

REZERVA CORONARIANĂ ÎN AFECȚIUNEA DOXORUBICINICĂ A MIOCARDULUI

Mihail Popovici¹ – academician AŞM, dr. hab. în şt. med., prof. univ.,
Valeriu Cobet² – dr. hab. în şt. med., prof. univ.,
Lucia Ciobanu¹ – dr. hab. în şt. med., conf. cercet.,
Ion Popovici¹ – dr. hab. în şt. med., prof. cercet.,
Victoria Ivanov¹ – dr. hab. în şt. med., prof. cercet.,
Nicolae Ciobanu¹ – dr. hab. în şt. med., prof. cercet.,
Ion Moraru¹ – dr. în şt. med., conf. cercet.,
Elena Panfile¹ – dr. în şt. med., conf. cercet.,
Mihail Todiraş² – dr. hab. în şt. med., conf. cercet.,
Lilia Tacu² – asistent univ.,
Mihaela Ivanov² – studentă,

¹IMSP Institutul de Cardiologie, Republica Moldova, Chişinău,

²USMF „Nicolae Testemiţanu”, Chişinău

popovicim@gmail.com

Rezumat

Utilizând modelul de perfuzie a cordului izolat izovolumetric a fost evaluată în vitro reactivitatea coronariană în cardiomiopatia doxorubicinică, reprodusă la șobolani prin administrarea antraciclinei în doză cumulativă de 16 mg/kg. Valoarea rezervei funcționale coronariene este semnificativ redusă cu până la 43,2% în CMPDx la acțiunea endotelium dependentă a factorilor vasotropi naturali: acetilcolina, adenzina și bradikina. Totodată, coronarodilatarea mediată prin hiperpolarizare nu este periclitată, RFC iminentă acțiunii peroxidului de hidrogen și EET-11,12 fiind decelată la nivelul martor. Acest patern al reglării perfuziei coronariene poate fi un mecanism compensator în condițiile disfuncției endoteliale, întrucât acțiunea ET-1 pe fondalul blocării canalelor responsabile pentru hiperpolarizare, K_{Ca} , a condus la o reducere semnificativ mai concludentă a fluxului coronarian în CMPDx comparativ cu indicele martor.

Cuvinte-cheie: doxorubicină, cardiotoxicitate, reactivitate coronariană

Summary. Coronary reserve in the doxorubicin induced myocardium injury

Using the model of izovolumetric isolated heart has been assayed in vitro the coronary reactivity in doxorubicin induced cardiomyopathy (DxCMP), reproduced in rat by antracycline administration in cumulative dose of 16 mg/kg. The coronary functional reserve (CFR) value in DxCMP is significantly reduced by a range up to 43,2% in response to endothelium-dependent action of natural vasotropic agents such as acetylcholine, adenosine and bradykinin. However, the coronary dilation mediated by hyperpolarization is not jeopardized, and CFR inherent to hydrogen peroxide and 11.12 EET action was estimated equal to control level. This pattern of coronary perfusion regulation could be a compensatory mechanism in endothelial dysfunction because the endothelin-1 action preceded by K_{Ca} channels (responsible for hyperpolarization) blocking led to a significant more conspicuous diminution of coronary flow in DxCMP comparing to control index.

Key words: doxorubicin, cardiotoxicity, coronary reactivity

Rezюме: Коронарный резерв при поражении миокарда доxorубицином

Используя модель перфузии изолированного сердца, была исследована коронарная реактивность при доxorубициновой кардиомиопатии (ДКМП), воспроизведенной на крысах путём введения антрациклина в кумулятивной дозе, 16 мг/кг. Значение коронарного функционального резерва при ДКМП оказалось достоверно сниженной на величине до 43,2% при эндотелий зависимом воздействии натуральных факторов: ацетилхолина, аденозина и брадикинина. Тем не менее, коронарная дилатация опосредованной гиперполяризацией, на действие таких факторов, как перекись водорода и эпоксиэйкозатриены-11,12, была обнаружена нормальной. Этот механизм может быть компенсаторным в условия эндотелиальной дисфункции, поскольку действие эндотелина-1 на фоне блокирования калиевых каналцев (K_{Ca}), ответственных за гиперполяризацию, привело к достоверно более выраженному снижению коронарного потока по сравнению с контрольным показателем.

Ключевые слова: доxorубицин, кардиотоксичность, коронарная реактивность

Introducere

Doxorubicina (Dx) este un remediu anti-neoplastic eficient, utilizat cu predilecție în tratamentul pacienților cu leucemie acută și cronică, limfoame, sarcoame și cancer de sân. Acesta face parte din grupul antraciclinelor, care se remarcă prin acțiunea sa de inhibiție a topoizomerazei tipul II, replicării ADN și transcrierii ARN, potențarea formării radicalilor liberi de oxigen, precum și înlăturarea histonilor din cromatina nucleară [1, 2].

Atingerea efectului antitumoral al Dx este frecvent periclitată prin dezvoltarea cardiomiopatiei dilatative drept o manifestare fatidică a cardiotoxicității preparatului, întâlnită la 10-15% din pacienții oncologici. Cardiomiopatia doxorubicinică (CMPDx) poate evolua foarte rapid, deja pe perioada primului an de aplicare a tratamentului antitumoral sau se constată tardiv, după mai mulți ani de la sistarea administrării Dx [3, 4, 5].

Fiind un acceptor potent de electron, Dx potențază nu numai stresul oxidativ, dar prin intermediul anionului superoxid, responsabil de activarea caspazei 3 și proteinei „heat-shock”-25, induce apoptoza celulară [6, 7].

Un alt mecanism important al CDx se referă la încărcarea cardiomiocitelor cu calciu, determinată în parte de activarea canalelor lente (voltaj dependente, L-type) de Ca^{2+} și a efluxului cationului din rezervele intracelulare cantonate în reticulul sarcoplasmatic, în timp ce pompa SERCA2a (ATP-aza de calciu) este inhibată [8]. Surplusul de calciu activează calpainele, care mediază 2 fenomene detrimentale în cardiomiocit: activarea caspazei 12 și titinei, ultimul, conducând la degradarea citoscheletului sarcomerului și depresia contractilă a miocardului [9].

Deja în concentrații mici doxorubicina inhibă respirația mitocondrială și beta-oxidarea acizilor grași, rezultând în declinul energetic al miocardului, asociat de micșorarea raportului creatinfosfat/creatin, formând astfel, o precondiționare pentru apoptoza și necroza cardiomiocitelor [10].

Remodelarea miocardului în CDx este definită

de mai multe paterne, printre care oportună se anunță activarea metaloproteinazelor matricei extracelulare, în special tipul 2 și 9 [11]. Degradarea exagerată a colagenului devine un factor trigger al dilatării ventriculare și evoluției insuficienței cardiace.

Cu toate acestea sunt slab cunoscute efectele Dx asupra reactivității coronariene și sistemului intrinsec de control al perfuziei coronariene. Deși entitatea fiziopatologică a cardiomiopatiei impune afectarea miocardului fără periclitarea sistemului coronarian, mai multe efecte iminente cardiotoxicității Dx sugerează hazardul funcțional al endoteliului vascular și compromiterea fenomenului coronarian Gregg, cum ar fi: apoptoza celulară, acumularea de peroxinitrit (ONOO, produsul reacției dintre anionul superoxid și oxidul nitric), reducerea fibrelor de elastină din peretele vascular [12], micșorarea expresiei factorului de transcripție KLF (Kruppel-like factor) implicat în angiogeneză, augmentarea răspunsului inflamator etc. Acesta din urmă se anunță oportun în remodelarea vasculară și diseminarea leziunilor endoteliale. C. Alise și colab. (2011) au demonstrat în acest context că doxorubicina stimulează eliberarea TNF-alpha de către macrofagele miocardului [13], iar M. Argun și colab. (2016) au decelat creșterea cantitativă semnificativă cu peste 34% a TNF-alpha în miocard deja după 2 săptămâni de acțiune a Dx [14].

Important de menționat, că creșterea expresiei TNF-alpha sub acțiunea Dx se atestă nu numai în miocard, dar și în peretele arterelor coronariene [15].

Prin urmare admiterea semnificației fiziopatologice a impactului coronarian al Dx în promovarea cardiotoxicității și evoluția CMPDx este inteligibilă.

Scopul studiului: evaluarea *in vitro* a răspunsului coronarian la acțiunea agenților vasotropi în CMPDx experimentală.

Material și metode

Afecțiunea Dx a miocardului s-a reprodus la șobolanii albi prin administrarea *i/p* a Dx (doza cumulativă 16 mg/kg în 2 săptămâni, 2 injecții/per săptămână în doza de o priză 4,0 mg/kg). Animalele au fost sacrificate prin eutanazie (tiopental de sodiu, 0,4

mg/kg) după 10 zile de la ultima injectare a antracilinei, întrucât doxorubicina este un remediu care în baza *clearance*-ului redus se cumulează efectiv în organism. Cordul izolat izovolumetric a fost perfuzat cu soluția Krebs conform modelului Langendorff fără recirculație la presiunea de umplere a estuarului aortic de 80 cm H₂O. Rezerva funcțională coronariană (RFC) s-a estimat prin modificarea relativă a fluxului coronarian (FC) la acțiunea acetilcolinei (Ach), adenozeinei (Az), bradikininei (Bk), peroxidului de hidrogen (H₂O₂), epoxieicosatrienelor 11,12 (EET-11,12) în concentrațiile 10⁻⁷-10⁻⁵ M față de valoarea bazală a FC. Totodată, a fost apreciat și răspunsul coronar-constrictor al endotelinei-1 (ET-1), inclusiv pe fondul premedicației cordului izolat cu apamină, blocator selectiv al canalelor de potasiu calciu dependente (K_{Ca}). Datele obținute au fost comparate și analizate statistic conform criteriului t-Student în raport cu inerențele din lotul martor (animalele intacte).

Rezultate

Valoarea rezervei funcționale coronariene a cordului izolat izovolumetric la acțiunea Ach în diferite concentrații poate fi estimată din tab.1.

Valoarea bazală (inițială) a FC în CMPDx nu diferă semnificativ față de paternul martor. Stimularea parasimpatică a cordului s-a impus printr-o creștere mai mică a FC comparativ cu lotul martor, fapt ce a condus la diferență semnificativă a indicelui în vârful

acțiunii Ach la concentrația agonistului natural $\geq 10^{-6}$ M. Reculul de 13,9 și 14,5% al FC se decelează la acțiunea Ach în concentrația de 10⁻⁶ M și, respectiv, 10⁻⁵ M.

Modificări similare al FC în CMPDx în raport cu răspunsul coronarian martor s-au constatat și la acțiunea altor 2 factori vasotropi cu efect coronarodilatator dependent de endotelii, adenozeina și bradikinina (tab. 2).

La acțiunea Ad și Bk în concentrația 10⁻⁷ M rezerva funcțională coronariană în CMPDx este comparabilă cu indicele martor, iar diferența fluxului coronarian estimat în vârful stimulării este statistic neconcludentă. Ca și în cazul Ach, devierile mai importante sunt decantate la acțiunea agenților coronarodilatatori naturali în concentrația 10⁻⁶ M, acestea devenind semnificative la concentrația Ad și Bk de 10⁻⁵ M, când fluxul coronarian se estimează în CMPDx semnificativ subiacent paternului martor cu 18,54% și, respectiv, 17,71%, iar valoarea RFC este depreciată cu peste 50%.

Importante se anunță datele privind valoarea RFC inerente acțiunii factorilor coronarodilatatori mediate prin mecanismul de hiperpolarizare, cum ar fi H₂O₂ și EET-11,12 (tab. 3).

Acțiunea acestor 2 factori vasotropi nu a determinat periclitarea rezervei funcționale coronariene în afecțiunea doxorubicinică a miocardului. Dimpotri-

Tabelul 1

Fluxul coronarian (ml/min) și RFC (%) la acțiunea acetilcolinei

Lot	FC bazal	Acțiunea acetilcolinei (M)		
		10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
CMPDx (n=9)	12,7±0,8	13,2±0,8 RFC=3,94%	14,2±0,8* RFC=11,81%	14,8±0,9* RFC=16,54%
Martor (n=9)	13,4±0,9	14,9±0,9 RFC=11,19%	16,5±0,9 RFC=23,13%	17,3±1,0 RFC=29,10%

Legendă: * – semnificativ (p<0,05) vs indicele martor

Tabelul 2

Fluxul coronarian (ml/min) și RFC (%) la acțiunea adenozeinei și bradikininei

Lot	Acțiunea adenozeinei (M)		Acțiunea bradikininei (M)	
	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵
CMPDx	13,4±0,8 RFC=5,51%	14,5±0,8* RFC=14,17%	13,5±0,9 RFC=6,30%	14,4±0,8* RFC=13,39%
Martor	14,5±0,9 RFC=8,21%	17,8±1,1 RFC=32,83%	14,6±1,0 RFC=8,96%	17,5±1,1 RFC=30,60%

Legendă: * – semnificativ (p<0,05) vs indicele martor

Tabelul 3

Rezerva funcțională coronariană la acțiunea H₂O₂ și EET-11,12

Indice	Lot	H ₂ O ₂ (M)		EET-11,12 (M)	
		10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
RFC (%)	CMPDx	15,7±1,27	16,2±1,29	14,3±1,21	15,1±1,32
RFC (%)	Martor	14,9±1,25	15,7±1,31	14,1±1,22	14,7±1,34

vă, în ambele concentrații aplicate RFC chiar a fost mare, deși nesemnificativ, în CMPDx comparativ cu paternul martor, fapt ce indică asupra rolului mecanismului de hiperpolarizare, drept unul compensator, de alternativă privind fenomenul coronarian Gregg în condițiile afectării reactivității coronariene mediate de endoteliul vascular.

Pentru a evidenția aportul acestuia în promovarea efectului coronaroconstrictor al ET-1 am apreciat efectul oligopeptidei pe fondalul blocării selective a canalelor K_{Ca} responsabile de hiperpolarizarea endoteliocitului și miocitului neted vascular, utilizând apamina (tab. 4).

Lot	FC bazal	FC la stimulare		
		ET-1 (5×10^{-7} M)	ET-1 (5×10^{-6} M)	ET-1 + Apamină (5×10^{-7} M)
CMPDx	12,9±0,8	10,9±0,8 -15,5%	9,7±0,8 -24,8%	9,2±0,9 -28,78%
Martor	13,6±0,9	11,5±0,9 -15,4%	11,3±0,9 -16,9%	10,9±0,9 -19,85%

Acțiunea ET-1 în concentrația 5×10^{-7} M a indus o reducere similară a FC în ambele loturi. În concentrație mai mare (5×10^{-6} M) endotelina-1 a determinat o coronaroconstricție mai importantă în CMPDx, dat fiind că FC s-a redus cu 24,8% vs 16,9% în lotul martor.

Dacă ET-1 în concentrația 5×10^{-7} M acționează pe fondalul pretratării cordului izolat izovolumetric cu apamină, atunci diminuarea FC devine mai concludentă în ambele loturi, reculul indicelui față de valoarea bazală a fost mult mai mare în CMPDx comparativ cu paternul martor: 28,78% vs 19,85%. Altfel spus, decrementul FC iminent acțiunii ET-1 a crescut în CMPDx pe fondalul blocării canalelor K_{Ca} cu 85,7%, iar în lotul martor doar cu 28,9%.

Prin urmare se poate evidenția rolul mecanismului de hiperpolarizare la noima efectului coronaroconstrictor al ET-1, ponderea acestuia, luând în considerare caracterul modificării FC pe fondalul apaminei, fiind mai pertinentă în afecțiunea doxorubicinică a miocardului.

Discuție

Rezultatele evaluării *in vitro* a răspunsului coronarian în CMPDx demonstrează afectarea vasorelaxării mediate de endoteliu inerentă acțiunii factorilor coronarodilatatori naturali principali: acetilcolina, adenzina și bradikinina. Rezerva funcțională coronariană la acțiunea acestora este statistic redusă față de paternul martor și reculul se majorează odată cu creșterea concentrației factorului vasotrop. Deci, cardiotoxicitatea doxorubicinei care se poate manifesta

chiar în primele 24 de ore de la administrarea antraciclonei prin activarea notabilă a sistemului simpatico-adrenergic [16, 17] este în contuguitate cu periclitarea reactivității coronariene.

Pot fi aduse la apel mai multe cauze plauzibile ale acestui fenomen, efectul lor rezultat fiind micșorarea conținutului de oxid nitric (NO).

Doxorubicina micșorează expresia tetrahidropterinei, cofactorul principal al enzimei endoteliale constitutive de sinteză a NO, NOsec [16]. Acest impact este augmentat și prin efectul proinflamator al Dx declanșat preponderent prin majorarea expresiei TNF-alpha în miocard și arterele coronariene. Administrarea fluvastatienei în CMPDx murină a redus cardiotoxicitatea doxorubicinei, beneficiu asociat de atenuarea răspunsului inflamator și creșterea cantitativă a NO [18].

Reducerea viabilității NO datorită inactivării lui de către anionul superoxid eliberat excesiv sub acțiunea Dx ar fi un mecanism incipient al periclitării fenomenului Gregg în CMPDx. R.Carvalho și colab. (2010) au relatat capacitatea Dx de a crește expresia genelor responsabile pentru glicoliza anaerobă, iar acumularea acidului lactic potențează acțiunea Dx de blocare a NOsec [19]. Administrarea Dx la pacienții oncologici a condus destul de repede (deja după 30 min) la elevarea conținutului sanguin de superoxid anion și afectarea reactivității vasculare endoteliu dependente [20].

Doxorubicina stimulează prin intermediul receptorului TOLL-like-2 expresia factorului nuclear-kappaB, efect important atât în promovarea inflamației, cât și apoptozei celulare [21]. Apoptoza cardiomiocitelor induce depresia cardiacă iminentă CMPDx, iar a celulelor endoteliale – incompetența de sinteză a NO. Totodată, Dx diminuează fezabilitatea proceselor de angiogeneză prin ce se perpetuă injuriile endoteliale și disfuncția coronariană.

Pe de altă parte, datele studiului relevă că CMPDx excelează prin coronarodilatarea adecvată mediată prin hiperpolarizare dependentă de activarea canalelor de potasiu. Rezerva funcțională coronariană estimată la acțiunea peroxidului de hidrogen și EET-11,12 este similară paternului martor, fapt ce indică asupra funcționalității normale a receptorilor, activarea cărora asigură deschiderea canalelor K_{Ca} și hiperpolarizarea atât a endoteliocitelor, care prin intermediul mecanismului electrogen de contact se propagă spre media musculară, cât și miocitelor netede vasculare.

Peroxidul de hidrogen este radicalul liber de oxigen activ format de către cardiomiocit, în special în tahicardie. Rata lui crește notabil și sub acțiunea Dx. Prin difuziune H_2O_2 atinge media musculară corona-

riană producând hiperpolarizarea și, respectiv, relaxarea acesteia. Endoteliocitul de asemenea este abil să elibereze H_2O_2 în condițiile stimulării de către stresul hemodinamic, dar paternul dat este mult inferior celui angrenat de cardiomiocit.

Sinteza EET-11,12 din acidul arihidonic este declanșată de epoxigenazele citocromului P450, expresia căruia este proprie nu numai hepatocitelor, dar este dovedită și pentru alte celule (e.g. astrocitele, endoteliocitele, cardiomiocitele etc.). Rolul EET-11,12, precum și EET-14,15 în reactivitatea vasculară este consemnat prin prisma fenomenului Vanhoutte, entitatea căruia constă în capacitatea acestor derivați ai acidului arahidonic de a relaxa arterele organelor vitale independent de capacitatea endoteliului vascular de sinteză a oxidului nitric [22].

Este importantă evidența potențării efectului coronarocunstrictor al ET-1 în CMPDx în condițiile blocării canalelor K_{Ca} , dat fiind că decrementul FC a crescut mai mult ca triplu comparativ cu paternul martor. Endotelina-1 este recunoscută drept cel mai potent agent vasoconstrictor și se anunță implicată în patogenia CMPDx, iar blocarea receptorilor ETA sau inhibiția enzimei de sinteză a ET-1 se impune prin beneficii cardiace [23, 24]. Există dovezi ce arată că administrarea într-o priză a Dx în doza de 20 mg/kg conduce la creșterea expresiei ET-1 în miocard, în asocierea cu majorarea TNF- α , dialdehidei malonice și reducerea activității antioxidante totale [25]. Prin urmare, influențele farmacologice ce majorează expresia citocromului P450 pot atenua cardiotoxicitatea Dx prin ameliorarea coronarodilatării iminente fenomenului Vanhoutte.

Concluzii

1. Afecțiunea doxorubicinică a miocardului excelează prin micșorarea semnificativă cu până la 43,2% a rezervei funcționale coronariene iminente acțiunii factorilor cu efect coronarodilatator endotelial dependent: acetilcolină, adenozină și bradikinină.

2. Coronarodilatarea mediată prin hiperpolarizare rezultantă din acțiunea H_2O_2 și EET-11,12 nu este periclitată în CMPDx, iar aportul canalelor K_{Ca} în contracararea efectului coronarocunstrictor al endotelinei-1 este mai concludent comparativ cu paternul martor.

Bibliografie

1. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E et al. *Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity*. Pharmacol Rev, 2004; 56(2): 185-229.

2. Pang B, Qiao X, Janssen L et al. *Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin*. Nature Communications, 2013; 4: 1908-1910.

3. Singal PK, Iliskovic N. *Doxorubicin-induced cardiomyopathy*. New Eng J Med, 1998; 339: 900-905.

4. Kumar S, Marfatia R, Tannenbaum S et al. *Doxorubicin-induced cardiomyopathy 17 years after chemotherapy*. Tex Heart Inst J, 2012; 39(3): 424-427.

5. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL et al. *Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies*. J Mol Cell Cardiol, 2012; 52(6): 1213-1225.

6. Simunek T, Sterba M, Popelovs O et al. *Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron*. Pharmacol Rep, 2009; 61: 154-171.

7. Tatidede E, Sehirli O, Veliglu-Ogunc A et al. *Resveratrol treatment protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage*. Free Radic Res, 2009; 43: 195-205.

8. Arai M, Yoguchi A, Takizawa T et al. *Mechanism of doxorubicin-induced inhibition of sarcoplasmic reticulum $Ca(2+)$ -ATPase gene transcription*. Circ Res, 2000; 86: 8-14.

9. Lim CC, Zuppinger C, Guo X et al. *Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes*. J Biol Chem, 2004; 279: 8290-8299.

10. Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, de Silva R et al. *Acute toxicity of doxorubicin on isolated heart: response of kinases regulating energy supply*. Am J Physiol heart Circ Physiol, 2005; 289: H37-H47.

11. Goetzenich A, Hatam N, Zerneck A et al. *Alteration of matrix metalloproteinases in selective left ventricular adriamycin-induced cardiomyopathy in the pig*. J Heart Lung Transplant, 2009; 28: 1087-1093.

12. Uhm JS, Chung WB, Yoon JS et al. *Effects of adriamycin and candesartan on the collagen and elastin of the aorta in rats*. Clin Hypertens, 2014; 20: 8-17.

13. Aluise CD, Miriyala S, Noel T et al. *2-Mercaptoethane sulfonate prevents doxorubicin-induced plasma protein oxidation and TNF- α release: implications for the reactive oxygen species-mediated mechanisms of chemobrain*. Free Radical Biology and Medicine, 2011; 50(1): 1630-1638.

14. Argun M, Uzum K, Sonmez M et al. *Cardioprotective effect of metformin against doxorubicin cardiotoxicity in rats*. Anatol J Cardiol, 2016; 16: 234-241.

15. Mukherjee S, Banerjee S, Maulik M et al. *Protection against acute adriamycin-induced cardiotoxicity by garlic: role of endogenous antioxidants and inhibition of TNF- α expression*. BMS Pharmacol, 2003; 3: 16-22.

16. Lemonyatis M. *Adriamycin-induced cardiomyopathy*. J Med Cases, 2015; 6(5): 226-228.

17. Chen YL, Chung SY, Chai HT et al. *Early administration of carvedilol protected against doxorubicin-induced cardiomyopathy*. J Pharmacol Exp Ther, 2015; 355(3): 516-527.

18. Riad A, Bien S, Westermann D et al. *Pretreatment with statin attenuates the cardiotoxicity of doxorubicin in mice*. Cancer Res, 2009; vol.69, p. 695-703.

19. Carvalho RA, Sousa RP, Cadete VJ et al. *Metabolic remodeling associated with subchronic doxorubicin CMP*. Toxicology, 2010; 270: 92-98.

20. Duquane D, Hirsch GA, Chakrabarti A et al. *Rapid-onset endothelial dysfunction with adriamycin: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase*. *Vasc Med*, 2003; 8: 101-107.
21. Nozaki N, Shishido T, Takeishi Y, Kubota I. *Modulation of doxorubicin-induced cardiac dysfunction in toll-like receptor-2-knockout mice*. *Circulation*, 2004; 110: 2869-2874.
22. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC, Feletou M. *Endothelial dysfunction and vascular disease*. *Acta Physiologica*, 2009; 196(2): 193-222.
23. Miyagawa K, Emoto N, Widyantoro D et al. *Attenuation of Doxorubicin-induced cardiomyopathy by endothelin-converting enzyme-1 ablation through prevention of mitochondrial biogenesis impairment*. *Hypertension*, 2010; 55(3): 738-746.
24. Bien-Moller. *The endothelin receptor blocker bosentan inhibits doxorubicin-induced cardiomyopathy*. *Cancer Research*, 2013; 67(21): 10428-10435.
25. El-Boghdady NA. *Increased cardiac endothelin-1 in adriamycin-induced acute cardiotoxicity*. *Ind J Biochem Biophys*, 2013; 50: 202-209.