

С. В. Пакришень, О. М. Килимник

Морфо-функціональний стан скоротливого апарату кардіоміоцитів щурів при доксорубіциновій кардіоміопатії та можливі шляхи її фармакологічної корекції

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ

Ключові слова: кардіотоксичність, ультраструктура, доксорубіцин, амлодипін, димеодипін

Частота розвитку пошкоджень серця при лікуванні антрациклінами (доксорубіцином, даунорубіцином, епірубіцином та ін.) становить 5–60 %. Кардіотоксичність цих препаратів є причиною зниження якості життя та передчасної смерті онкологічних хворих [1].

Натепер висунуто декілька гіпотез щодо вибіркової токсичності антрациклінових антибіотиків, серед яких надмірна генерація вільних радикалів, здатних викликати перекисне окиснення ліпідів і пошкодження внутрішньоклітинних мембран; взаємодія з актинміозиною скоротливою системою; порушення внутрішньоклітинного гомеостазу Ca^{2+} [2–4]. Зокрема, виявлене під впливом доксорубіцину збільшення концентрації кальцію в цитоплазмі може викликати переважанення клітини цими іонами, спричинити активацію фосфоліпази, посилити процеси перекисного окиснення і призвести до незворотних змін цитомембран [5–7]. За таких умов може бути перспективним застосування антагоністів кальцію.

Мета дослідження – вивчення можливого коригуючого впливу антагоністів кальцію – амлодипіну та димеодипіну – на ультраструктурний стан скоротливої системи міокарда лівого шлуночка щурів за умов доксорубіцинової кардіоміопатії.

Матеріали та методи. Дослідження проведено на 74 білих нелінійних статевозрілих щурах обох статей масою 140–270 г, у яких шляхом чотириразо-

вого (з інтервалом 1 тижд.) внутрішньоочеревинного введення розчину доксорубіцину в дозі 5,0 мг/кг маси тіла моделювали антрациклінову кардіоміопатію.

Блокаторами каналів Ca^{2+} у нашому дослідженні були димеодипін – новий оригінальний фторвмісний засіб, доклінічні дослідження якого були проведені у відділі фармакології серцево-судинних засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» [8], та амлодипін як референтний препарат.

Піддослідні тварини були розподілені на чотири групи. Щурам першої групи ($n = 34$) вводили доксорубіцин. Тваринам другої ($n = 20$) та третьої ($n = 20$) груп від дня третьої ін'єкції доксорубіцину щоденно *per os* вводили амлодипін і димеодипін відповідно в дозі 1,5 мг/кг упродовж 28 днів. Через 14 днів після останнього введення препаратів проводили евтаназію піддослідних тварин, які вижили (перша група – 14; друга – 17; третя – 7), шляхом цервікальної дислокації під ефірним наркозом. Четверту групу становили 6 інтактних щурів.

Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно із Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» [9] та Європейською конвенцією щодо захисту хребетних тварин [10].

Для електронномікроскопічного аналізу фрагменти міокарда лівого шлуночка фіксували в 4 % розчині парформальдегіду, дофіксували 1 % розчином OsO_4 , контрастували 2 % ураніл-ацетатом, зневоднення проводили за загальноприйнятою методикою та поміщали в суміш епону з аралдитом. Ультратонкі зрізи отримували на ультратомі

ЛКВПІ, контрастували розчином уранілацетату та цитрату свинцю та досліджували в електронному мікроскопі JEM-1010. Мікрофотографії отримували з використанням цифрової фотокамери LeicaDFC 320 і комп'ютерної програми LeicaQWin.

Для кількісної оцінки стану скоротливого апарату кардіоміоцитів визначали об'ємну щільність міофібрил, площу зрізу мітохондрій, їхню кількість та об'ємну щільність.

При статистичному аналізі отриманих даних було використано дискриптивну статистику; порівняння середніх значень змінних здійснювали за допомогою параметричних методів (t-критерію Стюдента) при нормальному розподілі показників, що виражені в інтервальній шкалі. Відповідність закону нормального розподілу ознак перевіряли за допомогою метода Шапіро-Уїлка. В інших випадках використовували непараметричний метод (U-критерій Манна-Уїтні, Колмогорова-Смірнова). Усі дані представлено у вигляді середнього \pm похибка середнього значення. Різниця визнавалася значущою при $p < 0,05$ [11]. Усі розрахунки здійснено в програмі SPSS 13.0 for Windows.

Результати та їх обговорення. За даними електронної мікроскопії в міо-

карді щурів на 14 добу після останньої ін'єкції доксорубіцину переважають скоротливі кардіоміоцити (КМЦ) з важкими ознаками альтерації і міститься незначна кількість непошкоджених КМЦ. У частини кардіоміоцитів визначаються виражені некробіотичні зміни з деструкцією міофіламентів, руйнуванням мітохондрій, деформацією ядер, порушенням цілісності сарколеми з виходом органел за межі клітини (рис. 1). Часто трапляються різнонаправлені міофібрили, що перетинаються між собою (рис. 2). У порівнянні з групою інтактних тварин у саркомерах спостерігається фрагментація Z-ліній зі зміщенням телофрагм одна відносно одної, визначаються ознаки лізису I-смуг та локальні просвітлення цитозолю.

У тварин першої групи в робочому міокарді виявляються ділянки з повною втратою поперечної посмугованості. Контрактурно змінені КМЦ демонструють глибокі структурні зміни: відмічаються смуги перескорочення біля M-та Z-ліній, висота саркомерів зменшується, зникають H-зони, подекуди відмічається відрив телофрагми від сарколеми, навколо Z-ліній містяться вакуолі. У деяких ділянках міокарда надлишкове скорочення міофібрил призводить до різкого звуження Z-ліній, A- та I-диски не розрізняються (рис. 3).

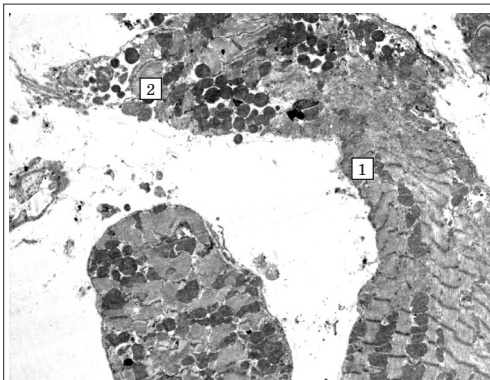


Рис. 1. Фрагмент міокарда лівого шлуночка серця щура через 14 днів після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії

Стоншені, неправильної форми кардіоміоцити (1).

Ділянки лізису саркоплазми з виходом органел в інтерстиційний простір (2).

Електронно-мікроскопічне фото. Зб. $\times 7500$.

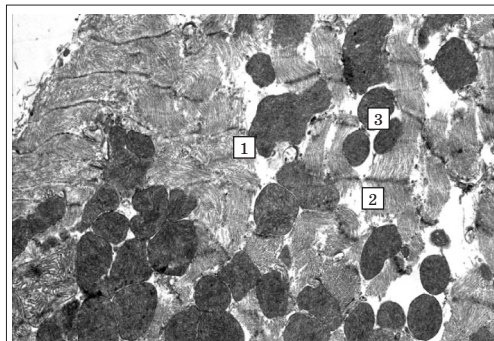


Рис. 2. Фрагмент кардіоміоцита лівого шлуночка щура на 14 добу після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії

Ділянки неупорядковано розташованих міофібрил із зміщенням Z-ліній в саркомерах (1) та лізису міофібрил (2). Мітохондрії з електронно-щільним матриксом та поодинокими кристами (3). Електронно-мікроскопічне фото. Зб. $\times 19\,500$.

Ядра КМЦ щурів першої групи зміщені в субсарколемальну зону, вирізняються поліморфізмом, мають значну кількість інвагінацій нуклеолеми, подекуди фрагментовані, містять зменшену кількість еухроматину.

У саркоплазмі трапляється значна кількість крапель ліпідів та зменшується порівняно з інтактними тваринами вміст гранул глікогену. Елементи саркоплазматичної системи різко розширені, в її трубочках і цистернах накопичується гомогенна, середньої електронної щільності речовина. Ці зміни саркоплазматичної сітки, яка акумулює Ca^{2+} , можуть зумовлювати порушення функцій міофібрил і мітохондрій. У клітинах з вираженими змінами філаментів відмічається значна кількість рибосом і полісом, вакуолізація та розпад мембран саркотубулярних структур, а Т-трубочки глибоко проникають у саркоплазму.

Матрикс мітохондрій ущільнений, кількість крист значно зменшена, вони майже не диференціюються, у деяких органелах виявляються лише поодинокі фрагменти двоконтурних крист.

На 14 добу після формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії порушується розташування десмосом та щільних з'єднань, що позначається на стані вставних дисків, до яких крі-

пляться міофібрили. У частині КМЦ спостерігаються розширення нексусів, в інших – десмосоми зближуються, утворюючи скупчення, а щільні контакти часто розширені, унаслідок чого формуються проміжки між сусідніми цитомембранами (рис. 4).

Таким чином, зумовлена доксорубіцином підвищена концентрація іонів кальцію в КМЦ призводить до низки структурно-функціональних змін їхньої скоротливої системи та процесів енергозабезпечення.

Ультраструктурні зміни КМЦ щурів при застосуванні блокаторів каналів Ca^{2+} амлодипіну та димедипіну на тлі доксорубіцинової кардіоміопатії були подібними. Загалом антагоністи іонів кальцію призводили до зниження альтеративних проявів, спричинених доксорубіцином. Частково нормалізувався стан міофібрил, були відсутні патологічні зміни в саркоплазматичному ретикулумі та системі Т-трубочок, що вказує на покращання кальцієвого обміну та скоротливої функції міокарда. Частка зменшених у довжині саркомерів була незначною, сарколема та вставні диски мали невиразні зміни, а розташування Z- та M-ліній не відрізнялося від таких у інтактних тварин (рис. 5). Ядра, звичайні за розмірами, містять більше активного еухроматину

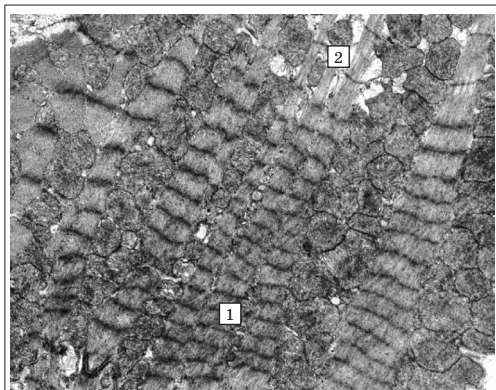


Рис. 3. Фрагмент міокарда лівого шлуночка щура через 14 днів після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії

Контрактурні зміни: висота саркомерів значно зменшена, відсутня світла зона в дисках (1), наявні ділянки лізису міофібрил (2). Електронно-мікроскопічне фото. 36×7500 .

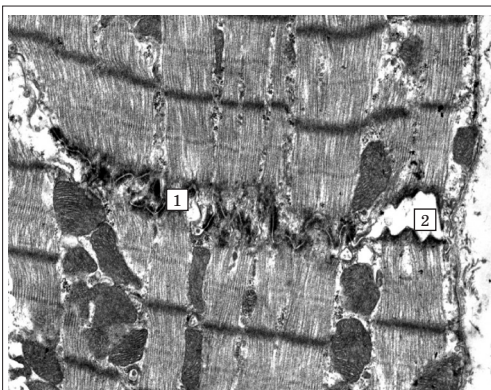


Рис. 4. Фрагмент кардіоміоцита лівого шлуночка щура на 14 добу після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії

Десмосомальні контакти (1). Розходження щільних контактів (2). Електронно-мікроскопічне фото. $36 \times 18\,000$.

(рис. 6). Уміст глікогенових гранул був суттєво вищим, ніж у КМЦ тварин першої групи, хоча й дещо нижчим від кількості глікогену в міокарді інтактних тварин.

Водночас поряд із слабо зміненими КМЦ виявлялися й стоншені та контрактурно змінені серцеві м'язові волокна, у яких зберігалися досить значні за розмірами ділянки лізису міофібрил, а також осередки їхнього розщеплення і розволокнення на більш тонкі пучки (рис. 7). Спостерігалася деформація Z-ліній та їхня фрагментація. Уміст органел біосинтетичного плану (рибосоми, комплекс Гольджі, полісоми) у локусах ушкоджених міофібрил підвищений.

Мітохондрії з вираженою гомогенізацією матриксу, тотальною фрагментацією та лізисом крист спостерігаються рідко. У деяких КМЦ виявляються значні скупчення мітохондрій у приядерній зоні та під сарколемою. Більшість мітохондрій – овальної форми, спостерігаються мітохондрії неправильної форми, різні за розмірами, зовнішні мембрани поодиноких органел з дрібними вогнищами пошкодженнями та незначною покрученістю контурів. Відзначається різноманітність розташування та кіль-

кості крист: у частини мітохондрій вони добре диференціюються, паралельно розташовані, проміжки між ними не збільшені (рис. 5, 7), у частини мітохондрій кристи розташовані дугоподібно, лише в деяких мітохондріях визначаються ділянки руйнування крист (рис. 8). Більшу частину об'єму займає матрикс помірної електронної щільності, у деяких мітохондріях матрикс просвітлений.

Відновлення структури та функції мітохондрій за рахунок гіпертрофії та гіперплазії створює умови для зменшення гіпоксичного пошкодження кардіоміоцитів.

Отже, у нашому дослідженні встановлено, що зумовлена амлодипіном і димедипіном нормалізація вмісту іонів кальцію призводить до часткового відновлення ультраструктури КМЦ щурів на тлі кардіоміопатії доксорубіцинового генезу.

При аналізі морфометричних показників стану ультраструктур КМЦ у щурів першої групи, дослідження яких проводилося на 14 добу після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії, відмічається достовірне зменшення всіх досліджуваних показників порівняно з такими в інтактних тварин ($p \leq 0,05$),

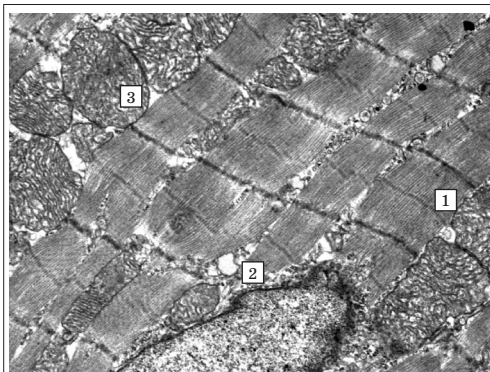


Рис. 5. Фрагмент міокарда лівого шлуночка щура при введенні амлодипіну на 14 добу після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії. Паралельне розташування міофібрил, чіткість M- та Z-ліній (1). Незначне розширення каналців саркоплазматичної сітки (2). Матрикс мітохондрій середньої електронної щільності, кристи мітохондрій диференціюються (3). Електронно-мікроскопічне фото. Зб. $\times 24\ 000$.

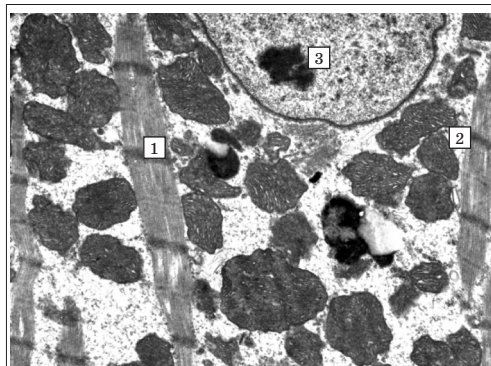


Рис. 6. Фрагмент міокарда лівого шлуночка щура при введенні димедипіну на 14 добу після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії. Z-лінії чіткі, довжина саркомерів однакова (1), більшість мітохондрій з чіткими зовнішніми мембранами, кристи виражені (2), ядро з рівномірно розподіленим хроматином і ядерцем (3). Електронно-мікроскопічне фото. Зб. $\times 12\ 000$.

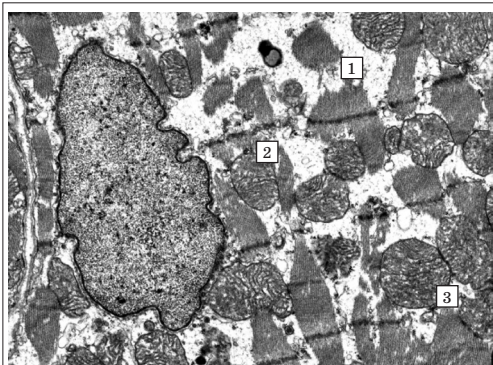


Рис. 7. Фрагмент міокарда лівого шлуночка щура при введенні амлодипіну на 14 добу після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії. Ділянки міоцитолізу з розволокненням та деструкцією міофібрил (1), розриви Z-ліній (2), мітохондрії з матриксом помірної електронної щільності (3). Електронно-мікроскопічне фото. Зб. $\times 16\ 000$.

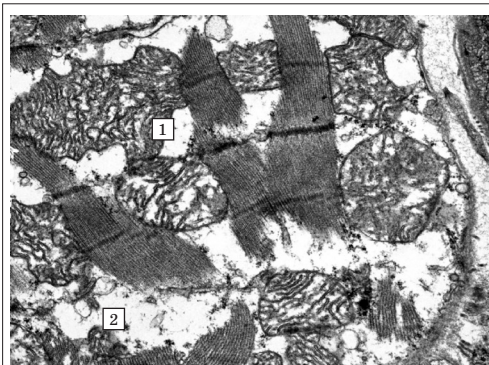


Рис. 8. Фрагмент міокарда лівого шлуночка щура при введенні амлодипіну на 14 добу після закінчення формування моделі доксорубіцинової кардіоміопатії. Мітохондрії з нерівномірно розширеним простором між кристами внаслідок локального лізису матриксу та крист (1). Канальці саркоплазматичної сітки (2). Електронно-мікроскопічне фото. Зб. $\times 22\ 500$.

що є відображенням виражених альтеративних змін міокарда, спричинених доксорубіцином (таблиця).

Унаслідок того, що зменшення об'ємів, які займають в КМЦ мітохондрії, відбувається більшою мірою, ніж зменшення об'єму міофібрил, показник співвідношення об'ємів цих структур у щурів першої групи достовірно менше, ніж у інтактних тварин: 1: 0,86

(у інтактних – 1: 0,9). Тобто, крім загального зменшення представництва скоротливого та енергетичного апаратів, знижується і насиченість КМЦ мітохондріями на одиницю об'єму міофібрил.

Після введення амлодипіну більшість морфометричних показників достовірно не відрізняються ($p \geq 0,05$) від інтактних тварин. Виняток становили

Таблиця

Морфометричні показники ультраструктур кардіоміоцитів піддослідних щурів, $M \pm m$

Група тварин Показник	Інтактні тварини (n = 6)	Доксорубіцин (n = 14)	Амлодипін (n = 7)	Димеодипін (n = 6)
Об'ємна щільність міофібрил, %	$34,20 \pm 1,94$	$24,06 \pm 1,14^*$	$32,10 \pm 1,21^{**}$	$32,02 \pm 1,34^{**}$
Площа зрізу мітохондрій, $10^{-2}/\text{мкм}^2$	$41,70 \pm 2,06$	$35,10 \pm 1,51^*$	$40,10 \pm 1,61^{**}$	$39,90 \pm 1,08^{**}$
Кількісна щільність мітохондрій, $10^{-2}/\text{мкм}^3$	$51,50 \pm 3,29$	$41,30 \pm 2,75^*$	$48,2 \pm 2,3^{**}$	$47,20 \pm 2,18$
Об'ємна щільність мітохондрій, %	$30,6 \pm 2,9$	$21,1 \pm 1,6^*$	$28,2 \pm 1,4^{**}$	$28,3 \pm 2,1^{**}$
Об'ємне мітох. - міофіб. відношення, у.о.	0,90	0,86	0,88	0,88

Примітка. *Достовірно відносно групи інтактних щурів ($p \leq 0,05$), **достовірно відносно групи контрольних щурів ($p \leq 0,05$).

показники об'ємної щільності МТ і МФ (14 доба спостережень) та кількісна щільність МТ. На 14 добу при застосуванні амлодипіну всі морфометричні показники МТ та МФ достовірно відрізняються ($p \leq 0,05$) від таких у контрольних тварин на 14 добу дослідження, що пояснюється ослабленням деструктивних процесів, частковим відновленням скоротливого та енергетичного апарату кардіоміоцитів.

При застосуванні димеодипіну зміни морфометричних показників мають таку саму спрямованість та близькі за значеннями, як і при застосуванні амлодипіну ($p \leq 0,05$). При порівнянні показників об'ємної щільності МТ та МФ з показниками інтактних тварин виявляються достовірні відмінності, які можна пояснити наявністю вогнищ альтерації в міокарді. На 14 добу дослідження при введенні димеодипіну відмічається достовірне збільшення площі зрізу та об'ємної щільності мітохондрій, об'ємної щільності міофібрил ($p \leq 0,05$) порівняно з показниками контрольної групи тварин, що свідчить про зменшення вираженості та площі ушкодження міокарда, відновлення енергетичних та скоротливих компартментів міоцитів.

Результати ультраструктурного дослідження впливу блокаторів кальцієвих каналів на тлі сформованої доксорубіцинової кардіоміопатії доводять, що

димеодипін і амлодипін покращують ультраструктуру міокарда і, як наслідок, функцію серця.

Висновки

1. При введенні амлодипіну та димеодипіну за умови доксорубіцинової кардіоміопатії структурні порушення скоротливого апарату КМЦ мають меншу вираженість, морфо-функціональний стан мітохондрій і міофіламентів частково відновлюється, що вказує на ефективність цих препаратів для лікування та профілактики антрациклінових ушкоджень серця.

2. Морфометричні зміни ультраструктури кардіоміоцитів при застосуванні амлодипіну та димеодипіну мають однакову спрямованість та ступінь вираженості, тому обидва препарати можуть ефективно застосовуватися при доксорубіциновій кардіоміопатії.

3. Незважаючи на низку позитивних змін в ультраструктурі кардіоміоцитів під впливом амлодипіну та димеодипіну на тлі доксорубіцинової кардіоміопатії, зберігаються ділянки пошкодження скоротливого апарату КМЦ і відсутня повна відповідність будови органел групі інтактних тварин, що свідчить про часткове відновлення енергетичної та скоротливої функції КМЦ при дії досліджуваних блокаторів Ca^{2+} -каналів.

1. Калинкина Н. В. Антрациклиновые кардиомиопатии / Калинкина Н. В. // Укр. кардиол. журнал. – 2004. – № 2. – С. 116–112.
2. Крикова А. В. Кардиотоксические эффекты антрациклиновых антибиотиков / А. В. Крикова // Научно-практ. медицинский журнал «Медицинские вести регионов», Смоленск. – 2008. – № 1. – С. 50–53.
3. Непомнящих Л. М. Влияние доксорубина на дилатационное ремоделирование миокарда в период прогрессивного роста / Л. М. Непомнящих // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26, № 4 (вып. 1). – С. 147–151.
4. Simunek T. Anthracycline – induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron / T. Simunek, M. Sttrba, O. Popelova // Pharmacol. Reports. – 2009. – V. 61 – P. 154–171.
5. Миронова Г. Д. Митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал. Структура канала, механизмы его функционирования и регуляции / Г. Д. Миронова, Е. В. Качаева, А. Т. Копылов // Вестник РАМН. – 2007. – № 2. – С. 34–43.
6. Капелько В. И. Концентрация Ca^{2+} в цитоплазме кардиомиоцитов и сократительная функция сердца на ранней стадии адриамициновой кардиомиопатии / В. И. Капелько, К. Виллиамс, Дж. П. Морган // Кардиология. – 1996. – Т. 36, № 12. – С. 57–61.
7. Berthiaume J. M. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity / J. M. Berthiaume, K. B. Wallace // Cell Biol. Toxicol. – 2007. – V. 23, № 1. – P. 15–25.
8. Мохорт М. А. Кардіотропна дія нового антагоніста кальцію дигідропіридинового ряду / М. А. Мохорт // Буковинський медичний вісник. – 2012. – Т. 16, № 3 (63). – С. 99–102.

-
9. Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» // Відомості Верховної Ради України. – 2006. – № 27. – С. 230.
10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 53 p.
11. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. / С. Гланц. – М. : Практика, 1999. – 459 с.

С. В. Пакришень, Е. Н. Килимник

Морфо-функциональное состояние сократительного аппарата кардиомиоцитов крыс при доксорубициновой кардиомиопатии и возможные пути ее фармакологической коррекции

Изучали влияние антагонистов Ca^{2+} дигидропиридинового ряда (амлодипина и димеодипина) на развитие антрациклиновой кардиомиопатии у крыс. Состояние сократительного аппарата миокарда левого желудочка сердца исследовали методами электронной микроскопии. Морфометрически изучали объемные части миофибрилл и митохондрий, площадь среза митохондрий и их количественную плотность, проводили статистическую обработку и анализ полученных результатов. В эксперименте на крысах установлено, что введение доксорубина приводит к необратимым дистрофически-некротическим изменениям кардиомиоцитов. Установленные ультраструктурные изменения саркоплазматического ретикула, митохондрий, миофибрилл приводят к нарушению сократительного и энергетического аппаратов кардиомиоцитов. В результате эксперимента установлено, что при применении амлодипина и димеодипина при сформированной доксорубициновой кардиомиопатии отмечается значительное уменьшение дистрофически-некротических изменений, происходит нормализация кальциевого обмена, улучшается структура саркоплазматического ретикула, частично восстанавливается морфо-функциональное состояние митохондрий и миофибрилл, что указывает на частичную нормализацию энергетической функции кардиомиоцитов и является свидетельством кардиопротекторных свойств блокаторов кальциевых каналов в условиях эксперимента.

Ключевые слова: кардиотоксичность, ультраструктура, доксорубин, амлодипин, димеодипин

S. V. Pakryshen', E. N. Kylymnyk

Morpho-functional state of cardiomyocytes contractile apparatus in rats with doxorubicin cardiomyopathy and possible ways of its pharmacological correction

Dihydropyridine Ca^{2+} antagonists (amlodipine and dimeodipine) effect on the anthracycline cardiomyopathy development in rats was studied. The contractile apparatus of left ventricle myocardium was studied using electron microscopy. The volume parts of myofibrils and mitochondria, mitochondrial cut area and its quantitative density were investigated by morphometry, statistical processing and analysis of the results. Doxorubicin administration leads to the irreversible necrotic and dystrophic changes in cardiomyocytes. Ultrastructural changes in sarcoplasmic reticulum, mitochondria and myofibrils lead to the alterations of contractile and energetic apparatuses in cardiomyocytes. The experiment found that amlodipine and dimeodipine administration to rats with doxorubicin cardiomyopathy showed a significant decrease in dystrophic and necrotic changes, led to the normalization of calcium metabolism, improved the structure of the sarcoplasmic reticulum, partially reversed the morphological and functional state of mitochondria and myofibrils, indicating that the partial normalization of the energy function of cardiomyocytes is evidence of cardioprotective properties calcium channel blockers under experiment.

Key words: cardiotoxicity, ultrastructure, doxorubicin, amlodipine, dimeodipine

Надійшла: 10.02.2014 р.

Контактна особа: Килимник О. М., ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд.14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 91 98.