

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.015; 615.361

З. Т. Шульгау¹, Ш. Д. Серғазы^{1, 2}, Г. В. Федотовских³, Т. Н. Криворучко¹, О. В. Толмачева¹,
Б. А. Сагиндыкова¹, Н. Н. Кенжебаева⁴, С. К. Жаугашева⁵, А. Е. Гуляев^{1, 2}

КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА РНК-ПРЕПАРАТА RN-13 НА МОДЕЛИ ДОКСОРУБИЦИНОВОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

¹РГП «Национальный центр биотехнологии» (Астана, Казахстан);

²ЧУ «National Laboratory Astana», Назарбаев Университет (Астана, Казахстан);

³АО «Национальный научный медицинский центр» (Астана, Казахстан);

⁴ТОО «Научно-практический центр «RE-BIOMED» (Астана, Казахстан); ⁵Карагандинский государственный медицинский университет (Караганда, Казахстан)

В статье представлены результаты оценки кардиопротекторных свойств РНК-препарата RN-13, изученные в условиях модели доксорубициновой кардиомиопатии у крыс. Модель доксорубициновой кардиомиопатии воспроизведена путем однократного внутривентрикулярного введения доксорубицина.

Электронно-микроскопическое исследование миокарда при воздействии доксорубицином выявило выраженные ультраструктурные изменения органелл кардиомиоцитов. Воздействие доксорубицином привело к агрегации ядерного хроматина, разволокнению наружной ядерной мембраны и перинуклеарному отеку в кардиомиоцитах. Значительно увеличены митохондрии с резким просветлением матрикса, лизисом, гомогенизацией крист, отдельные митохондрии вакуолизированы. Отмечено резкое расширение и деструкция Т- и L- системы саркоплазматического ретикулума, каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума расширены и дегранулированы. Миофибриллы неупорядоченно расположены с очагами лизиса и потерей Z- и M-полос. Наблюдаются явления субсарколемного отека, разрыхление сарколеммы и плазматической мембраны. Токсическое действие доксорубицина вызывало тяжелые ультраструктурные изменения капилляров интерстициального пространства и кардиомиоцитов.

В соответствии с электроннограммой, кардиомиоциты при воздействии RN-13 содержали ядро с крупным ядрышком, высоким содержанием эухроматина, узким перинуклеарным пространством. Митохондрии крупные с мелкоочаговым просветлением матрикса, плотно расположенными кристами. Мембраны Т- и L-системы саркоплазматического ретикулума оставались расширены, однако каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума узкие с обилием фиксированных рибосом. Оставались явления субсарколемного и внутриклеточного отека. Электронномикроскопическое исследование миокарда после лечения РНК-содержащим препаратом RN-13 на фоне токсического воздействия доксорубицином показало хорошую сохранность эндотелия кровеносных капилляров.

РНК-препарат RN-13 на модели доксорубициновой кардиомиопатии уменьшает морфологические признаки кардиотоксического действия доксорубицина, что можно расценивать как проявление кардиопротекторного эффекта.

Ключевые слова: доксорубицин, кардиомиопатия, RN-13, РНК-препарат

Препараты на основе рибонуклеиновых кислот из различных органов и дрожжей применялись в лечении хронических и дегенеративных заболеваний последние 60 лет [5, 7, 11].

Существует большое количество данных о применении РНК препаратов при различных патологических состояниях. Показано, что РНК-содержащие средства могут ускорять регенерацию тканей при повреждении и репарацию в эксперименте, есть данные о возможности РНК-содержащих препаратов менять течение воспалительного процесса, регулировать проявление гиперчувствительности немедленного и замедленного типов, стимулировать субпопуляции лимфоцитов, усиливать фагоцитоз макрофагов и воздействовать на реакции организма в отношении опухолей и аллотрансплантатов [6, 9, 10, 11]. Несмотря на значительное количество зафиксированных

потенциальных терапевтических эффектов, фармакодинамика РНК-препаратов практически не описана. Между тем, именно разнообразие эффектов наводит на мысль о вероятности универсальности механизма действия. В подобных случаях в качестве универсального компонента эффекта теоретически может быть так называемый цитопротекторный механизм. Прямые проявления цитопротекции довольно легко фиксируются на моделях с прямым повреждением клеток экзогенным фактором. К токсинам подобного рода относят доксорубицин [3, 4].

Цель работы – оценка кардиопротекторных свойств РНК-препарата RN-13 в условиях модели доксорубициновой кардиомиопатии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явился РНК-содержащий препарат RN-13 (Dyckerhoff Phar-

ma GmbH & Co. KG, Cologne, Germany), который, помимо РНК дрожжей, содержит РНК крупного рогатого скота из следующих органов: сосудистая стенка, кора головного мозга, сердце, гипофиз, гипоталамус, печень, селезенка, кора надпочечников, почки, яичники, плацента, семенники, таламус. Одна ампула препарата RN-13 объемом 5 мл содержит 6,3 мг натриевой соли рибонуклеиновой кислоты теленка и дрожжей.

Исследование проведено на 12 аутобредных крысах-самках массой тела 180 ± 20 г. Крысы получены из вивария Национального центра биотехнологий. Животные находились в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе и свободном доступе к воде и пище (*ad libitum*). Контрольные и опытные животные находились в аналогичных условиях и имели одинаковую исходную среднюю массу.

Все исследовательские работы с лабораторными животными выполнялись в соответствии с общепринятыми этическими нормами по обращению с животными, на основе стандартных операционных процедур, которые соответствуют правилам, принятым Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протокол исследования проекта «Оценка безопасности и эффективности РНК-содержащих биологически активных субстанций с геропротекторным потенциалом» одобрен 18 июня 2015 г. Локальной этической комиссией РГП «Национальный центр биотехнологий».

Кардиомиопатию вызывали путем однократного внутрибрюшинного введения доксорубина в дозе 10,0 мг/кг массы тела животного [2]. Животные с моделью кардиомиопатии были разделены на 2 исследуемые группы: опытную и контрольную. Крысам опытной группы в течение 5 суток после инъекции доксорубина внутрибрюшинно вводили РНК-препарат RN-13 в дозе 0,5 мл/кг. Крысы контрольной группы получали стерильный физиологический раствор в эквивалентном количестве. На следующие сутки после последней инъекции RN-13 крыс подвергали эвтаназии путем передозировки эфирным наркозом. Затем осуществляли забор биологического материала (сердце) для проведения электронно-микроскопического исследования.

Для проведения электронно-микроскопического исследования биопсийные кусочки миокарда были фиксированы в 2,5% растворе глутаральдегида на фосфатном буфере с постфиксацией в 2% растворе четы-

рехокси осмия, проведены по общепринятой методике [1] и заключены в эпон. Ультратонкие срезы были приготовлены на ультратонкотоме Leica. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу [8], исследовали и фотографировали в электронном микроскопе Libra 120 (C. Zeiss).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электронно-микроскопическое исследование миокарда при воздействии доксорубицином выявило агрегацию ядерного хроматина, разволокнение наружной ядерной мембраны и перинуклеарный отек в цитоплазме кардиомиоцитов (рис. 1). За исключением некроза отдельных клеток ультраструктурные изменения органелл кардиомиоцитов были гомогенными. Митохондрии овальной формы значительно увеличивались в размере и характеризовались набуханием, резким просветлением матрикса, лизисом, гомогенизацией крист, деструкцией и миелинизацией наружных мембран (рис. 2). Отдельные митохондрии были вакуолизированы. Отмечено резкое расширение и деструкция Т- и L-системы саркоплазматического ретикулума (рис. 3). Канальцы гранулярного эндоплазматического ретикулума были расширены и дегранулированы. Миофибриллы имели неупорядоченное расположение и отличались очагами лизиса и потерей Z- и М-полос (рис. 4). Наблюдались явления субсарколемного отека, разрыхление сарколеммы и плазматической мембраны (рис. 5). Уменьшалось количество гликогеновых гранул. Эндотелий капилляров интерстициального пространства был отечен с деструкцией органелл и резким разрыхлением базальной мембраны. Отмечены сосуды с полной деструкцией эндотелиальной выстилки (рис. 6). В просвете сосудов был виден материал разрушенных эндотелиальных клеток.

Таким образом, токсическое действие доксорубина вызывало тяжелые ультраструктурные изменения капилляров интерстициального пространства и кардиомиоцитов. Как известно, накопление редокс активного доксорубина в митохондриях сердца усиливает генерацию активных форм кислорода и азота, приводя к снижению энергетического метаболизма и патологическим изменениям клеток миокарда.

Электронно-микроскопическое исследование миокарда после лечения РНК-содержащим препаратом RN-13 на фоне токсического воздействия доксорубицином показало хорошую сохранность эндотелия кровеносных

капилляров (рис. 7). В соответствии с электроннограммой, кардиомиоциты содержали ядро с крупным ядрышком, высоким содержанием эухроматина, узким перинуклеарным пространством (рис. 8).

Митохондрии были крупными и характеризовались мелкоочаговым просветлением матрикса, плотно расположенными кристами (рис. 9). Мембраны Т- и L-системы саркоплазматического ретикулума были расширены. Канальцы гранулярного эндоплазматического ретикулума узкие с обилием фиксированных рибосом. Наблюдались явления субсарколемного и внутриклеточного отека (рис. 10). В гиалоплазме располагались гранулы гликогена.

Полученные данные свидетельствуют о том, что морфофункциональное состояние кардиомиоцитов при воздействии РНК-препарата RN-13 характеризовалось высоким уровнем ядерно-белкового синтеза и окислительного фосфорилирования митохондрий. Нормализовалась структура кровеносных капилляров. Однако сохранялись ультраструктурные изменения саркоплазматического ретикулума и признаки субсарколемного, внутриклеточного отека в кардиомиоцитах.

Таким образом, РНК-препарат RN-13 на модели доксорубициновой кардиопатии у крыс уменьшает морфологические признаки кардиотоксического действия доксорубицина, что можно расценивать как проявление кардиопротекторного эффекта.

ВЫВОДЫ

Электронно-микроскопическое исследование миокарда при воздействии доксорубицином выявило выраженные ультраструктурные изменения органелл кардиомиоцитов. Токсическое действие доксорубицина вызывало тяжелые ультраструктурные изменения капилляров интерстициального пространства и кардиомиоцитов.

РНК-препарат RN-13 приводил к нормализации ультраструктурных изменений органелл кардиомиоцитов и структуры кровеносных капилляров интерстициального пространства и кардиомиоцитов. Морфофункциональное состояние кардиомиоцитов при воздействии РНК-препарата RN-13 характеризовалось высоким уровнем ядерно-белкового синтеза и окислительного фосфорилирования митохондрий.

Таким образом, РНК-препарат RN-13 на модели доксорубициновой кардиопатии уменьшает морфологические признаки кардиотоксического действия доксорубицина.

Финансирование

Результаты исследований, представленные в статье, выполнены в рамках гранта «Оценка безопасности и эффективности РНК-содержащих биологически активных субстанций с геропротекторным потенциалом», финансируемого Комитетом науки Министерства образования и науки РК (5444/ГФ4).

ЛИТЕРАТУРА

1 Микроскопическая техника: рук. /Под ред. Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова. – М: Медицина, 1996. – 544 с.

2 Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

3 Ajith T. A. Zingiber officinale Roscoe ameliorates anticancer antibiotic doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rat /T. A. Ajith, U. Hema, S. Aswathi //J. Exp. Ther. Oncol. – 2016. – V. 11, №3. – P. 171-175.

4 Cardioprotective mechanisms of phytochemicals against doxorubicin-induced cardiotoxicity /A. I. Abushouk, A. Ismail, A.M.A. Salem // Biomed. Pharmacother. – 2017. – V. 90. – P. 935-946.

5 Die Behandlung Degenerativer Gelenkerkrankungen /A. Schroeder, M. Dorn, K.H. Schuehlein von Sulecki W. //Therapiewoche. – 1989. – V. 39. – P. 2310-2315.

6 miRNA therapeutics: a new class of drugs with potential therapeutic applications in the heart /B. C. Bernardo, J. Y. Ooi, R. C. Lin, J. R. McMullen //Future Medicinal Chemistry. – 2015. – V. 7, №13. – P. 1771-1792.

7 Rainsford K. D. Mode of action, uses and side effects of anti-inflammatory drugs. // Advances in anti-rheumatic therapy. – Boca Raton, CRC Press, 1996. – P. 59-111.

8 Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH an electron-opaque stain in electron microscopy //J. Cell Biol. – 1963. – V. 17. – P. 208-212.

9 Stable RNA nanoparticles as potential new generation drugs for cancer therapy /Y. Shu, F. Pi, A. Sharma et al. //Advanced drug delivery reviews. – 2014. – V. 66. – P. 74-89.

10 The new world of RNAs /D. B. Dogini, V. D. Pascoal, S. H. Avansini et al. //Genet. Mol. Biol. – 2014. – V. 37 (Suppl. 1). – P. 285-293.

11 Therapeutic Effects of Ribonucleinate (Ribonucleotides) in Immuno-Inflammatory and Arthritic Diseases /G. Stommel, S. Schuehlein, K. H. Schuehlein, K. D. Rainsford //Prog. Drug Res. – 2015. – V. 70. – P. 35-89.

Поступила 24.11.2017

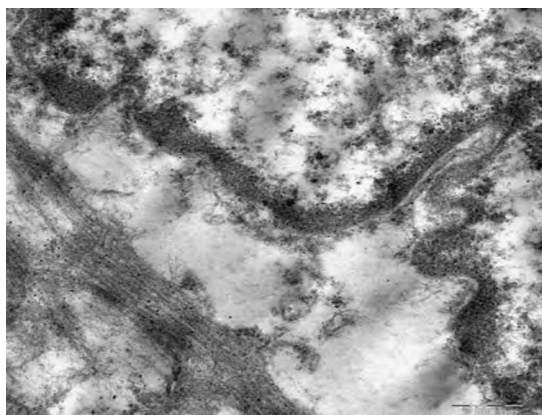


Рисунок 1 – Ультраструктура миокарда при воздействии доксорубицином. Агрегация ядерного хроматина, деструкция наружной ядерной мембраны, перинуклеарный отек. Лизис миофибрилл. Электроннограмма

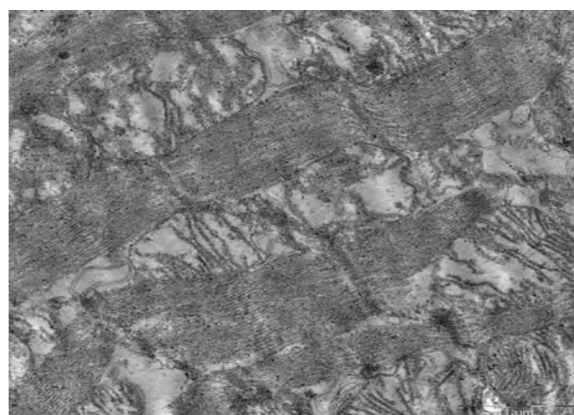


Рисунок 2 – Ультраструктура миокарда при воздействии доксорубицином. Набухание митохондрий, просветление матрикса, лизис, гомогенизация крист, деструкция мембран. Электроннограмма

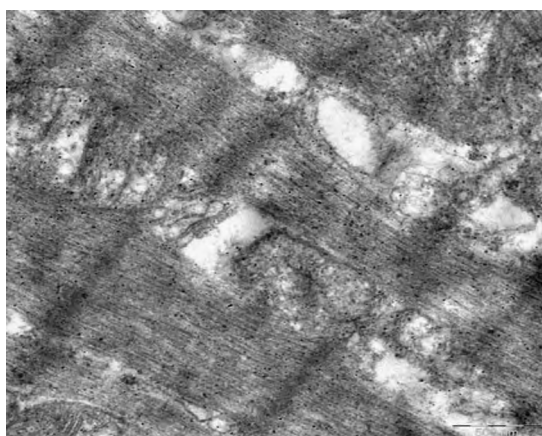


Рисунок 3 – Ультраструктура миокарда при воздействии доксорубицином. Вакуолизация митохондрий, деструкция мембран Т- и L- системы. Электроннограмма

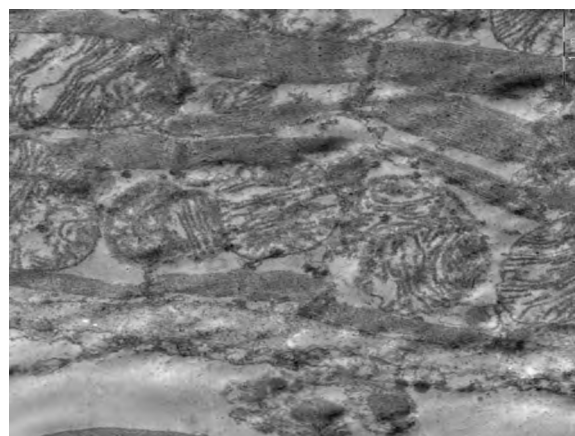


Рисунок 4 – Ультраструктура миокарда при воздействии доксорубицином. Неупорядоченное расположение миофибрилл с очагами лизиса и потерей Z- и M-полос. Электроннограмма

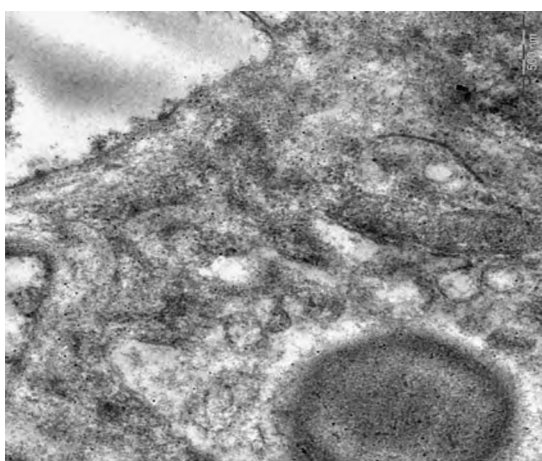


Рисунок 5 – Ультраструктура миокарда при воздействии доксорубицином. Субсарколемный отек, деструкция капилляра. Электроннограмма

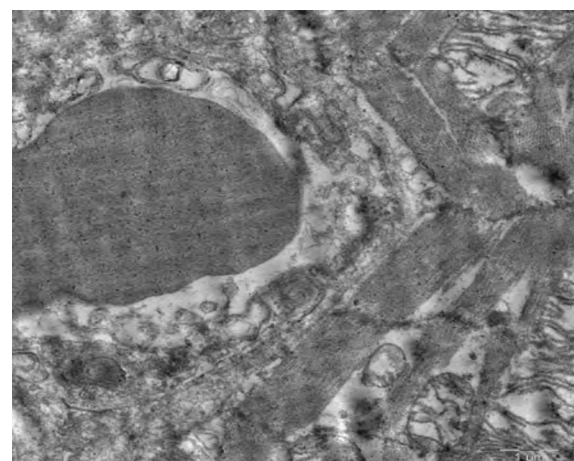


Рисунок 6 – Ультраструктура миокарда при воздействии доксорубицином. Деструкция эндотелия капилляра интерстициального пространства. Электроннограмма

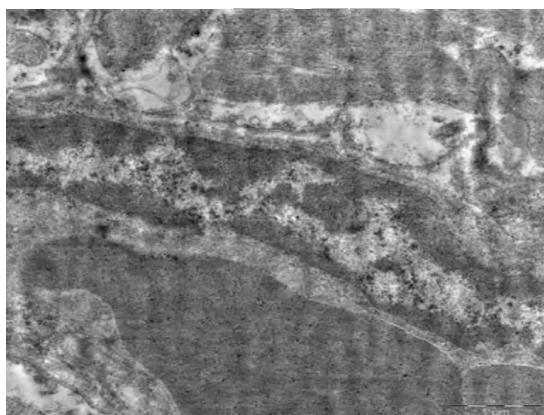


Рисунок 7 – Ультраструктура миокарда после лечения RN-13. Эндотелий кровеносных капилляров с крупным гиперхромным ядром. Электроннограмма.

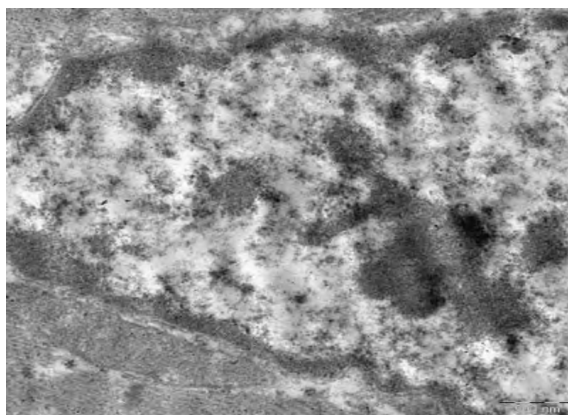


Рисунок 8 – Ультраструктура миокарда после лечения RN-13. Ядро кардиомиоцита с высоким содержанием эухроматина и узким перинуклеарным пространством. Электроннограмма

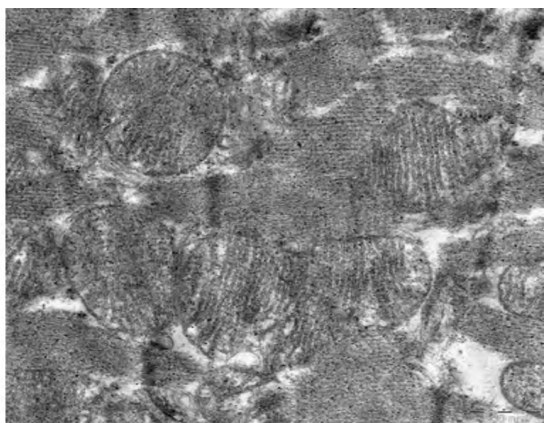


Рисунок 9 – Ультраструктура миокарда после лечения RN-13. Митохондрии с мелкоочаговым просветлением матрикса и часто расположенными кристами. Электроннограмма

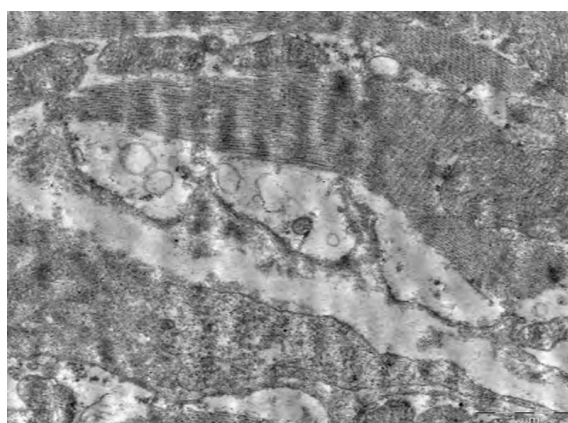


Рисунок 10 – Ультраструктура миокарда после лечения RN-13. Явление субсарколемного отека. Вакуолизация саркоплазматического ретикулума. Электроннограмма

Z. T. Shulgau¹, Sh. D. Sergazy^{1, 2}, G. V. Fedotovskikh³, T. N. Krivoruchko¹, O. V. Tolmacheva¹, B. A. Sagindykova¹, N. N. Kenzhebayeva⁴, S. K. Zhaugasheva⁵, A. Ye. Gulyayev^{1, 2}
CARDIOPROTECTIVE PROPERTIES OF RNA-CONTAINING DRUG RN-13 ON THE MODEL OF DOXORUBICINE INDUCED CARDIOMYOPATHY

¹RSE «National Center for Biotechnology» (Astana, Kazakhstan); ²PI «National Laboratory Astana» (Astana, Kazakhstan); ³«National Scientific Medical Center» JSC (Astana, Kazakhstan); ⁴«RE-BIOMED» scientific and practical center» LLP (Astana, Kazakhstan); ⁵Karaganda state medical university (Karaganda, Kazakhstan)

The results of the evaluation of cardioprotective properties of the RNA-containing drug RN-13, studied under the conditions of the doxorubicin induced cardiomyopathy in rats are presented in the article. The model of doxorubicin induced cardiomyopathy is reproduced by single intraperitoneal administration of doxorubicin.

Electron microscopic examination of the myocardium under the influence of doxorubicin revealed pronounced ultrastructural changes in the organelles of cardiomyocytes. The effect of doxorubicin has led to the aggregation of nuclear chromatin, the disintegration of the outer nuclear membrane, and perinuclear edema in cardiomyocytes. Significantly increased mitochondria with a sharp bleaching of the matrix, lysis, homogenization of the cristae, individual mitochondria are vacuolated. A sharp expansion and destruction of the T- and L-system of the sarcoplasmic reticulum is noted, the tubules of the granular endoplasmic reticulum are expanded and degranulated. Myofibrils are disorderly located with foci of lysis and loss of Z- and M- bands. Subsarcolemmic edema, loosening of the sarcolemma and plasma membrane were observed. The toxic effect of doxorubicin caused severe ultrastructural changes in the capillaries of the interstitial space and cardiomyocytes.

In accordance with the electronogram, cardiomyocytes under the action of RN-13 contained a nucleus with a large nucleolus, a high euchromatin content, a narrow perinuclear space. Mitochondria are large with fine focal clarifi-

cation of the matrix, densely located cristae. Membranes of the T- and L-systems of the sarcoplasmic reticulum remained expanded, but the tubules of the granular endoplasmic reticulum are narrow with an abundance of fixed ribosomes. There were phenomena of subsarcolemic and intracellular edema. Electron microscopic examination of the myocardium after treatment with RN-13 drug against the background of toxic effects of doxorubicin showed good preservation of the endothelium of the blood capillaries.

RNA-containing drug RN-13 on the model of doxorubicin cardiomyopathy reduces the morphological signs of cardiotoxic effect of doxorubicin, which can be regarded as a manifestation of cardioprotective effect.

Key words: doxorubicin, cardiomyopathy, RN-13, RNA-containing drug

З. Т. Шульгау¹, Ш. Д. Серғазы^{1, 2}, Г. В. Федотовских³, Т. Н. Қриворучко¹, О. В. Толмачева¹, Б. А. Сагиндыкова¹, Н. Н. Кенжебаева⁴, С. К. Жаугашева⁵, А. Е. Гуляев^{1, 2}

ДОКСОРУБИЦИНДІ КАРДИОМИОПАТИЯ МОДЕЛІНДЕ RN-13 РНҚ ПРЕПАРАТЫНЫҢ КАРДИОПРОТЕКТОРЛЫ ӘСЕРІ
¹«Ұлттық биотехнология орталығы» РМҚ (Астана, Қазақстан); ²«National Laboratory Astana» ЖМ (Астана, Қазақстан); ³«Ұлттық ғылыми медициналық орталық» АҚ (Астана, Қазақстан); ⁴«RE-BIOMED» ғылыми-практикалық орталығы» ЖШС (Астана, Қазақстан); ⁵Қарағанды мемлекеттік медицина университеті (Қарағанды, Қазақстан)

Мақалада егеуқұйрықтардың доксорубицинді кардиомиопатия моделі жағдайында зерттелген RN-13 РНҚ препаратының кардиопротекторлық қасиетін бағалау қорытындылары келтірілген. Доксорубицинді кардиомиопатия моделі доксорубицинді құрсақ қуысына енгізу жолымен алынған.

Доксорубицин әсерінен электронды микроскопиялық зерттеу кезінде кардиомиоцит органеллаларының ультрақұрылымы айтарлықтай өзгергенін айқындайды. Доксорубицин әсері ядерлі хроматин агрегациясы, сыртқы ядерлі мембранасының талшықтануына және кардиомиоциттердің перинуклеарлы ісінуіне әкелді. Матриктің саңылаулануымен митохондриялардың үлкеюімен, лизисімен, кристалдардың гомогенизациясы, жеке митохондриялардың вакуолизі айқын байқалды. Саркоплазматикалық ретикулумның Т- және L- жүйесінің декструкциясы және лезде үлкеюі, түйіршікті эндоплазматикалық жолының үлкеюі және декструкциясы байқалды. Миофибриллардың Z- және M- жолақтарының лизис ошақтарына өте жақын тәртіпсіз орналауы. Плазматикалық мембраналардың субсарколемді ісінуі, сарколемдердің қопсынуы байқалды. Доксорубицинді токсикалық әсері интерстециялды кеңістік капиллярларының және кардиомиоциттердің ауыр ультрақұрылымдық өзгерісіне әкелді.

Электрограммаға сәйкес RN-13 препаратының әсерінен кардиомиоциттердің ядролары үлкен ядролықтардан, көп мөлшерде эухроматин және жіңішке перинуклеарлы кеңістікпен ерекшеленді. Кіші ошақты саңылаулы матрикс ірі митохондриялармен кристалл түрінде тығыз орналасқан. Саркоплазматикалық ретикулумының Т- және L- жүйелері кеңейген күйінде, алайда түйіршікті эндоплазматикалық ретикулум жолдары бекітілген рибосомалар әсерінен тар қалыпта орналасқан. Субсарколемді және жасушаішілік ісіну әсерінен қалған құбылыстар байқалады. Миокардтың электрономикроскопиялық зерттеуі кезінде RN-13 РНҚ-лы препаратымен емдеу кезінде доксорубицинді токсикалық әсерінен қан капиллярлар эндотелиінің жақсы сақталғанын көрсетті.

РНҚ-лы RN-13 доксорубицинді кардиомиопатия моделіндегі препарат доксорубицинді кардиотоксикалық әсерін азайтады, ол оның кардиопротекторлық әсері бар екенін көрсетеді.

Кілт сөздер: доксорубицин, кардиомиопатия, RN-13, РНҚ-препараты