sercowego celem wywołania kardiotoxyczności.

Ponadto, zastosowany w niniejszej pracy doktorskiej sposób pomiaru LVEF, związany z ograniczeniami technicznymi badania echokardiograficznego u szczura, charakteryzuje się wysokim stopniem niedokładności. Celem dokładnego scharakteryzowania funkcji skurczowej LV w niniejszej pracy oceniono jednak szereg dodatkowych parametrów echokardiograficznych, które wykazywały tendencje spójne do tych obserwowanych w przypadku LVEF. Kolejne ograniczenie dotyczące tego parametru dotyczy braku definicji umożliwiających jednoznaczne rozpoznanie wystąpienia dysfunkcji skurczowej LV u zwierząt laboratoryjnych. Uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej obniżenie średnich wartości LVEF pod wpływem podania DOX były jednak spójne ze znaczną większością obserwacji z prac przeprowadzonych przez innych badaczy w szczurzych modelach AIC.

W niniejszej pracy doktorskiej, pomimo licznych prób i kontaktu z producentem stosowanego zestawu, nie udało się uzyskać pomiaru aktywności enzymatycznej sNEP w surowicy. Ograniczenie to związane jest przede wszystkim z brakiem walidacji w tym zastosowaniu dostępnych komercyjnie zestawów służących ocenie aktywności neprylizyny. W badaniu dysponowano jednak pomiarem stężenia sNEP w surowicy.

PIŚMIENICTWO

1. Martins-Teixeira, M. B., Carvalho, I. "Antitumour Anthracyclines: Progress and Perspectives." *ChemMedChem* 15, no. 11 (2020): 933-48.
2. Cardoso, F., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rubio, I. T., Zackrisson, S., Senkus E. "Early Breast Cancer: Esmo Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up." *Annals of Onc* 30, no. 8 (2019): 1194-220.
3. Powles, T., Bellmunt, J., Comperat, E., De Santis, M., Huddart, R., Loriot, Y., Necchi, A., Valderrama, B. P., Ravaud, A., Shariat S. F. i wsp. "Bladder Cancer: Esmo Clinical Practice Guideline for Diagnosis, Treatment and Follow-up." *Annals of Onc* 33, no. 3 (2022): 244-58.
4. Strauss, S. J., Frezza, A. M., Abecassis, N., Bajpai, J., Bauer, S., Biagini, R., Bielack, S., Blay, J. Y., Bolle, S., Bonvalot S. i wsp. "Bone Sarcomas: ESMO Clinical Practice Guideline for Diagnosis, Treatment and Follow-up." *Annals of Onc* 32, no. 12 (2021): 1520-36.
5. Gronchi, A., Miah, A. B., Dei Tos, A. P., Abecassis, N., Bajpai, J., Bauer, S., Biagini, R., Bielack, S., Blay, J. Y., Bolle S. i wsp. "Soft Tissue and Visceral Sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up." *Annals of Onc* 32, no. 11 (2021): 1348-65.
6. Eichenauer, D. A., Aleman, B. M. P., André, M., Federico, M., Hutchings, M., Illidge, T., Engert, A., Ladetto M. "Hodgkin Lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up." *Annals of Onc* 29 (2018): iv19-iv29.
7. Dreyling, M., Ghielmini, M., Rule, S., Salles, G., Ladetto, M., Tonino, S. H., Herfarth, K., Seymour, J. F., Jerkeman, M. "Newly Diagnosed and Relapsed Follicular Lymphoma: Esmo Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up." *Annals of Onc* 32, no. 3 (2021): 298-308.
8. Vitolo, U., Seymour, J. F., Martelli, M., Illerhaus, G., Illidge, T., Zucca, E., Campo, E., Ladetto, M. "Extranodal Diffuse Large B-Cell Lymphoma (Dlbcl) and Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up." *Annals of Onc* 27 (2016): v91-v102.
9. Tilly, H., Gomes da Silva, M., Vitolo, U., Jack, A., Meignan, M., Lopez-Guillermo, A., Walewski, J., André, M., Johnson, P.W., Pfreundschuh, M. i wsp. "Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up." *Annals of Onc* 26 (2015): v116-v25.
10. Hoelzer, D., Bassan, R., Dombret, H., Fielding, A., Ribera, J. M., Buske, M. C. "Acute Lymphoblastic Leukaemia in Adult Patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up." *Annals of Onc* 27 (2016): v69-v82.

11. Brown, P., Inaba, H., Annesley, C., Beck, J., Colace, S., Dallas, M., DeSantes, K., Kelly, K., Kitko, C., Lacayo N. i wsp. "Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology" *J Natl Compr Canc Netw* 18, no. 1 (2020): 81-112.
12. Kazanowska, B., Węclawek-Tompol, J., Klepacka, T., Szulc, A., Godziński, J. "Standardy Postępowania W Mięsakach Tkanek Miękkich." *Przegl Pediatr* 48, no. 3 (2019): 99-108.
13. Feijen, E. A. M., Leisenring, W. M., Stratton, K. L., Ness, K. K., van der Pal, H. J. H., van Dalen, E. C., Armstrong, G. T., Aune, G. J., Green, D. M., Hudson M. M. i wsp. "Derivation of Anthracycline and Anthraquinone Equivalence Ratios to Doxorubicin for Late-Onset Cardiotoxicity." *JAMA Oncol* 5, no. 6 (2019): 864-71.
14. Cardinale, D., Iacopo, F., Cipolla, C. M. "Cardiotoxicity of Anthracyclines." *Front Cardiovasc Med* 7 (2020): 26.
15. McMurray, J. J. V., Packer, M., Desai, A. S., Gong, J., Lefkowitz, M. P., Rizkala, A. R., Rouleau, J. L., Shi, V. C., Solomon, S. D., Swedberg, K. i wsp. "Angiotensin–Neprilysin Inhibition Versus Enalapril in Heart Failure." *N Engl J Med* 371, no. 11 (2014): 993-1004.
16. McDonagh, T. A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R. S., Baumbach, A., Böhm, M., Burri, H., Butler, J., Čelutkienė, J., Chioncel, O. i wsp. "2021 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure." *Eur Heart J* 42, no. 36 (2021): 3599-726.
17. Chuda, A., Lelonek, M. "Kandydat Do Nowej Terapii Niewydolności Serca Z Obniżoną Frakcją Wyrzutową — ARNI (Angiotensin Receptor-Nephrylysin Inhibitor). Przewodnik Kliniky." *Folia Cardiologica* 12, no. 4 (2017): 397-404.
18. Herrmann, J., Lenihan, D., S. Armenian, S., Barac, A., Blaes, A., Cardinale, D., Carver, J., Dent, S., Ky, B., Lyon, A. R. i wsp. "Defining Cardiovascular Toxicities of Cancer Therapies: An International Cardio-Oncology Society (IC-OS) Consensus Statement." *Eur Heart J* 43, no. 4 (2022): 280-99.
19. Lyon, A. R., López-Fernández, T., Couch, L. S., Asteggiano, R., Aznar, M. C., Bergler-Klein, J., Boriani, G., Cardinale, D., Cordoba, R., Cosyns B. i wsp. "2022 ESC Guidelines on Cardio-Oncology Developed in Collaboration with the European Hematology Association (EHA), the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO) and the International Cardio-Oncology Society (IC-OS): Developed by the Task Force on Cardio-Oncology of the European Society of Cardiology (ESC)." *Eur Heart J* (2022).
20. Neumann, D., Korzeniowska, K., Jankowski, J., Jabłeczka, A. "Kardiotoksyczność Leczenia Przeciwnowotworowego." *Choroby Serca i Naczyń* 13, no. 6 (2016): 434-44.
21. Lipshultz, S. E., Karnik, R., Sambatakos, P., Franco, V. I., Ross, S. W., Miller, T. L. "Anthracycline-Related Cardiotoxicity in Childhood Cancer Survivors." *Curr Opin Cardiol* 29, no. 1 (2014): 103-12.

22. Dazzi, H., Kaufmann, K., Follath, F. "Anthracycline-Induced Acute Cardiotoxicity in Adults Treated for Leukaemia. Analysis of the Clinico-Pathological Aspects of Documented Acute Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in Patients Treated for Acute Leukaemia at the University Hospital of Zürich, Switzerland, between 1990 and 1996." *Ann Oncol* 12, no. 7 (2001): 963-6.
23. Kamphuis, J. A. M., Linschoten, M., Cramer, M. J., Doevendans, P. A., Asselbergs, F. W., Teske, A. J. "Early- and Late Anthracycline-Induced Cardiac Dysfunction: Echocardiographic Characterization and Response to Heart Failure Therapy." *Cardio-Oncology* 6, no. 1 (2020): 23.
24. Cardinale, D., Colombo, A., Bacchiani, G., Tedeschi, I., Meroni, C. A., Veglia, F., Civelli, M., Lamantia, G., Colombo, N., Curigliano G. i wsp. "Early Detection of Anthracycline Cardiotoxicity and Improvement with Heart Failure Therapy." *Circulation* 131, no. 22 (2015): 1981-8.
25. Khan, A. A., Ashraf, A., Singh, R., Rahim, A., Rostom, W., Hussain, M., Renner, I., Collins., N. J. "Incidence, Time of Occurrence and Response to Heart Failure Therapy in Patients with Anthracycline Cardiotoxicity." *Intern Med J* 47, no. 1 (2017): 104-09.
26. Nakayama, T., Oshima, Y., Kusumoto, S., Osaga, S., Yamamoto, J., Wakami, K., Goto, T., Sugiura, T., Seo, Y., Iida S. i wsp. "Clinical Features, Risk Factors, and Prognosis of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in Patients with Malignant Lymphoma Who Received a Chop Like Regimen." *Eur Heart J* 41, no. Supplement 2 (2020).
27. Japp, A. G., Gulati, A., Cook, S. A., Cowie, M. R., Prasad. S. K. "The Diagnosis and Evaluation of Dilated Cardiomyopathy." *J Am Coll Cardiol* 67, no. 25 (2016): 2996-3010.
28. Wang, H., Xiao, X., Xiao, Q., Lu, Y., Wu, Y. "The Efficacy and Safety of Daunorubicin Versus Idarubicin Combined with Cytarabine for Induction Therapy in Acute Myeloid Leukemia: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials." *Medicine* 99, no. 24 (2020): e20094.
29. Owattanapanich, W., Owattanapanich, N., Kungwankiattichai, S., Ungprasert, P., Ruchutrakool, P. "Efficacy and Toxicity of Idarubicin Versus High-Dose Daunorubicin for Induction Chemotherapy in Adult Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 18, no. 12 (2018): 814-21.e3.
30. Von Hoff, D. D., Layard, M. W., Basa, P., Davis, Jr., H. L., Von Hoff, A. L., Rozenzweig, M., Muggia. F. M. "Risk Factors for Doxorubicin-Induced Congestive Heart Failure." *Ann Intern Med* 91, no. 5 (1979): 710-7.
31. Swain, S. M., Whaley, F. S., Ewer, M. S. "Congestive Heart Failure in Patients Treated with Doxorubicin: A Retrospective Analysis of Three Trials." *Cancer* 97, no. 11 (2003): 2869-79.

32. Qiu, S., Zhou, T., Qiu, B., Zhang, Y., Zhou, Y., Yu, H., Zhang, J., Liu, L., Yuan, L., Yang G. i wsp. "Risk Factors for Anthracycline-Induced Cardiotoxicity." *Front Cardiovasc Med* 8 (2021): 736854.
33. Lunning, M. A., Kutty, S., Rome, E. T., Li, L., Padiyath, A., Loberiza, F., Bociek, R. G., Bierman, P. J., Vose, J. M., Armitage J. O. i wsp. "Cardiac Magnetic Resonance Imaging for the Assessment of the Myocardium after Doxorubicin-Based Chemotherapy." *Am J Clin Oncol* 38, no. 4 (2015): 377-81.
34. Thavendiranathan, P., Wintersperger, B. J., Flamm, S. D., Marwick, T. H. "Cardiac MRI in the Assessment of Cardiac Injury and Toxicity from Cancer Chemotherapy." *Circ Cardiovasc Imaging* 6, no. 6 (2013): 1080-91.
35. Mancilla, T. R., Iskra, B., Aune., G. J. "Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Children." *Compr Physiol* 9, no. 3 (2019): 905-31.
36. Harake, D., Franco, V. I., Henkel, J. M., Miller, T. L., Lipshultz. S. E. "Cardiotoxicity in Childhood Cancer Survivors: Strategies for Prevention and Management." *Future Cardiol* 8, no. 4 (2012): 647-70.
37. Mulrooney, D. A., Yeazel, M. W., Kawashima, T., Mertens, A. C., Mitby, P., Stovall, M., Donaldson, S. S., Green, D. M., Sklar, C. A., Robison L. L. i wsp. "Cardiac Outcomes in a Cohort of Adult Survivors of Childhood and Adolescent Cancer: Retrospective Analysis of the Childhood Cancer Survivor Study Cohort." *BMJ* 339 (2009): b4606.
38. Tan, V. Z. Z., Chan, N. M., Ang, W. L., Mya, S. N., Chan, M. Y., Chen, C. K. "Cardiotoxicity after Anthracycline Chemotherapy for Childhood Cancer in a Multiethnic Asian Population." *Front Pediatr* 9 (2021): 639603.
39. Nathan, P., Kulkarni, K., MacDonald, T. "Incidence and Risk Factors of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in Long-Term Survivors of Pediatric Cancer: A Population Based Cohort Study." *Pediatr Hematol Oncol J.* 7, no. 4 (2022): 136-41.
40. Hudson, M. M., Ness, K. K., Nolan, V. G., Armstrong, G. T., Green, D. M., Morris, E. B., Spunt, S. L., Metzger, M. L., Krull, K. R., Klosky J. L. i wsp. "Prospective Medical Assessment of Adults Surviving Childhood Cancer: Study Design, Cohort Characteristics, and Feasibility of the St. Jude Lifetime Cohort Study." *Pediatr Blood Cancer* 56, no. 5 (2011): 825-36.
41. Mulrooney, D. A., Armstrong, G. T., Huang, S., Ness, K. K., Ehrhardt, M. J., Joshi, V. M., Plana, J. C., Soliman, E. Z., Green, D. M., Srivastava D. i wsp. "Cardiac Outcomes in Adult Survivors of Childhood Cancer Exposed to Cardiotoxic Therapy: A Cross-Sectional Study." *Ann Intern Med* 164, no. 2 (2016): 93-101.
42. Lefrak, E. A., Pitha, J., Rosenheim, S. Gottlieb, J. A. "A Clinicopathologic Analysis of Adriamycin Cardiotoxicity." *Cancer* 32, no. 2 (1973): 302-14.

43. Conroy, B., Guthrie, W. "Endocardial Fibroelastosis Associated with Fatal Adriamycin (Doxorubicin) Cardiomyopathy During Treatment of Ewing's Sarcoma." *Scott Med J* 28, no. 3 (1983): 295-9.
44. Billingham, M. E., Mason, J. W., Bristow, M. R., Daniels, J. R. "Anthracycline Cardiomyopathy Monitored by Morphologic Changes." *Cancer Treat Rep* 62, no. 6 (1978): 865-72.
45. Ewer, M. S., Ali, M. K., Mackay, B., Wallace, S., Valdivieso, M., Legha, S. S., Benjamin, R. S., Haynie, T. P. "A Comparison of Cardiac Biopsy Grades and Ejection Fraction Estimations in Patients Receiving Adriamycin." *J Clin Oncol* 2, no. 2 (1984): 112-7.
46. Mortensen, S. A., Olsen, H. S., Baandrup, U. "Chronic Anthracycline Cardiotoxicity: Haemodynamic and Histopathological Manifestations Suggesting a Restrictive Endomyocardial Disease." *Br Heart J* 55, no. 3 (1986): 274-82.
47. Bristow, M. R., Mason, J. W., Billingham, M. E., Daniels, J. R. "Dose-Effect and Structure-Function Relationships in Doxorubicin Cardiomyopathy." *Am Heart J* 102, no. 4 (1981): 709-18.
48. Bouhour, J. B., Petitier, H., Delajartre, A. Y., Fumoleau, P., Rozo, L., Nicolas, G. "[Endomyocardial Biopsy as a Method of Surveilling Adriamycin Cardiac Toxicity. 28 Biopsies in 26 Patients]." *Arch Mal Coeur Vaiss* 76, no. 11 (1983): 1277-83.
49. Jordan, J. H., Castellino, S. M., Meléndez, G. C., Klepin, H. D., Ellis, L. R., Lamar, Z., Vasu, S., Kitzman, D. W., Ntim, W. O., Brubaker P. H. i wsp. "Left Ventricular Mass Change after Anthracycline Chemotherapy." *Circ Heart Fail* 11, no. 7 (2018): e004560.
50. Ferreira de Souza, T., Silva A. C., Quinaglia, T., Osorio Costa, F., Shah, R., Neilan, T. G., Velloso, L., Nadruz, W., Brenelli, F., Sposito, A. C., Matos-Souza J. R. i wsp. "Anthracycline Therapy Is Associated with Cardiomyocyte Atrophy and Preclinical Manifestations of Heart disease." *JACC Cardiovasc Imaging* 11, no. 8 (2018): 1045-55.
51. Cove-Smith, L., Woodhouse, N., Hargreaves, A., Kirk, J., Smith, S., Price, S. A., Galvin, M., Betts, C. J., Brocklehurst, S., Backen A. i wsp. "An Integrated Characterization of Serological, Pathological, and Functional Events in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity." *Toxicol Sci* 140, no. 1 (2014): 3-15.
52. Zaragoza, C., Gomez-Guerrero, C., Martin-Ventura, J. L., Blanco-Colio, L., Lavin, B., Mallavia, B., Tarin, C., Mas, S., Ortiz, A., Egido, J. "Animal Models of Cardiovascular Diseases." *J Biomed Biotechnol* (2011): 497841.
53. Jia, T., Wang, C., Han, Z., Wang, X., Ding, M., Wang, Q. "Experimental Rodent Models of Cardiovascular Diseases." *Front Cardiovasc Med* 7 (2020): 588075.

54. Milani-Nejad, N., Janssen, P. M. "Small and Large Animal Models in Cardiac Contraction Research: Advantages and Disadvantages." *Pharmacol Ther* 141, no. 3 (2014): 235-49.
55. Krishnan, A., Samtani, R., Dhanantwari, P., Lee, E., Yamada, S., Shiota, K., Donofrio, M. T., Leatherbury, L., Lo, C. W. "A Detailed Comparison of Mouse and Human Cardiac Development." *Pediatr Res* 76, no. 6 (2014): 500-7.
56. Janssen, P. M., Periasamy, M. "Determinants of Frequency-Dependent Contraction and Relaxation of Mammalian Myocardium." *J Mol Cell Cardiol* 43, no. 5 (2007): 523-31.
57. Zhu, N., Suarez-Lopez, J. R., Sidney, S., Sternfeld, B., Schreiner, P. J., Carnethon, M. R., Lewis, C. E., Crow, R. S., Bouchard, C., Haskell, W. L. i wsp. "Longitudinal Examination of Age-Predicted Symptom-Limited Exercise Maximum Hr." *Med Sci Sports Exerc* 42, no. 8 (2010): 1519-27.
58. Nerbonne, J. M. "Studying Cardiac Arrhythmias in the Mouse - a Reasonable Model for Probing Mechanisms?" *Trends Cardiovasc Med* 14, no. 3 (2004): 83-93.
59. Malmqvist, U. P., Aronshtam, A., Lowey, S. "Cardiac Myosin Isoforms from Different Species Have Unique Enzymatic and Mechanical Properties." *Biochemistry* 43, no. 47 (2004): 15058-65.
60. Cazorla, O., Freiburg, A., Helmes, M., Centner, T., McNabb, M., Wu, Y., Trombitás, K., Labeit, S., Granzier, H. "Differential Expression of Cardiac Titin Isoforms and Modulation of Cellular Stiffness." *Circ Res* 86, no. 1 (2000): 59-67.
61. Riehle, C., Bauersachs, J. "Small Animal Models of Heart Failure." *Cardiovasc Res* 115, no. 13 (2019): 1838-49.
62. Podyacheva, E. Y., Kushnareva, E. A., Karpov, A. A., Toropova, Y. G. "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 (2021): 670479.
63. Georgiadis, N., Tsarouhas, K., Rezaee, R., Nepka, H., Kass, G. E. N., Dorne, J., C. M., Stagkos, D., Toutouzas, K., Spandidos, D. A., Kouretas D. i wsp. "What Is Considered Cardiotoxicity of Anthracyclines in Animal Studies." *Oncol Rep* 44, no. 3 (2020): 798-818.
64. Turner, P. V., Brabb, T., Pekow, C., Vasbinder, M. A. "Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider." *J Am Assoc Lab Anim Sci* 50, no. 5 (2011): 600-13.
65. Coria-Avila, G. A., Gavrila, A. M., Ménard, S., Ismail, N., Pfaus, J. G. "Cecum Location in Rats and the Implications for Intraperitoneal Injections." *Lab Animal* 36, no. 7 (2007): 25-30.
66. Al Shoyaib, A., Archie, S. R., Karamyan, V. T. "Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should It Be Used in Experimental Animal Studies?" *Pharm Res* 37, no. 1 (2019): 12.

67. Johansen, P. B. "Doxorubicin Pharmacokinetics after Intravenous and Intraperitoneal Administration in the Nude Mouse." *Cancer Chemother Pharmacol* 5, no. 4 (1981): 267-70.
68. Mathias, L., Alegre, P. H. C., Dos Santos, I. O. F., Bachiega, T., Figueiredo, A. M., Chiuso-Minicucci, F., Fernandes, A. A., Bazan, S. G. Z., Minicucci, M. F., Azevedo, P. S. i wsp. "Euterpe Oleracea Mart. (Açaí) Supplementation Attenuates Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats." *Cell Physiol Biochem* 53, no. 2 (2019): 388-99.
69. Carvalho, P. B., Gonçalves, A. F., Alegre, P. H., Azevedo, P. S., Roscani, M. G., Bergamasco, C. M., Modesto, P. N., Fernandes, A. A., Minicucci, M. F., Paiva, S. A. i wsp. "Pamidronate Attenuates Oxidative Stress and Energetic Metabolism Changes but Worsens Functional Outcomes in Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats." *Cell Physiol Biochem* 40, no. 3-4 (2016): 431-42.
70. Polegato, B. F., Minicucci, M. F., Azevedo, P. S., Carvalho, R. F., Chiuso-Minicucci, F., Pereira, E. J., Paiva, S. A., Zornoff, L. A., Okoshi, M. P., Matsubara, B. B. i wsp. "Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity Is Associated with Matrix Metalloproteinase-2 Alterations in Rats." *Cell Physiol Biochem* 35, no. 5 (2015): 1924-33.
71. Mostafa, M. G., Mima, T., Ohnishi, S. T., Mori, K. "S-Allylcysteine Ameliorates Doxorubicin Toxicity in the Heart and Liver in Mice." *Planta Med* 66, no. 2 (2000): 148-51.
72. Pontes, J. C., Gomes Junior, J. F., Silva, G. V., Benfatti, R. A., Dias, A. E., Duarte, J. J., Gardenal, N., Odashiro, M., Santos, C. H. "Anatomopathological Study of Cardiomyopathy Induced by Doxorubicin in Rats." *Acta Cir Bras* 25, no. 2 (2010): 137-43.
73. Manish, S., Shrutika, S., Prasad, D. P., Sonika, C. "Molecular-Level Understanding of the Anticancer Action Mechanism of Anthracyclines." *Advances in Precision Medicine Oncology*, 2020.
74. Marinello, J., Delcuratolo, M., Capranico, G. "Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives." *Int J Mol Sci* 19, no. 11 (2018).
75. Nitiss, J. L. "DNA Topoisomerase II and Its Growing Repertoire of Biological Functions." *Nat Rev Cancer*. 9, no. 5 (2009): 327-37.
76. Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalfe, T., Lu, L. S., Lyu, Y. L., Liu, L. F., Yeh, E. T. "Identification of the Molecular Basis of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity." *Nat Med* 18, no. 11 (2012): 1639-42.
77. D'Oria, R., Schipani, R., Leonardini, A., Natalicchio, A., Perrini, S., Cignarelli, A., Laviola, L., Giorgino, F. "The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor." *Oxid Med Cell Longev* 2020 (2020): 5732956.

78. Aryal, B., Rao, V. A. "Deficiency in Cardiolipin Reduces Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in Human B-Lymphocytes." *PLoS One* 11, no. 7 (2016): e0158376.
79. Fogli, S., Nieri, P., Breschi, M. C. "The Role of Nitric Oxide in Anthracycline Toxicity and Prospects for Pharmacologic Prevention of Cardiac Damage." 18, no. 6 (2004): 664-75.
80. Ichikawa, Y., Ghanefar, M., Bayeva, M., Wu, R., Khechaduri, A., Naga Prasad, S. V., Mutharasan, R. K., Naik, T. J., Ardehali, H. "Cardiotoxicity of Doxorubicin Is Mediated through Mitochondrial Iron Accumulation." *J Clin Invest* 124, no. 2 (2014): 617-30.
81. Catanzaro, M. P., Weiner, A., Kaminaris, A., Li, C., Cai, F., Zhao, F., Kobayashi, S., Kobayashi, T., Huang, Y., Sesaki, H. i wsp. "Doxorubicin-Induced Cardiomyocyte Death Is Mediated by Unchecked Mitochondrial Fission and Mitophagy." *Faseb J* 33, no. 10 (2019): 11096-108.
82. Osataphan, N., Phrommintikul, A., Chattipakorn, S. C., Chattipakorn, N. "Effects of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity on Cardiac Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial Function: Insights for Future Interventions." *J Cell Mol Med* 24, no. 12 (2020): 6534-57.
83. Sobczuk, P., Czerwińska, M., Kleibert, M., Cudnoch-Jędrzejewska, A. "Anthracycline-Induced Cardiotoxicity and Renin-Angiotensin-Aldosterone System-from Molecular Mechanisms to Therapeutic Applications." *Heart Fail Rev* 27, no. 1 (2022): 295-319.
84. Bagchi, A. K., Malik, A., Akolkar, G., Zimmer, A., Belló-Klein, A., De Angelis, K., Jassal, D. S., Fini, M. A., Stenmark, K. R., Singal, P. K. "Study of Er Stress and Apoptotic Proteins in the Heart and Tumor Exposed to Doxorubicin." *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1868, no. 7 (2021): 119039.
85. Ivanová, M., Dovinová, I., Okruhlicová, L., Tribulová, N., Šimončíková, P., Barte-ková, M., Vlkovičová, J., Barančík, M. "Chronic Cardiotoxicity of Doxorubicin Involves Activation of Myocardial and Circulating Matrix Metalloproteinases in Rats." *Acta Pharmacol Sin* 33, no. 4 (2012): 459-69.
86. Shinlapawittayatorn, K., Chattipakorn, S. C., Chattipakorn, N. "The Effects of Doxorubicin on Cardiac Calcium Homeostasis and Contractile Function." *J Cardiol* (2022).
87. Ranek, M. J., Wang, X. "Activation of the Ubiquitin-Proteasome System in Doxorubicin Cardiomyopathy." *Curr Hypertens Rep* 11, no. 6 (2009): 389-95.
88. Koleini, N., Kardami, E. "Autophagy and Mitophagy in the Context of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity." *Oncotarget* 8, no. 28 (2017): 46663-80.
89. Mitry, M. A., Laurent, D., Keith, B. L., Sira, E., Eisenberg, C. A., Eisenberg, L. M., Joshi, S., Gupte, S., Edwards, J. G. "Accelerated Cardiomyocyte Senescence Contributes to Late-

- Onset Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity." *Am J Physiol Cell Physiol* 318, no. 2 (2020): C380-c91.
90. Levick, S. P., Soto-Pantoja, D. R., Bi, J., Hundley, W. G., Widiapradja, A., Manteufel, E. J., Bradshaw, T. W., Meléndez, G. C. "Doxorubicin-Induced Myocardial Fibrosis Involves the Neurokinin-1 Receptor and Direct Effects on Cardiac Fibroblasts." *Heart Lung Circ* 28, no. 10 (2019): 1598-605.
91. De Angelis, A., Piegari, E., Cappetta, D., Marino, L., Filippelli, A., Berrino, L., Ferreira-Martins, J., Zheng, H., Hosoda, T., Rota, M. i wsp. "Anthracycline Cardiomyopathy Is Mediated by Depletion of the Cardiac Stem Cell Pool and Is Rescued by Restoration of Progenitor Cell Function." *Circulation* 121, no. 2 (2010): 276-92.
92. Luu, A. Z., Chowdhury, B., Al-Omran, M., Teoh, H., Hess, D. A., Verma, S. "Role of Endothelium in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy." *JACC Basic Transl Sci* 3, no. 6 (2018): 861-70.
93. Bhagat, A., Shrestha, P., Kleinerman, E. S. "The Innate Immune System in Cardiovascular Diseases and Its Role in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity." *Int J Mol Sci* 23, no. 23 (2022): 14649.
94. Trofenciuc, N., Bordejevic, A. D., Tomescu, M. C., Petrescu, L., Crisan, S., Geavlete, O., Mischie, A., Onel, A. F. M., Sasu, A., Pop-Moldovan, A. L. "Toll-Like Receptor 4 (Tlr4) Expression Is Correlated with T2* Iron Deposition in Response to Doxorubicin Treatment: Cardiotoxicity Risk Assessment." *Sci Rep* 10, no. 1 (2020): 17013.
95. Ye, S., Su, L., Shan, P., Ye, B., Wu, S., Liang, G., Huang, W. "LCZ696 Attenuated Doxorubicin-Induced Chronic Cardiomyopathy through the Tlr2-Myd88 Complex Formation." *Front Cell Dev Biol* 9 (2021): 654051.
96. Reis-Mendes, A., Padrão, A. I., Duarte, J. A., Gonçalves-Monteiro, S., Duarte-Araújo, M., Remião, F., Carvalho F., Sousa, E., Bastos, M. L., Costa, V. M. "Role of Inflammation and Redox Status on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Infant and Adult Cd-1 Male Mice." *Biomolecules* 11, no. 11 (2021).
97. Wei, S., Ma, W., Li, X., Jiang, C., Sun, T., Li, Y., Zhang, B., Li., W. "Involvement of Ros/Nlrp3 Inflammasome Signaling Pathway in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity." *Cardiovasc Toxicol* 20, no. 5 (2020): 507-19.
98. Sobiborowicz-Sadowska, A. M., Kamińska, K., Cudnoch-Jędrzejewska, A. "Nepriylisin Inhibition in the Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity." *Cancers* 15, no. 1 (2023): 312.
99. Lyon, A. R., Dent, S., Stanway, S., Earl, H., Brezden-Masley, C., Cohen-Solal, A., Tocchetti, C. G., Moslehi, J. J., Groarke, J. D., Bergler-Klein, J. i wsp. "Baseline Cardiovascular

Risk Assessment in Cancer Patients Scheduled to Receive Cardiotoxic Cancer Therapies: A Position Statement and New Risk Assessment Tools from the Cardio-Oncology Study Group of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology in Collaboration with the International Cardio-Oncology Society." *Eur J Heart Fail* 22, no. 11 (2020): 1945-60.

100. Armenian, S. H., Lacchetti, C., Barac, A., Carver, J., Constine, L. S., Denduluri, N., Dent, S., Douglas, P. S., Durand, J. B., Ewer, M. i wsp. "Prevention and Monitoring of Cardiac Dysfunction in Survivors of Adult Cancers: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline." *J Clin Oncol* 35, no. 8 (2017): 893-911.

101. Buzdar, A. U., Marcus, C., Smith, T. L., Blumenschein, G. R. "Early and Delayed Clinical Cardiotoxicity of Doxorubicin." *Cancer* 55, no. 12 (1985): 2761-5.

102. Bates, J. E., Howell, R. M., Liu, Q., Yasui, Y., Mulrooney, D. A., Dhakal, S., Smith, S. A., Leisenring, W. M., Indelicato, D. J., Gibson, T. M. i wsp. "Therapy-Related Cardiac Risk in Childhood Cancer Survivors: An Analysis of the Childhood Cancer Survivor Study." *J Clin Oncol* 37, no. 13 (2019): 1090-101.

103. Shaikh, A. S., Alam, M. M., Shazia S. M., Abbas, Q., Fadoo, Z., Atiq, M., "Risk Factors Associated with Anthracycline Induced Cardiac Dysfunction in Pediatric Patients" *World J Cardiovasc Dis* 4, No. 7 (2014): 7.

104. Zamorano, J. L., Lancellotti, P., Rodriguez Muñoz, D., Aboyans, V., Asteggiano, R., Galderisi, M., Habib, G., Lenihan, D. J., Lip, G. Y. H., Lyon, A. R. i wsp. "2016 ESC Position Paper on Cancer Treatments and Cardiovascular Toxicity Developed under the Auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines." *Eur Heart J* 19, no. 1 (2017): 9-42.

105. Reinbolt, R. E., Patel, R., Pan, X., Timmers, C. D., Pilarski, R., Shapiro, C. L., Lustberg, M. B. "Risk Factors for Anthracycline-Associated Cardiotoxicity." *Support Care Cancer* 24, no. 5 (2016): 2173-80.

106. Zhang, M., Yang, H., Xu, C., Jin, F., Zheng, A. "Risk Factors for Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in Breast Cancer Treatment: A Meta-Analysis." *Front Oncol* 12 (2022).

107. Al-Sadawi, M., Singh, K., Capric, V., Mohiuddin, A., Haddadin, M., Nunez, A., Shaikh, S., Bukharovich I., McFarlane, S. I. "Incidence and Associated Risk Factors of Chemotherapy-Induced Cardiomyopathy in the African American and Afro-Caribbean Populations." *Int J Clin Res Trials* 5 (2020).

108. Bansal, N., Adams, M. J., Ganatra, S., Colan, S. D., Aggarwal, S., Steiner, R., Amdani, S., Lipshultz, E. R., Lipshultz, S. E. "Strategies to Prevent Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in Cancer Survivors." *Cardio-Oncology* 5, no. 1 (2019): 18.

109. Visseren, F. L. J., Mach, F., Smulders, Y. M., Carballo, D., Koskinas, K. C., Bäck, M., Benetos, A., Biffi, A., Boavida, J., Capodanno, D. i wsp. "2021 ESC Guidelines on

Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice: Developed by the Task Force for Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice with Representatives of the European Society of Cardiology and 12 Medical Societies with the Special Contribution of the European Association of Preventive Cardiology (EAPC)." *Eur Heart J* 42, no. 34 (2021): 3227-337.

110. Martín García, A., Mitroi, C., Mazón Ramos, P., García Sanz, R., Virizuela, J. A., Arenas, M., Egocheaga Cabello, I., Albert, D., Anguita Sánchez, M., Arrarte Esteban, V. I. i wsp. "Stratification and Management of Cardiovascular Risk in Cancer Patients. A Consensus Document of the Sec, Fec, Seom, Seor, Sehh, Seng, Aeemt, Aeec, and Aecc." *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 74, no. 5 (2021): 438-48.

111. Batist, G., Ramakrishnan, G., Rao, C. S., Chandrasekharan, A., Gutheil, J., Guthrie, T., Shah, P., Khojasteh, A., Nair, M. K., Hoelzer, K. i wsp. "Reduced Cardiotoxicity and Preserved Antitumor Efficacy of Liposome-Encapsulated Doxorubicin and Cyclophosphamide Compared with Conventional Doxorubicin and Cyclophosphamide in a Randomized, Multicenter Trial of Metastatic Breast Cancer." *J Clin Oncol* 19, no. 5 (2001): 1444-54.

112. Yamaguchi, N., Fujii, T., Aoi, S., Kozuch, P. S., Hortobagyi, G. N., Blum, R. H. "Comparison of Cardiac Events Associated with Liposomal Doxorubicin, Epirubicin and Doxorubicin in Breast Cancer: A Bayesian Network Meta-Analysis." *Eur J Cancer* 51, no. 16 (2015): 2314-20.

113. Kalam, K., Marwick, T. H. "Role of Cardioprotective Therapy for Prevention of Cardiotoxicity with Chemotherapy: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Eur J Cancer* 49, no. 13 (2013): 2900-9.

114. Smith, Lesley A., Cornelius, V. R., Plummer, C. J., Levitt, G., Verrill, M., Canney, P., Jones, A. "Cardiotoxicity of Anthracycline Agents for the Treatment of Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials." *BMC Cancer* 10, no. 1 (2010): 337.

115. van Dalen, E. C., Caron, H. N., Dickinson, H. O., Kremer, L. C. "Cardioprotective Interventions for Cancer Patients Receiving Anthracyclines." *Cochrane Database Syst Rev*, no. 2 (2008): Cd003917.

116. Deng, S., Yan, T., Jendry, C., Nemecek, A., Vincetic, M., Gödtel-Armbrust, U., Wojnowski, L. "Dexrazoxane May Prevent Doxorubicin-Induced DNA Damage Via Depleting Both Topoisomerase II Isoforms." *BMC Cancer* 14 (2014): 842.

117. Lyu, Y. L., Kerrigan, J. E., Lin, C., Azarova, A. M., Tsai, Y., Ban, Y., Liu, L. F. "Topoisomerase II β -Mediated DNA Double-Strand Breaks: Implications in Doxorubicin Cardiotoxicity and Prevention by Dexrazoxane." *Cancer Res* 67, no. 18 (2007): 8839-46.

118. Hasinoff, B. B., Herman, E. H. "Dexrazoxane: How It Works in Cardiac and Tumor Cells. Is It a Prodrug or Is It a Drug?" *Cardiovasc Toxicol* 7, no. 2 (2007): 140-44.
119. Swain, S. M., Whaley, F. S., Gerber, M. C., Weisberg, S., York, M., Spicer, D., Jones, S. E., Wadler, S., Desai, A., Vogel C. i wsp. "Cardioprotection with Dexrazoxane for Doxorubicin-Containing Therapy in Advanced Breast Cancer." *J Clin Oncol* 15, no. 4 (1997): 1318-32.
120. Caspani, F., Tralongo, A. C., Campiotti, L., Asteggiano, R., Guasti, L., Squizzato, A. "Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Intern Emerg Med* 16, no. 2 (2021): 477-86.
121. Livi, L., Barletta, G., Martella, F., Saieva, C., Desideri, I., Bacci, C., Del Bene, M. R., Airoidi, M., Amoroso, D., Coltelli i L. wsp. "Cardioprotective Strategy for Patients with Nonmetastatic Breast Cancer Who Are Receiving an Anthracycline-Based Chemotherapy: A Randomized Clinical Trial." *JAMA Oncol* 7, no. 10 (2021): 1544-49.
122. Bosch, X., Rovira, M., Sitges, M., Domènech, A., Ortiz-Pérez, J. T., de Caralt, T. M., Morales-Ruiz, M., Perea, R. J., Monzó, M., Esteve, J. "Enalapril and Carvedilol for Preventing Chemotherapy-Induced Left Ventricular Systolic Dysfunction in Patients with Malignant Hemopathies: The Overcome Trial (Prevention of Left Ventricular Dysfunction with Enalapril and Carvedilol in Patients Submitted to Intensive Chemotherapy for the Treatment of Malignant Hemopathies)." *J Am Coll Cardiol* 61, no. 23 (2013): 2355-62.
123. Cardinale, D., Colombo, A., Sandri, M. T., Lamantia, G., Colombo, N., Civelli, M., Martinelli, G., Veglia, F., Fiorentini, C., Cipolla, C. M. "Prevention of High-Dose Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity in High-Risk Patients by Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition." *Circulation* 114, no. 23 (2006): 2474-81.
124. Gulati, G., Heck, S. L., Ree, A. H., Hoffmann, P., Schulz-Menger, J., Fagerland, M. W., Gravdehaug, B., von Knobelsdorff-Brenkenhoff, F., Bratland, Å Storås, T. H. i wsp. "Prevention of Cardiac Dysfunction During Adjuvant Breast Cancer Therapy (Prada): A 2 × 2 Factorial, Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial of Candesartan and Metoprolol." *Eur Heart J* 37, no. 21 (2016): 1671-80.
125. Nakamae, H., Tsumura, K., Terada, Y., Nakane, T., Nakamae, M., Ohta, K., Yamane, T., Hino, M. "Notable Effects of Angiotensin II Receptor Blocker, Valsartan, on Acute Cardiotoxic Changes after Standard Chemotherapy with Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisolone." *Cancer* 104, no. 11 (2005): 2492-98.
126. Li, X., Li, Y., Zhang, T., Xiong, X., Liu, N., Pang, B., Ruan, Y., Gao, Y., Shang, H., Xing, Y. "Role of Cardioprotective Agents on Chemotherapy-Induced Heart Failure: A Systematic

- Review and Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials." *Pharmacol Res* 151 (2020): 104577.
127. Kaya, M. G., Ozkan, M., Gunebakmaz, O., Akkaya, H., Kaya, E. G., Akpek, M., Kalay, N., Dikilitas, M., Yarlioglues, M., Karaca H. i wsp. "Protective Effects of Nebivolol against Anthracycline-Induced Cardiomyopathy: A Randomized Control Study." *Int J Cardiol* 167, no. 5 (2013): 2306-10.
128. Huang, S., Zhao, Q., Yang, Z. G., Diao, K. Y., He, Y., Shi, K., Shen, M. T., Fu, H., Guo, Y. K. "Protective Role of Beta-Blockers in Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity-a Systematic Review and Meta-Analysis of Carvedilol." *Heart Fail Rev* 24, no. 3 (2019): 325-33.
129. Avila, M. S., Ayub-Ferreira, S. M., de Barros Wanderley, Jr, M. R., das Dores Cruz, F., Gonçalves Brandão, S. M., Rigaud, V. O. C., Higuchi-dos-Santos, M. H., Abrahão Hajjar, L., Filho, R. K., Hoff, P. M. i wsp. "Carvedilol for Prevention of Chemotherapy-Related Cardiotoxicity." *J Am Coll Cardiol* 71, no. 20 (2018): 2281-90.
130. Korzeniowska, K., Jankowski, J., Cieślęwicz, A., Jabłeczka, A. "Is It Possible to Prevent Chemotherapy-Induced Heart Failure with Cardiovascular Drugs - the Review of the Current Clinical Evidence." *Ther Clin Risk Manag* 15 (2019): 1095-110.
131. Price, K. A. "Hydration in Cancer Patients." *Curr Opin Support Palliat Care* 4, no. 4 (2010): 276-80.
132. Erickson, R., Nebughr, N., Mosier, M. C., Nibley, W. "Hydration Requirements in Patients Receiving Highly Emetogenic Chemotherapy." *Future Oncol* 15, no. 7 (2019): 753-61.
133. Abdel-Qadir, H., Bobrowski, D., Zhou, L., Austin, P. C., Calvillo-Argüelles, O., Amir, E., Lee, D. S., Thavendiranathan, P. "Statin Exposure and Risk of Heart Failure after Anthracycline- or Trastuzumab-Based Chemotherapy for Early Breast Cancer: A Propensity Score-Matched Cohort Study." *J Am Heart Assoc* 10, no. 2 (2021): e018393.
134. Seicean, S., Seicean, A., Plana, J. C., Budd, G. T., Marwick, T. H. "Effect of Statin Therapy on the Risk for Incident Heart Failure in Patients with Breast Cancer Receiving Anthracycline Chemotherapy: An Observational Clinical Cohort Study." *J Am Coll Cardiol* 60, no. 23 (2012): 2384-90.
135. Nabati, M., Janbabai, G., Esmailian, J., Yazdani, J. "Effect of Rosuvastatin in Preventing Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity in Women with Breast Cancer: A Randomized, Single-Blind, Placebo-Controlled Trial." *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 24, no. 3 (2019): 233-41.
136. Obasi, M., Abovich, A., Vo, J. B., Gao, Y., Papatheodorou, S. I., Nohria, A., Asnani, A., Partridge, A. H. "Statins to Mitigate Cardiotoxicity in Cancer Patients Treated with Anthracyclines and/or Trastuzumab: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Cancer Causes Control* 32, no. 12 (2021): 1395-405.

137. Kim, J., Nishimura, Y., Kewcharoen, J., Yess, J. "Statin Use Can Attenuate the Decline in Left Ventricular Ejection Fraction and the Incidence of Cardiomyopathy in Cardiotoxic Chemotherapy Recipients: A Systematic Review and Meta-Analysis." *J Clin Med* 10, no. 16 (2021).
138. Felker, G. M., Thompson, R. E., Hare, J. M., Hruban, R. H., Clemetson, D. E., Howard, D. L., Baughman, K. L., Kasper, E. K. "Underlying Causes and Long-Term Survival in Patients with Initially Unexplained Cardiomyopathy." *N Engl J Med* 342, no. 15 (2000): 1077-84.
139. Curigliano, G., Lenihan, D., Fradley, M., Ganatra, S., Barac, A., Blaes, A., Herrmann, J., Porter, C., Lyon, A. R., Lancellotti, P. i wsp. "Management of Cardiac Disease in Cancer Patients Throughout Oncological Treatment: ESMO Consensus Recommendations." *Ann Oncol* 31, no. 2 (2020): 171-90.
140. Čelutkienė, J., Pudil, R., López-Fernández, T., Grapsa, J., Nihoyannopoulos, P., Bergler-Klein, J., Cohen-Solal, A., Farmakis, D., Tocchetti, C. G., von Haehling, S. i wsp. "Role of Cardiovascular Imaging in Cancer Patients Receiving Cardiotoxic Therapies: A Position Statement on Behalf of the Heart Failure Association (HFA), the European Association of Cardiovascular Imaging (EACVI) and the Cardio-Oncology Council of the European Society of Cardiology (ESC)." *Eur J Heart Fail* 22, no. 9 (2020): 1504-24.
141. Jensen, B. V., Skovsgaard, T., Nielsen, S. L. "Functional Monitoring of Anthracycline Cardiotoxicity: A Prospective, Blinded, Long-Term Observational Study of Outcome in 120 Patients." *Annals of Onc* 13, no. 5 (2002): 699-709.
142. Cardinale, D., Colombo, A., Lamantia, G., Colombo, N., Civelli, M., De Giacomi, G., Rubino, M., Veglia, F., Fiorentini, C., Cipolla, C. M. "Anthracycline-Induced Cardiomyopathy: Clinical Relevance and Response to Pharmacologic Therapy." *J Am Coll Cardiol* 55, no. 3 (2010): 213-20.
143. Lakhani, H. V., Pillai, S. S., Zehra, M., Dao, B., Tirona, M. T., Thompson, E., Sodhi, K. "Detecting Early Onset of Anthracyclines-Induced Cardiotoxicity Using a Novel Panel of Biomarkers in West-Virginian Population with Breast Cancer." *Sci Rep* 11, no. 1 (2021): 7954.
144. Srikanthan, K., Klug, R., Tirona, M., Thompson, E., Visweshwar, H., Puri, N., Shapiro, J., Sodhi, K. "Creating a Biomarker Panel for Early Detection of Chemotherapy Related Cardiac Dysfunction in Breast Cancer Patients." *J Clin Exp Cardiol* 8, no. 3 (2017).
145. Ng, S. M., Naqvi, D., Bingcang, J., Cruz, G., Nose, R., Lloyd, G., Speechly-Dick, M. E., Bhattacharyya, S. "Feasibility, Diagnostic Performance and Clinical Value of an Abbreviated Echocardiography Protocol in an out-Patient Cardiovascular Setting: A Pilot Study." *Echo Res Pract* 9, no. 1 (2022): 8.

146. Bunting, Karina V., Steeds, R. P., Slater, L. T., Rogers, J. K., Gkoutos, G. V., Kotecha, D. "A Practical Guide to Assess the Reproducibility of Echocardiographic Measurements." *J Am Soc Echocardiogr* 32, no. 12 (2019): 1505-15.
147. Jensen, B. V., Skovsgaard, T., Nielsen, S. L. "Functional Monitoring of Anthracycline Cardiotoxicity: A Prospective, Blinded, Long-Term Observational Study of Outcome in 120 Patients." *Ann Oncol* 13, no. 5 (2002): 699-709.
148. Chow, E. J., Chen, Y., Kremer, L. C., Breslow, N. E., Hudson, M. M., Armstrong, G. T., Border, W. L., Feijen, E. A., Green, D. M., Meacham, L. R. i wsp. "Individual Prediction of Heart Failure among Childhood Cancer Survivors." *J Clin Oncol* 33, no. 5 (2015): 394-402.
149. Rahman, A. "Prediction Model for Heart Failure in Childhood Cancer Survivors." *Lancet Oncol* 15, no. 12 (2014): e537.
150. Díaz-Antón, B., Madurga, R., Zorita, B., Wasniewski, S., Moreno-Arciniegas, A., López-Melgar, B., Ramírez Merino, N., Martín-Asenjo, R., Barrio, P., Amado Escañuela, M. G. i wsp. "Early Detection of Anthracycline- and Trastuzumab-Induced Cardiotoxicity: Value and Optimal Timing of Serum Biomarkers and Echocardiographic Parameters." *ESC Heart Fail* 9, no. 2 (2022): 1127-37.
151. Tan, L. L., Lyon, A. R. "Role of Biomarkers in Prediction of Cardiotoxicity During Cancer Treatment." *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 20, no. 7 (2018): 55.
152. Pudil, R., Mueller, C., Čelutkienė, J., Henriksen, P. A., Lenihan, D., Dent, S., Barac, A., Stanway, S., Moslehi, J., Suter T. M. i wsp. "Role of Serum Biomarkers in Cancer Patients Receiving Cardiotoxic Cancer Therapies: A Position Statement from the Cardio-Oncology Study Group of the Heart Failure Association and the Cardio-Oncology Council of the European Society of Cardiology." *Eur J Heart Fail* 22, no. 11 (2020): 1966-83.
153. Michel, L., Mincu, R. I., Mahabadi, A. A., Settelmeier, S., Al-Rashid, F., Rassaf, T., Totzeck, M. "Troponins and Brain Natriuretic Peptides for the Prediction of Cardiotoxicity in Cancer Patients: A Meta-Analysis." *Eur J Heart Fail* 22, no. 2 (2020): 350-61.
154. Demissei, B. G., Hubbard, R. A., Zhang, L., Smith, A. M., Sheline, K., McDonald, C., Narayan, V., Domchek, S. M., DeMichele, A., Shah, P. i wsp. "Changes in Cardiovascular Biomarkers with Breast Cancer Therapy and Associations with Cardiac Dysfunction." *J Am Heart Assoc* 9, no. 2 (2020): e014708.
155. Panagopoulou, V., Deftereos, S., Kossyvakis, C., Raisakis, K., Giannopoulos, G., Bouras, G., Pyrgakis, V., Cleman, M. W. "NTproBNP: An Important Biomarker in Cardiac Diseases." *Curr Top Med Chem* 13, no. 2 (2013): 82-94.
156. Hartmann, F., Packer, M., Coats, A. J. S., Fowler, M. B., Krum, H., Mohacsi, P., Rouleau, J. L., Tendera, M., Castaigne, A., Anker, S. D. i wsp. "Prognostic Impact of Plasma N-Terminal

Pro-Brain Natriuretic Peptide in Severe Chronic Congestive Heart Failure." *Circulation* 110, no. 13 (2004): 1780-86.

157. Spinar, J., Spinarova, L., Malek, F., Ludka, O., Krejci, J., Ostadal, P., Vondrakova, D., Labr, K., Spinarova, M., Pavkova Goldbergova, M. i wsp. "Prognostic Value of Nt-Probnp Added to Clinical Parameters to Predict Two-Year Prognosis of Chronic Heart Failure Patients with Mid-Range and Reduced Ejection Fraction - a Report from Far Nhl Prospective Registry." *PLoS One* 14, no. 3 (2019): e0214363.

158. Rüger, A. M., Schneeweiss, A., Seiler, S., Tesch, H., van Mackelenbergh, M., Marmé, F., Lübbe, K., Sinn, B., Karn, T., Stickeler E. i wsp. "Cardiotoxicity and Cardiovascular Biomarkers in Patients with Breast Cancer: Data from the Geparocto-GBG 84 Trial." *J Am Heart Assoc* 9, no. 23 (2020): e018143.

159. de la Fuente, A., Santisteban, M., Lupón, J., Aramendía, J. M., Díaz, A., Santaballa, A., Hernández, A., Sepúlveda, P., Cediél, G., López B. i wsp. "A Fibrosis Biomarker Early Predicts Cardiotoxicity Due to Anthracycline-Based Breast Cancer Chemotherapy." *Cancers (Basel)* 14, no. 12 (2022): 2941.

160. Leerink, J. M., Feijen, E. A. M., Mavinkurve-Groothuis, A. M. C., Tissing, W. J. E., Louwerens, M., Van Den Heuvel-Eibrink, M. M., Versluys, A. B., Van Dulmen-Den Broeder E., De Vries, A. C. H., Van Der Pal H. J. H. i wsp. "Biomarkers for Detection of Anthracycline-Induced Cardiomyopathy in Childhood Cancer Survivors: A Case-Control Study in the Dutch Later Cohort Study." *Eur Heart J* 41, no. Supplement 2 (2020).

161. Leger, K. J., Leonard, D., Nielson, D., de Lemos, J. A., Mammen, P. P., Winick. N. J. "Circulating Micrnas: Potential Markers of Cardiotoxicity in Children and Young Adults Treated with Anthracycline Chemotherapy." *J Am Heart Assoc* 6, no. 4 (2017).

162. Rigaud, V. O., Ferreira, L. R., Ayub-Ferreira, S. M., Ávila, M. S., Brandão, S. M. Cruz, F. D. Santos, M. H., Cruz, C. B., Alves, M. S., Issa, V. S. i wsp. "Circulating Mir-1 as a Potential Biomarker of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Breast Cancer Patients." *Oncotarget* 8, no. 4 (2017): 6994-7002.

163. Pavo, N., Prausmüller, S., Bartko, P. E., G Goliash, G., Hülsmann, M. "Neprilysin as a Biomarker: Challenges and Opportunities." *Card Fail Rev* (2020).

164. Feygina, E. E., Katrukha, A. G., Semenov, A. G. "Neutral Endopeptidase (Neprilysin) in Therapy and Diagnostics: Yin and Yang." *Biochemistry (Mosc)* 84, no. 11 (2019): 1346-58.

165. D'Elia, E., Iacovoni, A., Vaduganathan, M., Lorini, F. L., Perlini, S., Senni, M. "Neprilysin Inhibition in Heart Failure: Mechanisms and Substrates Beyond Modulating Natriuretic Peptides." *Eur J Heart Fail* 19, no. 6 (2017): 710-17.

166. Chiaretti, S., Zini, G., Bassan, R., "Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia." *Mediterr J Hematol Infect Dis* 6, no. 1 (2014): e2014073.
167. Nalivaeva, N. N., Zhuravin, I. A., Turner, A. J. "Neprilysin Expression and Functions in Development, Ageing and Disease." *Mech Ageing Dev* 192 (2020): 111363.
168. McKinnie, S. M., Fischer, C., Tran, K. M., Wang, W., Mosquera, F., Oudit, G. Y., Vederas, J. C. "The Metalloprotease Neprilysin Degrades and Inactivates Apelin Peptides." *Chembiochem* 17, no. 16 (2016): 1495-8.
169. Meems, L. M. G., Burnett, J. C. "Innovative Therapeutics: Designer Natriuretic Peptides." *JACC: Basic to Translational Science* 1, no. 7 (2016): 557-67.
170. Surma, S., Bańkowski, E. "Postęp W Badaniach Nad Peptydami Natriuretycznymi." 15, no. 2 (2020): 137-48.
171. Dietz, J. R. "Mechanisms of Atrial Natriuretic Peptide Secretion from the Atrium." *Cardiovasc Res* 68, no. 1 (2005): 8-17.
172. Lugnier, C., Meyer, A., Charloux, A., Andrès, E., Gény, B., Talha, S. "The Endocrine Function of the Heart: Physiology and Involvements of Natriuretic Peptides and Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Heart Failure." *J Clin Med* 8, no. 10 (2019): 1746.
173. Curry, F. R. "Atrial Natriuretic Peptide: An Essential Physiological Regulator of Transvascular Fluid, Protein Transport, and Plasma Volume." *J Clin Invest* 115, no. 6 (2005): 1458-61.
174. Silver, M. A. "The Natriuretic Peptide System: Kidney and Cardiovascular Effects." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15, no. 1 (2006): 14-21.
175. Volpe, M., Carnovali, M., Mastromarino, V. "The Natriuretic Peptides System in the Pathophysiology of Heart Failure: From Molecular Basis to Treatment." *Clin Sci (Lond)* 130, no. 2 (2016): 57-77.
176. Kerkelä, R., Ulvila, J., Magga, J. "Natriuretic Peptides in the Regulation of Cardiovascular Physiology and Metabolic Events." *J Am Heart Assoc* 4, no. 10 (2015): e002423.
177. Ibrahim, N. E., McCarthy, C. P., Shrestha, S., Gaggin, H. K., Mukai, R., Szymonifka, J., Apple, F. S., Burnett, J. C., Iyer, S., Januzzi, J. L. "Effect of Neprilysin Inhibition on Various natriuretic Peptide Assays." *J Am Coll Cardiol* 73, no. 11 (2019): 1273-84.
178. Gros, C., Souque, A., Schwartz, J. C., Duchier, J., Cournot, A., Baumer, P., Lecomte, J. M. "Protection of Atrial Natriuretic Factor against Degradation: Diuretic and Natriuretic Responses after in Vivo Inhibition of Enkephalinase (Ec 3.4.24.11) by Acetorphan." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, no. 19 (1989): 7580-4.

179. Richards, A. M., Wittert, G. A., Espiner, E. A., Yandle, T. G., Ikram, H., Frampton, C. "Effect of Inhibition of Endopeptidase 24.11 on Responses to Angiotensin II in Human Volunteers." *Circ Res* 71, no. 6 (1992): 1501-7.
180. Chappell, M. C. *The Angiotensin-(1-7) Axis: Formation and Metabolism Pathways: Angiotensin-(1-7)*. 2019 Aug 22:1-26. doi: 10.1007/978-3-030-22696-1_1.
181. Knecht, M., Pagel, I., Langenickel, T., Philipp, S., Scheuermann-Freestone, M., Willnow, T., Bruemmer, D., Graf, K., Dietz, R., Willenbrock, R. "Increased Expression of Renal Neutral Endopeptidase in Severe Heart Failure." *Life Sci* 71, no. 23 (2002): 2701-12.
182. Abassi, Z. A., Kotob, S., Golomb, E., Pieruzzi, F., Keiser, H. R. "Pulmonary and Renal Neutral Endopeptidase Ec 3.4.24.11 in Rats with Experimental Heart Failure." *Hypertension* 25, no. 6 (1995): 1178-84.
183. Pavo, I. J., Pavo, N., Kastner, N., Traxler, D., Lukovic, D., Zlabinger, K., Spannbaauer, A., Riesenhuber, M., Lorant, D., Bartko, P. E. i wsp. "Heart Failure with Reduced Ejection Fraction Is Characterized by Systemic Nep Downregulation." *JACC Basic Transl Sci* 5, no. 7 (2020): 715-26.
184. Arrigo, M., Vodovar, N., Nougue, H., Sadoune, M., Pemberton, C. J., Ballan, P., Ludes, P. O., Gendron, N., Carpentier, N., Cholley, B. i wsp. "The Heart Regulates the Endocrine Response to Heart Failure: Cardiac Contribution to Circulating Nephilysin." *Eur Heart J* 39, no. 20 (2018): 1794-98.
185. Kuruppu, S., Rajapakse, N. W., Minond, D., Smith, A. I. "Production of Soluble Nephilysin by Endothelial Cells." *Biochem Biophys Res Commun* 446, no. 2 (2014): 423-7.
186. Vodovar, N., Séronde, M. F., Laribi, S., Gayat, E., Lassus, J., Januzzi, Jr., J. L., Boukef, R., Noura, S., Manivet, P., Samuel J. L. i wsp. "Elevated Plasma B-Type Natriuretic Peptide Concentrations Directly Inhibit Circulating Nephilysin Activity in Heart Failure." *JACC Heart Fail* 3, no. 8 (2015): 629-36.
187. Bayes-Genis, A., Barallat, J., Galan, A., de Antonio, M., Domingo, M., Zamora, E., Urrutia, A., Lupon, J. "Soluble Nephilysin Is Predictive of Cardiovascular Death and Heart Failure Hospitalization in Heart Failure Patients." *J Am Coll Cardiol* 65, no. 7 (2015): 657-65.
188. Núñez, J., Núñez, E., Barallat, J., Bodí, V., Miñana, G., Pastor, M. C., Sanchis, J., Lupon, J., Bayes-Genis, A. "Serum Nephilysin and Recurrent Admissions in Patients with Heart Failure." *J Am Heart Assoc* 6, no. 8 (2017).
189. Goliash, G., Pavo, N., Zotter-Tufaro, C., Kammerlander, A., Duca, F., Mascherbauer, J., Bonderman, D. "Soluble Nephilysin Does Not Correlate with Outcome in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction." *Eur J Heart Fail* 18, no. 1 (2016): 89-93.

190. Bernelin, H., Mewton, N., Si-Mohamed, S., Croisille, P., Rioufol, G., Bonnefoy-Cudraz, E., Douek, P., Dufay, N., Amaz, C., Jossan, C. i wsp. "Neprilysin Levels at the Acute Phase of St-Elevation Myocardial Infarction." *Clin Cardiol* 42, no. 1 (2019): 32-38.
191. Choi, I. J., Lim, S., Hwang, Y., Lee, D., Lee, W. J., Lee, K. Y., Kim, M. J., Jeon, D. S. "Soluble Neprilysin and Long-Term Clinical Outcomes in Patients with Coronary Artery Disease Undergoing Percutaneous Coronary Intervention: A Retrospective Cohort Study." *BMC Cardiovasc Disord* 20, no. 1 (2020): 360.
192. Zelniker, T. A., Spaich, S., Stiepak, J., Steger, F., Katus, H. A., Preusch, M. R. "Serum Neprilysin and the Risk of Death in Patients with out-of-Hospital Cardiac Arrest of Non-Traumatic Origin." *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 9, no. 4 suppl (2020): 169-174.
193. Reddy, Y. N. V., Iyer, S. R., Scott, C. G., Rodeheffer, R. J., Bailey, K., Jenkins, G., Batzler, A., Redfield, M. M., Burnett, Jr., J. C., Pereira, N. L. "Soluble Neprilysin in the General Population: Clinical Determinants and Its Relationship to Cardiovascular Disease." *J Am Heart Assoc* 8, no. 15 (2019): e012943.
194. Saito, Y., Nakao, K., Nishimura, K., Sugawara, A., Okumura, K., Obata, K., Sonoda, R., Ban, T., Yasue, H., Imura, H. "Clinical Application of Atrial Natriuretic Polypeptide in Patients with Congestive Heart Failure: Beneficial Effects on Left Ventricular Function." *Circulation* 76, no. 1 (1987): 115-24.
195. Fifer, M. A., Molina, C. R., Quiroz, A. C., Giles, T. D., Herrmann, H. C., De Scheerder, I. R., Clement, D. L., Kubo, S., Cody, R. J., Cohn, J. N. i wsp. "Hemodynamic and Renal Effects of Atrial Natriuretic Peptide in Congestive Heart Failure." *Am J Cardiol* 65, no. 3 (1990): 211-6.
196. Colucci, W. S., Elkayam, U., Horton, D. P., Abraham, W. T., Bourge, R. C., Johnson, A. D., Wagoner, L. E., Givertz, M. M., Liang, C., Neibaur, M. i wsp. "Intravenous Nesiritide, a Natriuretic Peptide, in the Treatment of Decompensated Congestive Heart Failure." *N Engl J Med* 343, no. 4 (2000): 246-53.
197. Margulies, K. B., Barclay, P. L., Burnett, J. C. "The Role of Neutral Endopeptidase in Dogs with Evolving Congestive Heart Failure." 91, no. 7 (1995): 2036-42.
198. Helin, K., Ilkka, T., Tuula, T., Outi, S., Sybertz, E. J., Vemulapalli, S., Hannu, S., Fyhrquist, F. "Prolonged Neutral Endopeptidase Inhibition in Heart Failure." *Eur J Pharmacol* 198, no. 1 (1991): 23-30.
199. Seymour, A. A., Asaad, M. M., Lanoce, V. M., Fennell, S. A., Cheung, H. S., Rogers, W. L. "Inhibition of Neutral Endopeptidase 3.4.24.11 in Conscious Dogs with Pacing Induced Heart Failure." *Cardiovasc Res* 27, no. 6 (1993): 1015-23.

200. Seymour, A. A., Abboa-Offei, B., Asaad, M. M., Rogers, W. L. "Evaluation of Sq 28,603, an Inhibitor of Neutral Endopeptidase, in Conscious Monkeys." *Can J Physiol Pharmacol* 69, no. 10 (1991): 1609-17.
201. Seymour, A. A., Asaad, M. M., Abboa-Offei, B. E., Rovnyak, P. L., Fennell, S., Roger, W. L. "Potentiation of Brain Natriuretic Peptides by Sq 28,603, an Inhibitor of Neutral Endopeptidase 3.4.24.11, in Monkeys and Rats." *J Pharmacol Exp Ther* 262, no. 1 (1992): 60-70.
202. Rademaker, M. T., Charles, C. J., Espiner, E. A., Nicholls, M. G., Richards, A. M., Kosoglou, T. "Neutral Endopeptidase Inhibition: Augmented Atrial and Brain Natriuretic Peptide, Haemodynamic and Natriuretic Responses in Ovine Heart Failure." *Clin Sci (Lond)* 91, no. 3 (1996): 283-91.
203. Wegner, M., Ganten, D., Stasch, J. P. "Neutral Endopeptidase Inhibition Potentiates the Effects of Natriuretic Peptides in Renin Transgenic Rats." *Hypertens Res* 19, no. 4 (1996): 229-38.
204. Maki, T., Nasa, Y., Yamaguchi, F., Yoshida, H., Mori, M., Takada, T., Horikawa, E., Okano, K., Takeo, S. "Long-Term Treatment with Neutral Endopeptidase Inhibitor Improves Cardiac Function and Reduces Natriuretic Peptides in Rats with Chronic Heart Failure." *Cardiovasc Res* 51, no. 3 (2001): 608-17.
205. Stasch, J. P., Knorr, A., Wegner, M., Hirth-Dietrich, C. "Prolonged Inhibition of Neutral Endopeptidase 24.11 by Sinorphan in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats." *Hypertens Res* 18, no. 2 (1995): 137-43.
206. Monopoli, A., Ongini, E., Cigola, E., Olivetti, G. "The Neutral Endopeptidase Inhibitor, Sch 34826, Reduces Left Ventricular Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats." *J Cardiovasc Pharmacol* 20, no. 3 (1992): 496-504.
207. Wegner, M., Hirth-Dietrich, C., Stasch, J. P. "Role of Neutral Endopeptidase 24.11 in Av Fistular Rat Model of Heart Failure." *Cardiovasc Res* 31, no. 6 (1996): 891-8.
208. Münzel, T., Kurz, S., Holtz, J., Busse, R., Steinhauer, H., Just, H., Drexler, H. "Neurohormonal Inhibition and Hemodynamic Unloading During Prolonged Inhibition of ANF Degradation in Patients with Severe Chronic Heart Failure." *Circulation* 86, no. 4 (1992): 1089-98.
209. Kahn, J. C., Patey, M., Dubois-Rande, J. L., Merlet, P., Castaigne, A., Lim-Alexandre, C., Lecomte, J. M., Duboc, D., Gros, C., Schwartz, J. C. "Effect of Sinorphan on Plasma Atrial Natriuretic Factor in Congestive Heart Failure." *Lancet* 335, no. 8681 (1990): 118-19.
210. O'Connor, C. M., Gattis, W. A., Gheorghide, M., Granger, C. B., Gilbert, J., McKenney, J. M., Messineo, F. C., Burnett, J. C., Katz, S. D., Elkayam, U. i wsp. "A Randomized Trial of

Ecadotril Versus Placebo in Patients with Mild to Moderate Heart Failure: The U.S. Ecadotril Pilot Safety Study." *Am Heart J* 138, no. 6 (1999): 1140-48.

211. Cleland, J. G., Swedberg, K. "Lack of Efficacy of Neutral Endopeptidase Inhibitor Ecadotril in Heart Failure. The International Ecadotril Multi-Centre Dose-Ranging Study Investigators." *Lancet* 351, no. 9116 (1998): 1657-8.

212. McMurray, J. J. V. "Neprilysin Inhibition to Treat Heart Failure: A Tale of Science, Serendipity, and Second Chances." *Eur J Heart Fail* 17, no. 3 (2015): 242-47.

213. Rouleau, J. L., Pfeffer, M. A., Stewart, D. J., Isaac, D., Sestier, F., Kerut, E. K. Porter, C. B., Proulx, G., Qian, C., Block, A. J. "Comparison of Vasopeptidase Inhibitor, Omapatrilat, and Lisinopril on Exercise Tolerance and Morbidity in Patients with Heart Failure: Impress Randomised Trial." *Lancet* 356, no. 9230 (2000): 615-20.

214. Packer, M., Califf, R. M., Konstam, M. A., Krum, H., McMurray, J. J., Rouleau, J., Swedberg, K. "Comparison of Omapatrilat and Enalapril in Patients with Chronic Heart Failure." *Circulation* 106, no. 8 (2002): 920-26.

215. Kostis, J. B., Packer, M., Black, H. R., Schmieder, R., Henry, D., Levy, E., "Omapatrilat and Enalapril in Patients with Hypertension: The Omapatrilat Cardiovascular Treatment Vs. Enalapril (Octave) Trial." *Am J Hypertens* 17, no. 2 (2004): 103-11.

216. Sánchez-Borges, M., González-Aveledo, L. A. "Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angioedema." *Allergy Asthma Immunol Res* 2, no. 3 (2010): 195-8.

217. Campbell, D. J. "Neprilysin Inhibitors and Bradykinin." *Front Med (Lausanne)* 5 (2018): 257.

218. Pickering, T. G. "Effects of Stress and Behavioral Interventions in Hypertension: The Rise and Fall of Omapatrilat." *J Clin Hypertens (Greenwich)* 4, no. 5 (2002): 371-3.

219. Aroor, A. R., Mummidi, S., Lopez-Alvarenga, J. C., Das, N., Habibi, J., Jia, G., Lastra, G., Chandrasekar, B., DeMarco, V. G. "Sacubitril/Valsartan Inhibits Obesity-Associated Diastolic Dysfunction through Suppression of Ventricular-Vascular Stiffness." *Cardiovasc Diabetol* 20, no. 1 (2021): 80.

220. Burke, R. M., Lighthouse, J. K., Mickelsen, D. M., Small, E. M. "Sacubitril/Valsartan Decreases Cardiac Fibrosis in Left Ventricle Pressure Overload by Restoring Pkg Signaling in Cardiac Fibroblasts." *Circ Heart Fail* 12, no. 4 (2019): e005565.

221. Lu, H. I., Tong, M. S., Chen, K. H., Lee, F. Y., Chiang, J. Y., Chung, S. Y., Sung, P. H., Yip, H. K. "Entresto Therapy Effectively Protects Heart and Lung against Transverse Aortic Constriction Induced Cardiopulmonary Syndrome Injury in Rat." *Am J Transl Res* 10, no. 8 (2018): 2290-305.

222. Nordén, E. S., Bendiksen, B. A., Andresen, H., Bergo, K. K., Espe, E. K., Hasic, A., Hauge-Iversen, I. M., Veras, I., Hussain, R. I., Sjaastad, I. i wsp. "Sacubitril/Valsartan Ameliorates Cardiac Hypertrophy and Preserves Diastolic Function in Cardiac Pressure Overload." *ESC Heart Fail* 8, no. 2 (2021): 918-27.
223. Solomon, S. D., McMurray, J. J. V., Anand, I. S., Ge, J., Lam, C. S. P., Maggioni, A. P., Martinez, F., Packer, M., Pfeffer, M. A., Pieske, B. i wsp. "Angiotensin–Neprilysin Inhibition in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction." *N Eng J Med* 381, no. 17 (2019): 1609-20.
224. Liang, W., Xie, B. K., Ding, P. W., Wang, M., Yuan, J., Cheng, X., Liao, Y. H., Yu, M. "Sacubitril/Valsartan Alleviates Experimental Autoimmune Myocarditis by Inhibiting Th17 Cell Differentiation Independently of the Nlrp3 Inflammasome Pathway." *Front Pharmacol* 12 (2021): 727838.
225. Suematsu, Y., Jing, W., Nunes, A., Kashyap, M. L., Khazaeli, M., Vaziri, N. D., Moradi, H. "LCZ696 (Sacubitril/Valsartan), an Angiotensin-Receptor Neprilysin Inhibitor, Attenuates Cardiac Hypertrophy, Fibrosis, and Vasculopathy in a Rat Model of Chronic Kidney Disease." *J Card Fail* 24, no. 4 (2018): 266-75.
226. Li, S. N., Zhang, J. R., Zhou, L., Xi, H., Li, C. Y., Zhao, L. "Sacubitril/Valsartan Decreases Atrial Fibrillation Susceptibility by Inhibiting Angiotensin II-Induced Atrial Fibrosis through P-Smad2/3, P-Jnk, and P-P38 Signaling Pathways." *J Cardiovasc Transl Res* (2021).
227. Li, L., Lou, Q., Liu, G., Lv, J., Yun, F., Li, T., Yang, W., Zhao, H., Zhang, L., Bai, N. i wsp. "Sacubitril/Valsartan Attenuates Atrial Electrical and Structural Remodelling in a Rabbit Model of Atrial Fibrillation." *Eur J Pharmacol* 881 (2020): 173120.
228. Shen, J., Fan, Z., Sun, G., Qi, G. "Sacubitril/Valsartan (Lcz696) Reduces Myocardial Injury Following Myocardial Infarction by Inhibiting Nlrp3-Induced Pyroptosis Via the Tak1/Jnk Signaling Pathway." *Mol Med Rep* 24, no. 3 (2021).
229. Torrado, J., Cain, C., Mauro, A. G., Romeo, F., Ockaili, R., Chau, V. Q., Nestler, J. A., Devarakonda, T., Ghosh, S., Das, A. i wsp. "Sacubitril/Valsartan Averts Adverse post-Infarction Ventricular Remodeling and Preserves Systolic function in Rabbits." *J Am Coll Cardiol* 72, no. 19 (2018): 2342-56.
230. Trivedi, R. K., Polhemus, D. J., Li, Z., Yoo, D., Koiwaya, H., Scarborough, A., Goodchild, T. T., Lefer, D. J. "Combined Angiotensin Receptor-Neprilysin Inhibitors Improve Cardiac and Vascular Function Via Increased No Bioavailability in Heart Failure." *J Am Heart Assoc* 7, no. 5 (2018).
231. Vaskova, E., Ikeda, G., Tada, Y., Wahlquist, C., Mercola, C., Yang, P. C. "Sacubitril/Valsartan Improves Cardiac Function and Decreases Myocardial Fibrosis Via

- Downregulation of Exosomal Mir-181a in a Rodent Chronic Myocardial Infarction Model." *J Am Heart Assoc* 9, no. 13 (2020): e015640.
232. von Lueder, T. G., Wang, B. H., Kompa, A. R., Huang, L., Webb, R., Jordaan, P., Atar, D., Krum, H. "Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibitor Lcz696 Attenuates Cardiac Remodeling and Dysfunction after Myocardial Infarction by Reducing Cardiac Fibrosis and Hypertrophy." *Circ Heart Fail* 8, no. 1 (2015): 71-8.
233. Chang, P. C., Lin, S. F., Chu, Y., Wo, H. T., Lee, H. L., Huang, Y. C., Wen, M. S., Chou, C. C. "LCZ696 Therapy Reduces Ventricular Tachyarrhythmia Inducibility in a Myocardial Infarction-Induced Heart Failure Rat Model." *Cardiovasc Ther* 2019 (2019): 6032631.
234. Chang, P. C., Wo, H. T., Lee, H. L., Lin, S. F., Chu, Y., Wen, M. S., Chou, C. C. "Sacubitril/Valsartan Therapy Ameliorates Ventricular Tachyarrhythmia Inducibility in a Rabbit Myocardial Infarction Model." *J Card Fail* 26, no. 6 (2020): 527-37.
235. Ishii, M., Kaikita, K., Sato, K., Sueta, D., Fujisue, K., Arima, Y., Oimatsu, Y., Mitsuse, T., Onoue, Y., Araki S. i wsp. "Cardioprotective Effects of Lcz696 (Sacubitril/Valsartan) after Experimental acute myocardial Infarction." *JACC Basic Transl Sci* 2, no. 6 (2017): 655-68.
236. Kompa, A. R., Lu, J., Weller, T. J., Kelly, D. J., Krum, H., von Lueder, T. G., Wang, B. H. "Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibition Provides Superior Cardioprotection Compared to Angiotensin Converting Enzyme Inhibition after Experimental Myocardial Infarction." *Int J Cardiol* 258 (2018): 192-98.
237. Pfau, D., Thorn, S. L., Zhang, J., Mikush, N., Renaud, J. M., Klein, R., deKemp, R. A., Wu, X., Hu, X., Sinusas A. J. i wsp. "Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibitor Attenuates Myocardial Remodeling and Improves Infarct Perfusion in Experimental Heart Failure." *Sci Rep* 9, no. 1 (2019): 5791.
238. Raj, P., Sayfee, K., Parikh, M., Yu, L., Wigle, J., Netticadan, T., Zieroth, S. "Comparative and Combinatorial Effects of Resveratrol and Sacubitril/Valsartan Alongside Valsartan on Cardiac Remodeling and Dysfunction in Mi-Induced Rats." *Molecules* 26, no. 16 (2021).
239. Xia, Y., Chen, Z., Chen, A., Fu, M., Dong, Z., Hu, K., Yang, X., Zou, Y., Sun, A., Qian, J. i wsp. "Lcz696 Improves Cardiac Function Via Alleviating Drp1-Mediated Mitochondrial Dysfunction in Mice with Doxorubicin-Induced Dilated Cardiomyopathy." *J Mol Cell Cardiol* 108 (2017): 138-48.
240. Maurea, N., Canale, M. L., Buccolo, S., Bisceglia, I., Paccone, A., Maurea, F., Scherillo, M., Quagliariello, V. "Abstract 12402: Sacubitril-Valsartan Increases Pampk and Reduces Inflammasome, Myddosome, Il-6 and Galectin-3 Levels in Short-Term Doxorubicin-Treated Mice Improving Longitudinal Strain and Ejection Fraction." *Circulation* 146, no. Suppl 1 (2022): A12402-A02.

241. Boutagy, N. E., Feher, A., Pfau, D., Liu, Z., Guerrero, N. M., Freiburg, L. A., Womack, S. J., Hoenes, A. C., Zeiss, C., Young L. H. i wsp. "Dual Angiotensin Receptor-Nepriylisin Inhibition with Sacubitril/Valsartan Attenuates Systolic Dysfunction in Experimental Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity." *JACC CardioOncol* 2, no. 5 (2020): 774-87.
242. Miyoshi, T., Nakamura, K., Amioka, N., Hatipoglu, O. F., Yonezawa, T., Saito, Y., Yoshida, M., Akagi, S., Ito, H. "Lcz696 Ameliorates Doxorubicin-Induced Cardiomyocyte Toxicity in Rats." *Sci Rep* 12, no. 1 (2022): 4930.
243. Dindaş, F., Güngör, H., Ekici, M., Akokay, P., Erhan, F., Doğduş, M., Yılmaz, M. B. "Angiotensin Receptor-Nepriylisin Inhibition by Sacubitril/Valsartan Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in a Pretreatment Mice Model by Interfering with Oxidative Stress, Inflammation, and Caspase 3 Apoptotic Pathway." *Anatol J Cardiol* 25, no. 11 (2021): 821-28.
244. Gu, J., Noe, A., Chandra, P., Al-Fayoumi, S., Ligueros-Saylan, M., Sarangapani, R., Maahs, S., Ksander, G., Rigel, D. F., Jeng, A. Y. i wsp. "Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Lcz696, a Novel Dual-Acting Angiotensin Receptor-Nepriylisin Inhibitor (ARNI)." *J Clin Pharmacol* 50, no. 4 (2010): 401-14.
245. Khan, M. N., Soomro, N. A., Naseeb, K., Bhatti, U. H., Rauf, R., Balouch, I. J., Moazzam, A., Bashir, S., Ashraf, T., Karim, M. "Safety and Tolerability of Sacubitril/Valsartan in Heart Failure Patient with Reduced Ejection Fraction." *BMC Cardiovasc Disord* 23, no. 1 (2023): 133.
246. Norberg, H., Bergdahl, E., Lindmark, K. "Safety and Tolerability of Initiating Maximum-Dose Sacubitril-Valsartan in Patients on Target Dose Renin-Angiotensin System Inhibitors." *Cardiovasc Ther* 2019 (2019): 6745074.
247. Kim, H., Oh, J., Lee, S., Ha, J., Yoon, M., Chun, K., Lee, C. J., Park, S., Lee, S., Kang, S. "Clinical Evidence of Initiating a Very Low Dose of Sacubitril/Valsartan: A Prospective Observational Analysis." *Sci Rep* 11, no. 1 (2021): 16335.
248. Chen, W. W., Jiang, J., Gao, J., Zhang, X. Z., Li, Y. M., Liu, Y. L., Dang, H. Q. "Efficacy and Safety of Low-Dose Sacubitril/Valsartan in Heart Failure Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Clin Cardiol* 46, no. 3 (2023): 296-303.
249. Hu, J., Wu, Y., Zhou, X., Wang, X., Jiang, W., Huo, J., Shan, Q. "Beneficial Effects of Sacubitril/Valsartan at Low Doses in an Asian Real-World Heart Failure Population." *J Cardiovasc Pharmacol* 76, no. 4 (2020): 445-51.
250. Kim, D., Jang, G., Hwang, J., Wei, X., Kim, H., Son, J., Rhee, S. J., Yun, K. H., Oh, S. K., Oh, C. M. i wsp. "Combined Therapy of Low-Dose Angiotensin Receptor-Nepriylisin Inhibitor and Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitor Prevents Doxorubicin-Induced

Cardiac Dysfunction in Rodent Model with Minimal Adverse Effects." *Pharmaceutics* 14, no. 12 (2022).

251. Yu, C., Li, D., Li, Z., Yu, D., Zhai, G. "Effect of Sacubitril/Valsartan on Inflammation and Oxidative Stress in Doxorubicin-Induced Heart Failure Model in Rabbits." *Acta Pharmaceutica* 71, no. 3 (2021): 473-84.

252. Mecinaj, A., Gulati, G., Heck, S. L., Holte, E., Fagerland, M. W., Larsen, A. I., Blix, E. S., Geisler, J., Wethal, T., Omland, T. "Rationale and Design of the Prevention of Cardiac Dysfunction During Adjuvant Breast Cancer Therapy (Prada Ii) Trial: A Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Trial." *Cardiooncology* 7, no. 1 (2021): 33.

253. Dillmann, W. H. "The Rat as a Model for Cardiovascular Disease." *Drug Discov. Today Dis. Models* 5, no. 3 (2008): 173-78.

254. Morton, D. B., Jennings, M., Buckwell, A., Ewbank, R., Godfrey, C., Holgate, B., Inglis, I., James, R., Page, C., Sharman, I. i wsp. "Refining Procedures for the Administration of Substances. Report of the Bvaawf/Frame/Rspca/Ufaw Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare." *Lab Anim* 35, no. 1 (2001): 1-41.

255. Cada, D. J., Baker, D. E., Leonard, J. "Sacubitril/Valsartan." *Hosp Pharm* 50, no. 11 (2015): 1025-36.

256. Sztechman, D., Żera, T., Czarzasta, K., Wojciechowska, M., Szczepańska-Sadowska, E., Cudnoch-Jędrzejewska, A. "Transthoracic Echocardiography: From Guidelines for Humans to Cardiac Ultrasound of the Heart in Rats." *Physiol Meas* 41, no. 10 (2020): 10tr02.

257. Zacchigna, S., Paldino, A., Falcão-Pires, I., Daskalopoulos, E. P., Dal Ferro, M., Vodret, S., Lesizza, P., Cannatà, A., Miranda-Silva, D., Lourenço A. P. i wsp. "Towards Standardization of Echocardiography for the Evaluation of Left Ventricular Function in Adult Rodents: A Position Paper of the ESC Working Group on Myocardial Function." *Cardiovasc Res* 117, no. 1 (2021): 43-59.

258. Konopelski, P., Ufnal, M. "Electrocardiography in Rats: A Comparison to Human." *Physiol Res* 65, no. 5 (2016): 717-25.

259. Kmecova, J., Klimas, J. "Heart Rate Correction of the Qt Duration in Rats." *Eur J Pharmacol* 641, no. 2-3 (2010): 187-92.

260. Hazra, S., Guha, R., Jongkey, G., Palui, H., Mishra, A., Vemuganti, G. K., Basak, S. K., Mandal, T. K., Konar, A. "Modulation of Matrix Metalloproteinase Activity by EDTA Prevents Posterior Capsular Opacification." *Mol Vis* 18 (2012): 1701-11.

261. Yin, F. C., Spurgeon, H. A., Rakusan, K., Weisfeldt, M. L., Lakatta, E. G. "Use of Tibial Length to Quantify Cardiac Hypertrophy: Application in the Aging Rat." *Am J Physiol* 243, no. 6 (1982): H941-7.
262. Zeiss, C. J., Gatti, D. M., Toro-Salazar, O., Davis, C., Lutz, C. M., Spinale, F., Stearns, T., Furtado, M. B., Churchill, G. A. "Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Collaborative Cross (Cc) Mice Recapitulates Individual Cardiotoxicity in Humans." *G3 (Bethesda)* 9, no. 8 (2019): 2637-46.
263. O'Brien, P., Smith, D., Knechtel, T., Marchak, M. A., Pruijboom-Brees, I., Brees, D., Spratt, D., Archer, J., Butler, P., Potter A. i wsp. "Cardiac Troponin I Is a Sensitive, Specific Biomarker of Cardiac Injury in Laboratory Animals." *Lab Anim* 40 (2006): 153-71.
264. Ahmed, A. Z., Satyam, S. M., Shetty, P., D'Souza, M. R. "Methyl Gallate Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats by Suppressing Oxidative Stress." *Scientifica* 2021 (2021): 6694340.
265. Kwatra, M., Kumar, V., Jangra, A., Mishra, M., Ahmed, S., Ghosh, P., Vohora, D., Khanam, R. "Ameliorative Effect of Naringin against Doxorubicin-Induced Acute Cardiac Toxicity in Rats." *Pharm Biol* 54, no. 4 (2016): 637-47.
266. Pan, D., Li, B., Wang, S. "Evaluation of Biomarkers for Doxorubicin-Induced Cardiac Injury in Rats." *Exp Ther Med* 24, no. 6 (2022): 712.
267. Polegato, B. F., Minicucci, M. F., Azevedo, P. S., Carvalho, R. F., Chiuso-Minicucci, F., Pereira, E. J., Paiva, S A. R., Zornoff, L. A. M., Okoshi, M. P., Matsubara, B. B. i wsp. "Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity Is Associated with Matrix Metalloproteinase-2 Alterations in Rats." *Cell Physiol Biochem* 35, no. 5 (2015): 1924-33.
268. Wang, X., Chen, L., Wang, T., Jiang, X., Zhang, H., Li, P., Lv, B., Gao, X. "Ginsenoside Rg3 Antagonizes Adriamycin-Induced Cardiotoxicity by Improving Endothelial Dysfunction from Oxidative Stress Via Upregulating the Nrf2-Are Pathway through the Activation of Akt." *Phytomedicine* 22, no. 10 (2015): 875-84.
269. Mantawy, E. M., El-Bakly, W. M., Esmat, A., Badr, A. M., El-Demerdash, E. "Chrysin Alleviates Acute Doxorubicin Cardiotoxicity in Rats Via Suppression of Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis." *Eur J Pharmacol* 728 (2014): 107-18.
270. Lafrance, M. H., Vézina, C., Wang, Q., Boileau, G., Crine, P., Lemay, G. "Role of Glycosylation in Transport and Enzymic Activity of Neutral Endopeptidase-24.11." *Biochem J* 302 (Pt 2), no. Pt 2 (1994): 451-4.
271. Ganju, R. K., Shpektor, R. G., Brenner, D. G., Shipp, M. A. "CD10/Neutral Endopeptidase 24.11 Is Phosphorylated by Casein Kinase II and Coassociates with Other Phosphoproteins Including the Lyn Src-Related Kinase." *Blood* 88, no. 11 (1996): 4159-65.

272. Siepmann, M., Kumar, S., Mayer, G., Walter, J. "Casein Kinase 2 Dependent Phosphorylation of Neprilysin Regulates Receptor Tyrosine Kinase Signaling to Akt." *PLoS One* 5, no. 10 (2010).
273. Zheng, R., Horiguchi, A., Iida, K., Lee, J., Shen, R., Goodman, Jr., O. B., Nanus, D. M. "Neutral Endopeptidase Is a Myristoylated Protein." *Mol Cell Biochem* 335, no. 1-2 (2010): 173-80.
274. Broccolini, A., Gidaro, T., De Cristofaro, R., Morosetti, R., Gliubizzi, C., Ricci, E., Tonali, P. A., Mirabella, M. "Hyposialylation of Neprilysin Possibly Affects Its Expression and Enzymatic Activity in Hereditary Inclusion-Body Myopathy Muscle." *J Neurochem* 105, no. 3 (2008): 971-81.
275. Kumar, G. K., Runold, M., Ghai, R. D., Cherniack, N. S., Prabhakar, N. R. "Occurrence of Neutral Endopeptidase Activity in the Cat Carotid Body and Its Significance in Chemoreception." *Brain Res* 517, no. 1-2 (1990): 341-3.
276. Kumar, G. K., Kou, Y. R., Overholt, J. L., Prabhakar, N. R. "Involvement of Substance P in Neutral Endopeptidase Modulation of Carotid Body Sensory Responses to Hypoxia." *J Appl Physiol (1985)* 88, no. 1 (2000): 195-202.
277. Carpenter, T. C., Stenmark, K. R. "Hypoxia Decreases Lung Neprilysin Expression and Increases Pulmonary Vascular Leak." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, no. 4 (2001): L941-8.
278. Fisk, L., Nalivaeva, N. N., Boyle, J. P., Peers, C. S., Turner, A. J. "Effects of Hypoxia and Oxidative Stress on Expression of Neprilysin in Human Neuroblastoma Cells and Rat Cortical Neurones and Astrocytes." *Neurochem Res* 32, no. 10 (2007): 1741-8.
279. Wang, Z., Yang, D., Zhang, X., Li, T., Li, J., Tang, Y., Le, W. "Hypoxia-Induced Down-Regulation of Neprilysin by Histone Modification in Mouse Primary Cortical and Hippocampal Neurons." *PLoS One* 6, no. 4 (2011): e19229.
280. Oh-hashii, K., Nagai, T., Tanaka, T., Yu, H., Hirata, Y., Kiuchi, K. "Determination of Hypoxic Effect on Neprilysin Activity in Human Neuroblastoma Sh-Sy5y Cells Using a Novel Hplc Method." *Biochem Biophys Res Commun* 334, no. 2 (2005): 380-5.
281. Mitra, R., Chao, O. S., Nanus, D. M., Goodman, Jr., O. B. "Negative Regulation of NEP Expression by Hypoxia." *Prostate* 73, no. 7 (2013): 706-14.
282. D'Aiuto, N., Hochmann, J., Millán, M., Di Paolo, A., Bologna-Molina, R., Silveira, J. S., Arocena, M. "Hypoxia, Acidification and Oxidative Stress in Cells Cultured at Large Distances from an Oxygen Source." *Sci Rep* 12, no. 1 (2022): 21699.

283. Ichihara, S., Ichihara G., Kawai, Y., Osawa, T., Yamada, Y. "Abstract 2055: Regulatory Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Redox-Regulated Transcription Factor in Doxorubicin Cardiotoxicity." *Circulation* 114, no. suppl 18 (2006): II_414-II_15.
284. Wen, S. Y., Ali, A., Huang, I. C., Liu, J. S., Chen, P. Y., Viswanadha, V. P., Huang, C. Y., Kuo, W. W. "Doxorubicin Induced Ros-Dependent Hif1 α Activation Mediates Blockage of Igf1r Survival Signaling by IGFBP3 Promotes Cardiac Apoptosis." *Aging (Albany NY)* 15, no. 1 (2023): 164-78.
285. Sanders, C. R., Hutchison, J. M. "Membrane Properties That Shape the Evolution of Membrane Enzymes." *Curr Opin Struct Biol* 51 (2018): 80-91.
286. Yandle, T., Richards, M., Smith, M., Charles, C., Livesey, J., Espiner, E. "Assay of Endopeptidase-24.11 Activity in Plasma Applied to in Vivo Studies of Endopeptidase Inhibitors." *Clin Chem* 38, no. 9 (1992): 1785-91.
287. Sayed-Ahmed, M. M., Khattab, M. M., Gad, M. Z., Osman, A. M. "Increased Plasma Endothelin-1 and Cardiac Nitric Oxide During Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy." *Pharmacol Toxicol* 89, no. 3 (2001): 140-4.
288. Kang, Y., Wang, W., Zhao, H., Qiao, Z., Shen, X., He, B. "Assessment of Subclinical Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in a Rat Model by Speckle-Tracking Imaging." *Arq Bras Cardiol* 109, no. 2 (2017): 0.
289. Sacco, G., Bigioni, M., Evangelista, S., Goso, C., Manzini, S., Maggi, C. A. "Cardioprotective Effects of Zofenopril, a New Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor, on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in the Rat." *Eur J Pharmacol* 414, no. 1 (2001): 71-8.
290. Villani, F., Galimberti, M., Zunino, F., Monti, E., Rozza, A., Lanza, E., Favalli, L., Poggi, P. "Prevention of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy by Reduced Glutathione." *Cancer Chemother Pharmacol* 28, no. 5 (1991): 365-9.
291. Vandewijngaert, S., Swinnen, M., Walravens, A. S., Beerens, M., Gillijns, H., Caluwé, E., Tainsh, R. E., Nathan, D. I., Allen, K., Brouckaert P. i wsp. "Decreased Soluble Guanylate Cyclase Contributes to Cardiac Dysfunction Induced by Chronic Doxorubicin Treatment in Mice." *Antioxid Redox Signal* 26, no. 4 (2017): 153-64.
292. Hullin, R., Métrich, M., Sarre, A., Basquin, D., Maillard, M., Regamey, J., Martin, D. "Diverging Effects of Enalapril or Eplerenone in Primary Prevention against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity." *Cardiovasc Res* 114, no. 2 (2018): 272-81.
293. Allen, B. D., Zhang, Z., Naresh, N. K., Misener, S., Procissi, D., Carr, J. C. "Slow-Release Doxorubicin Pellets Generate Myocardial Cardiotoxic Changes in Mice without Significant Systemic Toxicity." *Cardiovasc Toxicol* 19, no. 5 (2019): 482-84.

294. Teng, L. L., Shao, L., Zhao, Y. T., Yu, X., Zhang, D. F., Zhang, H. "The Beneficial Effect of N-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Doxorubicin-Induced Chronic Heart Failure in Rats." *J Int Med Res* 38, no. 3 (2010): 940-8.
295. Liu, X., Gu, X., Li, Z., Li, X., Li, H., Chang, J., Chen, P., Jin, J., Xi, B., Chen D. i wsp. "Neuregulin-1/ErbB-Activation Improves Cardiac Function and Survival in Models of Ischemic, Dilated, and Viral Cardiomyopathy." *J Am Coll Cardiol* 48, no. 7 (2006): 1438-47.
296. Xiang, P., Deng, H. Y., Li, K., Huang, G., Chen, Y., Tu, L., Ng, P. C., Pong, N. H., Zhao, H., Zhang L. i wsp. "Dexrazoxane Protects against Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: Upregulation of Akt and Erk Phosphorylation in a Rat Model." *Cancer Chemother Pharmacol* 63, no. 2 (2009): 343-49.
297. Yu, Q., Li, Q., Na, R., Li, X., Liu, B., Meng, L., Liutong, H., Fang, W., Zhu, N., Zheng, X. "Impact of Repeated Intravenous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Infusion on Myocardial Collagen Network Remodeling in a Rat Model of Doxorubicin-Induced Dilated Cardiomyopathy." *Mol Cell Biochem* 387, no. 1 (2014): 279-85.
298. Chang, S. A., Lim, B. K., Lee, Y. J., Hong, M. K., Choi, J. O., Jeon. E. S. "A Novel Angiotensin Type I Receptor Antagonist, Fimasartan, Prevents Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats." *J Korean Med Sci* 30, no. 5 (2015): 559-68.
299. Mao, C., Hou, X., Wang, B., Chi, J., Jiang, Y., Zhang, C., Li, Z. "Intramuscular Injection of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in Dilated Cardiomyopathy Rats." *Stem Cell Res Ther* 8, no. 1 (2017): 18.
300. Sun, R., Wang, J., Zheng, Y., Li, X., Xie, T., Li, R., Liu, M., Cao, Y., Lu, L., Zhang, Q. i wsp. "Traditional Chinese Medicine Baoxin Decoction Improves Cardiac Fibrosis of Rats with Dilated Cardiomyopathy." *Exp Ther Med* 13, no. 5 (2017): 1900-06.
301. Medeiros-Lima, D. J. M., Carvalho, J. J., Tibirica, E., Borges, J. P., Matsuura, C. "Time Course of Cardiomyopathy Induced by Doxorubicin in Rats." *Pharmacol Rep* 71, no. 4 (2019): 583-90.
302. Li, X., Xu, G., Wei, S., Zhang, B., Yao, H., Chen, Y., Liu, W., Wang, B., Zhao, J., Gao, Y. "Lingguizhugan Decoction Attenuates Doxorubicin-Induced Heart Failure in Rats by Improving Tt-Sr Microstructural Remodeling." *BMC Complement Altern Med* 19, no. 1 (2019): 360.
303. Oliveira, M. S., Melo, M. B., Carvalho, J. L., Melo, I. M., Lavor, M. S., Gomes, D. A., de Goes, A. M., Melo, M. M. "Doxorubicin Cardiotoxicity and Cardiac Function Improvement after Stem Cell Therapy Diagnosed by Strain Echocardiography." *J Cancer Sci Ther* 5, no. 2 (2013): 52-57.

304. Willis, M. S., Parry, T. L., Brown, D. I., Mota, R. I., Huang, W., Beak, J. Y., Sola, M., Zhou, C., Hicks, S. T., Caughey, M. C. i wsp. "Doxorubicin Exposure Causes Subacute Cardiac Atrophy Dependent on the Striated Muscle-Specific Ubiquitin Ligase Murf1." *Circ Heart Fail* 12, no. 3 (2019): e005234.
305. Sharma, A., Parikh, M., Shah, H., Gandhi, T. "Modulation of Nrf2 by Quercetin in Doxorubicin-Treated Rats." *Heliyon* 6, no. 4 (2020): e03803.
306. Hong, Y. M., Lee, H., Cho, M. S., Kim, K. C. "Apoptosis and Remodeling in Adriamycin-Induced Cardiomyopathy Rat Model." *Korean J Pediatr* 60, no. 11 (2017): 365-72.
307. Neilan, T. G., Coelho-Filho, R. R., Pena-Herrera, D., Shah, R. V., Jerosch-Herold, M., Francis, S. A., Moslehi, J., Kwong, R. Y. "Left Ventricular Mass in Patients with a Cardiomyopathy after Treatment with Anthracyclines." *Am J Cardiol* 110, no. 11 (2012): 1679-86.
308. Mabudian, L., Jordan, J. H., Bottinor, W., Hundley, W. G. "Cardiac Mri Assessment of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity." *Front Cardiovasc Med* 9 (2022): 903719.
309. Armstrong, G. T., Plana, J. C., Zhang, N., Srivastava, D., Green, D. M., Ness, K. K., Donovan, F. D., Metzger, M. L., Arevalo, A., Durand, J. i wsp. "Screening Adult Survivors of Childhood Cancer for Cardiomyopathy: Comparison of Echocardiography and Cardiac Magnetic Resonance Imaging." *J Clin Oncol* 30, no. 23 (2012): 2876-84.
310. Meléndez, G. C., Sukpraphrute, B., D'Agostino, Jr., R. B., Jordan, J. H., Klepin, H. D., Ellis, L., Lamar, Z., Vasu, S., Lesser, G., Burke, G. L. i wsp. "Frequency of Left Ventricular End-Diastolic Volume-Mediated Declines in Ejection Fraction in Patients Receiving Potentially Cardiotoxic Cancer Treatment." *Am J Cardiol* 119, no. 10 (2017): 1637-42.
311. Liang, K., Yang, L., Yin, C., Xiao, Z., Zhang, J., Liu, Y., Huang, J. "Estrogen Stimulates Degradation of B-Amyloid Peptide by up-Regulating Neprilysin*." *J Biol Chem* 285, no. 2 (2010): 935-42.
312. Yao, M., Nguyen, T. V., Rosario, E. R., Ramsden, M., Pike, C. J. "Androgens Regulate Neprilysin Expression: Role in Reducing Beta-Amyloid Levels." *J Neurochem* 105, no. 6 (2008): 2477-88.
313. Saito, T., Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Takano, J., Huang, S., Suemoto, T., Higuchi, M., Saido, T. C. "Somatostatin Regulates Brain Amyloid B Peptide A β 42 through Modulation of Proteolytic Degradation." *Nat Med* 11, no. 4 (2005): 434-39.
314. Grimm, M. O. W., Lehmann, J., Mett, J., Zimmer, V. C., Grösgen, S., Stahlmann, C. P., Hundsdörfer, B., Hauptenthal, V. J., Rothhaar, T. L., Herr, C. i wsp. "Impact of Vitamin D on Amyloid Precursor Protein Processing and Amyloid-B Peptide Degradation in Alzheimer's Disease." *Neurodegener Dis* 13, no. 2-3 (2014): 75-81.

315. Abe, H., Semba, H., Takeda, N. "The Roles of Hypoxia Signaling in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases." *J Atheroscler Thromb* 24, no. 9 (2017): 884-94.
316. Kim, B. S., Park, I. H., Lee, A. H., Kim, H. J., Lim, Y. H., Shin, J. H. "Sacubitril/Valsartan Reduces Endoplasmic Reticulum Stress in a Rat Model of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity." *Arch Toxicol* 96, no. 4 (2022): 1065-74.
317. Jensen, R. A., Acton, E. M., Peters, J. H. "Doxorubicin Cardiotoxicity in the Rat: Comparison of Electrocardiogram, Transmembrane Potential, and Structural Effects." *J Cardiovasc Pharmacol* 6, no. 1 (1984): 1201.
318. Liu, X., Li, D., Pi, W., Wang, B., Xu, S., Yu, L., Yao, L., Sun, Z., Jiang, J., Mi, Y. "LCZ696 Protects against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Inhibiting Ferroptosis Via Akt/Sirt3/Sod2 Signaling Pathway Activation." *Int Immunopharmacol* 113 (2022): 109379.
319. Benson, A. B., Ajani, J. A., Catalano, R. B., Engelking, C., Kornblau, S. M., Martenson, J. A., McCallum, R., Mitchell, E. P., O'Dorisio, T. M., Vokes, E. E. i wsp. "Recommended Guidelines for the Treatment of Cancer Treatment-Induced Diarrhea." *J Clin Oncol* 22, no. 14 (2004): 2918-26.
320. Bossi, P., Antonuzzo, A., Cherny, N. I., Rosengarten, O., Pernot, S., Trippa, F., Schuler, U., Snegovoy, A., Jordan, K., Ripamonti, C. I. "Diarrhoea in Adult Cancer Patients: ESMO Clinical Practice Guidelines." *Annals of Onc* 29 (2018): iv126-iv42.

UCHWAŁA NR WAW2/031/2021

z dnia 10 marca 2021 r.

II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1¹ ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. z 2019 r. poz. 1392), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: „**Ocena roli neprylizyny w rozwoju kardiotoksyczności związanej z antracyklinami**” z dnia 04 lutego 2021 roku, złożonego przez Centrum Badań Przedklinicznych CBP WUM, adres: ul. Banacha 1B, 02-097 Warszawa, zaplanowanego przez Agnieszkę Cudnoch-Jędrzejewską² przy udziale:³ (nie dotyczy)

Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § 1, Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: [PB2] badania podstawowe - sercowo naczyniowy układ krążenia krwi i limfy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: umiarkowane.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków⁴:

Gatunek	Wiek/stadium rozwoju	Liczba
Szczur wędrowny Sprague Dawley (SPRD)	12 tygodni	70

4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska, Paweł Sobczuk, Elżbieta Budzińska-Wrzesień, Katarzyna Czarzasta, Aleksandra Sobiborowicz, Małgorzata Kowalczyk, Marzanna Tkaczyk, Dorota Sztechman.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie⁵ od 10.03.2021 do 30.06.2025.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku⁶: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem, w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy.
9. Doświadczenie ~~zostanie/nie zostanie~~ poddane ocenie retrospektywnej ~~na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.~~

¹ Niewłaściwy zapis usunąć

² imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

³ Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

⁴ Podać liczbę, szczerp/stado, wiek/stadium rozwoju

⁵ Nie dłużej niż 5 lat

⁶ Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

§ 3

Uzasadnienie:

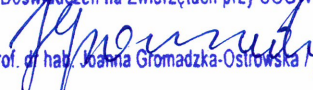
Komisja oceniła wniosek zgodnie z art. 47 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. z 2019 r. poz. 1392). Po zapoznaniu się z problematyką badawczą przedstawioną we wniosku komisja stwierdza, że przedstawiony projekt spełnia zasady dopuszczenia doświadczeń na zwierzętach pod kątem oceny etycznej. Na podstawie art. 107 § 4 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. – Kodeks postępowania administracyjnego z późniejszymi zmianami (Dz. U. 2020 r. poz. 256) odstąpiono od sporządzania uzasadnienia decyzji, gdyż decyzja jest zgodna z wnioskiem strony.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
II Lokalna Komisja Etyczna
ds. Doświadczeń na Zwierzętach
02-786 Warszawa, ul. Ciszewskiego 8
tel. 22 59-35622

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

PRZEWODNICZĄCA
II Lokalnej Komisji Etycznej
ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy SGGW

/ Prof. dr hab. Joanna Gromadzka-Ostrowska /
(Podpis Przewodniczącej Komisji)

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – tj.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

- 1) Użytkownik,
- 2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
- 3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu