

Вплив антагоністів кальцію дигідропіридинового ряду на ультраструктурні зміни міокарда лівого шлуночка у щурів з експериментальною доксорубіциновою кардіоміопатією



С.В. Пакришень

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ

Мета роботи — дослідити вплив антагоністів кальцію дигідропіридинового ряду димедипіну та амлодипіну, за даними порівняльного вивчення ультраструктурних морфометричних змін міокарда лівого шлуночка, на розвиток антрациклінової кардіоміопатії у піддослідних тварин.

Матеріали і методи. Есперимент проводили на 74 піддослідних нелінійних білих статевозрілих щурах обох статей, яким шляхом чотириразового (з інтервалом 1 тиждень) внутрішньоочеревинного введення доксорубіцину в дозі 5 мг/кг було змодельовано антрациклінову кардіоміопатію. Тваринам 1-ї групи ($n = 34$) вводили тільки доксорубіцин. Щурам 2-ї групи ($n = 20$), починаючи від дня третього введення доксорубіцину, призначали всередину амлодипін у дозі 1,5 мг/кг, щурам 3-ї групи ($n = 20$) так само від дня третього введення доксорубіцину — димедипін у дозі 1,5 мг/кг щоденно протягом 28 діб. Спостережали за тваринами протягом 28 діб експерименту та наступних 14 діб. У тварин, які залишилися живими (1-ша група — 18, або 52,9 %, 2-га — 11, або 55 %, 3-тя — 10, або 50 %), у першу добу після закінчення експерименту вивчали ультраструктурні зміни ядерного апарату і хроматину, каналців саркоплазматичної сітки та навколядерного простору, морфометричні зміни міофібрил, мітохондрій.

Результати та обговорення. Ультраструктурні зміни кардіоміоцитів щурів після застосування доксорубіцину виявляються масивними ділянками міоцитолізу, виразними патологічними змінами мітохондрій, розширенням та перевантаженням саркоплазматичного ретикулуму кальцієм. У тварин 2-ї та 3-ї груп помічено часткову нормалізацію стану міофібрил, збільшення об'ємної щільності міофібрил на 23,3 та 23,1 % відповідно ($p < 0,05$), зменшення набряку в міжклітинному просторі, відсутність патологічних змін у саркоплазматичному ретикулумі та системі Т-трубочок, вірогідне збільшення об'ємної щільності мітохондрій на 25 та 25,4 % відповідно.

Висновки. Антагоністи кальцію (амлодипін та димедипін) у піддослідних щурів із експериментальною доксорубіциновою кардіоміопатією сприяють частковому відновленню міофібрил та збільшенню їх об'ємної щільності у кардіоміоцитах на 23,3 і 23,1 % відповідно, збільшенню об'ємної щільності мітохондрій на 25 та 25,4 % відповідно.

Ключові слова: кардіотоксичність, ультраструктура, доксорубіцин, амлодипін, димедипін.

Антрациклінові антибіотики (доксорубіцин, даунорубіцин, епірубіцин та ін.) — найбільш використовувані протиопухлинні препарати в ліку-

ванні злоякісних пухлин та гемобластозів. Однак їх застосування часто обмежене ускладненнями, одним із найнебезпечніших з яких є ураження серця з розвитком антрациклінової кардіоміопатії у 5–60 % хворих [10].

Провідні патогенетичні механізми кардіотоксичної дії антрациклінових антибіотиків такі: активізація процесів перекисного окиснення ліпідів, порушення функції мітохондрій та саркоплазма-

Стаття надійшла до редакції 28 грудня 2012 р.

Пакришень Світлана Віталіївна, аспірант
01023, м. Київ, вул. Шовковична, 39/1
Тел. (44) 255-14-47. E-mail: svetlana.pakrishen@mail.ru

тичного ретикулуму, експресії генів, метаболізму жирних кислот та ліпідів, синтезу азоту оксиду, ДНК та протеїнів у кардіоміоцитах, утворення вторинних алкогольних метаболітів, адренергічний дисбаланс, ушкодження судин і ендотелію, ішемія міокарда та апоптоз його клітин [2, 4, 8, 13, 15].

Важливою складовою процесу розвитку пізньої кардіоміопатії є порушення функції саркоплазматичного ретикулуму, що неупинно прогресує після закінчення терапії антрациклінами. У дослідженнях Т.І. Букей та співавторів [1] встановлено, що доксорубіцин удвічі збільшує тривалість періоду розслаблення волокон і амплітуди тонічного скорочення, яке пов'язане зі змінами транспорту іонів Ca^{2+} за механізмом $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обміну. Збільшення концентрації кальцію в цитоплазмі може зумовити перевантаження клітини цими іонами, активізацію фосфоліпази, посилення процесів перекисного окиснення і призвести до необоротних змін клітинних мембран [1, 5, 10, 11]. З огляду на це використання блокаторів кальцієвих каналів одночасно з протипухлинними препаратами антрациклінового ряду дало б змогу знизити кардіотоксичну дію.

Мета роботи — дослідити вплив антагоністів кальцію дигідропіридинового ряду димеодипіну та амлодипіну, за даними порівняльного вивчення ультраструктурних морфометричних змін міокарда лівого шлуночка, на розвиток антрациклінової кардіоміопатії у піддослідних тварин.

Матеріали і методи

Ультраструктурні зміни міокарда лівого шлуночка (ЛШ) під час антрациклінової кардіоміопатії вивчали в експерименті на 74 піддослідних нелінійних білих статевозрілих щурах обох статей, у яких шляхом чотириразового (з інтервалом 1 тиждень) внутрішньоочеревинного введення доксорубіцину в дозі 5 мг/кг було змодельовано антрациклінову кардіоміопатію. Тваринам 1-ї групи ($n = 34$) вводили тільки доксорубіцин, 2-ї ($n = 20$) — починаючи від дня третього введення доксорубіцину, призначали всередину амлодипін у дозі 1,5 мг/кг, 3-ї ($n = 20$) — так само від дня третього введення доксорубіцину застосовували димеодипін у дозі 1,5 мг/кг щоденно протягом 28 діб.

Спостереження за тваринами проводили протягом 28 діб експерименту та наступних 14 діб. У 1-шу добу після закінчення експерименту тварин, які залишилися живими (1-ша група — 18, або 52,9 %, 2-га — 11, або 55 %, 3-тя — 10, або 50 %), декапітували з використанням ефірного наркозу.

Фрагменти міокарда ЛШ фіксували в 4 % розчині параформальдегіду, постфіксували в 1 % розчині осмієвої кислоти, зневоднювали в спиртах зі зростанням концентрації та поміщали в суміш епону з аралдитом.

Ультратонкі зрізи отримували на ультратомі LKBIII, контрастували ураніацетатом та цитратом свинцю і досліджували в електронному мікроскопі JEM 1010. Мікрофотографії отримували з використанням цифрової фотокамери LeicaDFC 320 та комп'ютерної програми LeicaQWin. Для кількісної оцінки ультраструктур кардіоміоцитів визначали кількісну та об'ємну щільність, площу зрізу мітохондрій, об'ємну щільність міофібрил і об'ємне мітохондріально-міофібрилярне відношення.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням t -критерію Стьюдента.

Результати

Міокард ЛШ щурів через добу після закінчення експерименту має гетерогенну структуру з незначною кількістю неушкоджених кардіоміоцитів. Трапляються ділянки з повною втратою поперечної посмугованості, у контрактурно змінених кардіоміоцитах помітні глибокі структурні зміни. В міокарді значна кількість стоншених неправильної форми атрофованих кардіоміоцитів та кардіоміоцитів з міоцитолізом, гетерогенних за виразністю структурних змін: у частині міоцитів спостерігається генералізований лізис усіх органел зі збереженою сарколемою, в інших — за збережених ядер і зруйнованих філаментів міститься значна кількість рибосом та полісом, у частини кардіоміоцитів виявляють найвиразніші некробіотичні зміни з деструкцією міофібрил, руйнуванням та патологічними змінами мітохондрій, різкою деформацією ядер, порушенням цілісності саркоплазми з виходом органел за межі клітини. Деякі міоцити характеризуються повною відсутністю міофібрил та просвітленням навколоядерних зон (рис. 1А). Морфометричний аналіз свідчить, що міофібрили становлять $(24,62 \pm 1,14) \%$ об'єму цитоплазми, об'ємна щільність мітохондрій — $(21,14 \pm 1,6) \%$ об'єму цитоплазми кардіоміоцитів.

Ядра кардіоміоцитів зміщені в субсарколемальну зону, вирізняються поліморфізмом, утворюють значну кількість інвагінацій ядерної оболонки, подекуди фрагментовані, містять менше еухроматину, часто спостерігають фрагментацію та кільцеподібність ядерця.

Матрикс мітохондрій різко ущільнений, крист значно менше, вони майже не диференціюються. У деяких виявляють лише поодинокі фрагменти двоконтурних перегородок. Зрідка бувають мітохондрії з просвітленням матриксу і ознаками набряку. Зовнішня мембрана частково зруйнована, в деяких міоцитах помітні тільки тіні мітохондрій (рис. 1Б). Елементи саркоплазматичної системи різко розширені, в трубочках і цистернах нагромаджується гомогенна середньої електронної щільності речовина. В клітинах із виразними змінами філаментів спостерігають вакуолізацію, розпад мембран сар-

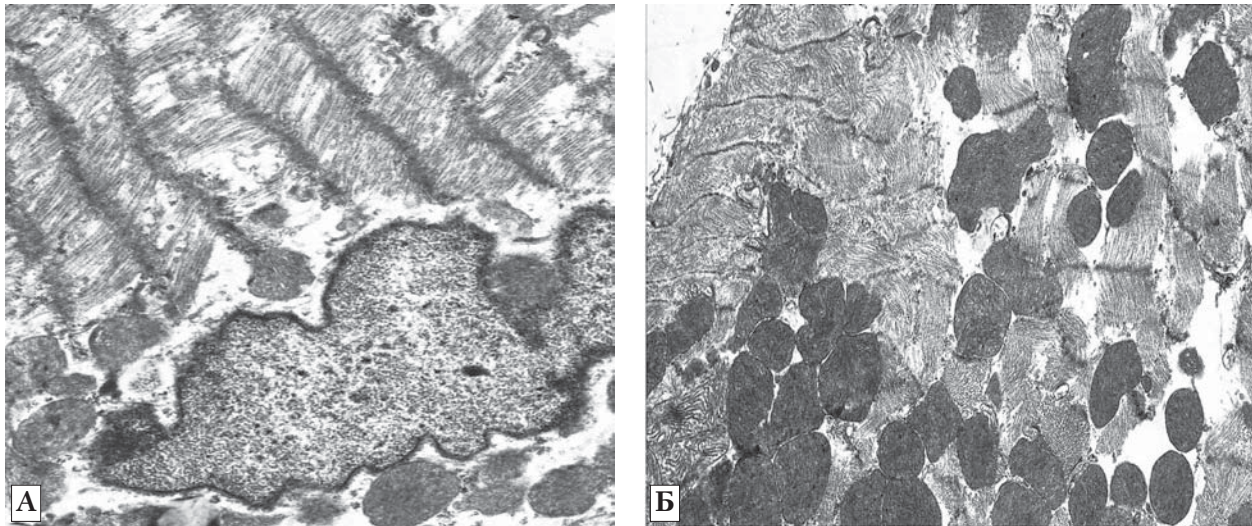


Рис. 1. Ультраструктура кардіоміоцитів лівого шлуночка щура 1-ї групи в 1-шу добу після закінчення експерименту.
 А — кардіоміоцити з ділянками міоцитолізу, розпадом міофібрил, навколядерним набряком. $\times 7500$
 Б — ділянки неупорядковано розташованих міофібрил із зміщенням Z-ліній у саркомерах та лізису міофібрил. Стиснені мітохондрії з електронно-щільним матриксом та поодинокими кристами. $\times 19\,500$

котубулярних структур, Т-трубочки глибоко проникають у міоцит.

Аморфна речовина міжклітинних просторів розріджена, пучки колагенових волокон розрізані, з ознаками набряку та некрозу, значна кількість детриту, вирізняються дрібні вогнища розростання сполучної тканини різного ступеня зрілості.

У тварин 2-ї групи на ультраструктурному рівні помітна незначна кількість укорочених у довжину саркомерів із правильнішим розташуванням Z- та М-ліній. Однак поряд із малозміненими кардіоміоцитами виявляють стоншені та контрактурно змінені міоцити. Ділянки пошкоджених міофібрил значно менші порівняно з такими у тварин 1-ї групи. Морфометрично визначають збільшення об'єму міофібрил на 23,3 % ($p < 0,05$), до $(32,12 \pm 1,21)$ % в одиниці об'єму цитоплазми порівняно з показниками тварин, яким вводили тільки доксорубіцин.

Більшість мітохондрій овальної форми, бувають мітохондрії неправильної форми, різного розміру, зовнішні мембрани в деяких із них мають дрібні вогнищеві ушкодження та незначну звивистість контурів. Спостерігається різноманітність розташування та кількості крист: у частини мітохондрій вони добре диференціюються, паралельно розташовані, проміжки між ними не збільшені (рис. 2), у деяких кристи мають дугоподібне розташування, у іншій частини кількість крист зменшена, в поодиноких мітохондріях виявляють ділянки руйнування крист. Більшу частину об'єму займає матрикс помірної електронної щільності, в деяких мітохондріях він просвітлений. Мітохондрії з виразною гомогенізацією матриксу, повною фрагментацією та лізисом крист трапляються рідко. Спостерігали вірогідне збільшення об'ємної щільності мітохондрій, яке сягало $(28,18 \pm 1,4)$ %, тобто на 25 % по-

рівняно з 1-ю групою тварин ($p < 0,05$). У деяких міоцитах виявляли значні скупчення мітохондрій у навколядерній зоні та під сарколемою. Канальці саркоплазматичного ретикулуму та Т-системи незначно розширені, кількість їх збільшена порівняно з показниками попередньої групи.

Набряк у міжклітинному просторі значно менший, ніж у тварин 1-ї групи, розміри периваскулярних екстравазатів зменшені. Спостерігаються

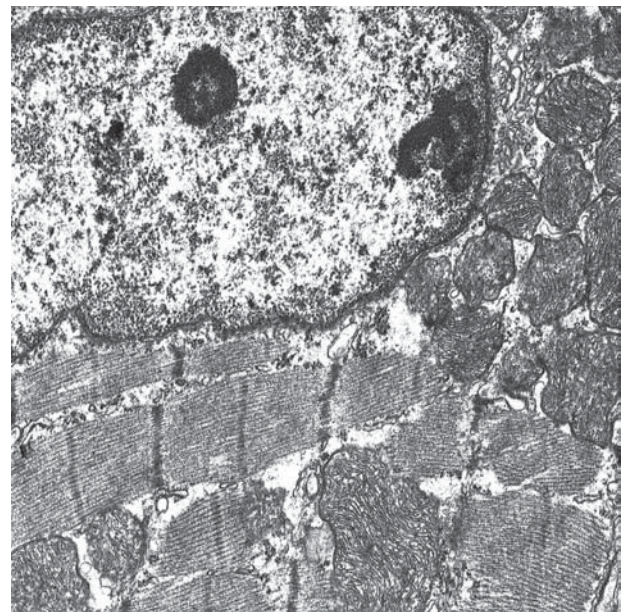


Рис. 2. Ультраструктура кардіоміоцитів лівого шлуночка щура 2-ї групи в 1-шу добу після закінчення експерименту. Z-лінії чіткі, довжина саркомерів однакова, більшість мітохондрій з чіткими зовнішніми мембранами, кристи виразні, ядро з рівномірним розподілом хроматину і ядерцем. $\times 12\,000$

множинні дрібні осередки зрілої сполучної тканини та периваскулярний склероз.

У кардіоміоцитах тварин 3-ї групи помітно поодинокі ділянки перескорочення міофібрил, дрібні ділянки з літичними змінами міофібрил. Об'єм міофібрил в одиниці об'єму цитоплазми становить $(32,02 \pm 1,34) \%$, що на 23,1 % більше ($p < 0,05$) порівняно з показниками тварин 1-ї групи. Кількість органел біосинтетичного плану (рибосоми, комплекс Гольджі, полісоми) в ділянках ушкоджених міофібрил підвищена. Ядра звичайних розмірів, містять більше активного еухроматину. Канальці саркоплазматичної сітки без патологічних змін.

У незначної частини мітохондрій помітні ознаки просвітлення матриксу та пошкодження крист. Мітохондрії дещо різні за формою, але матрикс незначно щільніший та кількість дрібних мітохондрій дещо менша, ніж у разі застосування амлодипіну (рис. 3). Мітохондрії дещо різні за формою та розмірами, становлять $(28,34 \pm 2,1) \%$ об'єму кардіоміоцитів, що на 25,4 % більше ($p < 0,05$) порівняно з показниками тварин, яким вводили лише доксорубіцин.

Обговорення

Ультраструктурні зміни міокарда ЛШ щурів після введення доксорубіцину містять значну кількість змінених міоцитів із ознаками необоротної дистрофії та міоцитолізу, ушкодженням мембран мітохондрій, що призводить до руйнування структури й порушень енергетичного обміну в клітині, розширення та перевантаження саркоплазматичного ретикулуму кальцієм і, як наслідок, — порушення скоротливості міокарда.

У щурів, яким вводили амлодипін та димеодипін, порівняно з тваринами 1-ї групи виявлено збільшення об'ємної щільності міофібрил на 23,3 та 23,1 % відповідно і зменшення набряку в міжклітинному просторі, а також майже повну відсутність патологічних змін у саркоплазматичному ретикулумі та системі Т-трубочок, що вказує на зменшення виявів порушення кальцієвого обміну і потенційно ліпшу скоротливу функцію міокарда ЛШ. Також встановлено вірогідне збільшення об'ємної щільності мітохондрій у тварин 2-ї та 3-ї

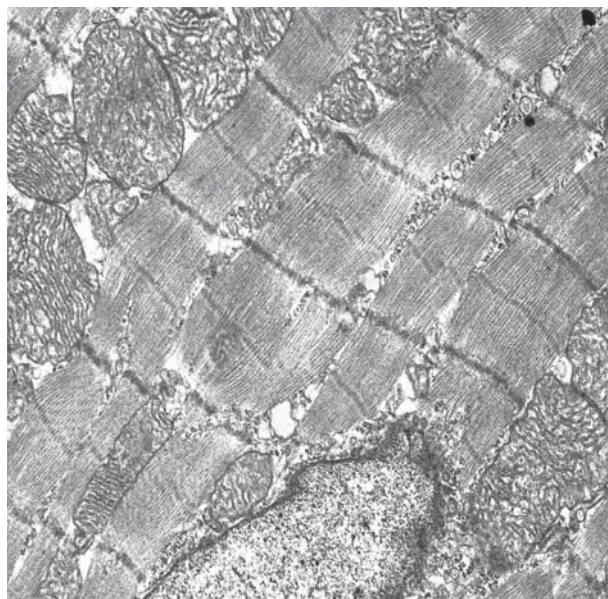


Рис. 3. Ультраструктура кардіоміоцитів лівого шлуночка щура 3-ї групи в 1-шу добу після закінчення експерименту. Паралельне розташування міофібрил, чіткість М- та Z-ліній. Незначне розширення каналців саркоплазматичної сітки. Матрикс мітохондрій середньої електронної щільності, кристи в більшості мітохондрій диференціюються. $\times 24\,000$

груп на 25 та 25,4 % відповідно порівняно з показниками тварин 1-ї групи, що, ймовірно, може свідчити про менше порушення енергетичного обміну в кардіоміоцитах.

Отже, у нашому експерименті виявлено позитивний вплив амлодипіну та димеодипіну на структурний стан міокарда ЛШ, але повного відновлення структури кардіоміоцитів не встановлено.

Висновки

Антагоністи кальцію (амлодипін та димеодипін) у піддослідних щурів з експериментальною доксорубіциновою кардіоміопатією сприяють частковому відновленню міофібрил та збільшенню об'ємної щільності їх у кардіоміоцитах на 23,3 і 23,1 % відповідно, збільшенню об'ємної щільності мітохондрій на 25 та 25,4 % відповідно.

Література

1. Букей Т.И., Филиппов А.К., Василец Л.А., Поротиков В.И. Влияние антрациклиновых антибиотиков на ионные токи и сокращение волокон предсердия лягушки, связанное с $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменом // Укр. кардіол. журн.— 1999.— № 5.— С. 48—51.
2. Ватутин Н.Т., Калинкина Н.В., Кетинг Е.В. Роль дисфункции эндотелия в генезе безболевого ишемии миокарда, вызванной антрациклинами // Арх. клин. и экспер. мед.— 2001.— № 13.— С. 287—290.
3. Захама С. Роль кверцетину в профилактике хронической кардиотоксичной дії антрациклиновых антибиотиков: Дис. ...канд. мед. наук: 14.01.11.— Симферополь, 2007.
4. Калинкина Н.В. Повреждения антрациклинами.— Донецк: Каштан, 2008.— 382 с.
5. Мохоут М.А., Серединська Н.М., Шаламай А.С. та ін. Експериментальне обґрунтування хімічної природи дифодипіну та можливості використання його в якості блокатора трансмембранного току кальцію через потенціалозалежні кальцеві канали // Фармакол. та лікарська токсикол.— 2009.— № 1 (8).— С. 48—54.

6. Нагорна О.О. Експериментальне обґрунтування доцільності застосування нікотинаміду для попередження кардіоміопатії доксорубіцинового генезу: Дис. ...канд. мед. наук.— К., 2006.— 162 с.
7. Струтинський Р., Мохорт М., Ягупольський Л. та ін. Флокалін — новий вітчизняний кардіопротектор // Вісн. фармакол. та фармат.— 2010.— № 3.— С. 44—56.
8. Aldieri E., Bergandi L., Riganti C. et al. Doxorubicin induces an increase of nitric oxide synthesis in rat cardiac cells that is inhibited by iron supplementation // Tox. Appl. Pharmacol.— 2002.— Vol. 185.— P. 85—90.
9. Anton E. Кардиопротекторное действие статинов у пациентов со значительным сердечно-сосудистым риском, находящихся на лечении антрациклинами: Дис. ...д-ра мед. наук.— Кишинев, 2008.— 119 с.
10. Hauser M., Gibson B.S., Wilson N. Diagnosis of anthracycline-induced late cardiomyopathy by exercise-spiroergometry and stress-echocardiography // Eur. J. Pediatr.— 2001.— Vol. 160.— P. 607—610.
11. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E. et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity // Pharmacol. Rev.— 2004.— Vol. 56 (2).— P. 185—229.
12. Shen F., Chu S., Bence A. Quantitation of Doxorubicin Uptake, Efflux, and Modulation of Multidrug Resistance in MDR Human Cancer Cells // J. Pharmacol. Exp. Ther.— 2008.— Vol. 324, N 1.— P. 95—102.
13. Tsang W.P., Chau S.P., Kong S.K. et al. Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced P53 — independent apoptosis // Life Sci.— 2003.— Vol. 73.— P. 2047—2058.
14. Wakabayashi I., Groschner K. Vascular actions of anthracycline antibiotics // Curr. Med. Chem.— 2003.— Vol. 10.— P. 427—436.
15. Xu M.F., Tang P.L., Qian Z.M. et al. Effects by doxorubicin on the myocardium are mediated by oxygen free radicals // Life Sci.— 2001.— Vol. 68.— P. 889—901.
16. Zima T., Tesar V., Mantle D. et al. Acute doxorubicin (adriamycin) dosage does not reduce cardiac protein synthesis in vivo, but decreases diaminopeptidase I and prolinecarboxypeptidase activities // Exp. Mol. Pathology.— 2001.— Vol. 70.— P. 154—161.

Влияние антагонистов кальция дигидропиридинового ряда на ультраструктурные изменения миокарда левого желудочка у крыс с экспериментальной доксорубициновой кардиомиопатией

С.В. Пакришень

Цель работы — изучить влияние антагонистов кальция дигидропиридинового ряда димеодипина и амлодипина, по данным сравнительного изучения ультраструктурных морфологических изменений миокарда левого желудочка, на развитие антрациклиновой кардиомиопатии.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на 74 подопытных нелинейных белых половозрелых крысах обоих полов, которым путем четырехкратного с интервалом в 1 нед внутрибрюшного введения доксорубина в дозе 5 мг/кг была смоделирована антрациклиновая кардиомиопатия. Животным 1-й группы ($n = 34$) вводили только доксорубин. Крысам 2-й группы ($n = 20$), начиная с дня третьего введения доксорубина, вводили амлодипин в дозе 1,5 мг/кг, крысам 3-й группы ($n = 20$), также начиная с дня третьего введения доксорубина, назначали димеодипин в дозе 1,5 мг/кг ежедневно в течение 28 сут. За животными наблюдали в течение 28 сут эксперимента и следующих 14 сут. У выживших животных (1-я группа — 18, или 52,9 %, 2-я — 11, или 55 %, 3-я — 10, или 50 %) в 1-е сутки после окончания эксперимента определяли ультраструктурные изменения ядерного аппарата и хроматина, канальцев саркоплазматической сети и околоядерного пространства, морфометрические изменения миофибрилл и митохондрий.

Результаты и обсуждение. Ультраструктурные изменения кардиомиоцитов у крыс после введения доксорубина проявляются массивными участками миоцитолита, выраженными патологическими изменениями митохондрий, расширением саркоплазматического ретикулума. У животных 2-й и 3-й групп определяются частичная нормализация состояния миофибрилл, достоверное увеличение объемной плотности миофибрилл на 23,3 и 23,1 % ($p < 0,05$), уменьшение отека межклеточного пространства, отсутствие патологических изменений в саркоплазматическом ретикулуме и системе Т-трубочек, достоверное увеличение объемной плотности митохондрий на 25 и 25,4 %.

Выводы. Антагонисты кальция (амлодипин и димеодипин) у подопытных крыс с экспериментальной доксорубициновой кардиомиопатией способствуют частичному восстановлению миофибрилл и увеличению их объемной плотности в кардиомиоцитах на 23,3 и 23,1 % соответственно, увеличению объемной плотности митохондрий на 25 и 25,4 % соответственно.

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

The effect of dihydropyridine calcium antagonists on ultrastructural changes in the myocardium of the left ventricle in rats with experimental doxorubicin-induced cardiomyopathy

S.V. Pakryshen

The purpose — to examine the effect of dihydropyridine calcium antagonists dimeodipine and amlodipine on the development of anthracycline cardiomyopathy, according to a comparative study of ultrastructural morphological changes of the left ventricular myocardium.

Materials and methods. The experiment was conducted on 74 adult guinea nonlinear white rats of both sexes who had anthracycline cardiomyopathy modeled by a four-fold intraperitoneal injection of doxorubicin at a dose of 5 mg/kg with intervals of 1 week. Only doxorubicin was injected to the animals of group 1 ($n = 34$). Rats of group 2 ($n = 20$), starting from the day of 3rd

administration of doxorubicin, were treated by amlodipine at a dose of 1.5 mg/kg; likewise the rats of group 3 (n = 20), starting from the day of 3rd administration of doxorubicin, were prescribed dimeodipine at a dose of 1.5 mg/kg daily for 28 days. The animals were observed for 28 days of the experiment and the following 14 days. Ultrastructural changes in the nuclear apparatus and chromatin, sarcoplasmic reticulum tubules and near-nuclear space, morphometric changes in myofibrils and mitochondria were determined in the animals that survived (group 1 – 18 or 52.9 %, group 2 – 11 or 55 %, group 3 – 10 or 50 %) on the 1st day after the end of experiment.

Results and discussion. Ultrastructural changes of cardiomyocytes in rats after administration of doxorubicin are manifested by massive portions of myocytolysis, expressed as pathological changes of mitochondria, increased sarcoplasmic reticulum. Partial normalization of the state of myofibrils, a significant increase in the volume density of myofibrils by 23.3 and 23.1 % ($p < 0.05$), the decrease of swelling of the intercellular space, the absence of pathological changes in the sarcoplasmic reticulum and T-tubules system, a significant increase in volume density of mitochondria by 25 and 25.4 % were defined in animals of groups 2 and 3.

Conclusions. Calcium antagonists (amlodipine and dimeodipine) in trial rats with experimental doxorubicin cardiomyopathy promote partial recovery of myofibrils and increase in their volume density in cardiomyocytes by 23.3 and 23.1 %, respectively, as well as increase in the volume density of mitochondria by 25 and 25.4 %, respectively.

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