

Розвиток мітохондріальної дисфункції при гострій кардіотоксичній дії доксорубіцину у дорослих щурів

М.В. Денисова, Н.А. Струтинська, Л.А. Мись, Ю. П. Коркач, К.В. Розова, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця Національної академії наук України, Київ;
e-mail: mayadenisova81@gmail.com

Доксорубіцин – потужний цитотоксичний антибіотик, який найбільш широко призначається у світі і є ефективним щодо широкої групи ракових захворювань. Водночас кардіотоксична дія цього препарату часто потребує припинення лікування ще до досягнення ефекту. Мітохондрії – важливі посередники клітинного життя, а загибель кардіоміоцитів внаслідок мітохондріальних механізмів лежить в основі багатьох серцевих захворювань. Метою нашої роботи було вивчення впливу короткострокового введення доксорубіцину на Ca^{2+} -індуковане відкриття неспецифічної мітохондріальної пори транзиторної провідності (МП), а також на маркери оксидативного стресу і вміст сірководню у мітохондріях серця дорослих щурів. Для відтворення її оцінки гострої кардіотоксичності у щурів, яка є основним ускладненням у пацієнтів, що приймають доксорубіцин, використовували короткострокову модель кардіоміопатії. Проводили порівняльне ультраструктурне дослідження тканин міокарда на загальних кумулятивних дозах доксорубіцину 8, 13 та 15 мг/кг, введених внутрішньоочередно протягом 2 днів. Показано, що препарат викликав ушкодження та загибель міофібрилярного апарату, мітохондрій і кардіоміоцитів та проявляв дозозалежний ефект. Отже, подальші експерименти проводили на найбільш показовій дозі, а саме 15 мг/кг. Виявлено, що вміст активних форм кисню у мітохондріях серця, зокрема $\bullet O_2^-$, H_2O_2 , $\bullet OH$, збільшувався після введення доксорубіцину у 10,5, 5,3 та 3,4 рази відповідно, що свідчить про значне посилення вільнорадикальних процесів. Важливо, що разом з цим в органелах зменшувалася у 2,6 рази вміст ендогенного газового трансмітера сірководню. В умовах порушення редокс-статусу у серці щурів активувалося відкриття МП: амплітуда спонтанного набухання збільшувалася вдвічі, Ca^{2+} -індукованого набухання – на 53% порівняно з контролем, а також підвищувалася чутливість МП до Ca^{2+} при всіх застосованих концентраціях. Таким чином, результатом гострої кардіотоксичної дії доксорубіцину було посилення продукції активних форм кисню на тлі зменшення вмісту сірководню, що сприяло індукції МП і призводило до мітохондріальної дисфункції і загибелі кардіоміоцитів.

Ключові слова: доксорубіцин; мітохондріальна пора транзиторної провідності; мітохондрії; кардіоміоцити; кардіоміопатії.

ВСТУП

Антрацикліни – потужні цитотоксичні антибіотики з широкою сферою клінічного застосування як протипухлинних засобів. Одним із найбільш ефективних серед таких препаратів вважають доксорубіцин, який застосовують в сучасній онкогематологічній практиці для лікування гемобластозів, лімфопроліферативних захворювань і злоякісних новоутворень різних локалізацій (рак щитоподібної

залози, сечового міхура, молочних залоз). Специфічний механізм протипухлинної дії зумовлений, насамперед, здатністю інгібувати топоізомеразу II [1] і порушувати синтез нуклеїнових кислот через взаємодію з молекулою ДНК, внаслідок чого змінюється її молекулярна структура, процеси реплікації і транскрипції. Також відомо, що антрацикліни спричиняють мітохондріальну дисфункцію, сприяючи генерації активних форм кисню (АФК) і збільшуючи оксидативний стрес

[2], а також викликають активацію каспаз, індукуючи апоптоз. Разом з високою протипухлинною активністю, доксорубіцину притаманна низка значних побічних ефектів та ускладнень (пригнічення гемопоєзу, ушкодження травного тракту та легень), але найбільша небезпека – ушкодження серця. Кардіотоксична дія доксорубіцину є головним лімітуючим фактором проведення адекватної цитостатичної терапії і буває настільки серйозною, що потребує припинення лікування ще до досягнення оптимального результату. Введення доксорубіцину викликає численні гострі кардіотоксичні ефекти, включаючи транзиторні аритмії, електрокардіографічні порушення, транзиторне пригнічення функції лівого шлуночка з наступним розвитком кардіоміопатії.

Кардіоміопатія визначається як збільшення об'єму шлуночків серця та зниження їхньої систолічної функції за умов відсутності значного ураження коронарних артерій [3]. У сучасній ад'ювантній терапії раку доксорубіцин використовується у середніх дозах 240–360 мг/м², збільшуючись до максимально рекомендованої (550 мг/м²) в окремих випадках. Частота розвитку кардіоміопатії при застосуванні доксорубіцину залежить від кумулятивної дози, збільшуючись до 36%, коли перевищує 600 мг/м², до 26% – у дозі 550 мг/м² і більше, до 5,1% – при 400 мг/м² та до 2% у пацієнтів, що отримували 240 мг/м² препарату [4]. Відомо, що антрациклініндукована кардіотоксичність призводить до шлуночкової дисфункції у 37,5% пацієнтів. Антрацикліни широко застосовуються в лікуванні як дорослих пацієнтів, так і дітей. Понад 50% тих, хто вижив після раку у дитячому віці в США, лікувалися антрациклінами [4]. Рання та прогресуюча кардіотоксичність цих препаратів може проявлятися протягом року у вигляді дилатаційної кардіоміопатії у дорослих пацієнтів або рестриктивної кардіоміопатії у пацієнтів молодшого віку, асоційованої зі зниженням фракції викиду лівого

шлуночка, що іноді призводить до летальних випадків. Але не менш клінічно важливим є те, що антрациклінова кардіотоксичність може проявлятися через тривалий проміжок часу після закінчення лікування у вигляді пізньої серцевої недостатності (СН) [5] і характеризується гіпертрофією кардіоміоцитів та посиленням фіброзу. Це спостерігається у 65% пацієнтів дитячого віку та у 12% дорослих пацієнтів [6]. Тридцятирічні пацієнти, які вижили, мали в 15 разів вищий рівень СН, ніж очікувалося [4]. Нині пізня та хронічна кардіотоксичність вважаються незворотними процесами і призводять до несприятливого прогнозу, що залишається значною проблемою. Розвиток кумулятивної та пізньої мітохондріальної кардіоміопатії є найскладнішим для прогнозування та клінічного лікування [7, 8]. Тому надзвичайно важливим є виявлення та вивчення саме ранніх ознак доксорубіцину кардіотоксичності для попередження розвитку незворотної кардіоміопатії.

Для виявлення ранніх ознак доксорубіцину індукованої кардіотоксичності було запропоновано кілька її моделей на тваринах (мишах, щурах, кроликах), які використовуються для виявлення діагностичних маркерів. Моделі можна класифікувати, залежно від протоколів введення, на коротко- (до 2 тиж) та довгострокові (2–12 тиж) при введенні препарату внутрішньовенно або внутрішньоочередовно. Ці моделі відтворюють патологічний процес, однак дози та інтервали між введеннями тваринних протоколів різноманітні і не збігаються з клінічним режимом пацієнтів [9].

Однією з основних причин серцево-судинних захворювань при різних патологічних станах є мітохондріальна дисфункція. Оскільки доксорубіцин накопичується переважно в мітохондріях і ядрах, величезна кількість мітохондрій саме у міокарді у поєднанні з менш активною антиоксидантною мережею в серці порівняно, наприклад, із печінкою, може пояснювати кардіоселек-

тивну токсичність препарату [10, 11]. Ca^{2+} -перевантаження мітохондрій, гіперпродукція ними АФК та зниження концентрації ендогенного газотрансмітера сірководню призводять до порушення мітохондріальних механізмів [12], лежать в основі розвитку патології серцево-судинної системи та мають вирішальне значення при кардіоміопатії. Їх характерною рисою є дисфункція та загибель кардіоміоцитів. Іони кальцію, хімічно активні речовини та окисний стрес індуюють таке явище, як відкриття МП, тоді як її інгібування з наступним захистом кардіоміоцитів від пошкодження може бути досягнуто, наприклад, впливом циклоспорину А або кислого рН, що блокують це відкриття [13, 14]. Таким чином, критичне ушкодження ультраструктурного апарату кардіоміоцитів має вирішальне значення у розвитку серцево-судинних захворювань, а посилення оксидативного стресу в серці призводить до дисфункції мітохондріальних механізмів, а саме до формування неселективного мегаканалу – МП, що також спричиняє апоптотичну загибель кардіоміоцитів.

Метою нашої роботи було вивчення впливу короткострокового введення доксорубіцину на Ca^{2+} -індуковане відкриття МП, маркери оксидативного стресу, а також вміст сірководню у мітохондріях серця дорослих щурів.

МЕТОДИКА

Експерименти виконані на 24 щурах-самцях лінії Вістер масою 310–400 г, віком 6 міс. Тварини знаходились у віварії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де їх утримували на стандартному харчовому раціоні. Всі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Міжнародних принципів Європейської конвенції (Страсбург, 1985). У дослідженні використовували доксорубіцин «Ебеве» 50 мг/25 мл («Фарма Гесюмюб», Австрія). Тварин рандомізовано розподілили

на дві групи: контрольну ($n = 10$), яким внутрішньоочеревинно вводили фізіологічний розчин (5 мл/кг) та дослідну ($n = 14$), яким вводили різну загальну кумулятивну дозу доксорубіцину (8, 13 та 15 мг/кг) протягом 2 днів з виведенням тварин з експерименту на 5-ту добу, а також 15 мг/кг у тому самому режимі, але з виведенням з експерименту на 10-ту добу.

Ультраструктурне морфологічне дослідження. У тварин відбирали шматочки тканини з верхівки серця. Матеріал фіксували згідно із загальноприйнятою методикою і негайно вносили зразки тканин у забуферений 2,5%-й розчин глутарового альдегіду (0,1 М фосфатний буфер, рН 7,4). Дофіксацію матеріалу здійснювали за допомогою реактиву Колфілда на основі 2%-го розчину чотириокису осмію, рН 7,4 («Sigma», США). Згодом зневоднювали матеріал у спиртах зростаючої концентрації, абсолютних спиртах і ацетоні з наступною заливкою в епон-аралдит («Fluka», Швейцарія). Ультратонкі зрізи товщиною 40–60 нм для перегляду в електронному мікроскопі контрастували 1%-м розчином ураніацетату і 0,4%-м розчином цитрату свинцю («Sigma», США) за методикою Рейнольдса [15]. Перегляд препаратів здійснювали за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К (Україна). Морфометричні дослідження проводили, базуючись на підходах Вейбеля [16] з використанням комп'ютерної програми для морфометричних підрахунків Image Tool Version 3 (США) у 130–150 полях для кожного досліджуваного впливу. При цьому визначали загальну кількість мітохондрій, кількість структурно пошкоджених мітохондрій, їх діаметр.

Біохімічні дослідження показників оксидативного стресу у мітохондріях серця. Визначали вміст ендогенного сірководню (H_2S) у мітохондріях серця дорослих щурів почерговим додаванням з наступною інкубацією і центрифугуванням 0,5 мл 1%-го розчину ацетату цинку ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), 0,5 мл 20 ммоль/л N,N-DPD (диметил-п-фені-

лендіамін), 0,5 мл 30 ммоль/л розчину FeCl_3 , 1 мл 10%-ї трихлороцтової кислоти. Далі проводили фотоелектроколориметричне вимірювання оптичної щільності надосадової рідини при $\lambda = 670$ нм. Вміст H_2S у зразках розраховували на основі калібрувальної кривої NaHS і виражали в наномолях на 1 г білка [17]. Метод визначення вмісту супероксиду ($\bullet\text{O}_2^-$) ґрунтувався на здатності цитохрому с окиснювати $\bullet\text{O}_2^-$ до O_2 . Зміни екстинції проб реєстрували після 30 хв інкубації (37°C) при $\lambda = 550$ нм. Для розрахунку концентрації супероксиду застосовували молярний коефіцієнт поглинання 28 000 моль⁻¹·см⁻¹ [17]. Швидкість генерування гідроксильного радикала ($\bullet\text{OH}$ -радикала) визначали методом окиснення дезоксирибози, а швидкість утворення $\bullet\text{OH}$ -радикала – за збільшенням поглинання при $\lambda = 532$ нм, і виражали в умовних одиницях $\Delta\text{E} \cdot 10^2$ за 60 хв на 1 мг білка проби [17]. Метод визначення вмісту пероксиду водню (H_2O_2) базувався на опосередкованій реєстрації споживання H_2O_2 під час окиснення йодиду (I^-) до йоду (I^{3-}) за наявності надлишку лактопероксидази. Утворення I^3 реєстрували спектрофотометрично при $\lambda = 353$ нм, а його кількість визначали за допомогою молярного коефіцієнта поглинання 26000 моль⁻¹·см⁻¹ [17].

Дослідження відкриття МП. Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування у нашій модифікації [18]. Серця, видалені з декапітованих щурів, промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl (4°C). Тканину серця подрібнювали та гомогенізували у середовищі виділення (ммоль/л): сахароза – 250, ЕДТА – 1, тріс- HCl – 25; рН 7,4. Гомогенат центрифугували при швидкості 700g протягом 8 хв при 2°C, щоб осадити ядра та клітинні фрагменти. Супернатанат, що отримали, піддавали центрифугуванню при швидкості 11000g протягом 16 хв і 2°C для осадження фракції мітохондрій. Осад зберігали в середовищі ресуспендування (ммоль/л): сахароза – 250,

тріс- HCl – 25; рН 7,2. Через 30 хв виділені органели використовували в експерименті. Відкриття МП досліджували методом спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій за допомогою спектрофотометра СФ-46. Органели поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): KCl – 120, тріс- HCl – 25, KH_2PO_4 – 3, сукцинат натрію – 5, рН 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл), і реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при довжині хвилі 520 нм за 5 хв до і впродовж 10 хв їх набухання за наявності індуктора Ca^{2+} , який додавали на 5-й хвилині вимірювання. Преінкубацію з циклоспорином А у концентрації 10⁻⁵ моль/л здійснювали протягом 5 хв до додавання індуктора. Зміну амплітуди (ΔD_{520}) набухання органел визначали як різницю між амплітудою набухання мітохондрій на 15-й хвилині та відносно вихідного значення на 1-й хвилині. Зменшення оптичної густини розчину з мітохондріями свідчило про їх набухання. Концентрація білка становила 0,4 мг/мл у кожній пробі. Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора з подальшою реєстрацією оптичної густини протягом 15 хв.

Для статистичного аналізу отриманих результатів використовували програми Excel (MS Office 2021) та Origin 8.0 («Microcal Software Inc.», США). Порівняння груп проводили за критерієм t Стьюдента для параметричної вибірки та Манна-Уїтні для непараметричної вибірки. Результати були виражені як середнє арифметичне значення \pm стандартна похибка середнього ($M \pm m$). Значення $P < 0,05$ вважалися достовірними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ультроструктурне морфологічне дослідження тканини серця. У серці щурів, яким вводили доксорубіцин, визначали загальну кількість мітохондрій, а саме субпопуляції субсарколемальних та інтраміофібрилярних

мітохондрій; кількість структурно пошкоджених мітохондрій, а також діаметр органел (табл. 1). Препарат у малих дозах (8 мг/кг) не спричиняв істотних ультраструктурних змін міокарда (рис. 1, а, б). Найбільш значні порушення спостерігалися лише з боку сарколеми. Зміни мали мозаїчний характер: спостерігався значний набряк з просочуванням у підсарколемальний простір плазми крові. Подекуди спостерігалися ділянки деструкції сарколеми. Особливо важливим, на наш погляд, було утворення крайових її випинань, у які переміщувалися субсарколемальні мітохондрії (див. рис. 1, а, б). Ці зміни зазвичай відбуваються у тканинах при розвитку вторинної тканинної гіпоксії. Така перебудова сприяє зменшенню шляху дифузії кисню з крові капілярів до мітохондрій. Отже, можна припустити розвиток під дією доксорубіцину гіпоксії міокарда. Крім цього, в мітохондріальному апараті активувалися процеси поділу-злиття (англ. fission-fusion) мітохондрій, що також є пристосувальним механізмом до несприятливих факторів у сенсі обміну інформацією між органелами [19]. Дещо збільшувалася кількість структурно змінених субсарколемальних мітохондрій, а також їхній діаметр (ця субпопуляція порівняно

із інтраміофібрилярними мітохондріями є більш чутливою до різноманітних впливів). Ендотеліальна вистилка капілярів здебільшого не мала суттєвих змін, як і міофібрилярний апарат міокарда.

Збільшення концентрації доксорубіцину (13 мг/кг) призводило, по-перше, до активації описаних процесів, по-друге, додавалися нові зміни ультраструктури міокарда (див. рис. 1, в). З боку мітохондрій, разом з набуханням, вакуолізацією, дисконкомплексацією крист, активувалась аутофагія, що можна розглядати як позитивний факт утилізації структурно пошкоджених органел і перешкоджання надмірної активації мітохондріями апоптозу. Спостерігався набряк та розволокнення міофібрил, окремі ділянки їх надскорочення. З боку ендотелію спостерігали ділянки активації піноцитозу або тотального набряку цитоплазматичних вуалей ендотеліальних клітин, часто з розходженням їх країв і утворенням щілин (зменшення шляху дифузії кисню), що також вказує на наявність вторинної тканинної гіпоксії.

При збільшенні дози доксорубіцину до 15 мг/кг явно проявлявся його дозозалежний ефект (див. рис. 1, г). До описаних змін додавалися суттєві пошкодження ультраструктури тканини міокарда. Спосте-

Таблиця 1. Ступінь пошкодження мітохондріального апарату кардіоміоцитів у дорослих щурів залежно від дози доксорубіцину

Схема експерименту	Загальна кількість мітохондрій, од./10 мкм ²		Кількість структурно пошкоджених мітохондрій, %		Діаметр мітохондрій, мкм	
	суб-сарколемальні	інтра-міофібрилярні	суб-сарколемальні	інтра-міофібрилярні	суб-сарколемальні	інтра-міофібрилярні
Контроль	23,5±3,6	19,2±1,3	3,1±0,5	2,2±0,4	0,48±0,04	0,64±0,05
Доксорубіцин,						
8 мг/кг	20,7±1,9	18,4±1,1	4,8±0,6*	3,5±0,8	0,59±0,05*	0,69±0,07
13 мг/кг	22,6±2,3	20,1±1,8	5,0±1,0*	3,2±0,7	0,55±0,03*	0,71±0,09
15 мг/кг						
через 5 діб	18,3±1,8*	15,7±2,0*	8,5±1,4**	9,4±1,8**	0,62±0,07*	0,75±0,05*
через 10 діб	15,5±2,4*	13,0±1,6*	25,3±1,8**	19,7±1,8**	0,66±0,08*	0,77±0,10*

*P < 0,05; **P < 0,01 щодо контрольної групи.

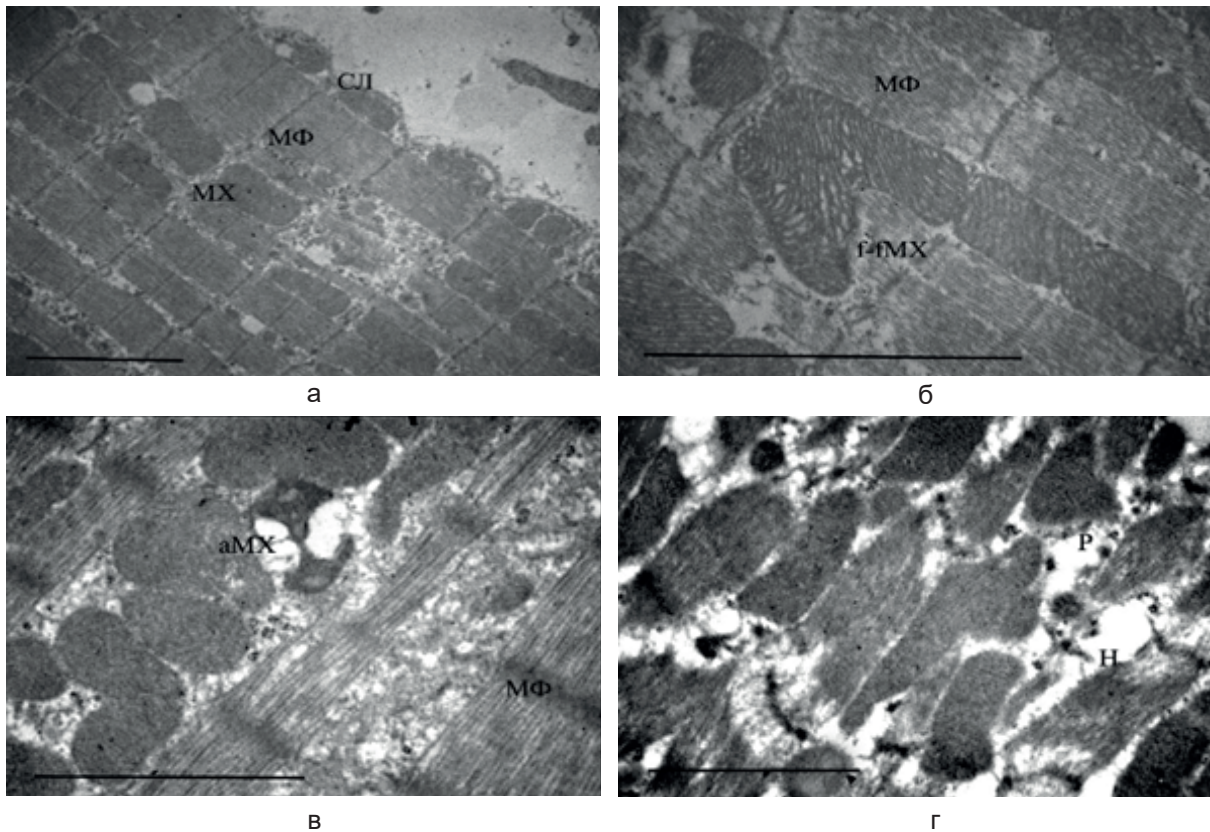


Рис. 1. Ультраструктурні зміни в кардіоміоцитах дорослих щурів при дії доксорубіцину: а, б – у дозі 8 мг/кг. Зміни мозаїчного характеру та ділянки деструкції сарколеми (СЛ), переміщення субсарколемальних мітохондрій (МХ) у крайові випинання сарколеми, активація процесів fission-fusion мітохондрій (f-fMX), міофібрилярний апарат (МФ) без змін; в – у дозі 13 мг/кг. Активація аутофагії мітохондрій (aMX), розволокнення міофібрилярного апарату (МФ); г – у дозі 15 мг/кг через 5 днів від початку введення препарату. Утворення набрякових вогнищ (Н) на місці міофібрил, поява вільних рибосом (Р)

рігалися значні ділянки деструкції сарколеми, ендотелію капілярів, міофібрил. На місці останніх утворювалися набрякові вогнища. Значно збільшувалася кількість структурно пошкоджених мітохондрій, часто повністю вакуолізованих, інколи – у вигляді апоптотичних тілець. Слід відмітити появу вільних рибосом, місцями зібраних у розетки (полісоми), що вказує на їх активність.

Суттєві зміни (пошкодження) ультраструктури тканини міокарда спостерігали через 10 діб після початку введення доксорубіцину у дозі 15 мг/кг (рис. 2). Розвивалася виражена мітохондріальна дисфункція. Значна кількість мітохондрій знаходилася на початкових етапах апоптозу (мітоптозу) з огрубінням міжкристних

проміжків та мембран, частина – набувала м'ялиноподібного вигляду, що вважають ознакою саме мітохондріальної дисфункції [20]. Значна кількість субсарколемальних та інтраміофібрилярних мітохондрій збільшувалася в діаметрі, утворюючи мегамітохондрії. При цьому органели змінювалися незворотно. Деструктивні процеси поширювалися на всі компоненти міокарда. Деструкції також піддавалися як ендотелій капілярів, характеризуючи формування ендотеліальної дисфункції, так і сарколема, що є свідченням порушення міжклітинного обміну інформації. Проте найсильніше вона проявлялася у міофібрилах, значна частина яких не тільки втрачала структуру, а й утворювалися великі ділянки, котрі

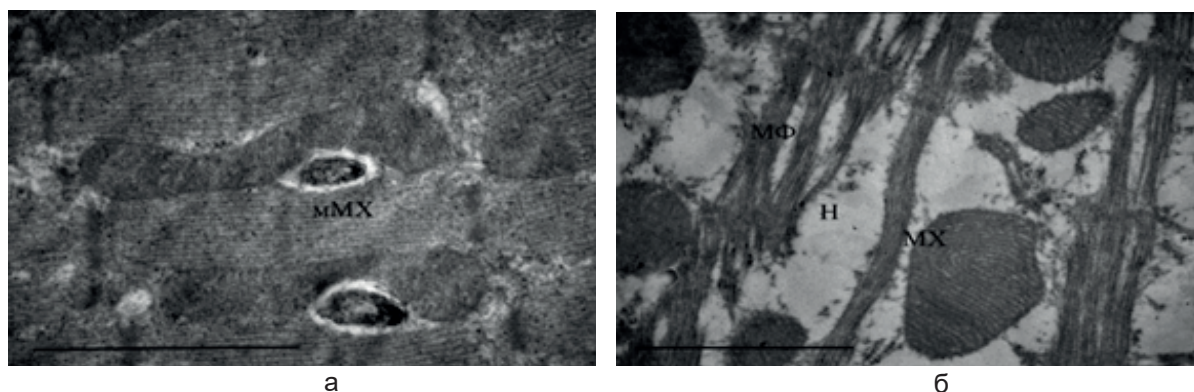


Рис. 2. Ультраструктурні зміни в кардіоміоцитах дорослих щурів при дії доксорубіцину у дозі 15 мг/кг через 10 днів від початку введення препарату. Значна кількість мітохондрій (MX) знаходиться на початкових етапах мітоптозу, утворення мегамітохондрій, частина органел набула міліноподібного вигляду (mMX)

перетворювалися на набрякові, без жодних елементів структури.

Отже, результати ультраструктурного морфологічного дослідження свідчать про те, що доксорубіциніндукована кардіотоксичність підтверджується ураженням тканини серця щурів і має явний дозозалежний ефект. Для подальшої експериментальної роботи нами була обрана короткострокова модель доксорубіциніндукованої серцевої недостатності з дією препарату у загальній дозі 15 мг/кг протягом 5 діб.

Дослідження біохімічних показників оксидативного стресу в мітохондріях серця. Раніше було показано, що в кардіоміоцитах, оброблених доксорубіцином, порушувалося мітохондріальне дихання [13]. Чутливі до доксорубіцину ділянки в основному розташовані в комплексах I, II, III, а особливо цитохромоксидаза [21]. Важливу роль в утворенні АФК у мітохондріях під впливом доксорубіцину відіграють НАДФН-оксидаза, ксантинооксидаза та НАДФН-залежна цитохром Р-450 редуктаза. За допомогою цих ферментів доксорубіцин відновлюється до напівхінону, результатом є генерація вільних радикалів-молекул з неспареним валентним електроном: супероксидного аніона, пероксиду водню через посередництво супероксиддисмутази, а згодом і високореактивного гідроксильного радикала. Будучи дуже не-

стабільним і реакційноздатним, неспарений електрон швидко віддається альтернативним акцепторам електронів.

У нашому дослідженні було показано, що вміст АФК у мітохондріях серця, а саме $\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 збільшувався після введення доксорубіцину у 10,5 та 5,3 раза відповідно (табл. 2). Підвищувався також вміст $\bullet\text{OH}$ порівняно з контролем у 3,4 раза. Це свідчить про значне посилення вільнорадикальних процесів в органах серця. Важливо, що водночас зменшувався у 2,6 раза вміст ендogenous H_2S . Відомо, що біологічно активна молекула H_2S має сильні відновлювальні властивості через зменшення АФК, забезпечення сульфгідратації білків, підвищення експресії антиоксидантних ферментів, підвищення внутрішньоклітинного вмісту глутатіону тощо [12]. За даними різних дослідників, захисні механізми H_2S -опосередкованої дії можуть бути пов'язані з активацією АТФ-залежних K^+ -каналів, відновленням конститутивного Ca^{2+} -залежного синтезу оксиду азоту [22]. Крім того, зниження концентрації H_2S у плазмі крові пацієнтів зараз розглядається як маркер серцево-судинних розладів, таких як гіпертонічна хвороба та ішемічна хвороба серця [23].

Отже, надмірне зростання концентрації Ca^{2+} в матриксі мітохондрій щурів при дії доксорубіцину спричиняється посилен-

ною генерацією АФК внаслідок стимуляції катіоном дихального ланцюга. Експериментальні моделі на щурах показали, що вивільнення Ca^{2+} із саркоплазматичного ретикулула через оксидативний стрес під дією доксорубіцину також призводить до активації кальпаїнів – кальційзалежних протеаз – і розщеплення каспази-12 з подальшою активацією апоптозу [24].

У структурних порушеннях мітохондрій серця, ймовірно, відіграє роль МП, що може мати суттєве значення у порушенні як функціонального стану кардіоміоцитів, так і загибелі їх від апоптозу. Тому наступним завданням було перевірити чутливість МП до дії природного індуктора – іонів кальцію в умовах дії доксорубіцину.

Дослідження відкриття МП. Згідно з концепцією, вплив доксорубіцину на мітохондрії може бути наслідком індукції МП [8]. Це робить внутрішню мембрану мітохондрій проникною для всіх розчинених речовин з молекулярною масою до 1,5 кДа. Відкриття МП призводить до колапсу потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій, роз'єднання дихального ланцюга, надходження іонів кальцію, зупинки синтезу АТФ, вивільненню проапоптотичних білків і, врешті-решт, набухання, розриву та загибелі мітохондрій клітин [7, 14]. Доксорубіцин індукує порушення кальцієвого гомеостазу. Нормальний кальцієвий гомеостаз може змінюватися як через порушення функції саркоплазматичного ретикулула інгібуванням Ca^{2+} АТФ-азної

помпи, так і через зниження рівня експресії мРНК SERCA та/або прямою активацією Ca^{2+} -каналів вивільнення. Однак саме по собі збільшення вмісту Ca^{2+} є відносно неефективним для запуску відкриття пори, але чутливість до цього індуктора може бути значно посилена виснаженням АТФ і оксидативним стресом.

У дослідах *in vitro* на ізольованих мітохондріях серця дорослих щурів контрольної та дослідної (в умовах дії доксорубіцину) груп оцінювали кінетику набухання органел, зміни амплітуди набухання та чутливість МП до дії Ca^{2+} (рис. 3; 4). Характерні криві спонтанного набухання мітохондрій у безкальцієвому середовищі та Ca^{2+} -індукованого набухання органел у серці контрольних щурів та після дії доксорубіцину показано на рис. 3. У дослідженні було ідентифіковано кальційіндуковану МП, оскільки при навантаженні іонами кальцію (10^{-4} ммоль/л) у середовищі інкубації реєстрували високоамплітудне набухання суспензії мітохондрій серця щурів контрольної та дослідної груп, яке, однак, розрізнялося за амплітудою.

Раніше було доведено, що імуносупресивний препарат циклоспорин А захищає ізольовані кардіоміоцити від пошкодження [25]. Він зв'язує та інгібує активність циклофіліну D – верифікованого і беззаперечного регулятора функціонування МП. Тобто відкриття останньої пов'язане з конформаційною зміною мембранного білка, яка запускається Ca^{2+} і полегшується

Таблиця 2. Маркери оксидативного стресу та вміст сірководню у мітохондріях серця дорослих (6 міс) щурів та при введенні їм доксорубіцину в дозі 15 мг/кг ($M \pm m$, $n = 5$)

Показник	Контроль	Дія доксорубіцину
Супероксидний радикал, нмоль \cdot хв ⁻¹ мг ⁻¹ білка	4,10±0,38	42,9±2,86*
Гідроксильний радикал, нмоль \cdot хв ⁻¹ мг ⁻¹ білка	3,28±0,24	11,31±0,23*
Пероксид водню, пмоль \cdot мг ⁻¹ білка	1,87±0,16	9,93±0,25*
H ₂ S, нмоль \cdot мг ⁻¹ білка	3,83±0,14	1,46±0,02*

* $P < 0,05$ щодо значень у контрольних тварин.

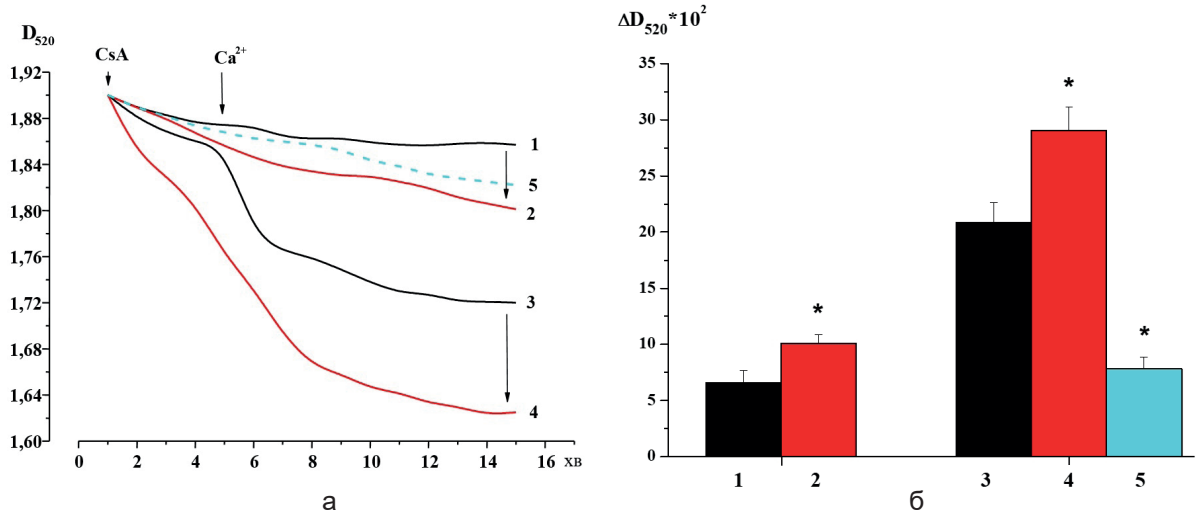


Рис 3. Типові кінетичні криві (а) та амплітуда (б) набухання мітохондрій серця дорослих щурів в умовах впливу доксорубіцину у дозі 15 мг/кг: 1 – безкальцієве середовище, 2 – безкальцієве середовище і доксорубіцин, 3 – Ca^{2+} (10^{-4} моль/л), 4 – Ca^{2+} і доксорубіцин, 5 – преінкубація мітохондрій *in vitro* з циклоспорином А, Ca^{2+} , доксорубіцин. * $P < 0,05$ щодо значень контрольної групи

(а не повністю залежить) циклофіліном D. Таким чином, таргетування МП має доведений потенціал як фармакологічна мішень для зменшення реперфузійних ушкоджень серця та мозку. Однак у клініці циклоспорин А не використовується для кардіопротекції через його міцне зв'язування з цитозольним циклофіліном А і, як наслідок, інгібування Ca^{2+} -чутливої

протеїнофосфатази, кальциневрину та небажану імуносупресивну активність [26]. Преінкубація *in vitro* з циклоспорином А культивованих неонатальних кардіоміоцитів, ізольованих мітохондрій щурів, пролікованих доксорубіцином, а також кардіоміоцитів передсердних трабекул людини [13] показало відновлення зниженої здатності цих мітохондрій до навантаження Ca^{2+} , збільшення їх трансмембранного потенціалу та покращення окисного фосфорилування.

Для з'ясування участі доксорубіцину у механізмах пошкоджуючої дії процесів пороутворення, ми також застосували циклоспорин А. Преінкубація з циклоспорином А (10^{-5} моль/л) суспензії ізольованих мітохондрій серця щурів після введення їм доксорубіцину майже повністю запобігала розвитку високоамплітудного кальційіндукованого набухання органел. Пригнічення відкриття МП при дії її специфічного інгібітора свідчить про формування класичної МП, що передбачає її чутливість до інгібуючої дії різних препаратів.

Показано, що зміна амплітуди набухання органел ($\Delta D_{520} \cdot 10^2$) у безкальцієвому середовищі становила 4,3 та 9,9 од.екст. у кон-

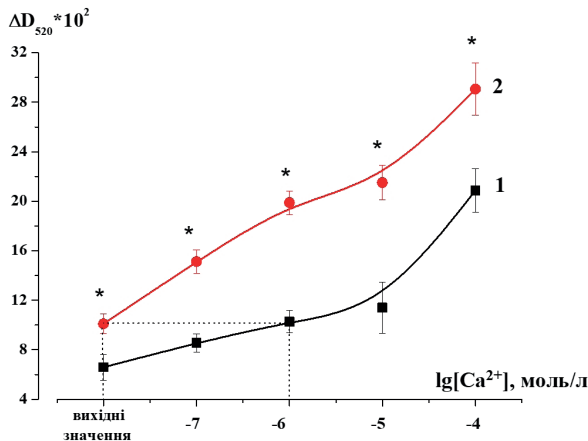


Рис 4. Зміна чутливості мітохондріальної пори транзитornoї провідності до дії індуктора Ca^{2+} (10^{-7} – 10^{-4} ммоль/л) у серці дорослих щурів за умов введення доксорубіцину у дозі 15 мг/кг: 1 – контрольна група, 2 – дія доксорубіцину. * $P < 0,05$ щодо значень контрольної групи

трольних щурів та щурів після курсового введення доксорубіцину відповідно. За умов навантаження мітохондрій Ca^{2+} у концентрації 10^{-4} ммоль/л, ці показники зростали до 18,1 та 27,5 од.екст. відповідно. Амплітуда набування мітохондрій у кальцієвому середовищі за умов додавання циклоспорину А становила 7,8 од.екст. Порівнюючи розраховані кінетичні параметри, встановлено, що особливістю мітохондрій серця щурів після введення доксорубіцину було перевищення значення амплітуди набування у безкальцієвому середовищі вдвічі порівняно з контролем. При навантаженні мітохондрій серця тварин іонами Са амплітуда набування органел збільшувалася на 53% порівняно з контролем. А після додавання циклоспорину А за тих самих умов цей показник зменшився до значень контрольного набування (див. рис. 3, б).

Отже, збільшення амплітуди спонтанного і Ca^{2+} -індукованого набування мітохондрій у серці дорослих щурів після курсового введення доксорубіцину порівняно з контрольними відбувалося внаслідок токсичного впливу препарату на кардіоміоцити дослідних щурів і свідчить про активацію пороутворення у серці після його введення. Додавання *in vitro* циклоспорину А, в свою чергу, нівелює вплив доксорубіцину через пряму інгібуючу дію на відкривання МП.

Для підтвердження ролі доксорубіцину у регуляції відкривання МП через вплив на її чутливість до природного індуктора Ca^{2+} у серці дорослих щурів контрольної та дослідної груп, була проведена серія експериментів з дією кальцію у діапазоні концентрацій 10^{-7} – 10^{-4} моль/л (див. рис. 4). Поріг чутливості відповідав найменшій концентрації Ca^{2+} , яка викликала набування мітохондрій у серці. У мітохондріях серця щурів після курсового введення доксорубіцину значно підвищувалась амплітуда набування відносно контролю при всіх задіяних концентраціях Ca^{2+} : спостерігали зміщення кривої в верх, що вказує на підвищення чутливості МП до

Ca^{2+} при всіх застосованих концентраціях. Амплітуда набування мітохондрій за дії Ca^{2+} у концентрації 10^{-6} ммоль/л контрольної групи була подібною такій, як у дослідних тварин у безкальцієвому середовищі. Отже, збільшувалася чутливість МП до Ca^{2+} внаслідок зниження на два порядки порогової концентрації індуктора, яка спричиняла набування органел. Таким чином, введення тваринам доксорубіцину стимулювало Ca^{2+} -індуковане відкривання МП через збільшення чутливості до її індуктора у серці дорослих щурів.

Ми досліджували участь МП у патогенезі порушень діяльності серця при дії доксорубіцину, оскільки формування цього мегаканалу лежить в основі індукції клітинної смерті – апоптозу. МП є важливою структурою, яка необхідна за фізіологічних умов для запобігання перевантаження органел Ca^{2+} (у стані низької провідності). При цьому при серцевих захворюваннях і інших патологічних станах організму вона розглядається як терапевтична мішень кардіопротекції. Оксидативний стрес і дія кальцію у високих концентраціях спричиняють формування високопровідної МП з усіма негативними наслідками. Дані наших попередніх досліджень [22] свідчать про те, що МП регулюється багатьма чинниками ендogenous та екзогенного походження (мелатонін, коензим Q, газові трансмітери тощо) через пряму взаємодію з компонентами пори або опосередковано внаслідок зменшення концентрації індукторів її відкривання. Було показано, що за умов зниження вмісту ендogenous газового медіатора H_2S у старих щурів спостерігалася підвищена чутливість МП до індукторів її відкривання, що вказує на важливу роль сірководню як одного із ключових чинників у розвитку патологічних процесів. У цьому дослідженні було продемонстровано доксорубіцинопосередкований розвиток мітохондріальної дисфункції у серці щурів через значно посилену генерацію АФК та зменшен-

ня продукції ендogenous сiрководню i, як наслiдок, пiдвищену чутливiсть до Ca^{2+} -залежної втрати функції, що пояснюється пiдвищеною активнiстю МП. Отриманi результати пiдтверджують, що в основi доксорубiцинової моделi кардiомiопатії лежить ураження кардiомiоцитiв. Це пов'язано з незворотною i тривалою деполаризацією внутрiшньої мiтохондрiальної мембрани та вивильненням апоптогенних факторiв у цитозоль, що i є раннiм кардiоспецифiчним ефектом пiсля лiкування шурiв доксорубiцином.

ВИСНОВКИ

1. Введення доксорубiцину в загальнiй кумулюючiй дозi 15 мг/кг супроводжувалося значним морфологiчним ураженням мiокарда, i, в першу чергу, впливало на мiтохондрії: збiльшувалася кiлькiсть структурно пошкоджених мiтохондрiй, їх повна вакуолiзація, набухання, дисконплексація крист, активація аутофагії та утворення апоптотичних тiлець.

2. Морфологiчні змiни супроводжувалися значним пiдвищенням чутливостi МП до природного її iндуктора Ca^{2+} через посилення генерації АФК та зменшення вмісту ендogenous H_2S , що свiдчить про можливе значення апоптотичної загибелi кардiомiоцитiв у розвитку серцевої недостатностi при дiї доксорубiцину.

3. Вiдкриття МП у кардiомiоцитах шурiв за умов гострої дiї доксорубiцину iнгiбувалося циклоспорином А *in vitro*. Отже, МП є прямим причинним фактором впливу доксорубiцину на функцію мiтохондрiй. Цей факт вiдкриває перспективи для застосування препаратiв iз мiтопротекторними властивостями для лiкування доксорубiцинiндукованої кардiотоксичностi.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to

the study, and interrelations of co-authors of the article.

M.V. Denysova, N.A. Strutynska, L.A. Mys, Yu.P. Korkach, K.V. Rozova, V.F. Sagach

DEVELOPMENT OF MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN THE ACUTE CARDIOTOXIC EFFECT OF DOXORUBICIN IN ADULT RATS

*Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: mayadenisova81@gmail.com*

Doxorubicin is a potent cytotoxic antibiotic that is the most widely prescribed in the world and is effective against a wide range of cancers. At the same time, the cardiotoxic effects of this drug often require discontinuation of treatment before the effect is achieved. Mitochondria are important mediators of cellular life, and cardiomyocyte death due to mitochondrial mechanisms of internal killing is the basis of many heart diseases. The aim of the study was to investigate the effects of short-term doxorubicin administration on Ca^{2+} -induced opening of the nonspecific mitochondrial permeability transition pore (mPTP) in the heart of adult rats. To reproduce and evaluate acute cardiotoxicity in rats, which is the main complication in patients taking doxorubicin, a short-term doxorubicin cardiomyopathy model was used. A comparative ultrastructural study of myocardial tissues was performed at total cumulative doses of doxorubicin of 8, 13 and 15 mg/kg administered intraperitoneally and spread over two days. It was shown that the drug caused damage and death of the myofibrillar apparatus, mitochondria and cardiomyocytes and exhibited a dose-dependent effect. Therefore, further experiments were carried out at the most indicative dose, namely 15 mg/kg. We have shown that the content of reactive oxygen species in the heart mitochondria, namely, $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, increased after doxorubicin administration by 10.5, 5.3 and 3.4 times, respectively, indicating a significant increase in free radical processes. It is important that at the same time, the content of endogenous H_2S decreased by 2.6 times. This activated mPTP opening in the rat heart: the amplitude of spontaneous swelling doubled, Ca^{2+} -induced swelling increased by 53% compared to the control, and an increase in mPTP sensitivity to Ca^{2+} was observed at all applied concentrations. Thus, the acute cardiotoxic effect of doxorubicin resulted in the induction of mPTP opening, which led to mitochondrial and cardiomyocyte death.

Key words: doxorubicin; nonspecific mitochondrial permeability transition pore; mitochondria; cardiomyocytes; cardiomyopathy.

REFERENCES

1. Tarr M, van Helden PD. Inhibition of transcription by adriamycin is a consequence of the loss of negative

- superhelicity in DNA mediated by topoisomerase II. *Mol Cell Biochem.* 1990;93:141-6.
2. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* 2012;18:1639-42.
 3. Elliott P. Cardiomyopathy. Diagnosis and management of dilated cardiomyopathy. *Heart.* 2000;84:106-12.
 4. Gianni L, Herman EH, Lipshultz SE, Minotti G, Sarvazyan N, Nair N, Gongora E. Heart failure in chemotherapy-related cardiomyopathy: Can exercise make a difference? *BBA Clin.* 2016;6:69-75.
 5. Cardinale D, Iacopo F, Cipolla CM. Cardiotoxicity of anthracyclines. *Front Cardiovascul Med.* 2020;7:26-4.
 6. Volkova M, Russell R. Anthracycline cardiotoxicity: Prevalence, pathogenesis and treatment. *Curr Cardiol Rev.* 2011;7:214-20.
 7. Zhou S, Palmeira CM, Wallace KB. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. *Toxicol Lett.* 2001;121:151-7.
 8. Wallace KB, Sardao VA, Oliveira PJ. Mitochondrial determinants of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circ Res.* 2020;126:926-41.
 9. Nakahara T, Petrov A, Tanimoto T, Chaudhry F, Narula N, Seshan SV, Mattis JA, Pak KY, Sahni G, Bhardwaj A, Sengupta PP, Tiersten A, Strauss HW, Narula J. Molecular imaging of apoptosis in cancer therapy related cardiac dysfunction before LVEF reduction. *JACC Cardiovascul Imag.* 2018;S1936-878X(18):30005-6.
 10. Doroshow JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: Alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest.* 1980;65:128-35.
 11. Kaiserova H, Simunek T, Sterba M, den Hartog GJ, Schroterova L, Popelova O, Gersl V, Kvasnickova E, Bast A. New iron chelators. *Circ Res.* 2022;23(5):11-8.
 12. Strutynska N, Goshovska Y, Mys L, Strutynskiy R, Luchkova A, Fedichkina R, Okhai I, Korkach Y, Sagach V. Glutathione restores the mitochondrial redox status and improves the function of the cardiovascular system in old rats. *Front Physiol.* 2023 Jan 9;13:1093388.
 13. Montaine D, Marechal X, Preau S, Baccouch R, Modine T, Fayad G, Lancel S, Neviere R. Doxorubicin induces mitochondrial permeability transition and contractile dysfunction in the human myocardium. *Mitochondrion.* 2011;11:22-6.
 14. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46:821-31.
 15. Karupu VY. Electron microscopy. K.:Higher school. 1984;208-10.
 16. Weibel ER. Morphometry of human lungs. K.:Medicine. 1970;170-2.
 17. Strutynska N, Strutynskiy R, Mys L, Luchkova A, Korkach Y, Goshovska Y, Sagach V. Exercise restores endogenous H₂S synthesis and mitochondrial function in the heart of old rats. *Eur J Cell Invest.* 2022;412:1-24.
 18. Sagach VF, Vavilova GL, Strutynska NA, Rudyk OV. The aging increase in the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore opening to inductors in rat heart. *Fiziol Zh.* 2004;50(2):49-63.
 19. Rozova KV. Structurally determined mitochondrial response to hypoxia and neurodegeneration. Kyiv: Znan-nya. 2019. [Ukrainian].
 20. Kuroпка P, Dobrzyński M, Gamian A, Gostomska-Pampuch K, Kuryszko J, Całkosiński I. Effect of glucocorticoids on ultrastructure of myocardial muscle in the course of experimentally induced acute myocardial ischemia. *Biomed Res Int.* 2017;210:84-97.
 21. Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, da Silva R, Lucchinetti E, Schaub MC, Wallimann T, Schlattner U. Acute toxicity of doxorubicin on isolated perfused heart: response of kinases regulating energy supply. *Am J Physiol.* 2005;289:H37-H47.
 22. Strutynska N, Semenykhina O, Chorna S, Vavilova H, Sahach V. Hydrogen sulfide inhibits Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition pore opening in adult and old rat heart. *Fiziol Zh.* 2011; 57(6): 3-14.
 23. David J, Polhemus, John W, Javed B, David J. The cardioprotective actions of hydrogen sulfide in acute myocardial infarction and heart failure. *Hindawi Publ Corp Sci Vol.* 2014; 768607: 8.
 24. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 2000; 403:98-103.
 25. Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;38:367-74.
 26. Periasamy M. Calcineurin and the heartbeat, an evolving story. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34:259-62.

*Матеріал надійшов
до редакції 18.08.2023*