

ผลยับยั้งและกึ่งยับยั้งของ DOXORUBICIN ต่ออัตราการเดิน  
แรงหดตัว และการทำงานของเอนไซม์ในหัวใจที่แยกจากหนูขาว



นางสาว สุกัลยา อัครัสกร

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาดตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตววิทยาการสัตว ภาควิชาสัตววิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4137-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACUTE AND SUBACUTE EFFECTS OF DOXORUBICIN  
ON RATE AND FORCE OF CONTRACTION AND  
ENZYME ACTIVITIES IN ISOLATED RAT HEART

Miss Sukullaya Assarasakorn

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Animal Physiology

Department of Physiology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-4137-5



สุกัลยา อัครัสกร : ผลเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของ DOXORUBICIN ต่ออัตราการเต้นแรงหดตัว และการทำงานของเอนไซม์ในหัวใจที่แยกจากหนูขาว. (ACUTE AND SUBACUTE EFFECTS OF DOXORUBICIN ON RATE AND FORCE OF CONTRACTION AND ENZYME ACTIVITIES IN ISOLATED RAT HEART)  
 อ. ที่ปรึกษา : รศ.สพ.ญ.ดร.ชลลดา บูรณกาล, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ประสาน ธรรม  
 อุปกรณ์ 74 หน้า. ISBN 974-17-4137-5.

เพื่อศึกษาผลเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของ doxorubicin (DOX) ต่อแคลเซียมใน SR และการตอบสนองของระบบแอดรีเนอร์จิกและโคลิเนอร์จิก โดยใช้กล้ามเนื้อหัวใจห้องบนที่แยกจากหนูขาว ผลเฉียบพลันพบว่า DOX 100 ไมโครโมลาร์ดี ทำให้ลดอัตราการเต้นแรงหดตัวของหัวใจห้องบนซ้าย และเปอร์เซ็นต์ของแรงหดตัวหลังหยุดกระตุ้นหัวใจ นอกจากนี้ยังมีผลการเพิ่มอัตราการเต้นแรงหดตัว และการตอบสนองสูงสุดต่อไอโซโพรเทอรินอล และทำให้ cumulative concentration response curve ของอะเซทิลโคลีนเลื่อนไปทางขวา ในการศึกษาถึงเฉียบพลันในหนูขาวที่ได้รับ DOX 2.5 มก./กก. เข้าช่องท้องในวันที่ 1 และ 7 พบว่าแรงหดตัวหลังหยุดกระตุ้นหัวใจเพิ่มขึ้นน้อยกว่ากลุ่มควบคุม และไม่พบการเปลี่ยนแปลงต่อการกระตุ้นด้วยไอโซโพรเทอรินอลและอะเซทิลโคลีน มีการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ myosin-ATPase และ actomyosin-ATPase จากผลกึ่งเฉียบพลันของ DOX แต่ไม่พบความแตกต่างดังกล่าวระหว่างกลุ่ม DOX และกลุ่มควบคุม และพบว่าหนูกลุ่ม DOX มีการทำงานของ CK ลดลง

ผลการทดลองสรุปว่าผลเฉียบพลันของ DOX ลดอัตราการเต้นและแรงหดตัวของหัวใจห้องบนที่แยกจากหนูขาว เห็นได้ชัดว่าเป็นผลจากการลดปริมาณแคลเซียมใน SR และพบว่า DOX สามารถแย่งจับ muscarinic receptor กับอะเซทิลโคลีนได้ และยับยั้ง common pathway ของระบบแอดรีเนอร์จิก สำหรับผลกึ่งเฉียบพลันของ DOX ทำให้ลดแคลเซียมใน SR โดยไม่กระทบต่อระบบแอดรีเนอร์จิกหรือโคลิเนอร์จิก นอกจากนี้ DOX ลดการทำงานของ CK แต่ไม่มีผลต่อ myosin และ actomyosin ATPase.

ภาควิชา สรีรวิทยา  
 สาขาวิชา สรีรวิทยาการสัตว์  
 ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต ..... สุกัลยา อัครัสกร .....  
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....  
 อ.ดร.ประสาน ธรรม

## 4475574831 : MAJOR ANIMAL PHYSIOLOGY

KEY WORD: DOXORUBICIN / CALCIUM / ADRENERGIC / CHOLINERGIC / ISOLATED HEART / RAT  
 SUKULLAYA ASSARASAKORN : ACUTE AND SUBACUTE EFFECTS OF  
 DOXORUBICIN ON RATE AND FORCE OF CONTRACTION AND ENZYME  
 ACTIVITIES IN ISOLATED RAT HEART. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF.  
 CHOLLADA BURANAKARL, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF.  
 PRASAN DHUMMA-UPAKORN, Ph.D., 74 pp. ISBN 974-17-4137-5.

Acute and subacute effects of doxorubicin (DOX) on  $Ca^{2+}$  in the SR and changes in adrenergic and cholinergic responses were examined on isolated Wistar rat atrial muscle preparations. Acute exposure with 100  $\mu$ M DOX caused a decrease in heart rate, left atrial force and percentage of post-rest contraction (PRC). It reduced both positive chronotropic and inotropic effects including maximal response of isoproterenol. DOX also caused a right shift of the cumulative concentration response curve of acetylcholine. In subacute treatment, rats treated with DOX (2.5 mg/kg i.p. on days 1 and 7) caused a less increase in PRC compared with control group, and no changes in response of isoproterenol and acetylcholine were observed. The activities of myosin ATPase and actomyosin ATPase determined in subacute treatment did not differ between DOX and control groups, but DOX group showed a decrease in CK activity.

These results lead to the conclusion that acute effect of DOX depresses rate and force of isolated rat atrial contraction predominantly by decreasing the amount of  $Ca^{2+}$  in the SR. DOX can compete with acetylcholine for muscarinic receptor, and inhibits common pathway of adrenergic system. Subacute effect of DOX causes a decrease of  $Ca^{2+}$  in the SR without modifying either adrenergic or cholinergic system. DOX suppresses the CK activity, but not myosin and actomyosin ATPase.

Department Physiology

Field of study Animal Physiology

Academic year 2003

Student's signature *Sukullaya Assarasakorn*

Advisor's signature *Chollada Buranakarl*

Co-advisor's signature *Prasan Dhumyakhorn*

## ACKNOWLEDGEMENTS

I gratefully acknowledge to my advisor, Associate Professor Dr. Chollada Buranakarl and my co-advisor, Associate Professor Dr. Prasan Dhumma-Upakorn for their valuable advice, support, encouragement and extensive help in this work.

I am grateful to the thesis committee for their valuable suggestion.

I give grateful acknowledgment to Miss Siripen Komolvanish for her helpfulness and technically laboratory guidance.

This study was supported in part by fund from the Faculty of Graduate Studies, Chulalongkorn University.

I greatly thank to my parents for their support, carefulness, greatly taking care of me and giving me warmth all the time and forever.

Finally, I would like to thank everyone else who helped me in this study, and all my lovely friends for their kindness.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
TABLE OF CONTENTS.....	vii
LISTS OF TABLES .....	x
LISTS OF FIGURES .....	xi
CHAPTER	
I. INTRODUCTION AND AIMS.....	1
II. BACKGROUND INFORMATION	
- Clinical Usage of DOX.....	4
- Clinical Cardiotoxicity Induced by DOX.....	5
- Acute and Subacute Cardiotoxicity.....	5
- Chronic Cardiotoxicity.....	5
- Late-onset Cardiotoxicity.....	6
- Preclinical Animal Models of DOX-induced Cardiotoxicity.....	7
- Antitumor Effects of DOX.....	8
- Mechanism of DOX induced cardiomyopathy.....	10
- Role of Free Radicals on DOX-induced Cardiomyopathy.....	10
- Role of Calcium on DOX-induced Cardiomyopathy.....	12
- Role of Sympathetic Innervation on DOX-induced Cardiotoxicity.....	14
- Role of Parasympathetic Innervation on DOX-induced Cardiotoxicity.....	16
- The Direct Effect of DOX on Cardiac Myofibril.....	17
- Hypothesis.....	19
III. MATERIALS AND METHODS	
- Experimental Protocol.....	20
- The Atrial Muscle Preparation.....	20

## TABLE OF CONTENTS (CONT)

	Page
- Section 1: Acute Effects of DOX.....	21
1.1 Effect of DOX on Rate and Force of Contraction.....	21
1.2 Effect of DOX on Post-rest Contraction (PRC).....	22
1.3 Cumulative Dose-response Curves of Isoproterenol at Doses of $10^{-9}$ – $10^{-5}$ M.....	23
1.4 Cumulative Dose-response Curves of Acetylcholine at Doses of $10^{-5}$ – $10^{-2}$ M.....	24
- Section 2: Subacute Effects of DOX.....	25
- Measurements of Myosin ATPase, Actomyosin ATPase and Creatine Kinase Activities.....	25
1. Tissue Preparation.....	25
2. Myosin ATPase, Actomyosin ATPase and Creatine Kinase Activities Determination.....	26
- Statistical Analysis.....	26
<b>IV. RESULTS</b>	
- Acute Effects of DOX Treatment.....	28
- Acute Effect of DOX on Rate and Force of Atria.....	28
- Acute Effect of DOX on Post-rest Contraction.....	29
- Acute Effect of DOX on Response to Isoproterenol.....	29
- Acute Effect of DOX on Response to Acetylcholine.....	30
- Subacute Effects of DOX treatment.....	41
- Subacute Effects of DOX on Post-rest Contraction.....	41
- Subacute Effects of DOX on Response to Isoproterenol and Acetylcholine.....	41
- Subacute Effect of DOX on Cardiac Enzyme Activity.....	50
<b>V. DISCUSSION</b> .....	53



## TABLE OF CONTENTS (CONT)

	Page
REFERENCES.....	58
BIOGRAPHY.....	74



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF TABLE

Table	Page
1. Subacute effect of DOX on CK activity.....	52



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Structure of DOX.....	4
2. Diagram of tissue extraction for ATPase and CK activities determination.....	27
3. Acute effects of DOX on heart rate, right atrial force and left atrial force. Each point represents the mean of 8 experiments. Vertical lines indicate the S.E. *, $p \leq 0.05$ versus 0 min; +, $p \leq 0.05$ versus control; †, $p \leq 0.01$ ; ‡, $p \leq 0.001$ .....	31
4. Changes in post-rest contraction of the isolated left atrium from control (A) and acute DOX-treated (B) animals.....	32
5. Acute effect of DOX on post-rest contraction. Each point represents the mean of 8 experiments. Vertical lines indicate the S.E. *, $p \leq 0.05$ versus 0 min; +, $p \leq 0.05$ versus control; †, $p \leq 0.01$ ; ‡, $p \leq 0.001$ . Ti and Tss indicate an initial tension after resting period and steady-state tension, respectively.....	33
6. Changes in cumulative dose-response of isoproterenol of right and left atria from acute control animal.....	34
7. Changes in cumulative dose-response of isoproterenol of right and left atria from acute DOX-treated animal.....	35
8. Acute effects of DOX on positive chronotropic and inotropic effects of isoproterenol in isolated rat right and left atria, respectively. Each point represents the mean of 8 experiments. Vertical lines indicate the S.E. *, $p \leq 0.05$ versus 0 min; +, $p \leq 0.05$ versus control; †, $p \leq 0.01$ .....	36
9. Effects of propranolol on positive chronotropic and inotropic effects of isoproterenol in isolated rat right and left atria, respectively. Each point represents the mean of 2 experiments. Vertical lines indicate the S.E.....	37
10. Changes in cumulative dose-response of acetylcholine of right and left atria from acute control animal.....	38

## LIST OF FIGURES (CONT)

Figure	Page
11. Changes in cumulative dose-response of acetylcholine of right and left atria from acute DOX-treated animal.....	39
12. Acute effects of DOX on negative chronotropic and inotropic effects of isoproterenol in isolated rat right and left atria, respectively. Each point represents the mean of 8 experiments. Vertical lines indicate the S.E. *, $p \leq 0.05$ versus 0 min; +, $p \leq 0.05$ versus control; †, $p \leq 0.01$ ; ‡, $p \leq 0.001$ .....	40
13. Changes in post-rest contraction of the isolated left atrium from control (A) and subacute DOX-treated (B) animals.....	42
14. Subacute effect of DOX on post rest contraction. Each point represents the mean of 8 experiments. Vertical lines indicate the S.E. *, $p \leq 0.05$ versus 0 min; +, $p \leq 0.05$ versus control; †, $p \leq 0.01$ .....	43
15. Changes in cumulative dose-response of isoproterenol of right and left atria from subacute control animal.....	44
16. Changes in cumulative dose-response of isoproterenol of right and left atria from subacute DOX-treated animal.....	45
17. Subacute effect of DOX on positive chronotropic and inotropic effects of isoproterenol in isolated rat right and left atria. Each point represents the mean of 8 experiments. Vertical lines indicate the S.E.....	46
18. Changes in cumulative dose-response of acetylcholine of right and left atria from subacute control animal.....	47
19. Changes in cumulative dose-response of acetylcholine of right and left atria from subacute DOX-treated animal.....	48
20. Subacute effect of DOX on negative chronotropic and inotropic effects of acetylcholine in isolated rat right and left atria. Each point represents the mean of 8 experiments. Vertical lines indicate the S.E.....	49

## LIST OF FIGURES (CONT)

Figure	Page
21. Subacute effect of DOX on myosin ATPase and actomyosin ATPase (presence or absence of $\text{Ca}^{2+}$ ) activities. Each bar represents the mean of 24 experiments. Vertical lines indicate the S.E.....	51



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย