

УДК 616-092.9+616.127+616.12-008.315

Шатинська Т.В., Синовська О.Б., Заяць Л.М.

**Ультроструктура міокарда щурів при доксорубіциновій кардіоміопатії**

ДВНЗ “Івано-Франківський національний медичний університет”

**Резюме.** В експерименті вивчено морфологічні зміни ультроструктури міокарда щурів під впливом кардіотоксичного антрациклінового антибіотику доксорубіцину. Експериментальне дослідження проведене на 70 статевозрілих білих щурах-самцях лінії Вістар, що були розподілені на три групи: інтактні, контрольні та експериментальна модель доксорубіцинової кардіоміопатії. Динамічне спостереження за тваринами здійснювали протягом всього періоду моделювання кардіоміопатії, а також 14 днів після завершення формування моделі патології. У результаті експерименту встановлено, що кардіотоксичні ефекти доксорубіцину починають проявлятися вже після першого введення антибіотику. Зі зростанням кумулятивної дози доксорубіцину загибель тварин зростала. Показано, що доксорубіцинова кардіоміопатія супроводжується ультроструктурними змінами в кардіоміоцитах у вигляді набряку органел, порушення внутрішньоклітинної архітекстоники, дезорганізації та фрагментації крист мітохондрій. Поза тим, мали місце набряк та виражена вакуолізація ендотеліоцитів із розвитком локального тромбозу гемокапілярів міокарда та “сладж-феномену”.

**Ключові слова:** доксорубіцинова кардіоміопатія, ультроструктура міокарда, експеримент.

**Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.**

Протокольна терапія більшості онкологічних захворювань передбачає застосування поліхіміотерапії (ПХТ), однією із складових якої є антрациклінові антибіотики (АА). Із проведенням такої терапії пов'язано виникнення ряду ускладнень, які значно погіршують перебіг основного захворювання, а часто й визначають його прогноз. Одним із органів-мішеней при застосуванні АА є серце [6, 13]. Відомо, що при тривалому прийомі антрациклінів формується кардіоміопатія (КМП), яка часто ускладнюється хронічною серцевою недостатністю (ХСН) [12] та проявляється змінами різного рівня організації (від молекулярного до органного і системного) з інтенсивним формуванням поліорганної патології [7]. Ураження міокарда антибіотиками антрациклінового ряду пов'язують з активацією вільнорадикального окислення [3], порушенням функції саркоплазматичного ретикулула (СР) та іонів  $Ca^{2+}$  [5], зміною метаболізму жирних кислот та ліпідів [10], пошкодженням структури ДНК в кардіоміоцитах (КМЦ) та експресією кардіальних генів [14], утворенням вторинних алкогольних метаболітів [17], активацією симпто-адреналової системи [8], пошкодженням судин [15] та дисфункцією їх ендотелію [2, 9], ішемією міокарду та апоптозом його клітин [16]. Утім, питання ультроструктурної характеристики доксорубіцинової кардіоміопатії (ДКМП) та можливості її корекції на клітинному рівні на сьогодні залишається відкритим.

**Мета дослідження** – дослідити динаміку змін ультроструктури міокарду під впливом доксорубіцину в залежності від кумулятивної дози останнього у тварин із модельованою доксорубіциновою кардіоміопатією.

**Матеріал і методи дослідження**

Дослідження проведене на 70 статевозрілих білих щурах-самцях лінії Вістар, масою тіла ( $200 \pm 20$ ) г, які знаходились на звичайному харчовому раціоні виварію. Тварин було розподілено на 3 групи: I – інтактні тварини (15 щурів); II (контрольна) – внутрішньоочеревинно вводили 0,9% розчин натрію хлориду в дозі 2,5 мл/кг маси тіла тварини один раз на тиждень протягом чотирьох тижнів (15 щурів) [1]; III (модель ДКМП) – внутрішньоочеревинно протягом чотирьох тижнів вводили доксорубіцину гідрохлорид (“ARTERIUM”, Україна) в дозі 5,0 мг/кг маси тіла тварини/тиждень (40 щурів) [4].

Спостереження за тваринами проводили протягом 28 діб (період моделювання КМП) та впродовж наступних 14 діб після завершення експериментальної частини. Аналізували зміну загального стану експериментальних тварин та час їх загибелі. Матеріал для

досліджень забирали на 7, 14, 21 та 28 добу. Виведення щурів з експерименту здійснювали шляхом декапітації під кетаміновим наркозом в дозі 100,0 мг/кг маси тіла тварини [11].

Ультроструктурні зміни міокарда вивчали на електронному мікроскопі “ПЭМ-125К” при прискорюючій напрузі 75 кВ з наступним фотографуванням при збільшеннях від 2000 до 40000 разів.

Для ультроструктурного дослідження матеріал фіксували в 2,5% глутаральдегід в 0,1 М розчині фосфатного буфера (pH 7,4) з подальшою до фіксацією протягом 1 години на холоді (при температурі 40°C) в 1% розчині  $O_3O_4$  на 0,1 М фосфатному буфері, зневоднення у спиртах зростаючої концентрації, проміжному середовищі (100% ацетоні) і заливкою у пластичну суміш Epon-Araldit. Зрізи товщиною 20-50 нм виготовляли на ультрамікромомі “Tesla BS-490”, фарбували уранілацетатом та сумішшю Рейнольдса.

Експеримент проводився згідно з нормами, встановленими законом України №3447-IV “Про захист тварин від жорстокого поводження” нормами, прийнятими в Європейській конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей (1985), Директиви ЄС (1986) №609 та Наказу МОЗ України №281 від 01.11.2000 р. «Про міри по подальшому вдосконаленню організаційних норм з використанням експериментальних тварин» та протоколу №63/12 від “23.04.2012 р.” комісії з питань біоетики ДВНЗ “ІФНМУ”.

**Результати дослідження та їх обговорення**

У результаті моделювання ДКМП відзначали погіршення стану тварин вже з восьмого дня після першого введення доксорубіцину. Тяжкість стану тварин визначалася ринореєю, зміною шерстяного покриву (надмірна зволоженість, настовбурченість); зниженням апетиту, рухової та поведінкової активності, діареєю.

Аналіз смертності тварин основної групи показав, що протягом 7 діб після першого введення доксорубіцину загинула одна (2,5%), з 7 по 14 добу – 3 тварини (8,0%), з 15 по 21 та з 22 по 28 добу загинуло по 6 тварин (20,0% та 29,0%, відповідно), тобто мало місце прогресивне зростання загибелі тварин залежно від збільшення отриманої дози АА (табл.1).

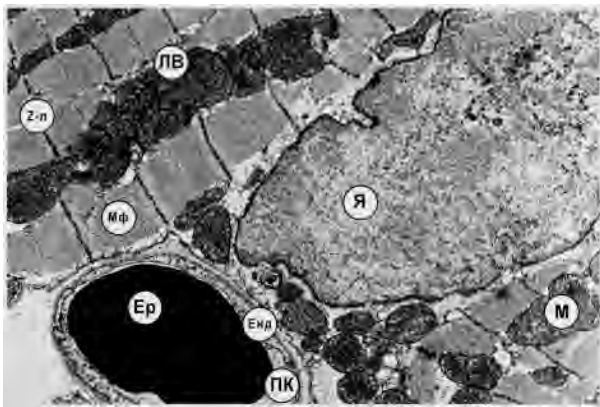
Крім того, відмічено, що загибель тварин продовжувалася і після припинення введення доксорубіцину. Так, через 7 діб після завершення формування патології загинуло ще 4 щурів (33,0%), а через 14 діб – ще 2 тварини (40,0%). Отже, впродовж всього терміну спостереження загинуло 55,0% тварин із групи модельованої КМП.

При цьому, загибелі серед тварин I та II груп не спостерігалось. Електронномікроскопічне дослідження міокарда лівого шлуночка тварин I та II груп не виявило будь-яких морфологічних змін.

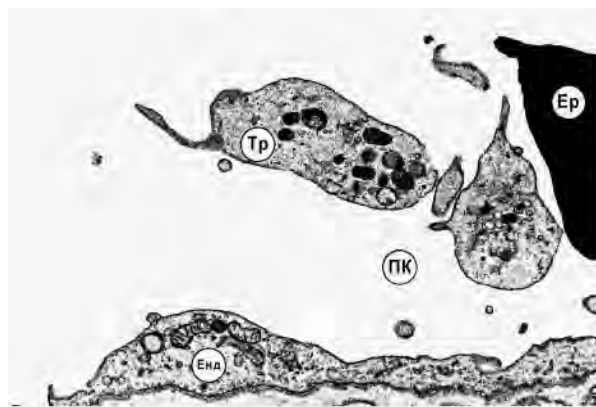
При дослідженні ультроструктури міокарда лівого шлуночка тварин III групи із модельованою ДКМП виявили ряд

**Таблиця 1. Терміни загибелі експериментальних щурів за умов моделювання доксорубіцинової кардіоміопатії**

Кількість тварин	Термін спостереження, доба					
	Після введення доксорубіцину				Після завершення формування моделі патології	
	7 (n=40)	14 (n=36)	21 (n=30)	28 (n=21)	7 (n=12)	14 (n=5)
загибель, абс.ч.(доба)	1(4)	1(9) 2(13)	2(17) 4(19)	3(23) 3(26)	3(2) 1(7)	2(10)
загибель, абс.ч./%	1/2,5	3/8,0	6/20,0	6/29,0	4/33,0	2/40,0
забір для досліджень абс.ч.(доба)	3(7)	3(14)	3(21)	3(28)	3(7)	3(14)



**Рис.1.** Ультраструктурні зміни у кардіоміоцитах лівого шлуночка через 7 днів після введення доксорубіцину. М – мітохондрії; Мф – міофібрили; Я – ядро; Z-л – Z-лінії; ЛВ – ліпідні включення. Електронномікроскопічна фотографія. Зб. 16000



**Рис.2.** Агрегація тромбоцитів у гемокапілярах міокарда лівого шлуночка через 7 днів після введення доксорубіцину. Енд – ендотеліоцит; Тр – тромбоцит; Ер – еритроцит; ПК – просвіт капіляра. Електронномікроскопічна фотографія. Зб. 12000

структурно-морфологічних змін, що стосувалися як КМЦ, так і гемокапілярів, та мали залежність від тривалості застоювання та отриманої кумулятивної дози АА. Так, через 7 днів після першого введення доксорубіцину в міокарді лівого шлуночка виявлено явища набряку та цитолізу КМЦ, розщеплення міофібрил, інвагінацію каріолеми ядра, порушення архітектоніки частини мітохондрій із дезорганізацією їх крист та помірне розширення цистерн і каналців апарату Гольджі та гранулярної ендоплазматичної сітки (рис. 1).

У гемокапілярах спостерігали помірний набряк ендотеліоцитів із значною кількістю мікропіноцитозних пухирців і вакуолей по периферії, складчастість базальної мембрани. Крім того, у просвіті окремих гемокапілярів спостерігали наявність тромбоцитарних агрегатів (рис. 2).

На 14-у добу дослідження домінуючим в КМЦ був набряк саркоплазми. При цьому, візуалізували ядра з матриксом низької електроннооптичної щільності та маргінальним розміщенням хроматину. Нуклеолема КМЦ має звивисті контури та утворює складки. Крім того, відзначаються набряклі мітохондрії з поодинокими, фрагментованими кристами, які місцями повністю зруйновані. Зовнішні мембрани окремих мітохондрій втрачають двохконтурність та стають розпливчастими (рис. 3).

Встановлено, що в гемокапілярах міокарда на 14-у добу моделювання КМП виражено наростають явища гіпергідратації ендотеліоцитів, при яких матрикс цитоплазми виглядає слабо електроннощільним. Спостерігаються збільшені за розмірами мітохондрії з поодинокими короткими кристами. Відмічено, що каналці і цистерни апарату Гольджі та гранулярної ендоплазматичної сітки розширені, кількість

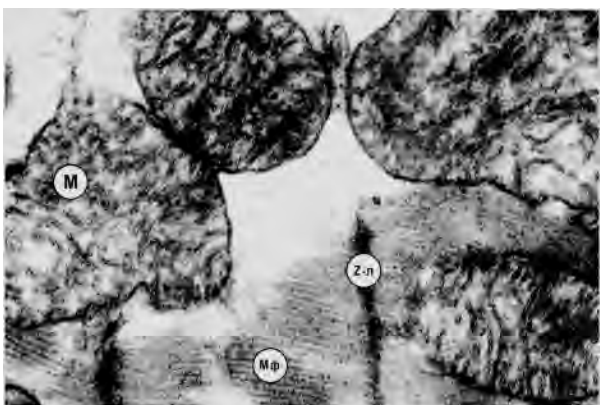
рибосом на мембранах останньої зменшена. Базальна мембрана в багатьох ділянках потовщена, нечітка. На люменальній поверхні периферичних ділянок ендотеліоцитів відзначаються складки і мікрворсинки (рис. 4).

На 21-у добу дослідження в КМЦ спостерігається велика кількість вакуолей та значне розширення елементів саркоплазматичної сітки. Відмічено значно розширений перинуклеарний простір. Крім того, встановлено, що зовнішня та внутрішня мембрани багатьох мітохондрій зруйновані. У деякій частині мітохондрій спостерігаються різної величини електроннощільні включення. В окремих КМЦ відмічаються вогнища розплавлення міофібрил і ділянки їх деструкції (рис. 5).

На цьому етапі дослідження в ендотеліоцитах продовжують зберігатися явища гіпергідратації, у просвіті деяких гемокапілярів визначаються значні еритроцитарні агрегати (рис. 6).

На 28-у добу експериментального моделювання ДКМП ультраструктурні зміни КМЦ значно прогресували. Так, виявлено виражену деструкцію крист, фрагментацію і руйнування як внутрішньої, так і зовнішньої мембран мітохондрій та лізис міофібрил (рис. 7).

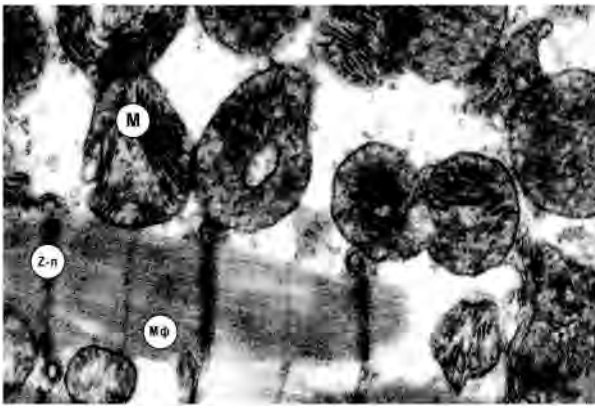
У гемокапілярах визначаються еритроцитарні агрегати. На люменальній поверхні плазмолемі ендотеліоцитів спостерігаються її вітрилоподібні випинання. Мітохондрії збільшені за об'ємом з просвітленим матриксом і редукованими кристами. Крім того, виявлено, що нуклеолема ядер утворює численні інвагінації і випинання. У периферійних відділах ендотеліальних клітин визначається велика кількість як малих, так і великих пухирців, які часто зливаються між



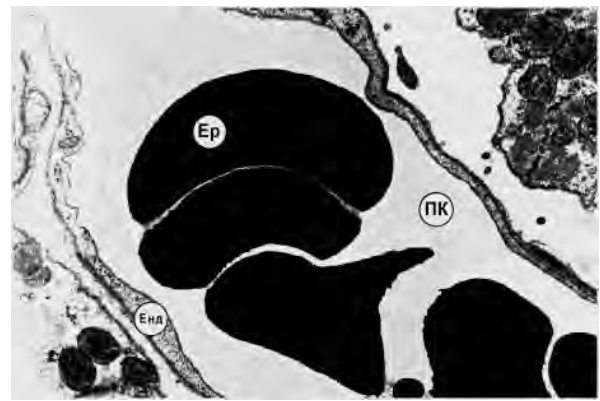
**Рис.3.** Субмікроскопічні зміни у кардіоміоцитах лівого шлуночка через 14 днів після введення доксорубіцину: М – мітохондрії; Мф – міофібрили; Z-л – Z-лінії. Електронномікроскопічна фотографія. Зб. 24000



**Рис.4.** Ультраструктурна організація гемокапіляра лівого шлуночка через 14 днів після введення доксорубіцину. Енд – ендотеліоцит; Я – ядро; Ер – еритроцит; ПК – просвіт капіляра. Електронномікроскопічна фотографія. Зб. 12000



**Рис.5.** Ультраструктура кардіоміоцитів лівого шлуночка через 21-у добу після введення доксорубіцину: М – мітохондрії; Мф – міофібрили; Z-л – Z-лінії. Електронномікроскопічна фотографія. Зб.16000



**Рис.6.** Ультраструктурні зміни у гемокapілярах кардіоміоцитів лівого шлуночка через 21-у добу після введення доксорубіцину. Енд – ендотеліоцит; Ер – еритроцит; ПК – просвіт капіляра. Електронномікроскопічна фотографія. Зб. 10000

собою, утворюючи великі вакуолі. Базальна мембрана потовщена з нечіткими контурами (рис.8).

### Висновки

1. Патоморфологічні зміни кардіоміоцитів у тварин з кардіоміопатією, спричиненою доксорубіцином, прогресують вже після першого введення антрациклінового антибіотика та посилюються зі зростанням його кумулятивної дози.

2. Основними внутрішньоклітинними мішенями впливу доксорубіцину є мітохондрії.

3. Набряк та виражена вакуолізація ендотеліоцитів на фоні тромбозу гемокapілярів призводить до порушення гемомікроциркуляції міокарда.

**Перспективи подальших досліджень** полягатимуть у вивченні можливості медикаментозної корекції доксорубіцинової кардіоміопатії в експерименті на тваринах.

### Література

1. Гоголь С.В. Зменшення токсичної дози доксорубіцину за допомогою церулоплазміну / С.В. Гоголь, Н.К. Бердинских // *Експериментальна онкологія*. – 2000. – №22. – С.225-227.
2. Калинкина Н.В. Дисфункція ендотелію як один з можливих патогенетичних механізмів ушкодження серця антрациклінами / Н.В. Калинкина // *Укр. кардіол. ж-л*. – 2000. – №5-6. – С.69-71.
3. Мамчур В.Й. Використання нових лікарських форм кверцетину для профілактики доксорубіцинової кардіоміопатії в експерименті / В.Й. Мамчур, А.С Шаламай, М.Г. Старченко, К.О. Кравченко, Є.О. Чернов // *Медичні перспективи*. – 2005. – Т.10, №4. – С.4-7.

№4. – С.4-7.

4. Нагорна О.О. Експериментальне обґрунтування доцільності застосування нікотинаміду для попередження кардіоміопатії доксорубіцинового генезу: Дис. ...канд. мед. н. - К., Національний медичний університет ім. Богомольця, 14.03.05., 2006. – 162 с.

5. Сачок В.В. Експериментальне дослідження ефективності антагоністів кальцію з покоління похідних 1,4-дигідропіридину на енергетичний обмін в серці за умов доксорубіцинової кардіоміопатії / В.В. Сачок // *Вісник морфології*. – 2010. – №16 (3). – С.575-578.

6. Семенова А.И. Кардио- и нейротоксичность противоопухолевых препаратов (патогенез, клиника, профилактика, лечение) / А.И.Семенова // *Практическая онкология*. – 2009. – Т.10, №3. – С.168-176.

7. Трофимова Т.С. Вплив тіотриазоліну на морфологічну структуру міокарда щурів при доксорубіцинової кардіоміопатії / Т.С. Трофимова, Н.А. Колесова, І.С. Чекман, М.О. Авраменко // *Запорозький медичний журнал*. – 2006. – №3 (36). – С.107-109.

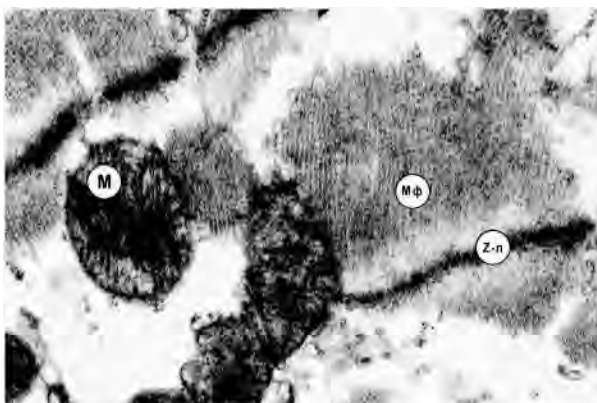
8. Cirillo R. Comparison of doxorubicin and MEN 10755-induced long-term progressive cardiotoxicity in the rat / R. Cirillo, G. Sacco, S. Venturella et al. // *J.Cardiovasc.Pharmacol*. – 2000. – Vol.35. – P.100-108.

9. Fogli S. The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage / S. Fogli, P. Nieri, M.C. Brecchi // *FASEB J*. – 2004. – Vol.18. – P. 664-675.

10. Hrelia S. Role of gamma-linolenic acid in counteracting doxorubicin-induced damage in cultured rat cardiomyocytes / S. Hrelia, A. Bordoni, P.L. Biagi // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. – 2001. – 64. – P.139-145.

11. Kubota T. Inhibitory effect of clonidine on ketamine-induced norepinephrine release from the medial prefrontal cortex in rats / T. Kubota K.Hirota // *British Journal of Anaesthesia*. – 1999. – 83 (6). – P. 945-947.

12. Menna P. Cardiotoxicity of antitumor drags / P. Menna, E.



**Рис.7.** Субмікроскопічна організація кардіоміоцитів лівого шлуночка через 28 дб після введення доксорубіцину. М – мітохондрії; Мф – міофібрили; Z-л – Z-лінії. Електронномікроскопічна фотографія. Зб. 20000



**Рис.8.** Ультраструктурний стан гемокapілярів лівого шлуночка через 28 дб після введення доксорубіцину. Енд – ендотеліоцит; Ер – еритроцит; Тр – тромбоцит; ПК – просвіт капіляра. Електронномікроскопічна фотографія. Зб. 10000

Salvatorelli, G. Minotti // Chem. Res. Toxicol. – 2008. – Vol.21. – P.978-989.

13. Shen F. Quantitation of doxorubicin uptake, efflux and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells / F. Shen, S. Chu, A. Bence et al. // J.Pharmacol. and Exp. Ther. – 2008. – Vol.324, №1. – P.95-102.

14. Szuawska A. Molecular mechanisms of anthracyclines action / A. Szuawska. M. Czyz // Postepy Hig. Med. Dosw. (Online). – 2006. – № 60. – P.78-100.

15. Wakabayashi I. Vascular actions of anthracycline antibiotics / I. Wakabayashi, K. Grosher // Curr. Med. Chem. – 2003. – Vol.10. – P.427-436.

16. Wang S. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms intermediacy of H(2)O(2) and p53-dependent pathways / S. Wang. E.A. Konorev. S. Kotamraju., J. Joseph. et al. // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol.279. – P. 25535-25543.

17. Zucchi R. Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines / R. Zucchi, R. Danesi // Curr. Med. Chem. Anticancer Agents. – 2003. – Vol.3.№2. – P.151-171.

*Шатинская Т.В., Синоверская О.Б., Заяц Л.М.*

#### **Ультраструктура миокарда крыс при доxorубициновой кардиомиопатии**

**Резюме.** В эксперименте изучены морфологические изменения ультраструктуры миокарда крыс под влиянием кардиотоксического антрациклинового антибиотика доxorубицина. Экспериментальное исследование проведено на 70 половозрелых белых крысах-самцах линии Вистар, которые были разделены на три группы: интактные, контрольные и экспериментальная модель доxorубициновой кардиомиопатии. Динамическое наблюдение за животными осуществляли в течение всего периода моделирования кардиомиопатии, а также 14 дней после завершения формирования модели патологии. В результате эксперимента установлено, что кардиотоксические эффекты доxorубицина начинают проявляться уже после первого введения антибиотика. С ростом куму-

лятивной дозы доxorубицина гибель животных возрастала. Показано, что доxorубициновая кардиомиопатия сопровождается ультраструктурными изменениями в кардиомиоцитах в виде отека органелл, нарушение внутриклеточной архитектоники, дезорганизации и фрагментации крист митохондрий. Кроме того, имели место отек и выраженная вакуолизация эндотелиоцитов с развитием локального тромбоза гемокapилляр миокарда и “сладж-феномена”.

**Ключевые слова:** доxorубициновая кардиомиопатия, ультраструктура миокарда, эксперимент.

*T.V. Shatynska, O.B. Synoverska, L.M. Zajac*

#### **Ultrastructure of the Myocardium of Rats with Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy**

**Summary.** The experiment studied the morphological changes of the ultrastructure of the myocardium of rats under the influence of cardiotoxic anthracycline antibiotic doxorubicin. An experimental study conducted on 70 mature white male rats Wistar, which were divided into three groups: intact, control and experimental model doxorubicin-induced cardiomyopathy. Dynamic observation of the animals was carried out during the period of simulation cardiomyopathy, and 14 days after the completion of the model of pathology. The result of the experiment revealed that doxorubicin cardiotoxic effects begin to appear after the first administration of antibiotic. With increasing cumulative doses of doxorubicin death of animals grew. It was shown that doxorubicin-induced cardiomyopathy accompanied by ultrastructural changes in cardiomyocytes as edema organelles, violation intracellular architectonics, disorganization and fragmentation of cristae of mitochondria. Nevertheless, there were swelling and severe vacuolization of endothelial development of local thrombosis and myocardial blood capillary “sludge-phenomenon.”

**Key words:** doxorubicin-induced cardiomyopathy, myocardial ultrastructure, experiment.

Надійшла 18.02.2013 року.

УДК 576.2+616.61+616-092.9+575.322

*Швец Л.С., Ковальчук Л.Є.*

#### **Морфогенез юкстагломерулярного комплексу нирки білих мишей в постнатальному періоді онтогенезу**

Кафедра медичної біології і медичної генетики (зав. каф. – проф. Л.Є. Ковальчук)  
ДВНЗ “Івано-Франківський національний медичний університет”

**Резюме.** Методами гістологічного, електронно-мікроскопічного, морфо метричного аналізу встановлено особливості становлення юкстагломерулярного комплексу нирки 40 білих безпородних мишей в постнатальному періоді онтогенезу (новонароджених, на 14-15 доби життя, п’яти - восьми - тижневих та 19-20-місячних). Формування трьох компонентів ендокринного комплексу нирки залежить від топографії нефронів та їх дозрівання. Секреторна активність юкстагломерулярного комплексу нирки формується в три фази: I – накопичення та раннє диференціювання юкстагломерулярних клітин, клітин щільної плями і клітин Гурмагтіа від народження до 15 доби; II – повне диференціювання, дозрівання і стабілізація структури юкстагломерулоцитів, клітин щільної плями і юкстаскулярного острівця, формування взаємозв’язків між ними з наростанням активності утворення гранул (від 15 доби до п’яти-восьми тижнів); III фаза – поступове зниження функціональної активності юкстагломерулярного комплексу паралельно з пригніченням біосинтетичних процесів в органелах під час старіння (16-20 місяців).

**Ключові слова:** морфологія, юкстагломерулярний комплекс, нирки, онтогенез.

**Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.** Використання медико-біологічних моделей для з’ясування загальних закономірностей існування та відтворення різно-

манітних патологічних процесів у людини набуває все більшої актуальності, що зумовлено вимогами біоетики. Одними з найбільш доступних піддослідних тварин є савці, зокрема білі миші та шурі. Оскільки будь-які захворювання перебігають тривалий час, виникає необхідність при їх моделюванні враховувати особливості онтогенезу експериментальних тварин.

Серед сучасних наукових досліджень велика увага надається вивченню механізмів підтримки гомеостазу організму, до якого долучається видільна система, зокрема нирки [1-2]. Це пов’язано із забезпеченням регуляції водно-солевого обміну, кислотно-лужної рівноваги організму, артеріального тиску. Важлива роль у здійсненні авторегуляції ниркового кровоплину, підтримці структурно-функціональних аспектів сталості внутрішнього середовища належить ренін-ангіотензиновій системі та її морфологічному субстрату юкстагломерулярному комплексу (ЮГК) [5, 7, 10]. Наші попередні дослідження онтогенетичних закономірностей становлення компонентів ЮГК у білих шурів, показали кореляції між ростом і дозріванням нефронів та формуванням ЮГК і дозволили виявити характерні ознаки його перебудови на різних етапах постнатального періоду [3]. У зв’язку