

Ochranný účinok berberínu na akútnu kardiomyopatiu spojenú s liečbou doxorubicínom

Doxorubicín (DOX) je silné a širokospektrálne antracyklínové chemoterapeutické činidlo, ale kardiotoxické vedľajšie účinky závislé od dávky obmedzujú jeho klinickú aplikáciu. Táto toxicita je úzko spojená s tvorbou radikálov reaktívnych foriem kyslíka (ROS) počas metabolizmu DOX. Táto štúdia skúmala účinky berberínu (Ber) na akútne poškodenie srdca vyvolané DOX na modeli potkanov a analyzovala jeho mechanizmus v kardiomyocytoch *in vitro*. Hladiny sérovej kreatínkinázy (CK), izoenzymu kreatínkinázy (CK-MB) a malondialdehydu (MDA) boli významne zvýšené v skupine DOX v porovnaní s kontrolnou skupinou. Toto zvýšenie bolo sprevádzané srdcovým histopatologickým poškodením a poklesom kardiomyocytovej superoxiddismutázy (SOD) a katalázy (CAT). Hladiny CK, CK-MB a MDA sa znížili a hladiny SOD a CAT sa zvýšili v skupine liečenej Berom v porovnaní so skupinou DOX. Ber zlepšil DOX-indukovaný nárast koncentrácie cytosolického vápnika ($[Ca^{2+}]_i$), zmiernil mitochondriálne preťaženie Ca^{2+} a obnovil DOX-indukovanú stratu mitochondriálneho membránového potenciálu *in vitro*. Tieto výsledky preukázali, že Ber vykazoval ochranné účinky proti DOX-indukovanému poškodeniu srdcového tkaniva voľnými radikálmi, potenciálne prostredníctvom inhibície intracelulárneho zvýšenia Ca^{2+} a zoslabenia mitochondriálnej dysfunkcie.

ÚVOD

Doxorubicín (DOX) je účinné chemoterapeutické činidlo, ktoré sa široko používa na liečbu mnohých typov novotvarov. Avšak závažné kardiotoxické vedľajšie účinky, ktoré môžu spôsobiť arytmiu a srdcové zlyhanie, obmedzujú jeho klinickú aplikáciu. Na kardiotoxicite DOX sa podieľa viacero mechanizmov, vrátane peroxidácie lipidov a znížených hladín glutatiónu, preťaženia vápnikom a mitochondriálnej dysfunkcie prostredníctvom zvýšenia mitochondriálneho vápnika a tvorby reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Zvýšený oxidačný stres a deficit antioxidantov zohrávajú kľúčovú úlohu pri kardiotoxicite vyvolanej DOX. Predchádzajúce údaje naznačujú, že dysregulácia manipulácie s vápnikom a funkcie mitochondrií prispievajú k DOX-indukovanej kardiotoxicite. Na elimináciu jeho kardiotoxicity je možné kombinovať viacero kardioprotektívnych liekov alebo sa očakáva, že zníženie dávok na prijateľnú úroveň zvýši jeho účinnosť. Väčšina týchto pokusov mala priaznivé účinky, ale hľadanie účinnejších stratégií proti komplikáciám vyvolaným DOX dosiahlo malý úspech. Preto sa pacientom s neoplastickými ochoreniami súbežne s DOX podávajú ďalšie adjuvantné lieky, aby sa znížila kardiotoxicita vyvolaná DOX alebo aby sa zvýšili jej terapeutické účinky.

Berberín (Ber) je izochinolínový alkaloid, ktorý bol pôvodne extrahovaný z tradičnej čínskej rastliny *Coptis chinensis* (Huang Lian) a je osvedčenou liečbou hnačky v tradičnej čínskej medicíne. Ber vykazuje širokú škálu farmakologických aktivít, vrátane: Antioxidačných vlastností na zmiernenie tvorby reaktívnych foriem kyslíka (ROS) v rôznych tkanivách; antidiabetikum; antihyperlipidemikum; protizápalové; protinádorové; a kardioprotektívne účinky. Predpokladali sme, že antioxidačné a kardioprotektívne účinky Ber môžu vykazovať ochranné účinky proti kardiomyopatii vyvolanej DOX. Táto experimentálna štúdia skúmala možné ochranné účinky Ber proti akútnej DOX-indukovanej kardiotoxicite indukovanej v modeli potkanov. Účinok Ber na zmeny v známých indikátoroch kardiotoxicity

a oxidačného stresu vrátane aktivity sérovej kreatínkinázy (CK), aktivity izoenzymu kreatínkinázy (CK-MB) a sérovej a myokardiálnej superoxid-dismutázy (SOD), malondialdehydu (MDA) a katalázy (CAT) obsah sa skúmal. Táto štúdia môže podporiť užitočnosť Ber ako bezpečného, klinicky schváleného lieku pri liečbe rakoviny.

Materiál a metódy

Drogy a chemikálie

DOX poskytol Lingnan Pharmaceutical, Ltd. (Guangzhou, Čína). Ber poskytla spoločnosť Acros Organics (Geel, Belgicko). Fluo3-AM bol zakúpený od Sigma-Aldrich; Merck KGaA (Darmstadt, Nemecko). Testovacie súpravy MDA, CAT a SOD boli zakúpené od Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute (Nanjing, Čína). Testovacie súpravy CK a CK-MB boli zakúpené od spoločnosti Sysmex Corporation (Kobe, Japonsko). Rodamín (Rh-123) a Rhod-2-acetoxymetyl (rhod-2-AM) boli zakúpené od Molecular Probes; Thermo Fisher Scientific, Inc., (Waltham, MA, USA). Pracovné roztoky Harris Haematoxylin a eoZín boli zakúpené od Baso Diagnostics Inc. Zhuhai (New Taipei City, Taiwan).

Zvieratá a liečba

Všetky experimenty boli uskutočnené v súlade s Príručkou pre starostlivosť a používanie laboratórnych zvierat a boli preskúmané a schválené Etickou komisiou pre používanie experimentálnych zvierat na Hebei Medical University (Shijiazhuang, Čína). Potkany Sprague-Dawley (SD) s hmotnosťou 200–250 g boli získané z lekárskeho laboratória Hebei Medical University. Zvieratá sa aklimatizovali na laboratórne prostredie počas 1 týždňa v štandardných experimentálnych podmienkach (12 hodín svetlo: 12 hodín tma) a umožnili im prístup k potrave a vode *ad libitum*. Pokusy na zvieratách sa uskutočňovali v súlade s usmerneniami National Institute of Health pre experimentálne použitie zvierat. Potkany boli náhodne rozdelené do nasledujúcich piatich skupín po 10 zvierat: skupina ošetrovaná vodou (kontrolná) skupina, skupina ošetrovaná DOX a ošetrovanie DOX plus Ber v dávkach 5, 10 a 20 mg/kg. Kontrolná skupina a skupina DOX dostávali destilovanú vodu perorálne počas 10 po sebe nasledujúcich dní. Ber sa podával vo vyššie uvedených dávkach perorálne raz denne počas 10 po sebe nasledujúcich dní. Objem dávky bol 1 ml/100 g telesnej hmotnosti. Všetkým potkanom bola intraperitoneálne podaná jedna dávka DOX 20 mg/kg v deň 8, s výnimkou kontrolnej skupiny. Zvolená dávka bola založená na našej predchádzajúcej štúdií.

Odber vzoriek a biochemické testy

Všetky potkany boli anestetizované 48 hodín po injekcii DOX a vzorky krvi boli odobraté pred usmrtením. Sérum bolo oddelené pre testy CK a CK-MB. Srdce sa rýchlo izolovalo, vysušilo sa na filtračnom papieri a odvážilo sa. Srdce sa rozrezalo a pripravilo na histopatologické vyšetrenie a jedna časť sa pripravila ako 10 % homogenáty v ľadovo chladnom fyziologickom roztoku na stanovenie MDA, aktivity CAT a obsahu SOD. Celkový obsah proteínu sa detegoval pomocou súpravy na stanovenie proteínu kyseliny bicinchonínovej (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc.) a aktivity MDA, CAT a SOD v srdcovom tkanive sa vyjadrili ako jednotky/mg proteínu.

Histopatologické vyšetrenia

Na analýzu histopatologických zmien srdcového tkaniva sa jedna časť srdca fixovala v 10 % pufrovanom formalíne, zaliela sa do parafínu a dehydratovala sa vo vzostupnej sérii etanolu (70, 80, 96 a 100 %). Vzorky tkaniva boli zaliata do parafínu a narezané na plátky s hrúbkou 5 um. Rezy boli zafarbené pri teplote miestnosti pracovným roztokom hematoxylinu a 1%

eozínom (H&E) počas 2 minút na histologickú analýzu pod svetelným mikroskopom (zväčšenie, x 200, Olympus BX-50; Olympus Corporation, Tokio, Japonsko).

Všeobecné pozorovanie toxicity

Na stanovenie úmrtnosti v každej skupine sa použilo celkom 10 zvierat. Humánne koncové body boli strata hmotnosti nad 15 % pôvodnej hmotnosti alebo zviera v stave vyčerpania. Všeobecné podmienky, úmrtnosť a telesná hmotnosť zvierat sa sledovali denne až do konca experimentu. Akumulácia tekutiny v brušnej dutine bola hodnotená na konci experimentu po otvorení brucha a hodnotená na stupnici od 0 do 3+ · kde: 0, žiadne; 1+ · mierne; 2+ ·, mierny; a 3+ · ťažké.

Akútna izolácia srdcových myocytov

Jednotlivé srdcové myocyty boli enzymaticky izolované zo srdca dospelých samcov potkanov, ako už bolo opísané. Stručne povedané, SD potkany (200 - 250 g) boli anestetizované pomocou pentobarbitalu sodného (50 mg / kg, intraperitoneálne). Srdcia boli rýchlo vyrezané, pripravené cez aortu a perfundované na modifikovanom Langendorffovom prístroji roztokom Tyrode bez vápnika pri 37 °C, po čom nasledovala 0,6 % kolagenáza II v roztoku Tyrode bez Ca²⁺ na strávenie srdca. Izolované komorové myocyty sa udržiavali v Krebsovom roztoku. Všetky experimenty sa uskutočnili do 6 hodín po izolácii komorových myocytov.

Meranie koncentrácie vápnika v cytosóle [Ca²⁺]

Izolované myocyty sa pripravili ako je uvedené vyššie a naplnili sa 20 umol/l membránovo permeabilným pracovným roztokom Fluo3-AM obsahujúcim 0,03 % pluronic F-127 pri 37 °C počas 60 minút. Bunky boli superfúzané s čerstvým Tyrodovým roztokom trikrát pri 25 °C, aby sa umožnila deesterifikácia Fluo3-AM. Bunky boli umiestnené v komore na stolíku inverzného mikroskopu. Boli použité iba bunky s tyčinkovým tvarom a viditeľnými pruhmi. Fluo3-AM fluorescencia v bunkách bola excitovaná pri 488 nm a fluorescenčná emisia bola zaznamenaná pri 530 nm pomocou fotonásobiča. Fluorescenčný signál sa detegoval pomocou konfokálneho laserového skenovacieho systému (Leica TCS-SP II; Leica Microsystems GmbH, Nemecko). Meranie vápnika je vyjadrené ako relatívna intenzita fluorescencie ((FI-FI₀) / FI₀ · %; FI₀ : kontrola; FI: podanie liečiv). Bunky boli perfundované normálnym roztokom Tyrode počas 2 minút a perfundované roztokom Tyrode obsahujúcim Ber počas 15 minút. Z každej bunky sa naskenovalo celkom 50–100 obrázkov a údaje sa analyzovali konfokálnym laserovým mikroskopickým systémom (Leica TCS SP2, Mannheim, Nemecko).

Mitochondriálna koncentrácia Ca²⁺ a meranie membránového potenciálu

Mitochondriálny membránový potenciál ($\Delta\Psi_m$) bol vizualizovaný v kardiomyocytoch zafarbených fluorescenčnou sondou Rh-123. Myocyty sa inkubovali s 0,5 uM Rh-123 počas 10 minút pri 37 °C. Fluorescencia Rh-123 bola detegovaná pri emisnej vlnovej dĺžke 490 nm a zelená emisná fluorescencia bola excitovaná pri 530 nm, aby sa analyzovala $\Delta\Psi_m$. Mitochondriálna koncentrácia Ca²⁺ [(Ca²⁺)_m] sa merala pomocou farbiva rhod-2-AM snímajúceho Ca²⁺ v naložených bunkách. Myocyty boli vystavené 10 uM rhod-2 acetoxymetylesteru počas 120 minút pri 4 °C a prenesené na 37 °C na ďalších 30 minút v roztoku Tyrode. Fluorescencia Rhod-2 bola excitovaná prostredníctvom excitácie pri 540 nm a na analýzu [Ca²⁺]_m sa použil 570 nm pásmový bariérový filter. Fluorescenčný signál bol detegovaný pomocou konfokálneho laserového skenovacieho systému uvedeného vyššie. Oblasti paličkových kardiomyocytov boli načrtnuté/zvýraznené, aby predstavovali zmeny intenzity fluorescencie v priebehu času, a intenzita vybranej oblasti obrazu sa

analyzovala pomocou konfokálneho laserového mikroskopického systému. Intenzita fluorescencie sa normalizovala na počiatočnú hodnotu (F_0) zaznamenanú v normálnom roztoku Tyrode v každom experimente a pomer hustoty predstavoval relatívnu fluorescenciu: $(F_1 - F_{I0}) / F_{I0} \times 100$, kde F_{I0} predstavuje kontrolu a F_1 predstavuje skupiny liečené liekom. Potkanie kardiomyocyty boli ošetrené 0,1 alebo 1 μM Ber počas 20 minút a vystavené 1 μM DOX počas 15 minút, čo je minimálny čas potrebný na účinné zmeny v $[\text{Ca}^{2+}]_m$ a $\Delta\Psi_m$.

Štatistická analýza

Všetky údaje sú prezentované ako priemer \pm štandardná odchýlka. Štatistické testy boli vykonané pomocou Microsoft Excel 2010 (číslo verzie, 14.0.4760.1000; Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) a SPSS pre Windows (verzia 11.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Po jednosmernej analýze rozptylu sa kvantitatívne údaje analyzovali s post hoc kontrastmi pomocou Fisherovho testu najmenej významného rozdielu. Na analýzu rozdielu v skóre závažnosti poranenia srdca medzi rôznymi liečebnými skupinami sa použil test chí-kvadrát. $P < 0,05$ sa považovalo za štatisticky významný rozdiel.

Výsledky

Účinky Ber na telesnú hmotnosť zvierat a prežitie pri kardiotoxicite indukovanej DOX

Ošetrovanie DOX počas dvoch dní znížilo telesnú hmotnosť potkana v porovnaní s kontrolnou skupinou (235 ± 35 vs. 266 ± 15 g; $P < 0,01$). Liečba s 5, 10 a 20 mg/kg Ber nevykazovala žiadne výrazné zvýšenie účinkov na telesnú hmotnosť (231 ± 36 , 226 ± 16 a 253 ± 54 g, v tomto poradí; $P > 0,05$ oproti samotnému DOX). Medzi piatimi skupinami nebol významný rozdiel v pomere hmotnosť srdca/telesná hmotnosť ($3,0 \pm 0,4$ mg/g v kontrolnej skupine vs. $3,1 \pm 0,3$ mg/g pri liečbe DOX a $2,8 \pm 0,5$, $3,3 \pm 0,3$ a $2,9 \pm 0,3$ mg/g v skupinách Ber 5, 10 a 20 mg/kg, v danom poradí).

Účinky Ber na všeobecnú toxicitu pri kardiotoxicite indukovanej DOX

Celkovo 2 potkany v skupine liečenej iba DOX podľahli 2 dni po injekcii DOX. V skupinách liečených Ber+DOX nebola pozorovaná žiadna mortalita. Všetky krysy, ktoré prežili v skupine liečenej iba DOX, sa zdali slabé, s ošúchanou srstou a vyvinul sa u nich svetložltý nádych. Tieto zvieratá vykazovali významný pokles telesnej hmotnosti v porovnaní so skupinami liečenými Ber+DOX. Pozoruhodné je, že u týchto zvierat sa vyvinulo kongestívne zlyhanie srdca, ktoré sa prejavilo ako výrazný ascites počas pitvy. Charakteristickými hrubými patologickými zmenami u potkanov liečených iba DOX boli nadmerné množstvá perikardiálnych, pleurálnych a peritoneálnych tekutín. Maximálny objem ascitu vykazovaný jedným zvieratkom v skupine liečenej len DOX bol 11,5 ml. V porovnaní so samotným DOX ($2,9 \pm 1,8$ %) sa percento priemerného maximálneho objemu ascitu k telesnej hmotnosti zvierat a zjavne znížilo v skupinách liečených 5, 10 a 20 mg/kg Ber+DOX ($1,8 \pm 0,9$, $1,0 \pm 0,1$ a $1,4 \pm 1,1$ %; $P < 0,05$). Skóre intenzity výpotku bolo závažné u 100 % zvierat liečených iba DOX v porovnaní s 20–30 % závažných skóre v skupinách Ber+DOX (Tabuľka I).

Effect of Ber on DOX-induced abdominal, pleural and pericardial effusion intensity scores in surviving rats.

Group	n	Effusion intensity score							
		0		+		++		+++	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Con	10	10	100	0	0	0	0	0	0
DOX	8	0	0	0	0	0	0	8	100 ^a
Ber (5 mg/kg)	10	0	0	4	40	3	30	3	30 ^{a,b}
Ber (10 mg/kg)	10	1	10	4	40	2	20	3	30 ^{a,b}
Ber (20 mg/kg)	10	1	10	5	50	2	33.3	2	20 ^{a,b}

Con, control; DOX, doxorubicin; Ber, berberine. 0, none; +, mild; ++, moderate; +++, severe. Statistical evaluation was performed using the χ^2 -test.

^aP<0.01 vs. Con.

^bP<0.01 vs. DOX.

Ber zmiernuje oxidačné poškodenie spôsobené DOX

Hladiny CK-MB a CK v sére sa široko používajú ako klinické markery oxidačného stresu, ktoré naznačujú poškodenie myokardu (Tabuľka II). Oxidačný stres bol evidentný v srdcových myocytoch skupín DOX s významným zvýšením hladín CK a CK-MB v sére v porovnaní s kontrolou ($P < 0,01$) a liečba Ber zmiernila tieto zvýšenia v závislosti od dávky ($P < 0,05$). Hodnoty CK a CK-MB v skupinách Ber 10 a 20 mg/kg boli takmer ekvivalentné kontrolným hladinám. Sérum a srdcové tkanivá potkanov liečených iba DOX odhalili významné zvýšenie MDA a znížený obsah CAT a SOD v porovnaní s kontrolnou skupinou. Koncentrácie MDA, CAT a SOD sa výrazne obnovili v skupinách Ber+DOX v porovnaní so skupinou, ktorá dostávala iba DOX. Avšak 5 mg/kg Ber nezabránilo DOX-indukovanému zvýšeniu srdcových enzýmov.

Serum levels of CAT, SOD, MDA, CK, and CK-MB activities following acute DOX intoxication and protective activity by Ber.

Group	n	CAT (U/ml)	SOD (U/ml)	MDA (mmol/ml)	CK (U/l)	CK-MB (U/l)
Con	10	29.72±11.68	41.35±3.60	40.42±6.73	727±261	1,843±659
DOX	8	19.79±4.53 ^a	23.41±12.10 ^b	55.37±6.20 ^b	1,426±540 ^b	3,404±939 ^b
Ber (5 mg/kg)	10	28.53±7.72 ^d	36.44±9.65 ^c	46.93±7.90 ^c	1,069±366 ^a	2,694±571 ^a
Ber (10 mg/kg)	10	25.70±5.16 ^c	44.76±3.02 ^{a,d}	47.98±8.81 ^c	991±271 ^c	2,395±618 ^c
Ber (20 mg/kg)	10	27.51±10.20 ^c	41.51±3.77 ^d	40.47±18.21 ^c	792±378 ^c	2,123±865 ^c

Data are presented as mean ± standard deviation. Con, control; DOX, doxorubicin; Ber, berberine; CAT, catalase; MDA, malondialdehyde; SOD, superoxide dismutase; CK, creatine kinase; CK-MB, creatine kinase isoenzyme.

^aP<0.05

^bP<0.01 vs. Con

^cP<0.05

^dP<0.01 vs. DOX.

Effect of Ber on peroxidative alterations induced by acute DOX intoxication in rat cardiac tissue.

Group	n	CAT (U/mg prot)	SOD (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)
Con	10	52.0±4.5	54.3±8.5	28.73±3.94
DOX	8	37.9±13.4 ^b	42.1±6.2 ^b	42.59±4.93 ^b
Ber (5 mg/kg)	10	48.3±9.9	46.15±7.25 ^a	42.50±7.22 ^b
Ber (10 mg/kg)	10	52.6±1.7 ^d	49.32±7.12 ^c	35.41±5.38 ^{a,d}
Ber (20 mg/kg)	10	52.9±2.6 ^c	50.97±6.77 ^d	33.00±1.15 ^{b,d}

Con, control; DOX, doxorubicin; Ber, berberine; CAT, catalase; MDA, malondialdehyde; SOD, superoxide dismutase; mg prot, mg protein.

^aP<0.05

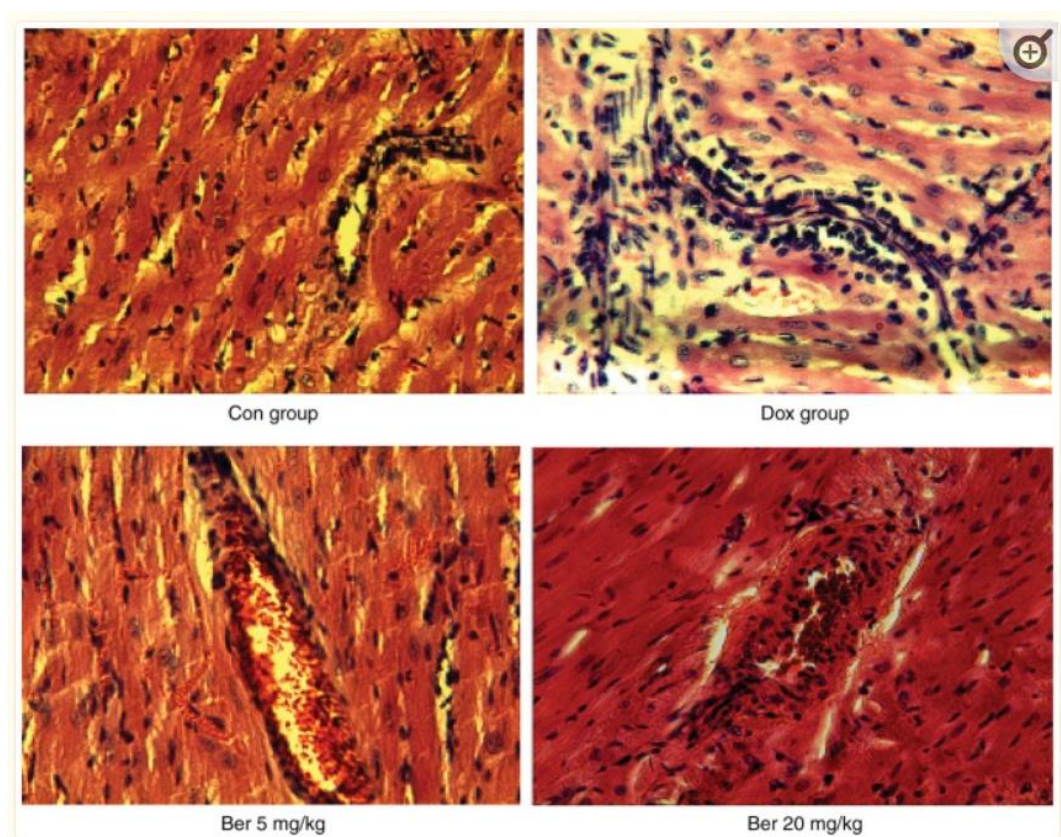
^bP<0.01 vs. Con

^cP<0.05

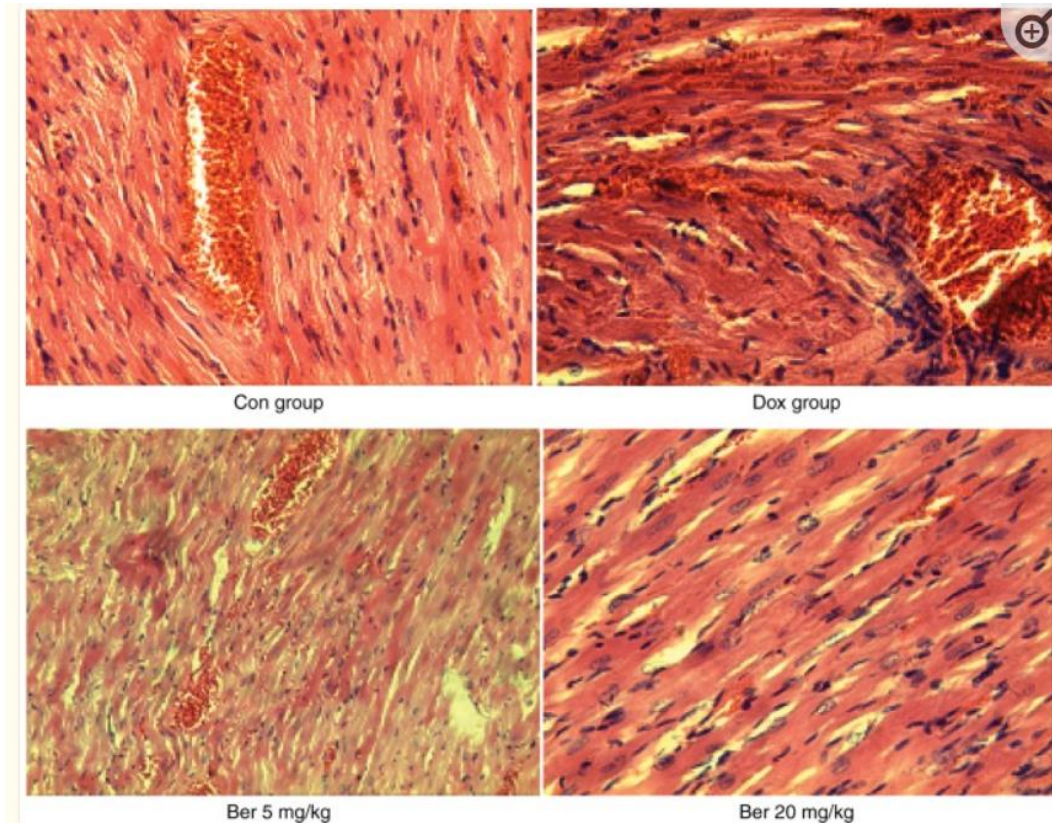
^dP<0.01 vs. DOX. Data are presented as mean ± standard deviation.

Histopatologické vyšetrenie

Kardiotoxicita vyvolaná DOX bola dodatočne hodnotená pomocou rezov zafarbených H&E. Srdcové tkanivo z kontrolných skupín vykazovalo pravidelnú distribúciu buniek a normálnu architektúru myokardu. Histologické vyšetrenie srdcových rezov pomocou H&E farbenia odhalilo, že DOX indukoval kardiomyocytovú cytoplazmatickú vakuolizáciu, intersticiálny edém a infiltráciu zápalových buniek. Lézie myokardu boli oslabené v skupinách Ber+DOX v porovnaní so skupinou so samotným DOX.



Reprezentatívne histopatologické rezy farbenia srdcového tkaniva hematoxylínom a eozínom v rôznych skupinách. V skupine DOX bol pozorovaný výrazný intersticiálny edém a infiltrácia zápalových buniek. Intersticiálny edém a infiltrácia zápalových buniek sa zmiernili v skupine s Ber 5 mg/kg. Minimálna reziduálna infiltrácia zápalových buniek bola pozorovaná v skupine s Ber 20 mg/kg. (zväčšenie, $\times 200$). DOX, doxorubicín; Ber, berberín; Con, normálne srdcové tkanivo.

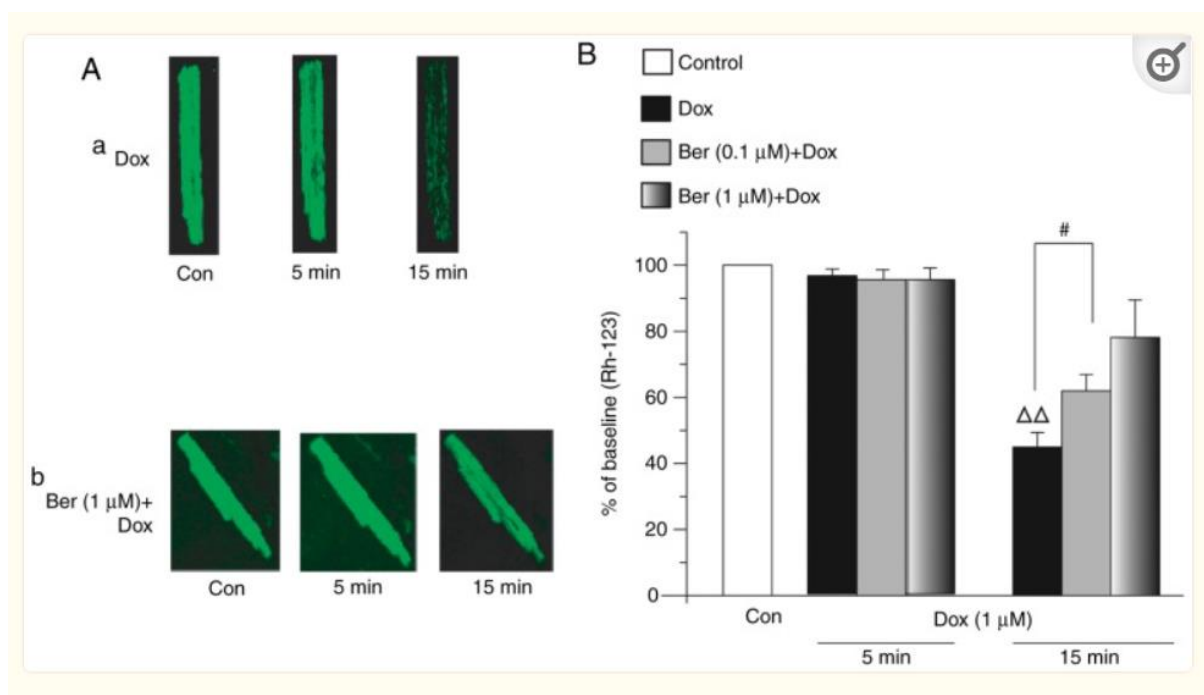


Histologické vyhodnotenie farbenia srdcového tkaniva hematoxylínom a eozínom z neošetrených skupín liečených Dox a Ber (zväčšenie, $\times 200$). V skupine Con sa pozorovala normálna srdcová štruktúra. Krvácanie a nekróza boli pozorované v intersticiálnych srdcových tkanivách skupiny DOX. V skupine s Ber 5 mg/kg sa pozorovalo oslabenie krvácania do srdcových tkanív. V skupine s Ber 20 mg/kg nebolo pozorované žiadne výrazné krvácanie do srdcových tkanív. DOX, doxorubicín; Ber, berberín; Con, normálne srdcové tkanivo.

Účinok Ber na DOX-indukované zvýšenie $[Ca^{2+}]_i$

$[Ca^{2+}]_i$ je kriticke dôležitý pri kontrakcii a relaxácii kardiomyocytov. DOX-indukované zmeny v Ca^{2+} homeostáze sú jedným z možných mechanizmov kardiotoxicity. Preto bol účinok DOX na $[Ca^{2+}]_i$ v izolovaných kardiomyocytoch skúmaný pomocou zmien intenzity fluorescencie kardiomyocytov naplnených Fluo-3 AM. Obr. 3A demonštruje účinky 1 μ M DOX na zvýšenie bazálnej fluorescencie Fluo-3 v prítomnosti alebo neprítomnosti 1 μ M Ber v potkaních kardiomyocytoch. Ošetrenie kardiomyocytov 1 μ M DOX výrazne zvýšilo hladiny $[Ca^{2+}]_i$ a kardiomyocyty sa postupne „zaoblili“ do stavu kontraktúry za 15 minút (Obr. 3A-a). Kardiomyocyty liečené Berom sa však nezaoblili (Obr. 3A-b).

Obr. 3Bsumarizuje kvantitatívne údaje. DOX (1 μM) zvýšil hladiny $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na $186,6 \pm 18,3$ % po 5 minútach a $252,1 \pm 11,1$ % po 15 minútach DOX a rozsah zvýšenia $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po 15 minútach bol významne > 5 min ($P < 0,05$). Predbežné ošetrenie s 1 μM Ber významne zoslabilo 1 μM DOX-indukované zvýšenie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na $150,6 \pm 4,7$ % po 5 minútach a $164,2 \pm 10,8$ % po 15 minútach. Tieto výsledky ukázali, že DOX sa zvýšil $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a že Ber toto zvýšenie zoslabil.

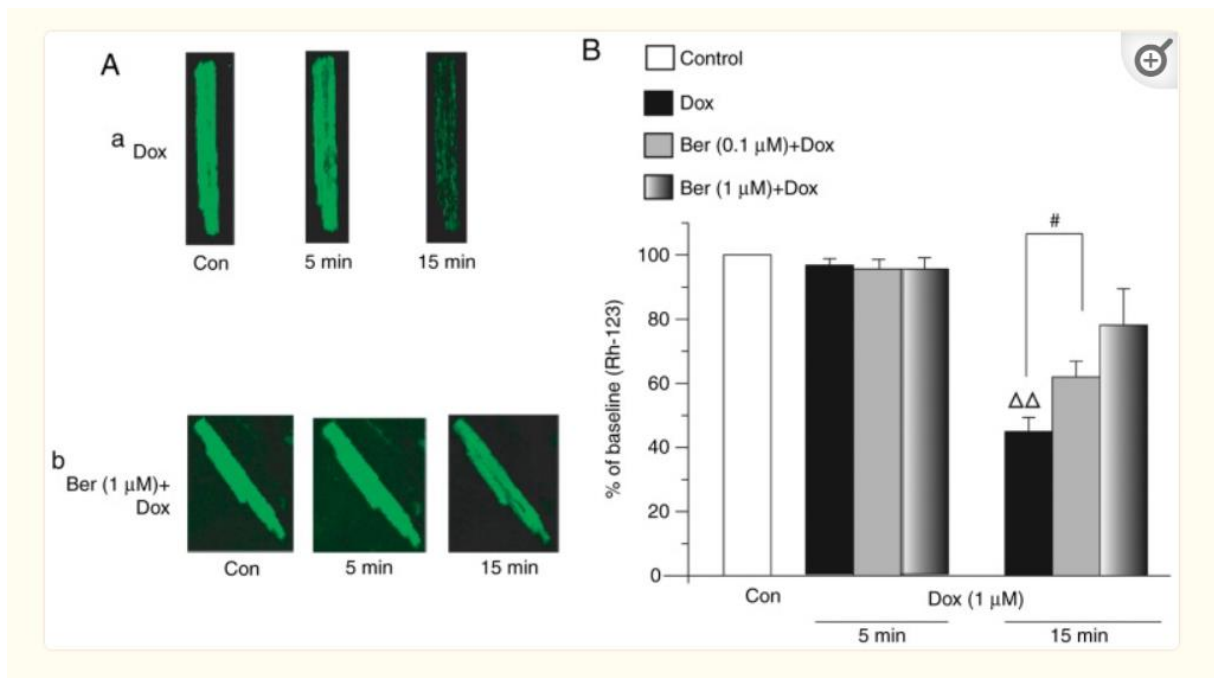


Účinok Ber na DOX-indukované zvýšenie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v izolovaných komorových myocytoch potkanov. (A) (a) Reprezentatívny obraz zmien vo fluorescenčných obrazoch $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v jednotlivých izolovaných komorových myocytoch potkana po expozícii Dox, zaznamenaný po 15 minútach pomocou laserovej konfokálnej mikroskopie. (b) Účinky inkubácie Ber na hladiny $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indukované DOX (zväčšenie, $\times 40$). (B) Účinky Ber inkubácie na DOX-indukované zvýšenie $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Zmeny $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sú vyjadrené ako pomer FI / FIO . ($n=7$ v každej skupine) ($\Delta\Delta P < 0,01$ vs. kontrola, $\#\# P < 0,01$ a $\# P < 0,05$). DOX, doxorubicín; Ber, berberín; con, kontrolná skupina; FIO , kontrola; FI , skupiny liečené liekom; $[\text{Ca}^{2+}]_i$, koncentrácia vápnika v cytosóle.

Účinky Ber na DOX-indukovaný $\Delta\Psi_m$

Mitochondrie sa podieľajú na udržiavaní homeostázy Ca^{2+} predovšetkým vďaka svojej schopnosti tlmiť cytosolický Ca^{2+} . $\Delta\Psi_m$ je centrálny faktor, ktorý riadi akumuláciu Ca^{2+} v mitochondriálnej matici, bunkové dýchanie a syntézu ATP. Meranie $\Delta\Psi_m$ je výkonný nástroj na vyhodnotenie poškodenia mitochondrií pomocou fluorescenčnej sondy Rhodamine 123 (Rh-123). Intenzita mitochondriálnej fluorescence kvantitatívne koreluje so zmenami v $\Delta\Psi_m$. Preto sa účinky DOX na $\Delta\Psi_m$ v potkaních komorových myocytoch skúmali vyhodnotením $\Delta\Psi_m$ v kardiomyocytoch pomocou testu farbenia Rh-123. Zodpovedajúce zmeny v intenzite fluorescence Rh-123 v kardiomyocytoch sa merali 5 a 15 minút po perfúzii 1 μM DOX. **Obr. 4A-a** označuje konfokálne obrazy $\Delta\Psi_m$ po ošetrení buniek počas 15 minút s 1 μM DOX. Výsledky ukázali, že DOX vyvolal výrazný pokles mitochondriálneho membránového potenciálu. Predbežné ošetrenie myocytov 1 μM Ber však významne obnovilo

DOX-indukované zníženie $\Delta\Psi_m$ ($P < 0,05$, Obr. 4B) a zoslabil DOX-indukovaný pokles intenzity fluorescence Rh-123 (Obr. 4A-b). Tieto výsledky ukázali, že Ber zabránil DOX-indukovanej strate mitochondriálneho membránového potenciálu.



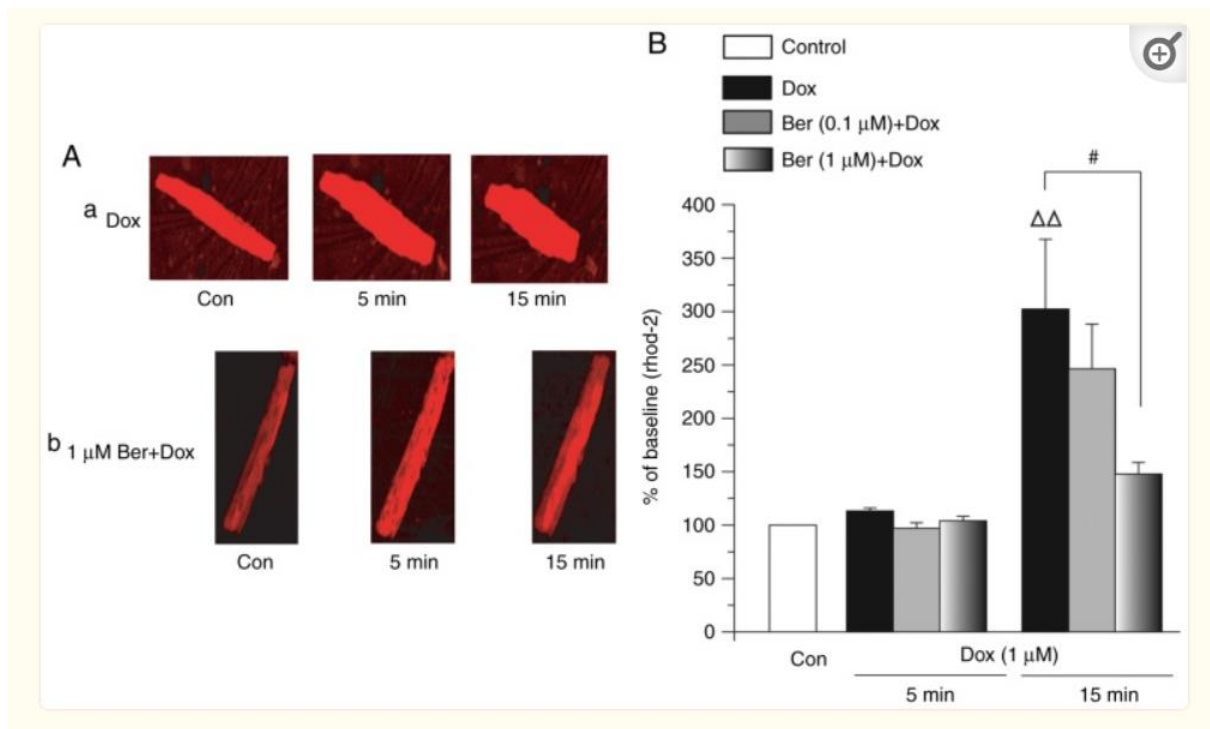
Účinok Ber na $\Delta\Psi_m$ v potkaních komorových myocytoch naplnených rodamínom 123. (A) Konfokálne obrazy $\Delta\Psi_m$ v jednotlivých izolovaných komorových myocytoch potkanov. Bunky boli ošetrené DOX počas 15 minút nasledovne: (a) DOX a (b) Ber (1 μM) + DOX (zväčšenie, $\times 40$). (B) Súhrnné údaje o relatívnych zmenách fluorescence Rh-123 meraných 15 minút pred (Con) a po liečbe liekom. Myocyty boli vopred ošetrené rôznymi koncentraciami Ber počas 1 hodiny, vystavené 1 mM DOX počas 15 minút a testované na $\Delta\Psi_m$. ($n=6$ v každej skupine) ($\Delta\Delta P < 0,01$ vs. kontrola, $\# P < 0,05$). $\Delta\Psi_m$, mitochondriálny membránový potenciál; con, kontrola; DOX, doxorubicín; Ber, berberín.

Účinky Ber na DOX-indukované $[\text{Ca}^{2+}]_m$ preťaženie

Preťaženie Ca^{2+} v mitochondriách môže viesť k mitochondriálnej dysfunkcii a byť dôležitým determinantom toxicity myocytov. Skúmalo sa, či Ber zmiernil nárast DOX-indukovaného preťaženia $[\text{Ca}^{2+}]_m$.

Obr. 5A demonštruje konfokálne obrazy potkaních ventrikulárnych myocytov naplnených Rhod-2 v prítomnosti alebo neprítomnosti 1 μM DOX alebo 1 μM DOX + 1 μM Ber. Pokojový $[\text{Ca}^{2+}]_m$ v intaktných bunkách bol nízky, ako sa ukázalo na slabom základnom signáli fluorescence Rhod-2. Liečba 1 μM DOX významne zvýšila $[\text{Ca}^{2+}]_m$ (Obr. 5A-a). Bunky vykazovali vysokú intenzitu Rhod-2 fluorescence v prítomnosti 1 μM DOX a táto fluorescence sa postupne zvyšovala. Predinkubácia s 1 μM Ber však výrazne znížila intenzitu DOX-indukovaného nárastu fluorescence Rhod-2 (Obr. 5A-b). Obr. 5B naznačuje, že fluorescence Rhod-2 po 15 minútach expozície 1 μM DOX bola $303,2 \pm 65,1$ % základnej hodnoty ($P < 0,001$). Predinkubácia 1 μM Ber zjavne znížila 1 μM DOX-indukovaný nárast fluorescence Rhod-2, ktorý sa znížil na $119,3 \pm 20,2$ % základnej hodnoty

($P < 0,05$). Tieto údaje naznačujú, že aplikácia Ber pred liečbou DOX zabránila zvýšeniu mitochondriálneho preťaženia Ca^{2+} vyvolanému samotným DOX a umožnila normálnu mitochondriálnu funkciu.



Účinok Ber na mitochondriálne preťaženie Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) v komorových myocytoch potkanov zaťažených Rhod 2-AM. (A) Konfokálne obrázky intenzity fluorescence Rhod 2-AM z jedného myocytu (zväčšenie, $\times 40$). Bunky boli ošetrené DOX počas 15 minút nasledovne: (a) DOX-indukované zvýšenie $[\text{Ca}^{2+}]_m$ a (b) Účinky Ber (1 μM) na $[\text{Ca}^{2+}]_m$ spôsobené DOX. (B) Účinok Ber na DOX-indukované preťaženie $[\text{Ca}^{2+}]_m$ po 5 minútach a 15 minútach na zmeny relatívnej intenzity fluorescence Rhod 2-AM. ($n=6$ v každej skupine) ($\Delta\Delta P < 0,01$ vs. kontrola, $\# P < 0,05$). Con, kontrola; DOX, doxorubicín; Ber, berberín; Rhod-2-AM, Rhod-2-acetoxymetyl; $[\text{Ca}^{2+}]_i$, koncentrácia vápnika v cytosóle.

Diskusia

DOX je jedným z najúčinnjších protinádorových antibiotík a očakávajú sa nové metódy na zníženie alebo prevenciu kardiotoxických vedľajších účinkov DOX. Kardiotoxicita vyvolaná DOX sa prejavuje ako akútne účinky (atriálne a ventrikulárne dysrytmie), ktoré sa líšia od prechodných elektrokardiografických abnormalít až po kardiomyopatiu závislú od dávky a kongestívne srdcové zlyhanie. Predchádzajúca štúdia kardiotoxicity DOX preukázala, že model s jednou vysokou dávkou je široko používaný, pretože vykazuje určité charakteristiky kardiotoxicity vyvolanej DOX, ktorá je ekvivalentná jednej injekcii vysokej dávky u pacientov s rakovinou.

Ber hydrochlorid je účinný antioxidant a lapač voľných radikálov, ktorý zabraňuje tvorbe ROS a má ochranné účinky na srdcové, pečenné a obličkové funkcie. Naša predchádzajúca štúdia tiež preukázala, že Ber vykazoval ochranný účinok na akútnu hepatorenálnu toxicitu vyvolanú DOX u potkanov. Nie je známe, či Ber má ochranný účinok proti poškodeniu srdca

vyvolanému DOX. Množstvo kardioprotektívnych činidiel, vrátane dexrazoxánu, amifostínu a probukolu, má obmedzenú hodnotu v boji proti DOX kardiotoxicite a zlepšuje jeho klinickú užitočnosť. Tieto lapače však vykazujú klinické nevýhody, vrátane zníženého protinádorového účinku a zlyhania ochrany srdca pred poškodením vyvolaným DOX v klinických podmienkach. Tong *et al* odhalili, že liečba Berom zosilnila citlivosť rakovinových buniek na DOX. Patil *et al* tiež preukázali, že Ber potlačil rast nádoru prostredníctvom indukcie apoptózy a zastavenia bunkového cyklu v rakovinových bunkách. Celkovo na základe týchto údajov sme predpokladali, že kombinácia DOX s Ber ako nová stratégia liečby nádorov by nielen zvýšila účinok DOX, ale tiež zabránila kardiotoxicite vyvolanej DOX. Táto štúdia skúmala mechanizmus ochranných účinkov Ber proti kardiotoxicite vyvolanej DOX u potkanov. Na stanovenie potenciálneho ochranného účinku Ber proti kardiotoxickým účinkom DOX bol vyvinutý potkaní model kardiotoxicity indukovanej DOX *in vivo* a *in vitro*. Dávky Ber použité *in vivo* boli tie, ktoré vykazovali maximálny kardioprotektívny účinok v predbežných optimalizačných experimentoch (údaje nie sú uvedené). Tento výsledok je tiež v súlade s predchádzajúcou štúdiou, ktorá naznačila, že Ber preukázal významné ochranné účinky na srdcové tkanivo pri dávke 10 mg/kg u potkanov.

Údaje z tejto štúdie ukázali, že podávanie DOX bolo sprevádzané vysokou mortalitou v porovnaní s kontrolnou skupinou. Prežívajúce zvieratá trpeli nadmerným stupňom perikardiálneho, pleurálneho a peritoneálneho výpotku, čo naznačovalo vážne poškodenie srdca. Schopnosť Ber chrániť pred DOX-indukovanou vysokou mortalitou a skóre intenzity výpotku sa považovalo za skorý príznak kardioprotekcie. Ber tiež zmiernil histopatologické a ultraštruktúrne poškodenia vyvolané DOX. Tieto údaje naznačujú, že Ber je potenciálnym ochranným činidlom proti poškodeniu DOX. Oxidačné poškodenie a antioxidačné nedostatky v kardiomyocytoch sa široko považujú za primárnu príčinu srdcovej toxicity vyvolanej DOX a tieto faktory sa použili v tejto štúdii na preskúmanie oxidačného/antioxidačného stavu potkanov. Použili sme model jednej vysokej dávky a skúmali sme, či Ber chráni srdce pred akútnou toxicitou DOX. Súčasné údaje ukázali, že srdcové a sérové hladiny MDA, CK a CK-MB boli významne zvýšené a že aktivity srdcových antioxidačných enzýmov CAT a SOD boli významne znížené po podaní DOX v porovnaní s kontrolnou skupinou. Tieto údaje jasne naznačujú stav zjavného oxidačného stresu. Ber signifikantne znížil DOX-asociované zvýšenie sérových MDA, CK a CK-MB aktivít, ktoré sú klasickými biomarkermi kardiotoxicity. Je dobre známe, že hladiny expresie natriuretického peptidu typu B (BNP) a troponínov sú špecifické a citlivé indikátory poškodenia srdca. V tejto štúdii sa však pozorovalo vážne poškodenie srdca vyvolané doxorubicínom, ktoré sa prejavilo výrazným ascitom a výrazným príznakom kongestívneho zlyhania srdca. Pretože stačilo analyzovať kardiotoxicitu detekciou hladín CK a CK-MB v sére, nebolo potrebné merať hladiny expresie BNP a troponínov. Napriek tomu budú prostriedky merania expresie BDP a troponínov zahrnuté do budúcich štúdií, aby sa úplne objasnil ochranný mechanizmus Ber na kardiotoxicitu indukovanú DOX. Aktivity CAT a SOD boli významne zvýšené v skupinách liečených BER+DOX v porovnaní s podávaním iba DOX u potkanov. Tieto údaje sú v súlade so súčasným chápaním zvýšenej peroxidácie srdcových lipidov sprevádzanej zhoršujúcim sa antioxidačným stavom, ktorý bol evidentný u potkanov liečených iba DOX. Predliečba Ber významne zmiernila oxidačný stres v skupine DOX a terapia Ber úplne zabránila biochemickým a histopatologickým zhoršeniam spôsobeným DOX. Tieto výsledky naznačujú, že Ber terapia počas liečby rakoviny DOX významne chráni srdce pred poranením vyvolaným DOX. Tieto údaje sú v súlade so štúdiou Chen *et al* a Hao *a kol*. Počiatočné poškodenie DOX-indukovanej kardiotoxicity je pravdepodobne oxidatívnej povahy, pretože

podlieha redukcii o jeden elektrón, ktorej výsledkom je zodpovedajúci semichinón, za vzniku voľných radikálov a superoxidových radikálov.

Oxidačné poškodenie srdcových mitochondrií a kardiomyocytov je základným kameňom DOX-indukovanej kardiotoxicity, ale predchádzajúca štúdia naznačila preťaženie vápnikom ako ďalší dôležitý mechanizmus DOX-indukovanej kardiotoxicity. Predchádzajúce štúdie preukázali, že DOX otvoril kanály na uvoľňovanie vápnika v sarkoplazmatickom retikule a zvýšil maximálne množstvo uvoľňovania vápnika, inhiboval výmenu Na^+ - Ca^{2+} alebo aktivoval srdcový vápnikový kanál L-typu. DOX môže viesť k preťaženiu srdcových buniek vápnikom, čo spôsobuje neadekvátnu kontrakciu a zhoršuje mitochondriálnu homeostázu vápnika, čo mení energetický metabolizmus a tvorbu ROS a môže spustiť prechod mitochondriálnej permeability závislý od vápnika otvorením pórov prechodu permeability. Otvorenie týchto pórov indukuje uvoľnenie cytochrómu c, čo je kritický krok pre apoptózu. Mitochondrie sú kľúčovými cieľmi pre antracyklínovú kardiotoxicitu a môžu byť kľúčové aj pre účinnú kardioprotekciu. Pokles $\Delta\Psi_m$ znížil kapacitu pre prílev Ca^{2+} do mitochondrií, keďže $\Delta\Psi_m$ primárne poháňa mitochondriálny príjem vápnika. Preto táto štúdia skúmala intracelulárny vápnik a mitochondriálny vápnik v srdcových myocytoch po liečbe DOX a skúmala, či ochranný účinok Ber na preťaženie Ca^{2+} indukované DOX bol spojený s depolarizáciou $\Delta\Psi_m$. Výsledky ukázali, že vysoká lokálna hladina $[\text{Ca}^{2+}]_i$ produkovaná DOX spôsobila mitochondriálne preťaženie Ca^{2+} a zníženie $\Delta\Psi_m$, čo môže zmeniť metabolizmus srdca a viesť k smrti kardiomyocytov. Inkubácia s Ber počas 1 hodiny významne znížila preťaženie mitochondrií Ca^{2+} a významne zvýšila metabolizmus energie srdca. Liečba Ber významne potlačila DOX-indukované zvýšenie $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Tieto výsledky ukazujú, že Ber inhiboval DOX-indukované akútne modifikácie v homeostáze vápnika v kardiomyocytoch a naznačujú ochrannú úlohu Ber proti DOX-indukovanej kardiotoxicite. Predchádzajúca štúdia preukázala, že Ber môže tiež zmierniť apoptózu kardiomyocytov indukovanú DOX inhibíciou aktivácie kaspázy-3, adenozin 5'-monofosfátom aktivovanej proteínkinázy α a fosforylácie nádorového proteínu 53. Ber je potenciálnym kandidátskym činidlom na spoločné podávanie s DOX na zlepšenie jeho kardiotoxicity. Na dôkladné vyhodnotenie potenciálneho ochranného účinku Ber pri kardiotoxicite vyvolanej DOX sú potrebné ďalšie štúdie.

Skratky

DOX	doxorubicín
Ber	berberín
ROS	reaktívne druhy kyslíkových radikálov
$\Delta\Psi_m$	mitochondriálny membránový potenciál
CK	kreatínkináza
CK-MB	izoenzym kreatínkinázy
MDA	malondialdehyd
SOD	superoxiddismutáza
CAT	kataláza

Zdroj: Protective effect of berberine on acute cardiomyopathy associated with doxorubicin treatment

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5840547/>