

Член-кореспондент НАН України **І. С. Чекман, Н. О. Горчакова, І. Ф. Беленічев, О. О. Максимчук, С. В. Павлов**

## **Експериментальне обґрунтування застосування яктону для корекції мітохондріальної дисфункції в умовах доксорубіцинової кардіоміопатії**

*В експериментах на щурах в умовах доксорубіцинової кардіоміопатії показано, що яктон запобігає порушенням у міокарді енергопродукувальної функції мітохондрій, обмежує дію оксидативного стресу. Яктон обумовлює зменшення окиснювальної модифікації білків, інтенсифікацію реакцій на трикарбонових та дикарбонових ділянках циклу Кребса, активізацію роботи малат-аспартатного шунта, транспорту енергії, зниження формування мітохондріальної дисфункції.*

Доксорубіцин є одним з найефективніших протипухлинних антибіотиків антрациклінового ряду, який широко застосовується в лікуванні онкологічних та гематологічних захворювань. Механізми протипухлинної дії доксорубіцину пов'язані з індукцією апоптотичної загибелі пухлинних клітин і інгібуванням у них проліферативних процесів внаслідок деградації ДНК [1]. Ушкодження нуклеїнових кислот спричиняють вільні радикали, що утворюються під впливом доксорубіцину. Цитостатичний ефект може бути пов'язаний з прямим впливом на цитоплазматичну мембрану і ендотелій судин. Проте доксорубіцин викликає серйозні побічні ефекти, особливо токсичного впливу зазнає серце, що істотно обмежує застосування даного хіміотерапевтичного засобу в клінічній практиці. Вважають, що однією з головних причин токсичної дії доксорубіцину на міокард є його здатність індукувати окиснювальний стрес і порушувати обмінні процеси, у тому числі регуляторний вплив природних метаболітів на клітинні функції, які необхідні для нормального функціонування міокарда [2]. У зв'язку з цим актуальним завданням для медичної науки є як дослідження механізмів міжклітинних взаємодій в умовах токсичної дії доксорубіцину, так і розробка ефективних методів фармакологічної корекції патологічних змін у міокарді, які викликає доксорубіцин.

Останнім часом отримані і широко застосовуються похідні янтарної кислоти з метою органопротекції (мексидол, мексикор), у тому числі для кардіопротекції, які мають здатність швидко створювати високий рівень багатих енергією сполук та виявляють антиоксидантну, антигіпоксантну дію. За нашими даними, похідне янтарної кислоти яктон виявляє виражену метаболітотропну, енергомодуляторну, антиоксидантну активність при різних патологічних станах, а також в умовах токсичного ураження органів і тканин ксенобіотиками [3]. Але остаточно механізми кардіопротекторної дії яктону на міокард не вивчені.

Мета проведеного нами дослідження полягала у визначенні протекторної дії яктону в умовах токсичного (доксорубіцинового) ураження міокарда за його впливом на формування мітохондріальної дисфункції, розвиток порушень енергетичного метаболізму і оксидативного стресу.

Досліди виконані на білих щурах обох статей лінії Вістар масою 220–240 г, отриманих з розплідника Інституту фармакології і токсикології АМН України. Дослідних

тварин утримували на однакових раціонах у звичайних умовах віварію відповідно до правил, що прийняті Європейською конвенцією по захисту хребетних тварин, яких застосовують для наукових цілей, а також методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України [4].

Для моделювання доксорубіцинової кардіоміопатії доксорубіцин вводили внутрішньо-очеревинно протягом чотирьох тижнів у дозі 5 мг/кг один раз на добу [6]. Яктон вводили в дозі 357 мг/кг внутрішньоочеревинно протягом чотирьох тижнів за 1 год до введення доксорубіцину [5].

Для біохімічних досліджень тканини серця гомогенізували на холоді в сольовому ізотонічному середовищі (0,15 М КСІ) при 4 °С, за допомогою скляного гомогенізатора в співвідношенні тканина — сольовий розчин 1 : 40 [6].

Для оцінки функціональної активності мітохондрій проводили їх виділення з кардіоміоцитів [6]. Для цього суспензію виділених нейронів центрифугували 7 хв при 700 g (40 °С). Потім супернатант центрифугували повторно 15 хв при 11 000 g (40 °С). Мітохондрії суспендували в невеликому об'ємі середовища виділення, що не містить ЕДТА, і зберігали на льоду. Утворення пори, викликане набуханням мітохондрій, реєстрували спектрофотометрично при 540 нм (А540) [7].

Безбілковий екстракт отримували додаванням точної наважки гомогенату тканини серця в хлористоводневу кислоту (0,6 М) з наступною нейтралізацією 5,0 М калію карбонатом [6].

Для оцінки інтенсивності вільнорадикального окиснення в міокарді визначали маркери окиснювальної модифікації білка — альдегідфенілгідрозони (АФГ) та карбоксифенілгідрозони (КФГ). Стан оксидантної системи аналізували за ефективністю супероксиддисмутази (СОД), стан вуглеводно-енергетичного обміну (продукція і транспорт енергії) — за рівнем найбільш вагомих інтермедіатів: АТФ, АДФ, АМФ, лактату, пірувату, малату, ізоцитрату, глікогену, глюкозо-6-фосфату, а також за активністю цитозольної і мітохондріальної креатинфосфокінази (цтКФК; мхКФК). Роботу компенсаторного малат-аспартатного шунта енергопродукції оцінювали за активністю малатдегідрогенази (МДГ) та вмістом малату, аспартату і глутамату.

Активність СОД визначали за методикою, що була описана Чеварі зі співавтор., із застосуванням феназинметансульфату і нітросинього тетразолію [8]. Показники окиснювальної модифікації білка в тканинах міокарда розраховували, застосовуючи метод В. Halliwell, за взаємодією окиснених амінокислотних залишків з 2,4-динітрофенілгідрозинами (2,4-ДНФГ) та утворенням дигідрофенілгідрозинів і карбоксилфенілгідрозону, що мають спектр поглинання при 274 та 363 нм відповідно. Рівень нітротирозину визначали в гомогенаті серця твердофазним імуносорбентним методом за набором фірми ELISA і виражали в нмоль/г тканини [9]. Активність серцевого ізоензиму креатинфосфокінази (МВ-КФК) у сироватці крові, а також цтКФК і мхКФК у міокарді визначали після хроматографічного розділення за оптичним тестом Варбурга [10]. Кількість малату розраховували методом Хохорста за зменшенням НАДН при 340 нм [11], ізоцитрату та пірувату — методом Цоха–Ломпрехта за зменшенням НАДН при 340 нм, лактату — методом Хохорста за підвищенням НАДН при 340 нм. Рівень аденілових нуклеотидів визначали методом тонкошарової хроматографії, концентрацію аргініну, аспартату, метіоніну, цистеїну і глутамату — методом тонкошарової хроматографії з наступною спектрофотометрією елюату [6].

Вірогідність результатів оцінювали за допомогою *t*-критерію Стьюдента, застосовуючи версії Microsoft Office Excel 2003.

Як було зазначено вище, накопичені відомості про клітинні “мішені” дії доксорубіцину дозволяють припустити високу значущість механізмів оксидативного стресу в пошкодженні клітин цим ксенобіотиком.

Отримані дані свідчать про те, що введення експериментальним тваринам доксорубіцину протягом чотирьох тижнів супроводжується інтенсифікацією в міокарді процесів вільнорадикального окиснення. Так, у міокарді тварин після введення доксорубіцину відзначено різке зниження активності ключового ферменту антиоксидантного захисту — СОД, а також підвищення рівня маркерних продуктів окиснювального пошкодження білків — АФГ і КФГ щодо цих показників у інтактних тварин (табл. 1).

Окиснювальне пошкодження білків призводить до порушення метаболізму кардіоміоцитів. Так, в умовах інтенсифікації вільнорадикального окиснення гідроксилрадикал і пероксинітрит модифікують антиоксидантні ферменти — ксантиндегідрогеназу, СОД, підсилюючи тим самим явища оксидативного стресу в міокарді. З’являються карбонільні і карбоксильні групи, виникають бітирозинові зшивки і підвищується ступінь дефрагментації молекули. Негативний ефект окиснювально-модифікованих білків у клітині, на думку ряду дослідників, пов’язаний з тим, що окиснені білки можуть виступати як джерело вільних радикалів, виснажувати запаси клітинних антиоксидантів, таких як аскорбінова кислота і глутатіон. Експерименти *in vitro* показали, що саме продукти вільнорадикального окиснення білків визначають окиснювальні пошкодження ДНК [11–13].

Одним з важливих моментів у патологічному впливі окиснених білків на клітину є їх властивість знижувати функцію білків у ланцюгу переносників електронів, активність АТФази, вибірковості дії транспортних пор. Зміни редокс-потенціалу мітохондріальної мембрани можуть виявлятися в дисфункції каскаду дихального ланцюга, порушенні метаболізму кардіоміоцита. Дані зміни призводять до порушення окиснювального метаболізму в клітині, а також до розвитку мітохондріальної дисфункції. Дослідженнями останнього десятиліття встановлено, що розвиток мітохондріальної дисфункції при впливі на клітину різних токсичних агентів супроводжується зміною проникності внутрішньої мембрани мітохондрій, яка пов’язана з відкриттям мітохондріальної пори (МП) (mitochondrial permeability transition pore (MPTP)), — мультибілкового мегаканалу неспецифічної проникності, що відіграє ключову роль у порушеннях клітинних функцій. Відомо, що індукція МП є головною ланкою патогенезу таких станів, як ішемічне ураження серця, діабет, хвороба Паркінсона. Серед причин розвитку МП-залежної мітохондріальної дисфункції розрізняють оксидативний стрес, порушення біосинтезу оксиду азоту (NO), токсичне ураження клітини, дефіцит енергетичних запасів клітини [14].

Мітохондріальна дисфункція викликає активізацію “паразитарних” енергопродукувальних реакцій, що призводить до істотного зменшення енергетичних запасів кардіоміоцитів. Крім того, під дією гідроксилрадикала відбувається відкриття МП з наступною експе-

Таблиця 1. Показники антиоксидантної системи окиснювальної модифікації білка в міокарді при експериментальній терапії яктоном на фоні введення доксорубіцину ( $M \pm m$ )

Показник	Інтактні тварини	Доксорубіцин	Доксорубіцин + яктон
СОД, у.о./( $\text{мг} \cdot \text{хв}$ )	$271,8 \pm 10,7$	$100,5 \pm 8^*$	$183,4 \pm 6,2^{**}$
АФГ, у.о./г білка	$7,6 \pm 0,5$	$26,8 \pm 0,74^*$	$15,2 \pm 0,58^{**}$
КФГ, у.о./г білка	$11,7 \pm 0,63$	$39,3 \pm 1,21^*$	$22,7 \pm 0,84^{**}$

Примітка. Тут і в табл. 2: \* $p \leq 0,05$  відносно показників у інтактних тварин; \*\* $p \leq 0,05$  відносно показників у тварин, яким вводили доксорубіцин.

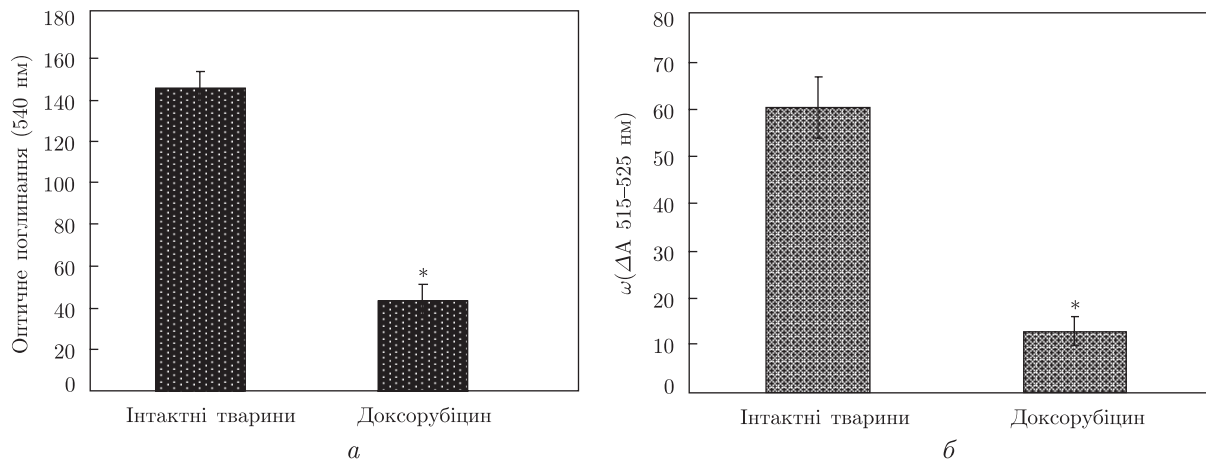


Рис. 1. Вплив доксорубіцину на відкриття мітохондріальної пори (а); на мембранний потенціал заряду мітохондрій, виділених з кардіоміоцитів (б).

\* $p \leq 0,05$  відносно даних, отриманих для інтактних тварин

сією та виходом у цитозоль проапоптичних білків. Відкриття пор здійснюється за рахунок окиснення тіольних груп цистеїнзалежної ділянки білка внутрішньої мембрани мітохондрій (АТФ/АДФ-антипортеру), що перетворює його на проникний неспецифічний канал-пору.

Відкриття пор сприяє зміні функції мітохондрій, перетворенню субстратів окиснення без утворення АТФ. Раніше було встановлено, що внаслідок порушення кисневого режиму тканин, гіперпродукції ексайтотоксичних амінокислот, зниження акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями, пошкодження мембрани мітохондрій АФК і відкриття пор відбувається вивільнення апоптогенних білків з пошкоджених мітохондрій у цитозоль з подальшою індукцією апоптозу/некрозу кардіоміоцитів [15].

Показано, що на фоні оксидативного стресу у тварин, яким вводили доксорубіцин, розвивалася мітохондріальна дисфункція, про що свідчило відкриття МП (циклоспорин-А-чутливі поглинання, 540 нм), зниження мембранного потенціалу заряду мітохондрій, які були виділені з кардіоміоцитів експериментальних тварин (рис. 1, а, б). Отримані нами дані дозволяють зробити висновок, що одним із значущих клітинних механізмів токсичної дії ксенобіотиків антрациклінового ряду в міокарді є індукція дисрегуляторних процесів у механізмі міжклітинної комунікації та інтеграції. Доксорубіцин, що є індуктором мітохондріальної дисфункції, реалізує свою токсичну дію поряд з іншими механізмами за рахунок порушення метаболізму АТФ, дискоординації в циклі Кребса.

Розвиток оксидативного стресу з наступною ініціалізацією мітохондріальної дисфункції у тварин на фоні введення доксорубіцину спричинив значне порушення енергетичного метаболізму в міокарді. У тварин даної експериментальної групи виявлено дефіцит АТФ, активізацію гліколізу, дискоординацію в циклі Кребса, виснаження вуглеводних резервів, гальмування компенсаторних шунтів енергії (табл. 2).

Відомо, що при оксидативному стресі ушкоджуючого впливу активних форм кисню зазнають у першу чергу не ліпіди, а білки плазматичних мембран. Після введення доксорубіцину в міокарді щурів знижується активність СОД, зростає вміст АФГ та КФГ, що свідчить про розвиток оксидативного стресу (див. табл. 1). Нормалізуюча дія яктону на процеси окиснювальної модифікації білків пояснює його позитивний вплив на явища мітохондріальної дисфункції. Так, в умовах введення доксорубіцину яктон продемонстрував

високу здатність впливати на відкриття МП, підвищуючи циклоспорин-А-чутливе поглинання на 56%, а мембранний потенціал заряду мітохондрій — на 60%.

За рахунок зменшення оксидативного стресу, мітохондріальної дисфункції, а також метаболітотропних властивостей яктон істотно покращував окиснювальний метаболізм міокарда. Введення яктону сприяло зменшенню активності малопродуктивного анаеробного гліколізу, про що свідчило зниження рівня лактату. Біологічно активна сполука нормалізувала окиснення в циклі Кребса на дикарбоновій (підвищення рівня малату), особливо трикарбоновій (підвищення рівня ізоцитрату) ділянках та в дихальному ланцюзі (активність цитохром-С-оксидази) (див. табл. 2).

Важливим моментом у механізмі енерготропної дії яктону є його активуючий вплив на компенсаторний малат-аспартатний шунт. Малат-аспартатний шунт здійснює перенесення відновлених еквівалентів, що утворюються в цитоплазмі під час гліколізу в мітохондрії в умовах ішемії. НАДН<sup>+</sup>, що міститься в цитоплазмі в умовах зниженого вмісту кисню, використовується для перетворення щавлевооцтової кислоти в малат, і цей малат проникає в мітохондрію та бере участь в експорті  $\alpha$ -кетоглутарату. Малат у мітохондріях перетворюється на щавлевооцтову кислоту з утворенням НАДН, доступного для електронтранспортного ланцюга (з двох протонів утворюється три молекули АТФ). З малату щавлевооцтова кислота, що виникла, перетворюється в  $\alpha$ -кетоглутарат і аспартат.  $\alpha$ -Кетоглутарат виходить з мітохондрій в обмін на малат, а аспартат перетворюється на глутамат. Перенесення відбувається за рахунок градієнта глутамату та високого внутрішньомітохондріального співвідношення глутамат/аспартат. Співвідношення НАДН/НАД<sup>+</sup> і малат/щавлевооцтова кислота регулюється МДГ.

При введенні доксорубіцину спостерігалось гальмування малат-аспартатного шунта, що виявлялося в зниженні активності МДГ, зменшенні рівня малату, аспартату і глутамату. Яктон зменшував гальмування активності малат-аспартатного шунта, про що свідчило гальмування активності МДГ, падіння вмісту малату, аспартату і глутамату. Крім того,

Таблиця 2. Показники вуглеводно-енергетичного обміну і малат-аспартатного шунта при експериментальній терапії яктоном в умовах інтоксикації доксорубіцином ( $M \pm m$ )

Показник	Інтактні тварини	Доксорубіцин	Доксорубіцин + яктон
АТФ, мкмоль/г	3,4 ± 0,10	1,4 ± 0,13*	2,4 ± 0,17**
АДФ, мкмоль/г	0,611 ± 0,04	0,215 ± 0,07*	0,47 ± 0,08**
АМФ, мкмоль/г	0,15 ± 0,01	0,25 ± 0,07*	0,19 ± 0,04**
Глікоген, мг/г	10,2 ± 0,80	1,05 ± 0,11*	5,3 ± 0,12**
Глюкозо-6-фосфат, мкмоль/г	0,850 ± 0,05	0,311 ± 0,07*	0,526 ± 0,06**
Лактат, мкмоль/г	2,58 ± 0,21	9,5 ± 0,24*	4,8 ± 0,30**
Піруват, мкмоль/г	0,16 ± 0,03	0,09 ± 0,002*	0,14 ± 0,02**
Ізоцитрат, мкмоль/г	0,61 ± 0,04	0,287 ± 0,05*	0,43 ± 0,04**
Малат, мкмоль/г	0,77 ± 0,023	0,28 ± 0,01*	0,49 ± 0,02**
МДГ, мкмоль/(г · хв)	7,9 ± 0,07	4,3 ± 0,03*	6,5 ± 0,06**
Глутамін, мкмоль/г	26,7 ± 0,20	17,3 ± 0,11*	23,4 ± 0,18**
Аспартат, мкмоль/г	17,4 ± 0,15	11,5 ± 0,16*	15,9 ± 0,14**
цтКФК, мкмоль/(мг · хв)	2,0 ± 0,04	0,741 ± 0,02*	1,56 ± 0,06**
мхКФК, мкмоль/(мг · хв)	0,9 ± 0,06	0,4 ± 0,01*	0,6 ± 0,02**
Цитохром-С-оксидаза, мкмоль/(мг · хв)	6,2 ± 0,10	2,9 ± 0,20*	4,4 ± 0,15**
МВ-КФК, мкмоль/(л · г) (сироватка крові)	0,04 ± 0,002	0,19 ± 0,04*	0,08 ± 0,006**

яктон інтенсифікував не тільки продукцію енергії, але також її транспорт внаслідок зростання активності мХКФК. У сироватці крові виявлено зменшення гіперферментемії серцевого ізоензиму креатинфосфокінази (МВ-КФК), що підтверджувало цитопротективну й енерготропну дію яктону.

Таким чином, похідне янтарної кислоти яктон значно гальмує формування мітохондріальної дисфункції міокарда при токсичному (доксорубіциновому) ураженні. Дія яктону спрямована на відновлення енергопродукувальної функції мітохондрій (підвищення рівня макроергічних сполук) за рахунок інтенсифікації реакцій на трикарбонних та дикарбонних ділянках циклу Кребса, активізацію роботи малат-аспартатного шунта. Подібний позитивний вплив яктону на функціональну активність мітохондрій в умовах доксорубіцинової кардіоміопатії виявляється в гальмуванні непродуктивних реакцій утворення активних форм кисню і обмеженні дії оксидативного стресу. Отримані дані дозволили встановити нові властивості яктону: здатність знижувати формування мітохондріальної дисфункції, нормалізувати енергопродукувальні реакції і обмежувати розвиток оксидативного стресу при доксорубіциновій кардіоміопатії, що є експериментальним обґрунтуванням застосування цього похідного янтарної кислоти як препарату “прикриття” в умовах хіміотерапії.

1. Егорова А. Б., Успенская Ю. А., Михуткина С. В., Ставицкая Е. Ю. Повреждение цитоскелета и клеточных мембран при апоптозе // Успехи соврем. биологии. – 2001. – **121**, № 5. – С. 502–510.
2. Трофімова Т. С., Юрженко Н. М., Чекман І. С., Авраменко М. О. Вплив тіотриазоліну на перебіг вільнорадикальних процесів при моделюванні доксорубіцинової хронічної кардіоміопатії // Запороз. мед. журн. – 2004. – № 4. – С. 141–143.
3. Горчакова Н. О., Лозинський М. О., Чекман І. С. та ін. Яктон – новий перспективний актопротектор // Актуальні проблеми фізкультури і спорту. – Київ: Наук. світ, 2003. – С. 183–188.
4. Испытания лекарственных средств. Методические рекомендации. – Киев: Авиценна, 2002. – 256 с.
5. Яковлева І. Ю., Беленічев І. Ф. Нейропротективна дія яктону // Вісн. пробл. біології і медицини. – 2009. – Вип. 1. – С. 145–150.
6. Прохорова М. И. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). – Ленинград: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. – 272 с.
7. Беленічев І. Ф., Колесник Ю. М., Павлов С. В. и др. Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропротекция цереброкурином // Междунар. неврологич. журн. – 2008. – **20**, № 4. – С. 20–26.
8. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах в клетке и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 678–681.
9. Halliwell B., Yutteridge M. C. Free radicals in Biology and Medicine. – Oxford: Clarendon Press, 1999. – 320 p.
10. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа. – Москва: Наука, 1969. – 739 с.
11. Губский Ю. И., Беленічев І. Ф., Павлов С. В. и др. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) // Соврем. пробл. токсикологии. – 2005. – № 3. – С. 20–26.
12. Witko-Sarsat V., Friedlander M. Advanced oxidation protein products as a novel markers of oxidative stress in ischemia // J. Neurochem. – 2000. – **22**, No 6. – P. 342–350.
13. Дубініна О. Ю. Окиснювальний стрес і окиснювальна модифікація білків // Мед. хімія. – 2001. – **3**, № 2. – С. 5–11.
14. Cadenas E., Davies K. J. A. Mitochondrial Free Radical Generation Oxidative Stress and Aging // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – **29**, No 3–4. – P. 222–230.
15. Лукьянова Л. Д., Дудченко А. М. Регуляторная роль митохондриальной дисфункции при гипоксии и ее взаимодействие с транскрипционной активностью // Вестн. РАМН. – 2007. – № 2. – С. 3–13.

Національний медичний університет  
ім. О. О. Богомольця, Київ

Надійшло до редакції 26.10.2009

Corresponding Member of the NAS of Ukraine **I. S. Chekman, N. O. Gorchakova, I. F. Belenichev, O. O. Maximchuk, S. V. Pavlov**

**Experimental grounds for the application of yakton for the correction of mitochondrial disfunction under conditions of doxorubicin cardiomiopathy**

*Under conditions of doxorubicin cardiomiopathy in the experiments on rats, yakton protects the myocardial energy-production in mitochondrial function damages and limits oxidative stress. Yakton decreases oxidation protein products, intensifies the reactions on the tricarbonate and dicarbonate section of Krebs' cycle, activates malate-aspartate shunt' work and energy transport, and lowers the mitochondrial dysfunction' formation.*