

FUNCTIONAL DYNAMICS OF MYOCARDIAL INJURY BIOMARKERS PRODUCTION DURING ACUTE ISOPRENALINE TREATMENT IN RATS

FUNKCIONALNA DINAMIKA PROIZVODNJE BIOMARKERA OŠTEĆENJA MIOKARDA TOKOM AKUTNOG TRETMANA IZOPRENALINOM KOD PACOVA

Nina Gatarić¹, Ana Ilić², Dušan Todorović¹, Slavica Mutavdžin¹, Jovana Jakovljević Uzelac¹,
Sanja Stanković³, Dragan Đurić¹

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za fiziologiju "Rihard Burijan", Beograd, Srbija

² KBC "Dr Dragiša Mišović - Dedinje", Klinika za internu medicinu, Odeljenje za kardiologiju, Beograd, Srbija

³ Univerzitetski klinički centar Srbije, Centar za biohemiju, Beograd, Srbija

Correspondence: gataricnina@gmail.com

Abstract

Introduction: Isoprenaline or isoproterenol (1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-isopropylaminoethanolhydrochloride; ISO), a synthetic β -adrenergic agonist, can be used to establish myocardial ischemia, cardiotoxicity, necrosis and/or an experimental model of infarction in rats.

Aim: Determination of the dynamics of myocardial injury biomarkers production of aspartate transaminase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), and high-sensitive troponin T (hsTnT), with changes on electrocardiogram (ECG) parameters during the subcutaneous application of ISO in male Wistar rats.

Material and methods: All animals (n = 23) were divided into two groups: control group (n = 11) treated with a saline solution, during two consecutive days (0,2 ml/kg b.m. daily, sc); and the ISO group (n = 12) treated with isoprenaline, during two consecutive days (85 mg/kg b.m. daily, sc). Blood was drawn from the rat tail vein in both groups, in order to determine serum activity levels of myocardial injury biomarkers, and an ECG (n = 6) was registered prior to the application, as well as 48h following the first dose of saline solution or isoprenaline.

Results: In comparison to the control group, in which no significant enzyme activities elevation ($p > 0.05$) nor ECG changes were registered, ISO group presented a significant rise of two clinically significant biomarkers of acute myocardial injury/myocardial infarction (AMI), CK ($p = 0.05$) and hsTnT ($p < 0.01$), as well as an ST segment elevation, with a pathognomonic ECG change.

Conclusion: Obtained results support previous studies, proving that isoprenaline represents an adequate experimental model for myocardial injury/AMI induction, and a „golden standard“ for evaluating potential cardioprotective effects of pharmacological and non-pharmacological therapeutic modalities, with the ultimate goal of lowering the degree of lesions and improving post-infarction myocardium function.

Keywords:

acute myocardial injury,
isoprenaline,
cardiac injury biomarkers,
ECG,
rat

Sažetak

Uvod: Primena izoproterenola s. izoprenalina (1-(3,4-dihidroksifenil)-2-izopropilamino-
etanol-hidrohlorid, ISO), sintetskog β -adrenergičkog agonista, može izazvati ishemijsku
toksičnost, nekrozu ili infarkt srčanog tkiva kod pacova.

Cilj: je utvrđivanje dinamike proizvodnje biomarkera oštećenja miokarda (aspartat transaminaza, AST; laktat dehidrogenaza, LDH; kreatin kinaza, CKi visokosenzitivni troponin T, hsTnT) sa promenama na elektrokardiogramu (EKG) tokom supkutane aplikacije ISO kod pacova mužjaka soja Vistar (*Wistar*).

Materijal i metode: Sve eksperimentalne životinje (n = 23) podeljene su u dve grupe: kontrolnu grupu (n = 11) tretiranu fiziološkim rastvorom tokom dva uzastopna dana (dnevno 0,2 ml/kg t.m., sc); i ISO grupu (n = 12) tretiranu izoprenalinom tokom dva uzastopna dana (dnevno 85 mg/kg t.m., sc). Kontrolnim i eksperimentalnim životinjama je uzorkovana krv iz repne vene za određivanje biomarkera oštećenja miokarda u serumu i registrovan je EKG (n = 6) pre aplikovanja, kao i 48 h nakon aplikovanja prve doze fiziološkog rastvora, odnosno izoprenalina.

Rezultati: U odnosu na kontrolnu grupu, u kojoj nije registrovano povećanje serumske aktivnosti bilo kog biomarkera (p > 0,05), kao ni značajnije promene na EKG zapisu, u eksperimentalnoj ISO grupi je pokazano značajno povećanje serumske aktivnosti dva klinički značajna biomarkera akutnog oštećenja/akutnog infarkta miokarda (AIM), CK (p = 0,05) i hsTnT (p < 0,01), kao i prisustvo patoloških promena na EKG zapisu u vidu elevacije ST segmenta (> 1 mm).

Zaključak: Dobijeni rezultati potvrđuju stavove prethodnih studija da aplikacija izoprenalina predstavlja adekvatan model za eksperimentalnu indukciju akutnog oštećenja miokarda i time „zlatni standard“ za ispitivanje potencijalnih kardioprotektivnih efekata farmakoloških i nefarmakoloških terapijskih modaliteta u cilju smanjenja stepena lezija i poboljšanja postinfarktne funkcije miokarda.

Ključne reči:

akutno oštećenje miokarda,
izoprenalin,
biomarkeri oštećenja srca,
EKG,
pacov

Uvod

Izoproterenol s. izoprenalin (1-(3,4-dihidroksifenil)-2-izopropilaminoetanol-hidrohlorid; ISO), sintetski β -adrenergički agonista i potentni kardio-stimulator, pokazuje snažno pozitivno hronotropno i inotropno dejstvo na miokard (1). Kao neselektivni β_1 i β_2 stimulator (2), u prošlosti je našao široku primenu u tretmanu *status asthmaticus*-a, bronhijalne astme, ventrikularne bradikardije, srčanog zastoja i glaukoma (3). Iako izoprenalin direktnom stimulacijom β_2 receptora indukuje vazodilataciju koronarnih arterija, periferna vazodilatacija, koja uslovljava pojavu sistemske hipotenzije, dovodi do hipoperfuzije srca u uslovima kada pojačani srčani rad zahteva pojačanu perfuziju (4). Ekstenzivna tahikardija u kombinaciji sa hipoperfuzijom uslovljava pojavu ishemijske i akutni infarkt miokarda (AIM), odnosno ishemijsku nekrozu kardiomiocita (4), kao klinički najvažniju nuspojavu parenteralne aplikacije visokih doza izoprenalina (5-8). Primena izoprenalina se stoga smatra adekvatnim modelom indukcije ishemijskih lezija kod eksperimentalnih životinja bez klinički manifestne koronarne aterosklerozne okluzije i tzv. ishemijske „povrede kardiomiocita“ (engl. *cardiac muscle cell injury*) (9).

Specifični mehanizmi koji leže u osnovi AIM pokazuju jasnu korelaciju sa endogenim procesima koji se aktiviraju prilikom primene izoprenalina: oksidativnim stresom (10), apoptozom (11) i inflamacijom (12), zbog čega se govori i o kardiotoksičnosti indukovanoj izoprenalinom. Protektivno dejstvo endogenih antioksidanasa

(katalaze, superoksid dizmutaze i glutation peroksidaze) u stanjima oksidativnog stresa opada (13), rezultirajući pojačanom proizvodnjom slobodnih radikala i sniženjem antioksidativnog statusa organizma (14). Isto tako, perzistentna β -adrenergička stimulacija izoprenalinom rezultira padom lokalnog nivoa endogenih antioksidanasa i glutation-S-transferaze (15), formiranjem reaktivnih kiseoničnih vrsta, „povredom“ kardiomiocita, miofibrozom i ventrikularnom hipertrofijom (16, 17).

Cilj ove studije je utvrđivanje korelacije dinamike biomarkera oštećenja miokarda (ishemija, kardiotoksičnost, nekroza), (aspartat transaminaza, AST; laktat dehidrogenaza, LDH; kreatin kinaza, CK i visokosenzitivni troponin T, hsTnT) i funkcionalnih parametara na elektrokardiogramu (EKG), tokom supkutane aplikacije ISO kod pacova mužjaka soja Vistar (*Wistar*), u cilju uspostavljanja eksperimentalnog modela akutnog oštećenja miokarda ili AIM.

Materijal i metode

Eksperimentalne životinje

Istraživanje je vršeno na pacovima mužjacima soja Vistar (n = 23), prosečne telesne mase 200 - 400 g. Pacovi su smeštani u paru unutar transparentnih kaveza od pleksiglasa i sa dnom obloženim šuškom. Ambijentalni uslovi su održavani na konstantnom nivou (temperatura 21 ± 2 °C; vlažnost vazduha $55\% \pm 5\%$; ciklus 12 h svetlost - 12 h mrak, sa početkom perioda svetlosti u 07:30 h).

Hrana i voda su bili dostupni *ad libitum*.

Ovo istraživanje je sprovedeno u skladu sa etičkim principima u radu sa ogleđnim životinjama, kao i u skladu sa odlukama Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (br. 323-07-01339/2017-05/04 od 8.11.2017. godine) i Etičke komisije za zaštitu dobrobiti ogleđnih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (br. 4195/2 od 10.8.2017. godine).

Eksperimentalni protokol

Sve eksperimentalne životinje ($n = 23$) podeljene su u dve grupe. Kontrolna grupa ($n = 11$, K) tretirana je fiziološkim rastvorom tokom dva uzastopna dana (dnevno 0,9% NaCl 0,2 ml/kg t.m., sc). ISO grupa ($n = 12$) tretirana je izoprenalinom (*Isoprenaline hydrochloride, Sigma-Aldrich*) tokom dva uzastopna dana (dnevno 85 mg/kg t.m., sc). Životinjama je uzorkovana krv iz repne vene u cilju određivanja biomarkera oštećenja srca i registrovan je EKG pre aplikovanja izoprenalina, kao i 48 h nakon aplikovanja prve doze izoprenalina. Životinje su žrtvovane 24 h nakon aplikovanja druge doze izoprenalina, a njihova srca su izolovana. U cilju određivanja kardiotelesnog indeksa, svim životinjama je merena telesna masa neposredno pre žrtvovanja, a masa srca nakon njegove izolacije. Kardiotelesni indeks predstavlja odnos mase srca [mg] i telesne mase [g]. U serumu dobijenom iz krvi određene su vrednosti nespecifičnih i specifičnih biomarkera akutnog oštećenja miokarda ili infarkta: AST, LDH, CK i hsTnT.

Određivanje aktivnosti aspartat transaminaze

Serumska aktivnost AST merena je upotrebom komercijalno dostupnih setova (*Nanjing Jiancheng Biological Company, Nanjing, China*) (18).

Određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze

Serumska aktivnost LDH određena je spektrofotometrijski, merenjem smanjenja apsorbance na talasnoj dužini od 340 nm, tokom oksidacije *NADH*. Jedinica aktivnosti (U) LDH katališe transformaciju 1 μmol *NADH* u minuti u eksperimentalnim uslovima (19).

Određivanje aktivnosti kreatin kinaze

Serumska aktivnost CK merena je spektrofotometrijski na 340 nm, upotrebom komercijalno dospunog seta (*Randox Laboratories, USA*), prema metodi Lamprehta i saradnika (*Lamprecht et al*) (1974). Jedinica aktivnosti CK izoenzima definisana je kao količina enzima koja katališe transfer 1 mol fosfata sa fosfokreatina na adenzin-difosfat u minuti na pH 7,4 i temperaturi 30 °C (20).

Određivanje visokosenzitivnog troponina T

Visokosenzitivni troponin T je kvantifikovan upotrebom visokosenzitivnog imunoeseja (engl. *immunoassay*), baziranog na elektrohemiluminiscentnoj tehnologiji (ECLIA), korišćenjem Cobas e411 analizatora (*Roche Diagnostics, Penzberg, Germany*) (21). Granica slepe probe (engl. *The Limit of the Blank, LoB*) (22), ovog eseja iznosi

3 ng/L. Gornja granica (engl. *The Upper Range Limit, URL*), definisana kao 99. percentil zdrave populacije, iznosi 14 ng/L (21).

Elektrokardiografija

Elektrokardiogram je registrovan pre i 48 h nakon aplikovanja prve doze fiziološkog rastvora, odnosno izoprenalina. Petnaest minuta pre merenja i.p. primenjeni su anestetici u niskim dozama (acepromazin, 2,5 mg/kg + ketamin, 0,01 mg/kg), a potom su pacovi postavljani u ležeći položaj i EKG zapis je registrovan upotrebom standardnog elektrokardiografa (*CardioTouch 6.11.30, Bionet Co., Ltd.*). U cilju registrovanja EKG-a iglene elektrode su zakačene za kožu životinja (23). Brzina papira je podešena na 25 mm/s, a standardizacija voltaže na 20 mm/mV. Upoređivanje promena na EKG zapisima kontrolne i ISO grupe rađeno je u drugom standardnom odvodu.

Statistička analiza

Statistička značajnost je određena korišćenjem programa *EZR (R version 3.6.1)*. Unutar grupa su poređene statističke značajnosti razlika vrednosti biomarkera oštećenja miokarda u serumu neposredno pre primene, kao i 48 h nakon aplikovanja prve doze izoprenalina, odnosno fiziološkog rastvora. Ukoliko su podaci pokazali normalnu raspodelu, kao statistički test primenjen je Studentov t-test za zavisne uzorke (engl. *Paired t-test*). U suprotnom je primenjen Vilkoksonov (*Wilcoxon*) test ekvivalentnih parova (engl. *Wilcoxon's signed rank test*). Između grupa su poređene i statističke značajnosti razlika biomarkera oštećenja miokarda u serumu, tj. ISO i kontrolne grupe, neposredno pre primene i 48 h nakon prve doze izoprenalina, odnosno fiziološkog rastvora. Ukoliko su podaci pokazali normalnu raspodelu, primenjen je Studentov t-test za nezavisne uzorke (engl. *Two-sample t-test*). U suprotnom je primenjen Men-Vitnijev (*Mann-Whitney*) test sume rangova (engl. *Mann-Whitney U test*). Statistički značajnom se smatrala vrednost $p < 0,05$. Rezultati su predstavljeni numerički, tabelarno i grafički, kao srednje vrednosti + SEM. Analizirani su ritam, frekvencija rada srca i prisustvo značajne elevacije ST segmenta (> 1 mm) u EKG zapisima kontrolne i ISO grupe.

Rezultati

Kardiotelesni indeks

U poređenju sa kontrolnom grupom, ISO grupa nije pokazala statistički značajno povećanje vrednosti srčane i telesne mase, a samim tim ni kardiotelesnog indeksa, čija je prosečna vrednost u kontrolnoj grupi iznosila 3,82 + 0,18 mg/g, a u ISO grupi 4,48 + 0,17 mg/g (**tabela 1**).

Aspartat transaminaza

U kontrolnoj i ISO grupi nije pokazano statistički značajno povećanje serumskih vrednosti AST 48 h nakon sc. aplikacije prve doze izoprenalina ($p > 0,05$). Poređenjem vrednosti AST pre aplikovanja prve doze ISO

(126,03 + 4,57 U/L), odnosno fiziološkog rastvora (138,23 + 10,92 U/L) između dve testirane grupe nije dobijena statistički značajna razlika ($p > 0,05$). Statistički se značajno nisu razlikovale ni vrednosti AST u ISO (208,92 + 57,87) i kontrolnoj grupi (204,18 + 18,40 U/L) dobijene dva dana nakon aplikovanja prve doze ISO, odnosno fiziološkog rastvora ($p > 0,05$) (**grafikon 1A**).

Tabela 1. Prosečna telesna masa, srčana masa i kardiotelesni indeks u kontrolnoj (K) i ISO grupi

Parametri	Grupe (srednja vrednost ± SEM)		P vrednost
	K	ISO	
Telesna masa (g)	340,0 ± 19,0	403,5 ± 58,5	> 0,05
Masa srca (mg)	1301,0 ± 106,1	1776,5 ± 325,5	> 0,05
Kardiotelesni indeks (mg/g)	3,82 ± 0,18	4,38 ± 0,17	> 0,05

Tabela 2. Serumska aktivnost aspartat transaminaze (AST), laktat dehidrogenaze (LDH), kreatin kinaze (CK) i visokosenzitivnog troponina T (hsTnT) u kontrolnoj grupi pre i 48 h nakon primene prve doze fiziološkog rastvora

Parametri	K (srednja vrednost ± SEM)		P vrednost
	Pre	Posle 48 h	
AST (U/L)	138,23 ± 10,92	204,18 ± 18,40	> 0,05
LDH (U/L)	2255,33 ± 430,31	3907,86 ± 464,55	> 0,05
CK (U/L)	1501,67 ± 249,03	1809,88 ± 216,34	> 0,05
hsTnT (ng/L)	23,74 ± 6,67	19,17 ± 4,19	> 0,05

Tabela 3. Serumska aktivnost aspartat transaminaze (AST), laktat dehidrogenaze (LDH), kreatin kinaze (CK) i visokosenzitivnog troponina T (hsTnT) u grupi eksperimentalnih životinja tretiranih izoprenalinom (ISO) pre i 48 h nakon primene prve doze izoprenalina

Parametri	ISO (srednja vrednost ± SEM)		P vrednost
	Pre	Posle 48 h	
AST (U/L)	126,03 ± 4,57	208,92 ± 57,87	> 0,05
LDH (U/L)	3328,58 ± 291,21	3365,17 ± 310,50	> 0,05
CK (U/L)	1540,83 ± 129,15	3008,58 ± 898,03	= 0,05
hsTnT (ng/L)	21,78 ± 2,01	992,81 ± 346,08	< 0,01

Tabela 4. Serumska aktivnost aspartat transaminaze (AST), laktat dehidrogenaze (LDH), kreatin kinaze (CK) i visokosenzitivnog troponina T (hsTnT) u kontrolnoj (K) i grupi eksperimentalnih životinja tretiranih izoprenalinom (ISO) pre primene prve doze fiziološkog rastvora, odnosno izoprenalina

Parametri	Grupe (srednja vrednost ± SEM)		P vrednost
	K	ISO	
AST (U/L)	138,23 ± 10,92	126,03 ± 4,57	> 0,05
LDH (U/L)	2255,33 ± 430,31	3328,58 ± 291,21	> 0,05
CK (U/L)	1540,83 ± 129,15	1540,83 ± 129,15	> 0,05
hsTnT (ng/L)	1501,67 ± 249,03	21,78 ± 2,01	> 0,05

Tabela 5. Serumska aktivnost aspartat transaminaze (AST), laktat dehidrogenaze (LDH), kreatin kinaze (CK) i visokosenzitivnog troponina T (hsTnT) u kontrolnoj (K) i grupi eksperimentalnih životinja tretiranih izoprenalinom (ISO) 48 h nakon primene prve doze fiziološkog rastvora, odnosno izoprenalina

Parametri	Grupe (srednja vrednost ± SEM)		p vrednost
	K	ISO	
AST (U/L)	204,18 ± 18,40	208,92 ± 57,87	> 0,05
LDH (U/L)	3907,86 ± 464,55	3365,17 ± 310,50	> 0,05
CK (U/L)	1809,88 ± 216,34	3008,58 ± 898,03	> 0,05
hsTnT (ng/L)	19,17 ± 4,19	992,81 ± 346,08	< 0,01

Laktat dehidrogenaza

U kontrolnoj i ISO grupi nije pokazano statistički značajno povećanje serumskih vrednosti LDH 48 h nakon aplikovanja prve doze izoprenalina ($p > 0,05$). Poređenjem aktivnosti LDH pre aplikacije prve doze ISO (3328,58 + 291,21 U/L), odnosno fiziološkog rastvora (2255,33 + 430,31 U/L) između dve grupe nije dobijena statistički značajna razlika ($p > 0,05$), kao ni poređenjem aktivnosti LDH u ISO (3365,17 + 310,50 U/L) i kontrolnoj grupi (3907,86 + 464,55 U/L) dobijenih dva dana nakon aplikacije prve doze ISO, odnosno fiziološkog rastvora ($p > 0,05$) (**grafikon 1B**).

Kreatin kinaza

U kontrolnoj grupi nije pokazano statistički značajno povećanje serumskih vrednosti CK 48 h nakon aplikacije prve doze izoprenalina ($p > 0,05$). Nasuprot tome, postoji statistički značajno povećanje CK vrednosti (3008,58 + 898,03 U/L) u ISO grupi ($p = 0,05$), gde je

prosečna serumska vrednost CK nakon 48 h bila čak 95% veća u odnosu na vrednost pre aplikovanja ISO (1540,83 + 129,15 U/L). Poređenjem aktivnosti CK pre aplikacije i 48 h nakon aplikacije prve doze ISO, odnosno fiziološkog rastvora, između dve testirane grupe nije dobijena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) (**grafikon 1C**).

Visokosenzitivni troponin T

U kontrolnoj grupi nije pokazano statistički značajno povećanje serumskih vrednosti hsTnT 48 h nakon aplikacije prve doze izoprenalina ($p > 0,05$). Nasuprot tome, zabeleženo je izrazito povećanje vrednosti hsTnT (992,81 + 346,08 ng/L) u ISO grupi ($p = 0,0005$), gde je prosečna serumska vrednost hsTnT nakon 48 h bila čak 46 puta veća u odnosu na vrednost pre aplikacije ISO (21,78 + 2,01 ng/L). Ne postoji statistički značajna razlika između vrednosti hsTnT pre primene prve doze ISO, odnosno fiziološkog rastvora u ISO i kontrolnoj grupi ($p > 0,05$); ISO grupa, međutim, pokazuje 52 puta veću serumsku koncentraciju hsTnT dva dana nakon aplikacije ISO u odnosu na kontrolnu grupu ($p = 0,0009$) (**grafikon 1D**).

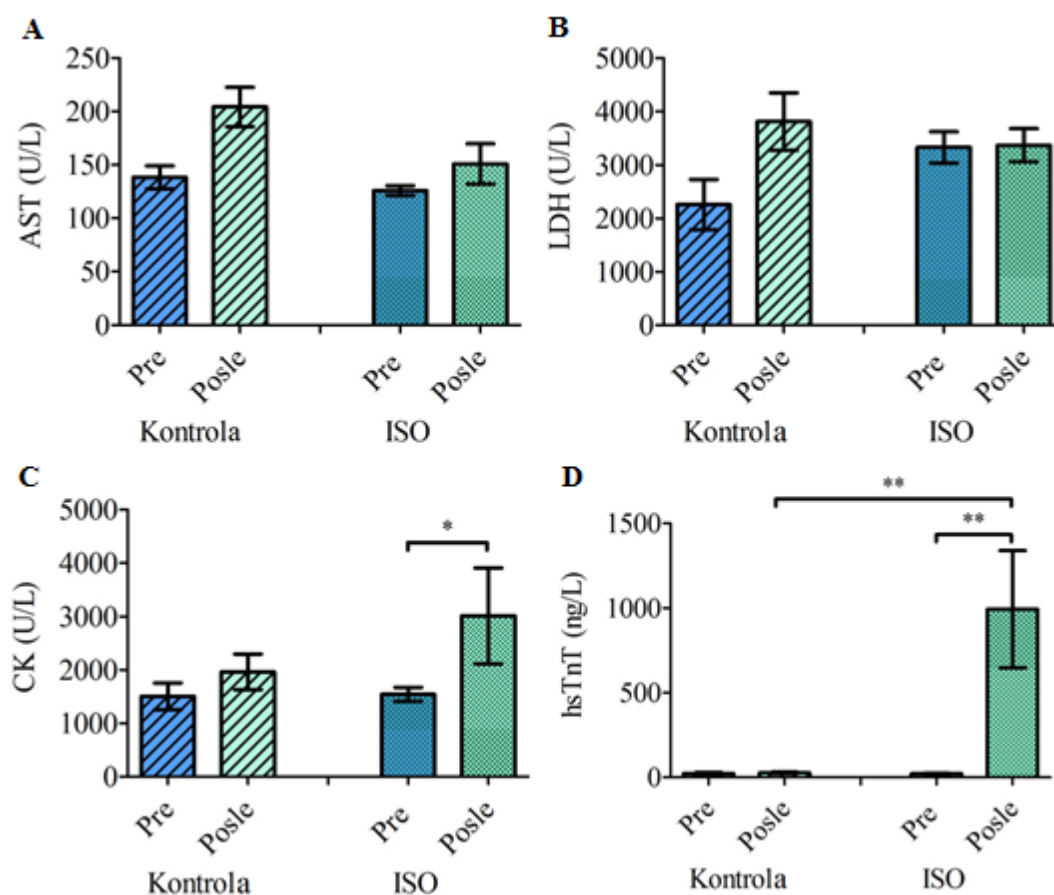
Elektrokardiografija

Pacovi iz kontrolne grupe su imali normalan EKG zapis sa regularnim sinusnim ritmom od 450 + 11 otkucaj/min, dok su EKG zapisi pacova tretiranih izoprenalinom pokazali 100% učestalost značajnih elevacija ST segmenta ($> 1\text{mm}$) ($p < 0,01$), ali i nižu frekvenciju (401 + 15,3 otkucaja/min) u odnosu na kontrolnu grupu.

Diskusija

Prosečne vrednosti srčane mase, telesne mase i kardiotelesnog indeksa bile su više u ISO grupi, međutim, bez postojanja statističke značajnosti. Verovatno da period od dva dana između aplikacije prve doze izoprenalina i žrtvovanja eksperimentalnih životinja nije bio dovoljan za razvoj adekvatne srčane hipertrofije koju indukuje *sc.* aplikacija izoprenalina (16, 17).

Biomarkeri oštećenja miokarda, AST, LDH, CK i hsTnT, čija je aktivnost merena 48 h nakon aplikacije prve doze fiziološkog rastvora, odnosno izoprenalina, predstavljaju senzitivne i visokospecifične kliničke markere za



Grafikon 1. A. Serumska aktivnost aspartat transaminaze (AST) u kontrolnoj i grupi eksperimentalnih životinja tretiranih izoprenalinom (ISO) pre i 48 h nakon primene prve doze fiziološkog rastvora, odnosno izoprenalina; B. Serumska aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) u kontrolnoj i grupi eksperimentalnih životinja tretiranih izoprenalinom (ISO) pre i 48 h nakon primene prve doze fiziološkog rastvora, odnosno izoprenalina; C. Serumska aktivnost kreatin kinaze (CK) u kontrolnoj i grupi eksperimentalnih životinja tretiranih izoprenalinom (ISO) pre i 48 h nakon primene prve doze fiziološkog rastvora, odnosno izoprenalina * $p < 0,05$; D. Serumska aktivnost visokosenzitivnog troponina T (hsTnT) u kontrolnoj i grupi eksperimentalnih životinja tretiranih izoprenalinom (ISO) pre i 48 h nakon primene prve doze fiziološkog rastvora, odnosno izoprenalina ** $p < 0,01$.

dokazivanje prisustva i određivanje opsega ishemijskih lezija, odnosno nekroze u AIM (24, 25). U ovoj studiji nismo procenjivali izoenzimske aktivnosti već ukupne aktivnosti srčanih enzima, zbog čega je nemoguće sa sigurnošću tvrditi da li je srce, ili neko drugo izoprenalinom zahvaćeno tkivo primarni izvor izoenzima u serumu. U izoenzimskoj slici ispitivanih enzima seruma različiti autori su uočili porast aktivnosti tzv. „srčano specifičnih enzima“ (CK-MB, LDH-1 i LDH-2) tokom prva dva (26) ili tri sata (27) nakon sc aplikacije izoprenalina (28, 29). Povećanje aktivnosti „srčano specifičnog“ izoenzima LDH-3 ukazuje da izoprenalin indukuje oštećenje papilarnih mišića, pre svega levog papilarnog mišića, koji ima značajan sadržaj LDH-3 i najveći sadržaj M-subjedinice LDH u srcu (30).

U ovoj eksperimentalnoj studiji, pacovi tretirani izoprenalinom pokazali su značajno povećanje serumskog nivoa CK ($p = 0,05$) i hsTnT ($p < 0,05$), kao i više vrednosti hsTnT dva dana nakon sc aplikacije prve doze ISO u odnosu na kontrolnu grupu, što je u saglasnosti sa ranijim studijama (23, 27, 31, 32). Povišene CK i hsTnT vrednosti ipak ukazuju na teško oštećenje miokarda (verovatno ishemijsko) i prekid integriteta membrane kardiomiocita, što dozvoljava „curenje“ nefunkcionalnih enzima u serum (23). Prethodne studije ukazuju na najintenzivniji porast serumске vrednosti CK tri sata nakon sc aplikacije izoprenalina. Ukupna vrednost CK raste i nakon ovog perioda, a dostiže maksimalnu vrednost nakon šest sati (27), što sugerise da je za određivanje serumskih vrednosti najpouzdanije uzorkovati krv iz repne vene šest sati nakon sc aplikacije izoprenalina.

ISO grupa nije pokazala statistički značajno povećanje aktivnosti AST i LDH u serumu ($p > 0,05$) 48 h nakon sc. aplikacije prve doze, što nije u saglasnosti sa prethodnim studijama (23, 27, 31, 32), koje navode da sc. aplikacija izoprenalina uslovljava formiranje tzv. „srčane izoenzimske slike CK i LDH“ (27), tj. porast ukupne vrednosti CK i LDH u serumu. Aktivnost LDH dostiže najviše vrednosti tri sata nakon aplikacije ISO. Između trećeg i šestog sata aktivnost izoenzima LDH znatno opada, što je naročito izraženo kod izoenzima LDH-1 i LDH-2. Dvadeset četiri sata nakon sc aplikacije ISO ove vrednosti se vraćaju na nivo približno jednak kontrolnim vrednostima (27), što objašnjava zašto u našoj studiji nije registrovan statistički značajan porast ukupne serumске vrednosti LDH 48 h nakon sc aplikacije prve doze izoprenalina.

Da posmatranje samo ukupnih vrednosti biomarkera srčanog oštećenja nije adekvatno za preciznu lokalizaciju ishemijskog oštećenja u pacovima ukazuju nalazi ranijih studija, koji u periodu od 3 do 6 sati nakon sc. aplikacije izoprenalina beleže porast izoenzima CK-MM, LDH-4 i LDH-5, što sugerise da izoprenalin deluje štetno i na druga tkiva, kao što je jetra (27). Time je najadekvatnije posmatrati kompletnu izoenzimsku sliku LDH nakon 6 sati, kada je aktivnost svih LDH izoenzima značajno veća u odnosu na kontrolne vrednosti. Ovaj fenomen se označava kao „izomorfna izoenzimska slika

serumske LDH“ i može biti posledica opšte hipoksije organizma (27). Navedeno stanje se javlja u toku infarkta ili ishemijskog oštećenja srca, koji se neretko komplikuju kardiogenim šokom (33), čije bi prisustvo potvrdila patohistološka analiza miokarda sa uočljivim „undulacijama“ kardiomiocita (27). Međutim, na osnovu iskustva drugih autora, poznato je da se štetno delovanje izoprenalina ispoljava prvenstveno na srcu (9, 27, 34-36), na šta najviše ukazuju rezultati o uticaju izoprenalina na izoenzimsku sliku serumске CK i LDH.

Elektrokardiogram predstavlja značajan dijagnostički pokazatelj patoloških abnormalnosti miokarda (37). Svi pacovi tretirani izoprenalinom pokazali su elevaciju ST segmenta (> 1 mm) i neočekivanu redukciju srčane frekvencije, dok aritmije nisu registrovane. Navedene abnormalnosti potvrđuju prisustvo srčanog oštećenja, tj. AIM, analogno rezultatima prethodnih studija (38, 39). Patognomonične promene u ST segmentu ukazuju na gubitak integriteta i funkcije kardiomiocita. Dodatno, očekivali smo da će eksperimentalna grupa pokazati tahikardiju koja, usled nemogućnosti zadovoljavanja povećane potrebe za kiseonikom, vodi ubrzanoj nekrozi kardiomiocita (9, 38, 40-42). Studije, međutim, beleže slučajeve u kojima je neinvazivna aplikacija izoprenalina indukovala tzv. „paradoksalnu bradikardiju“ i time redukovala srčanu frekvenciju kod pacijenata sa AV blokom, najverovatnije usled aktivacije neurovagalnog refleksa sa hipervagatonijom, koja se javlja nakon β -adrenergičke stimulacije (43). Pokazano je i da nishodna regulacija β -receptora, koja dovodi do izostanka adekvatnog odgovora nakon stimulacije, može biti uslovljena starosnom dobi (44), polom (45), hroničnom uremijom (46), ali i izoprenalinom indukovanim remodelovanjem miokarda, koje se zapaža u okviru srčane insuficijencije, ventrikularne aritmije ili naprasne srčane smrti (47).

I pored značajnih rezultata, ova studija ima i svojih ograničenja jer tokom ISO indukovanih efekata nije dokazana periferna vazodilatacija koja bi teorijski dovela do kompenzatornog povećanja srčane frekvencije. Budući da tahikardija kod pacova nije registrovana, smatramo da se periferna vazodilatacija u primenjenoj dozi i načinu aplikacije izoprenalina verovatno nije javila. U prethodnim studijama, gde je ISO aplikovan u značajno višoj dozi (dnevno 250 mg/kg tm) intraperitonealno, javilo se povećanje srčane frekvencije (27). Postepen razvoj patoloških lezija u akutnom infarktu miokarda najpouzdanije je pratiti kroz profil biomarkera srčanog oštećenja, što je u prethodnim studijama izvedeno praćenjem promena serumskog nivoa izoenzima specifičnih za miokardno tkivo (27). Dodatno, potrebno je ovaj rad dopuniti širim biohemijskim analizama da bi se sagledali eventualni efekti izoprenalina na druge organe, ali i patohistološkom analizom na srcu. U ovoj studiji je standardizacija voltaže bila verovatno veća od potrebne, što je, u nedostatku odgovarajućeg softvera i pojačivača električnog signala, onemogućilo precizniju analizu EKG zapisa, pre svega sa aspekta trajanja promene QT intervala (48), ali i ST segmenta.

Zaključak

U odnosu na kontrolnu grupu, u kojoj nije registrovano povećanje bilo kog ispitivanog biomarkera AIM u serumu, niti značajnije promene na EKG zapisu, u ISO grupi je pokazano značajno povećanje serumske aktivnosti dva klinički značajna biomarkera AIM, CK i hsTnT, kao i prisustvo patognomonične elevacije ST segmenta na EKG zapisu. Dobijeni rezultati potvrđuju stavove prethodnih studija, da aplikacija izoprenalina predstavlja adekvatan model za eksperimentalnu indukciju oštećenja miokarda ili AIM, i time „zlatni standard“ za ispitivanje potencijalnih kardioprotektivnih efekata farmakoloških (49) i nefarmakoloških terapijskih modaliteta, u cilju smanjenja stepena ishemijskih lezija i poboljšanja postinfarktne funkcije miokarda (18).

Literatura

1. Stuhr LE, Ask JA, Tyssebotn I. Inotropic and chronotropic effects of isoprenaline in rats exposed to 30 bar. *Aviat Space Environ Med.* 1991; 62(1):41-5.
2. Kirby R, Novak C, Thurnhorst R, Johnson A. The role of beta 1 and beta 2 adrenoceptors in isoproterenol-induced drinking. *Brain Research.* 1994; 656(1):79-84.
3. Amano S, Arai M, Goto S, Togari A. Inhibitory effect of NPY on isoprenaline-induced osteoclastogenesis in mouse bone marrow cells. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1770:966-973.
4. Beregovich J, Reicher-Reiss H, Grishman A. Haemodynamic effects of isoprenaline in acute myocardial infarction. *Heart.* 1972; 34(7):705-710.
5. Long J, Gao M, Kong Y, Shen X, Du X, Son YO, et al. Cardioprotective effect of total paeony glycosides against isoprenaline-induced myocardial ischemia in rats. *Phytomedicine.* 2012; 19:672-676.
6. Rona G, Chappel CI, Balazs T, Gaudry R. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *AMA Arch Pathol.* 1959; 67(4):443-55.
7. Rona G, Zsoter R, Chappel CI, Gaudry R. Myocardial lesions, circulatory and electrocardiographic changes produced by isoproterenol in the dog. *Rev Canad Biol.* 1959; 18(1):83-94.
8. Chappel CI, Rona G, Balazs T, Gaudry R. Severe myocardial necrosis produced by isoproterenol in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1959; 122:123-8.
9. Rona G. Catecholamine cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol.* 1985; 17(4):291-306.
10. Tang Y, He X, Ye M, Huang H, Chen H, Peng W et al. Cardioprotective effect of total saponins from three medicinal species of *Dioscorea* against isoprenaline-induced myocardial ischemia. *J Ethnopharmacol.* 2015; 175:451-455.
11. Suchal K, Malik S, Gamad N, Malhotra RK, Goyal SN, Bhatia J, et al. Kampeferol protects against oxidative stress and apoptotic damage in experimental model of isoproterenol-induced cardiac toxicity in rats. *Phytomedicine.* 2016; 23:1401-1408.
12. Allijn IE, Czarny BM, Wang X, Chong SY, Weiler M, da Silva AE, et al. Liposome encapsulated berberine treatment attenuates cardiac dysfunction after myocardial infarction. *J Control Release.* 2017; 247:127-133.
13. Geng ZH, Huang L, Song MB, Song YM. Protective effect of a polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza* on isoproterenol (ISO)-induced myocardial injury in rats. *Carbohydr Polym.* 2015; 132:638-642.
14. Tang Y, He X, Ye M, Huang H, Chen H, Peng W et al. Cardioprotective effect of total saponins from three medicinal species of *Dioscorea* against isoprenaline-induced myocardial ischemia. *J Ethnopharmacol.* 2015; 175:451-455.
15. Anandan R, Ganesan B, Obulesu T, Mathew S, Kumar RS, Lakshmanan PT, et al. Dietary chitosan supplementation attenuates isoprenaline-induced oxidative stress in rat myocardium. *Int J Biol Macromol.* 2012; 51:783-787.
16. Aman U, Vaibhav P, Balaraman R. Tomato lycopene attenuates myocardial infarction induced by isoproterenol: Electrocardiographic, biochemical and anti-apoptotic study. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012; 2:345-351.
17. Fathiazad F, Matlobi A, Khorrami A, et al. Phytochemical screening and evaluation of cardioprotective activity of ethanolic extract of *Ocimum basilicum* L. (basil) against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Daru.* 2012; 20:87.
18. Huang H, Geng Q, Yao H, Shen Z, Wu Z, Miao X, Shi P. Protective effect of scutellarin on myocardial infarction induced by isoprenaline in rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2018; 21(3):267-276.
19. Hollaar L, Van Der Laarse A. Interference of the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity in human serum and plasma by LDH from blood cells. *Clin Chim Acta.* 1979; 99(2):135-142.
20. Ojha S, Golechha M, Kumari S, Bhatia J, Arya D. Glycyrrhiza glabra protects from myocardial ischemia-reperfusion injury by improving hemodynamic, biochemical, histopathological and ventricular function. *Exp Toxicol Pathol.* 2013; 65(1-2):219-227.
21. Giannitsis E, Kurz K, Hallermayer K, Jarausch J, Jaffe AS, Katus HA. Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay. *Clin Chem.* 2010; 56(2):254-61.
22. Armbruster AA, Pry T. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin Biochem Rev.* 2008; 29(Suppl 1):S49-S52.
23. Ghazouani L, Khdhiri E, Elmufli A, Feriani A, Tir M, Baaziz I et al. Cardioprotective effects of (E)-4-hydroxy-N-(1-(3-oxo-3H-benzo[f]chromen-2-yl)ethylidene)benzohydrazide: a newly synthesized coumarin hydrazone against isoproterenol-induced myocardial infarction in a rat model. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019; 97(10):989-998.
24. Hammerschmidt S, Bell M, Büchler N, Wahn H, Remkes H, Lohse M et al. Acute changes of myocardial creatine kinase gene expression under β -adrenergic stimulation. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1502(3):471-480.
25. Saravanan G, Ponnuragan P, Sathiyavathi M, Vadivukkarasi S, Sengottuvelu S. Cardioprotective activity of *Amaranthus viridis* Linn: Effect on serum marker enzymes, cardiac troponin and antioxidant system in experimental myocardial infarcted rats. *Int J Cardiol.* 2013; 165(3):494-498.
26. Preus M, Bhargava AS, Khater Abd El R, Gunzel P. Diagnostic value of serum creatine kinase and lactate dehydrogenase isoenzyme determinations for monitoring early cardiac damage in rats. *Toxicol Lett.* 1998; 42:225-33.
27. Ljubunčić P, Mujić, F, Winterhalter M, Huković N, Vidović Z, Đuričić S. Toksičnost izoproterenola za miokard u eksperimentalnim uvjetima. *Arh hig rada toksikol.* 1992; 43:11-20.
28. Wang TY, Godfrey JH, Graham LG. Clinical evaluation of immunochemical assay of lactate dehydrogenase isoenzyme-1 in early detection of acute myocardial infarction. *Clin Chem.* 1982; 28:2152-4.
29. Lott JA. Serum enzyme determinations in the diagnostics of acute myocardial infarction. *Hum Pathol.* 1984; 15:706-16.
30. Schultheiss HP, Bispink G, Neuhoff V, Bolte HD. Myocardial lactate dehydrogenase isoenzyme distribution in the normal heart. *Basic Res Cardiol.* 1981; 76:681-9.
31. Khalil M, Ahmmed I, Ahmed R, Tanvir E, Afroz R, Paul S et al. Amelioration of Isoproterenol-Induced Oxidative Damage in Rat Myocardium by *Withania somnifera* Leaf Extract. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:1-10.
32. Kumar M, Kasala E, Bodduluru L, Dahiya V, Lahkar M. Baicalein protects isoproterenol induced myocardial ischemic injury in male Wistar rats by mitigating oxidative stress and inflammation. *Inflamm Res.* 2016; 65(8):613-622.
33. Rotenberg Z, Weinberger I, Davidson E, Fuchs J, Sperling O, Agmon J. Atypical patterns of lactate dehydrogenase isoenzymes in acute myocardial infarction. *Clin Chem.* 1988; 34:1096-8.

34. Wexler BS. Prolonged protective effects following propranolol withdrawal against isoproterenol-induced myocardial infarction in normotensive and hypertensive rats. *Br J Exp Pathol.* 1985; 66:143-54.
35. Ramos K, Combs AB, Acosta D. Role of calcium in isoproterenol cytotoxicity to cultured myocardial cells. *Biochem Pharmacol.* 1984; 33:1989-92.
36. Todd GL, Baroldi G, Pieper GM, Clayton FC, Eliot RS. Experimental catecholamine-induced myocardial necrosis. I. Morphology, quantification and regional distribution of acute contraction band lesions. *J Moll Cell Cardiol.* 1985; 17:317-38.
37. Panda S, Kar A, Ramamurthy V. Cardioprotective effect of vincristine on isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Eur J Pharmacol.* 2014; 723:451-458.
38. Kannan M, Quine S. Ellagic acid ameliorates isoproterenol induced oxidative stress: Evidence from electrocardiological, biochemical and histological study. *Eur J Pharmacol.* 2011; 659(1):45-52.
39. Shaikh S, Bhatt L, Barve K. Attenuation of isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats by Narirutin rich fraction from grape fruit. *Phytomedicine.* 2019; 55:222-228.
40. Patel V, Upaganlawar A, Zalawadia R, Balaraman R. Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats: A biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural evaluation. *Eur J Pharmacol.* 2010; 644(1-3):160-168.
41. Mnafigui K, Hajji R, Derbali F, Gammoudi A, Khabbabi G, Ellefi H et al. Anti-inflammatory, Antithrombotic and Cardiac Remodeling Preventive Effects of Eugenol in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Wistar Rat. *Cardiovasc Toxicol.* 2015; 16(4):336-344.
42. Mnafigui K, Hajji R, Derbali F, Khlif I, Kraiem F, Ellefi H et al. Protective Effect of Hydroxytyrosol Against Cardiac Remodeling After Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rat. *Cardiovasc Toxicol.* 2015; 16(2):147-155.
43. Brembilla-Perrot B, Muhanna I, Nippert M, Popovic B, Beurrier D, Houriez P et al. Paradoxal effect of isoprenaline infusion. *Europace.* 2005; 7(6):621-627.
44. Stratton J, Cerqueira M, Schwartz R, Levy W, Veith R, Kahn S et al. Differences in cardiovascular responses to isoproterenol in relation to age and exercise training in healthy men. *Circ J.* 1992; 86(2):504-512.
45. Elmes M, Haase A, Gardner D, Langley-Evans S. Sex differences in sensitivity to β -adrenergic agonist isoproterenol in the isolated adult rat heart following prenatal protein restriction. *Br J Nutr.* 2008; 10(5):725-734.
46. Dhein S, Röhnert P, Markau S, Kotchi-Kotchi E, Becker K, Poller U et al. Cardiac beta-adrenoceptors in chronic uremia: studies in humans and rats. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36(2):608-617.
47. Yin Q, Yang C, Wu J, Lu H, Zheng X, Zhang Y et al. Downregulation of β -Adrenoreceptors in Isoproterenol-Induced Cardiac Remodeling through HuR. *PLoS ONE.* 2016; 11(4):e0152005.
48. Mullabaeva G. QT interval dispersion in patients with Q-wave myocardial infarction. *Eur Sci J.* 2017; 79-81.
49. Upaganlawar A, Gandhi H, Balaraman R. Isoproterenol Induced Myocardial Infarction: Protective Role of Natural Products. *Am J Pharmacol Toxicol.* 2011; 6(1):1-17.