

Лакомкин В. Л., Абрамов А. А., Лукошкова Е. В., Просвирнин А. В., Капелько В. И.
 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия

ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ДИАСТОЛИЧЕСКОЙ ДИСФУНКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ДОКСОРУБИЦИНОМ, МИТОХОНДРИАЛЬНЫМ АНТИОКСИДАНТОМ ПЛАСТОМИТИНОМ

<i>Цель</i>	Попытка предотвратить развитие диастолической дисфункции (ДД) с помощью митохондриального антиоксиданта пластомитина на модели развития кардиомиопатии, вызванной доксорубицином. ДД – одна из форм хронической сердечной недостаточности. В связи с ростом числа больных с таким состоянием и отсутствием эффективной терапии разработка средств для коррекции ДД является актуальной задачей.
<i>Материал и методы</i>	Кардиомиопатию у 17 крыс вызывали введением доксорубицина подкожно в дозе 2 мг/кг/нед 2 раза. Другой группе (n=17), также получавшей доксорубицин, ежедневно вводили пластомитин в дозе 0,32 мг/кг подкожно. Функцию левого желудочка оценивали с помощью эхокардиографии (ЭхоКГ) и катетеризации сердца с одновременной регистрацией давления и объема.
<i>Результаты</i>	По данным ЭхоКГ, фракция выброса в экспериментальных группах не изменялась. Катетеризация сердца выявила нарушение как сократимости, так и расслабимости миокарда только в группе доксорубицина.
<i>Заключение</i>	Курсовое применение пластомитина в сочетании с доксорубицином способно поддерживать нормальный уровень сократительной функции сердца и тем самым предотвратить известное токсическое действие доксорубицина на миокард.
<i>Ключевые слова</i>	Доксорубицин; сердечная недостаточность; пластомитин; диастолическая дисфункция; левый желудочек; объем, давление
<i>Для цитирования</i>	Lakomkin V. L., Abramov A. A., Lukoshkova E. V., Prosvirnin A. V., Kapelko V. I. Prevention of Diastolic Dysfunction Caused by Doxorubicin by Mitochondrial Antioxidant Plastomitin. <i>Kardiologiya</i> . 2020;60(7):98–102. [Russian: Лакомкин В. Л., Абрамов А. А., Лукошкова Е. В., Просвирнин А. В., Капелько В. И. Предотвращение диастолической дисфункции, вызываемой доксорубицином, митохондриальным антиоксидантом пластомитином. <i>Кардиология</i> . 2020;60(7):98–102]
<i>Автор для переписки</i>	Лакомкин Владимир Леонидович. E-mail: v.lakomkin@yandex.ru

Диастолическая дисфункция (ДД) – одна из форм хронической сердечной недостаточности (ХСН). Несмотря на менее выраженную степень, ее прогноз примерно такой же, как при систолической дисфункции со снижением фракции выброса, к тому же ее доля среди больных ХСН начинает превалировать [1]. Положение осложняется отсутствием эффективной терапии. В связи с этим перспективным является стремление предотвратить развитие ХСН и, в частности, ДД в начальном периоде возникновения кардиомиопатии.

Применение доксорубицина в качестве антиопухолевого препарата нередко сопровождается развитием кардиомиопатии. Обязательным компонентом патогенеза этой кардиомиопатии является окислительный стресс [2, 3]. Известно, что кардиомиопатия, вызываемая доксорубицином, характеризуется нарушением функции митохондрий, что проявляется, в частности, снижением уровня важнейшего участника электронно-транспортной цепи – коэнзима Q₁₀ – в миокарде больных с систолической дисфункцией, и его назначение улучшает симптоматику [4]. Примененный в нашей работе комплекс пластохино-

на с трифенилфосфонием (препарат SkQ1, пластомитин) в ряде работ показал значительное преимущество перед коэнзимом Q₁₀ [5].

В нашей недавней работе [6] было показано, что использование пластомитина успешно предотвратило развитие систолической дисфункции сердца, возникавшей через 8 нед после начала 4-недельного применения доксорубицина. В данной работе была поставлена задача – выяснить, способен ли пластомитин предотвратить развитие ДД сердца, возникающей в большинстве опытов после 2-недельного применения доксорубицина.

Материал и методы

В работе использованы крысы-самцы стока Wistar массой 320–380 г. Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией (2000) и Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных (1985). Одной группе животных (n=17) вводили подкожно доксорубицин 2 мг/кг еженедельно дважды, а другой (n=17) наряду с доксорубицином также подкожно вводили препа-

рат пластомитин (SkQ1 в 50% водном пропиленгликоле, 0,32 мг/кг ежедневно), любезно предоставленный НИИ митоинженерии МГУ им. М. В. Ломоносова. Контрольной группе (n=15) вводили изотонический раствор натрия хлорида. Предварительно, а также через 2 нед всем животным была выполнена трансторакальная эхокардиография (ЭхоКГ). В данной работе для физиологического исследования использовали примерно 50% крыс, другие 50% были предназначены для биохимических исследований.

Катетеризация левого желудочка (ЛЖ) с применением Р-V-катетера была выполнена по методике, подробно изложенной ранее [6]. Измерение параметров в исходном состоянии осуществляли с многократной (от 10 до 40 раз) записью параметров, на основании которых программа автоматически вычисляла средние величины параметров, характеризующих функцию сердца. Для изучения растяжимости миокарда после записи исходных параметров приток к правому желудочку ограничивали посредством сужения нижней полой вены. Это позволяло получать ряд сердечных циклов с постепенным снижением наполнения ЛЖ.

Для статистической обработки полученных данных использовали вычислительные алгоритмы, предоставляемые программой GraphPad Prism (версия 8.4.0). Статистический пакет этой программы позволяет эффективно анализировать результаты множественных сравнений,

выполняя как дисперсионный анализ (ANOVA) – применяли F-тест и тест Брауна-Форсайта, так и оценку достоверности различий средних значений измеряемых параметров, в том числе с учетом множественности сравнений. Результаты представлены как M±SEM (среднее значение и его стандартная ошибка). Для сравнения параметров по всем трем группам опытов использовали ТЗ тест Даннетта. Нормальность распределения значений измерявшихся параметров подтверждена результатами применения тестов Холмогорова–Смирнова и Агостино–Пирсона.

Результаты

У всех крыс через 2 нед от начала опыта результаты ЭхоКГ оказались сопоставимыми во всех группах (табл. 1). Отмечено лишь достоверное уменьшение конечного диастолического размера ЛЖ в группе доксорубицина и заметное увеличение E/a, отражающего скорость раннего наполнения ЛЖ, в группе доксорубицин + пластомитин по сравнению с обеими группами сравнения.

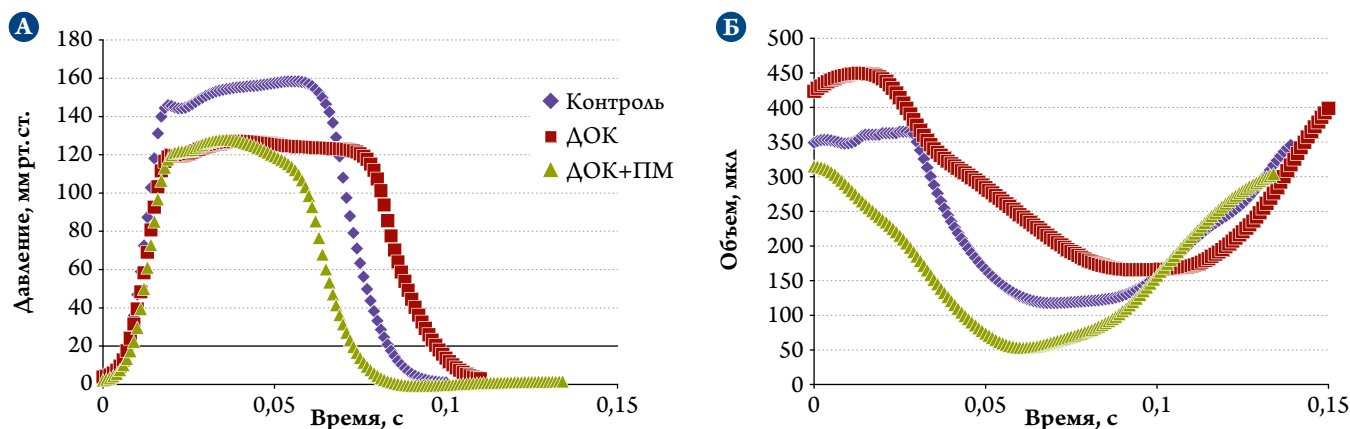
Динамика давления в ЛЖ в сердцах крыс, получавших доксорубицин и пластомитин, отличалась от таковой в группе доксорубицина. Наибольшее систолическое давление в ЛЖ выявлено в контрольном опыте, в двух других группах оно ниже (рис. 1, А). Однако между последни-

Таблица 1. Эхокардиографические показатели функции сердца крыс через 2 нед от начала введения доксорубицина

Показатель	Контроль	Доксорубицин	Доксорубицин + пластомитин
Число крыс	15	17	17
Масса крыс, г	380±12	364±14	374±8
Частота сокращений сердца, уд/мин	371±3	366±2	371±2
Конечный диастолический размер ЛЖ, мм	7,1±0,1	6,5±0,2*	6,9±0,1
Фракция укорочения ЛЖ, %	48±2	48±2	45±1
Конечный диастолический объем ЛЖ, мл	0,41±0,02	0,37±0,01	0,38±0,01
Фракция выброса ЛЖ, %	74±2	73±2	70±1
E/a	2,16±0,08	2,14±0,09	2,76±0,17**

Различия достоверны (p<0,05) по сравнению * – с контролем, # – с группой доксорубицина. ЛЖ – левый желудочек.

Рисунок 1. Динамика изменения систолического давления (А) и объема (Б) левого желудочка сердца крыс в контроле, через 2 нед после введения доксорубицина (ДОК) и доксорубицина с пластомитином (ДОК+ПМ)



Обозначения групп на частях рисунка А и Б идентичны.

Таблица 2. Гемодинамические показатели насосной функции сердца крыс после 2 инъекций доксорубицина

Показатель	Контроль	Доксорубицин	Доксорубицин + пластомитин
Число опытов	7	7	7
Минутный объем сердца, мл/мин	118±9	105±10	102±8
Частота сокращений сердца, уд/мин	430±9	412±12	395±15
Конечный диастолический объем ЛЖ, мл	0,41±0,03	0,47±0,02	0,42±0,03
Работа сердца (мм рт. ст. x мл)	37,3±2,6	30,4±2,9	32,8±2,7
Максимальная скорость выброса, мл/с	15,5±2,7	9,3±1,4	12,2±2,1
Фракция выброса, %	63±2	57±4	64±4
Максимальная скорость наполнения ЛЖ, мл/с	10,5±2,8	10,2±1,0	11,4±1,7
Упругость артерий Ea, мм рт. ст./мкл	0,54±0,04	0,48±0,04	0,51±0,03

Таблица 3. Показатели сократительной функции сердца крыс после 2 инъекций доксорубицина или доксорубицина с пластомитином

Показатель	Контроль	Доксорубицин	Доксорубицин + пластомитин
Число опытов	7	7	7
Систолическое давление в ЛЖ, мм рт. ст.	142±7	120±4*	134±5
Максимальная скорость развития давления в ЛЖ, мм рт. ст./с	15190±1353	9690±755**	11900±1144
Индекс сократимости, с ⁻¹	147±8	113±5**	131±8
Максимальная скорость снижения давления в ЛЖ, мм рт. ст./с	12240±870	6950±541***	10480±1005#
Индекс расслабления, с ⁻¹	84±6	56±5**	77±5#
Константа скорости расслабления, с ⁻¹	125±5	89±3***	114±5##
Диастолическое давление в ЛЖ, мм рт. ст.	1,1±0,3	3,2±1,1	0,3±0,4
Конечное диастолическое давление в ЛЖ, мм рт. ст.	4,9±0,7	7,2±2,0	3,1±0,7

Различия достоверны: * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 по сравнению с контролем; # – p<0,05, ## – p<0,01 по сравнению с группой доксорубицина; ЛЖ – левый желудочек.

ми видна существенная разница по длительности фазы систоли, которая в группе доксорубицина оказалась гораздо больше, в то время как в опыте из группы доксорубицин + пластомитин она была короче даже по сравнению с контролем. Динамика объема ЛЖ в тех же опытах представлена на рис. 1, Б. Опыт из группы доксорубицина заметно отличался от контроля сниженной скоростью выброса, тогда как скорость наполнения была примерно одинаковой.

В среднем применение доксорубицина и доксорубицина + пластомитина не привело к значительным нарушениям гемодинамики (табл. 2), но в группе доксорубицина отмечена тенденция к увеличению диастолического объема, снижению фракции выброса ЛЖ, работы сердца и скорости сердечного выброса. Эти изменения были гораздо менее выражены в группе доксорубицин + пластомитин.

При этом измерение показателей сократительной функции ЛЖ позволило выявить в группе доксорубицина явные изменения сократимости и расслабимости миокарда (табл. 3). Максимальная скорость развития давления в ЛЖ была снижена на 36%, а индекс сократимости – на 23%. Еще в большей степени – на 39–43% были снижены показатели расслабимости миокарда. Имелась явная тенденция к повышению диастолического давления в ЛЖ. Таким образом, в данной группе наблюдали признаки ДД.

В группе доксорубицин + пластомитин показатели сократимости и расслабимости миокарда были явно лучше,

чем в группе доксорубицина, они не отличались от контрольных величин. Эти изменения сочетались со сниженным диастолическим давлением в ЛЖ. Таким образом, применение пластомитина полностью устранило признаки ДД, наблюдаемые в группе доксорубицина.

Ограничение притока к правому желудочку посредством сужения нижней полой вены позволило рассчитать экспоненциальную зависимость соотношения между приростом диастолического давления и объема в ЛЖ при разной степени наполнения ЛЖ. Этот показатель в контрольной группе был равен 14,3±0,9 мл⁻¹. В группе доксорубицина он был равен 8,1±1,9 (p<0,05), а в группе доксорубицин + пластомитин – 9,4±1,5 мл⁻¹. Таким образом, для обеих групп, получавших доксорубицин, было характерно снижение диастолической упругости миокарда.

Обсуждение

Результаты данной работы соответствуют ранее полученным в другой нашей работе, в которой прием пластомитина снизил степень ХСН после 4-недельного применения доксорубицина [6]. Предотвращение ДД в настоящей работе было достигнуто за счет значительного усиления параметров расслабимости и сократимости миокарда. Это наводит на мысль о наличии у пластомитина прямого влияния на кальциевый транспорт в кардиомиоцитах. Это же позволяют предполагать наши ранее

выполненные работы, в которых показано значительное уменьшение частоты и интенсивности аритмий, вызванных пероксидом водорода или адреналином [5]. Кроме того, длительное (3 нед) применение препарата SkQ1 в умеренной дозировке 0,2–2,0 нМ/кг массы тела повышало индекс расслабления изолированного сердца нормальных крыс и снижало тонус артериальных сосудов [7].

Относительно механизма действия предполагаемого эффекта пластомитина на кальциевый транспорт можно высказать следующую гипотезу. Известно, что действующая в миоплазме концентрация Ca^{2+} определяется количеством Ca^{2+} , выделяющегося при возбуждении из саркоплазматической сети через рианодиновый рецептор, воротный белок RyR2. Количество высвобождаемого Ca^{2+} зависит от нескольких факторов, в том числе от степени окисления тиоловых групп цистеинов, составляющих канал. Умеренное окисление этих групп повышает чувствительность белка к концентрации Ca^{2+} [8, 9] и тем самым способствует открытию канала и выходу Ca^{2+} .

Именно посредством этого механизма митохондрии регулируют количество Ca^{2+} , активирующего миофибриллы. Эта связь осуществляется посредством изменения количества супероксида, образующегося при прохождении молекул кислорода по электронно-транспортной цепи. Повышение потребления кислорода, например, при физической работе, сопровождается умеренным увеличением образования супероксида и соответствующим увеличением концентрации Ca^{2+} и силы сокращений. При этом повышенное поступление Ca^{2+} в митохондрии сопровождается увеличением скорости окислительного фосфорилирования и концентрации АТФ в них [10, 11], т. е. возросшая функция получает достаточное энергетическое обеспечение.

Однако при задержке прохождения электронов по цепи, что происходит под влиянием доксорубицина, количество образованного супероксида или пероксида водорода, образуемого из него при реакции дисмутирования, многократно возрастает, окисляется большое количество цистеинов, и это сопровождается уменьшением выхода Ca^{2+} из канала. Действие супероксида на RyR2 представляет собой важную форму взаимосвязи между функцией и ее энергообеспечением, и состояние каналов RyR2 находится под постоянным тоническим влиянием редокс-регуляторов [12]. Данный механизм является примером экономного расходования запасов энергии в клетках – ведь если не ограничить силу сокращений, то запасы АТФ будут быстро израсходованы. Возможно, молекулы пластомитина встраиваются в электронно-транспортную цепь, замещая поврежденные молекулы коэнзима Q_{10} [5], и тем самым поддерживают должный уровень синтеза АТФ и нормальный уровень Ca^{2+} , активирующего миофибриллы.

Важным фактором, компенсирующим сниженную сократимость миокарда, является повышенная растяжимость

миокарда, которая позволяет увеличить зону возможного актомиозинового взаимодействия. В наших опытах в обеих группах, подвергавшихся действию доксорубицина, была отмечена сниженная диастолическая упругость или повышенная растяжимость миокарда. В физиологическом диапазоне длины саркомеров растяжимость миокарда определяется состоянием титина – наибольшего белка в миокарде [13], соединяющего концы миозиновых нитей с границей саркомера линией Z. При развитии сокращения миозиновые нити, образуя связи с актиновыми, смещаются к линии Z, сжимая пружину титина, а при устранении Ca^{2+} из миофибрилл пружиноподобная структура титина обеспечивает упругое возвращение сокращенных миофибрилл в расслабленное состояние даже в отсутствие растягивающей силы, как например, в изолированных кардиомиоцитах. В отличие от скелетной мышцы титин в миокарде содержит, кроме упругой изоформы N2B, также растяжимую изоформу N2BA. Именно она позволяет миокарду растягиваться под влиянием притока крови из левого предсердия.

Анализ известных данных об изменении соотношения N2BA/N2B при различных видах кардиомиопатии показывает широкую вариабельность при разных моделях патологии. Повышенное отношение N2BA/N2B характерно для дилатационной или ишемической кардиомиопатии со снижением фракции выброса [14], пониженное – для концентрической кардиомиопатии или артериальной гипертензии [15]. Сходные изменения наблюдались при ХСН с нормальной фракцией выброса [16]. В общем увеличение изоформы N2BA характерно для ситуаций, связанных с увеличением диастолического объема, а снижение – для ситуаций, связанных с необходимостью преодоления повышенного сопротивления. Наши данные о повышенной растяжимости миокарда позволяют предполагать сдвиг соотношения N2BA/N2B в сторону преобладания N2BA, как было показано недавно при 4-недельном введении доксорубицина [17].

Заключение

Таким образом, курсовое применение пластомитина в сочетании с доксорубицином способно поддерживать нормальный уровень сократительной функции сердца и тем самым предотвратить известное токсическое действие доксорубицина на миокард.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 18-015-00271 и № 20-015-00027.

Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Статья поступила 20.04.20

- Li S, Gupte AA. The Role of Estrogen in Cardiac Metabolism and Diastolic Function. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*. 2017;13(1):4–8. DOI: 10.14797/mdcj-13-1-4
- Mitry MA, Edwards JG. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *IJC Heart & Vasculature*. 2016;10:17–24. DOI: 10.1016/j.ijcha.2015.11.004
- Singal PK, Iliskovic N, Li T, Kumar D. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB journal*. 1997;11(12):931–6. DOI: 10.1096/fasebj.11.12.9337145
- Sharma A, Fonarow GC, Butler J, Ezekowitz JA, Felker GM. Coenzyme Q10 and Heart Failure: A State-of-the-Art Review. *Circulation: Heart Failure*. 2016;9(4):e002639. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002639
- Skulachev VP, Anisimov VN, Antonenko YN, Bakeeva LE, Chernyak BV, Elichev VP et al. An attempt to prevent senescence: A mitochondrial approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2009;1787(5):437–61. DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.12.008
- Abramov A.A., Lakomkin V.L., Prosvirnin A.V., Lukoshkova E.V., Kapelko V.I. Mitochondrial Antioxidant Plastomitin Improves Cardiac Function in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *Kardiologiya*. 2019;59(6):35–41. [Russian: Абрамов А.А., Лакомкин В.Л., Просвирнин А.В., Лукошкова Е.В., Капелько В.И. Улучшение функции сердца под влиянием митохондриального антиоксиданта пластомитина при доксорубициновой кардиомиопатии. *Кардиология*. 2019;59(6):35–41]. DOI: 10.18087/cardio.2019.6.2649
- Lakomkin V.L., Kapelko V.I. The effect of prolonged administration of mitochondrial antioxidant SkQ1 on the cardiac contractile function. *Kardiologicheskij Vestnik*. 2012;7(2):35–40. [Russian: Лакомкин В.Л., Капелько В.И. Влияние длительного назначения митохондриального антиоксиданта SkQ1 на сократительную функцию изолированного сердца. *Кардиологический вестник*. 2012;7(2):35–40]
- Marengo JJ, Hidalgo C, Bull R. Sulfhydryl Oxidation Modifies the Calcium Dependence of Ryanodine-Sensitive Calcium Channels of Excitable Cells. *Biophysical Journal*. 1998;74(3):1263–77. DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77840-3
- Zima A, Blatter L. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovascular Research*. 2006;71(2):310–21. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.02.019
- Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD. Calcium and mitochondria. *FEBS letters*. 2004;567(1):96–102. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.03.071
- Rimessi A, Giorgi C, Pinton P, Rizzuto R. The versatility of mitochondrial calcium signals: From stimulation of cell metabolism to induction of cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2008;1777(7–8):808–16. DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.05.449
- Gyorke S, Terentyev D. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovascular Research*. 2007;77(2):245–55. DOI: 10.1093/cvr/cvm038
- Borlaug BA, Kass DA. Mechanisms of Diastolic Dysfunction in Heart Failure. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2006;16(8):273–9. DOI: 10.1016/j.tcm.2006.05.003
- Makarenko I, Opitz CA, Leake MC, Neagoe C, Kulke M, Gwathmey JK et al. Passive Stiffness Changes Caused by Upregulation of Compliant Titin Isoforms in Human Dilated Cardiomyopathy Hearts. *Circulation Research*. 2004;95(7):708–16. DOI: 10.1161/01.RES.0000143901.37063.2f
- Hamdani N, Franssen C, Lourenço A, Falcão-Pires I, Fontoura D, Leite S et al. Myocardial Titin Hypophosphorylation Importantly Contributes to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in a Rat Metabolic Risk Model. *Circulation: Heart Failure*. 2013;6(6):1239–49. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000539
- Borbély A, Papp Z, Edes I, Paulus WJ. Molecular determinants of heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Pharmacological reports*. 2009;61(1):139–45. DOI: 10.1016/s1734-1140(09)70016-7
- Lakomkin V.L., Abramov A.A., Studneva I.M., Ulanova A.D., Vikhlyantsev I.M., Prosvirnin A.V. Early changes of energy metabolism, isomorph content and level of titin phosphorylation at diastolic dysfunction. *Kardiologiya*. 2020;60(2):4–6. [Russian: Лакомкин В.Л., Абрамов А.А., Студнева И.М., Уланова А.Д., Вихлянцев И.М., Просвирнин А.В. и др. Ранние изменения энергетического метаболизма и изоформного состава и уровня фосфорилирования титина при диастолической дисфункции. *Кардиология*. 2020; 60, №2, 4–9.] DOI: <http://dx.doi.org/10.18087/cardio.2020.2.n531>