

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ імені О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

ЛІННИК ОКСАНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 576.311.347:616.12:612.273.2-577.181.7:577.117:575.113

**ПОРУШЕННЯ МІТОХОНДРІАЛЬНОГО АПАРАТУ
КАРДІОМІОЦИТІВ ПРИ ДОКСОРУБІЦИН-ІНДУКОВАНОМУ
ОКСИДАТИВНОМУ СТРЕСІ: МЕХАНІЗМИ ТА КОРЕКЦІЯ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі з вивчення гіпоксичних станів Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор

Маньковська Ірина Микитівна

провідний науковий співробітник відділу з вивчення гіпоксичних станів Інституту фізіології

Офіційні опоненти: ім. О.О. Богомольця НАН України

доктор медичних наук, професор

Лановенко Іван Іванович

завідувач лабораторії патофізіології крові

ДУ «Інститут гематології

та трансфузіології НАМН України»,

член-кореспондент НАН і НАМН України

заслужений діяч науки і техніки України

доктор медичних наук, професор

Чекман Іван Сергійович

професор кафедри фармакології, клінічної фармакології ПНВЗ «Київський медичний університет УАНМ»

Захист дисертації відбудеться « 13 » лютого 2018 року о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4 та на сайті Інституту www.biph.kiev.ua

Автореферат розісланий « 11 » січня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

О.П. Любанова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Дослідження, проведені за останні десятиліття, значно розширили погляди на функції мітохондрій. В даний час визнано, що мітохондрії відіграють важливу роль у клітинній сигналізації, міжорганному зв'язку, старінні, проліферації та загибелі клітин, хворобах людини тощо. Як відомо, мітохондрії відповідають за постачання постійного притоку енергії для підтримання окисно-відновного стану клітин, порушення якого викликає підвищення рівня активних форм кисню (ROS). Надмірне утворення ROS (переважно у мітохондріях) призводить до розвитку оксидативного стресу з порушенням метаболічних процесів, структурних і молекулярних компонентів клітин, зокрема самих мітохондрій та їх геному, що є причиною чи ланкою патогенезу важких захворювань. Так, активація вільно-радикального окислення (ВРО) є одним із провідних патогенетичних механізмів ушкодження серця антрациклінами - антибіотиками, які широко використовують при лікуванні пухлин, що особливо актуально у зв'язку з великим зростанням онкологічної патології (Lemoniatis M., 2015).

В експерименті антрацикліни, зокрема доксорубіцин, використовуються для відтворення оксидативного стресу. Але, при дослідженні впливу доксорубіцину на мітохондріальний апарат кардіоміоцитів комплексне вивчення показників генерації різних видів активних форм кисню, окисної модифікації протеїнів і перекисного окиснення ліпідів, активності та експресії білків антиоксидантних ензимів дотепер не проводилось. Відсутні також дані про те, якими шляхами відбувається загибель кардіоміоцитів при доксорубіцин-індукованому оксидативному стресі та як це корелює з порушеннями функціональної активності мітохондрій. Не були дотепер докладно вивчені доксорубіцин-індуковані порушення скорочувальної активності кардіоміоцитів у культурі клітин у співставленні зі змінами кардіогемодинаміки *in vivo*, хоча такі порушення характеризують розвиток доксорубіцинової кардіоміопатії (Mavinkurve-Groothuis A., 2012; Нагорна О.О., Чекман І.С., 2004).

Відомо, що транскрипційний протеїновий комплекс HIF – фактор, що індукується гіпоксією, вважається відповідальним за розвиток компенсаторних реакцій на нестачу кисню та мобілізацію клітинної відповіді на нього, в тому числі на підвищення продукції вільних радикалів кисню в мітохондріях (Semenza G., 2011). Нещодавно було показано, що HIF грає критичну роль в регуляції продукції ROS у мітохондріях завдяки різним механізмам (Fukuda R. et al., 2007; Kirito K. et al., 2009). Доведено, що при збільшенні утворення ROS мітохондріями підвищується експресія HIF-1 α та його генів-мішеней. Список цільових генів, експресія яких активується за дії HIF-1, постійно збільшується (Kaluz S. et al., 2008; Weidemann A. et al., 2008). Одну групу становлять гени, продукти яких приймають участь в антиоксидантному захисті клітин, наприклад, піруватдегідрогенази кіназа-1 (PDK-1) та теломераза (TERT) (Kirito K. et al., 2009; Mattiussi M. et al., 2012). Ще одну групу становлять гени, продукти яких регулюють проліферацію та виживання клітин, зокрема інсуліноподібний фактор росту-1 (IGF-1) (Kaluz S. et al., 2008). Розробка фармакологічних підходів до пригнічення експресії HIF може мати терапевтичне значення в лікуванні онкологіч-

них захворювань, а засоби активації експресії - для протекції клітин при гіпоксії та оксидативному стресі.

Але, треба підкреслити, що при експериментальному відтворенні оксидативного стресу за допомогою антрациклінових антибіотиків, зокрема доксорубіцину, молекулярні механізми регуляції продукції ROS, пов'язані з HIF, залишаються дуже мало дослідженими. При цьому, було встановлено, що саме цей антибіотик є інгібітором комплексу HIF (Duynham M. et al., 2007), що може бути ще одним фактором оксидативного пошкодження кардіоміоцитів. Недослідженим залишається питання про роль різних α -субодиниць HIF-1 в регуляції продукції ROS у мітохондріях при доксорубіцин-індукованому оксидативному стресі. В той же час нещодавно було показано, що саме HIF 3- α відіграє специфічну регуляторну роль при оксидативному стресі іншого генезу, який супроводжує гіпоксію навантаження (Drevytska T. et al., 2012). Залишається також необхідність встановлення механізмів впливу на рівень експресії HIF та його можливих генів-мішеней для знаходження ефективних методів протекції міокарду на молекулярно – генетичному рівні при використанні антрациклінів.

В пошуку можливого кардіопротектора при оксидативному стресі ми зупинилися на використанні рослинного антиоксиданту куркуміну. Саме ця речовина має протективний ефект при пошкодженнях міокарду та допомагає збереженню функцій серця (Srivastav G. et al., 2009), одночасно впливаючи на активність цитокінів, ензимів та транскрипційних факторів, пов'язаних із розвитком оксидативного стресу (Ströfer M. et al., 2011). Також куркумін зменшує токсичний вплив доксорубіцину на серце за рахунок його потужних антиоксидантних властивостей (Swamy A. et al., 2012).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках наукової тематики відділу з вивчення гіпоксичних станів Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України «Механізми змін функціонального стану і структурної організації мітохондрій при оксидативному стресі різного генезу», 2013-2016 (№ держреєстрації 0112U008232) та програми «Функціональна геноміка, протеоміка та метаболоміка в системній біології» (№ держреєстрації 0112U001477).

Мета роботи: дослідити клітинні та молекулярно-генетичні механізми порушень мітохондріальної системи кардіоміоцитів при доксорубіцин-індукованому оксидативному стресі та можливість фармакологічної корекції цих порушень.

Завдання дослідження:

1. Оцінити вплив доксорубіцину на життєздатність клітин в культурі неонатальних кардіоміоцитів.
2. Визначити вираженість оксидативного стресу в мітохондріях (за змінами вмісту вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів, активності антиоксидантних ферментів, рівня генерації перекису водню), виділених з культури ізольованих кардіоміоцитів та з міокарду щурів, при впливі доксорубіцину.
3. Встановити зміни параметрів окислювального фосфорилування, рівня потенціал-чутливого флуоресцентного компонента в мітохондріях (який характеризує зміни мітохондріального мембранного потенціалу) та швидкості входу K^+

- до ізольованих мітохондрій міокарду при доксорубіциновій інтоксикації.
4. Оцінити експресію мРНК HIF-1 α та його генів-мішеней (PDK-1, TERT, IGF-1), а також експресію мРНК іншої α -субодиниці HIF (HIF-3 α) в кардіоміоцитах при дії доксорубіцину.
 5. Визначити вплив доксорубіцину на скорочувальну активність неонатальних кардіоміоцитів і параметри кардіогемодинаміки у дорослих щурів.
 6. З'ясувати ефективність фармакологічної корекції порушень мітохондріального апарату кардіоміоцитів за допомогою куркуміну при дії доксорубіцину *in vitro* та *in vivo*.

Об'єкт дослідження – мітохондріальний апарат кардіоміоцитів щурів.

Предмет дослідження – порушення функціонального стану мітохондрій кардіоміоцитів при доксорубіцин-індукованому оксидативному стресі та їх зв'язок з HIF-залежними механізмами.

Методи дослідження: функціональні, біохімічні, молекулярно-генетичні, цитологічні, біофізичні та статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше було проведено розгорнуте дослідження функціональних порушень мітохондріального апарату кардіоміоцитів щурів *in vitro* та *in vivo* та їх корекції за допомогою куркуміну за умов доксорубіцин-індукованого оксидативного стресу у співставленні з показниками активності про- та антиоксидантної системи, а також експресії генів редокс-чутливих факторів транскрипції (HIF-1 α , HIF-3 α , PDK-1, TERT, IGF-1), що приймають участь у регуляції мітохондріального метаболізму. Встановлено, що інкубація неонатальних кардіоміоцитів з доксорубіцином погіршує функціональний стан клітин. Вперше показано, що доксорубіцин інгібує експресію гену HIF-1 α і його важливих генів-мішеней (PDK-1, TERT, IGF-1). Підтверджено зв'язок між HIF-залежними процесами та збільшенням загибелі кардіоміоцитів при дії доксорубіцину і встановлено молекулярно-генетичні шляхи корекції доксорубіцин-індукованої мітохондріальної дисфункції в кардіоміоцитах за допомогою куркуміну. Показано, що застосування куркуміну при доксорубіцин-індукованому оксидативному стресі в кардіоміоцитах значно покращує електронтранспортну функцію мітохондрій, посилює спряженість й ефективність процесів дихання та фосфорилування. Також застосування куркуміну зменшує пошкодження клітин при оксидативному стресі завдяки активації мітохондріальних K_{ATP}-каналів і відновленню мембранного потенціалу мітохондрій. Вперше показано, що застосування куркуміну при доксорубіцин-індукованому оксидативному стресі запобігає порушенню скорочувальної активності клітин, що може бути пов'язано зі зменшенням проявів оксидативного стресу в кардіоміоцитах та свідчить про захисний ефект куркуміну при пошкодженнях міокарду.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані результати можуть мати практичне значення для розробки нових засобів корекції оксидативного стресу та мітохондріальних порушень у кардіоміоцитах при ряді патологічних станів (онкологічні, нейродегенеративні, ішемічні захворювання тощо). Крім того, розкриття молекулярних, генетично-детермінованих механізмів (зміна експресії генів HIF-1,3 α та їх генів-мішеней) розвитку та корекції оксидативних порушень мітохондрій може слугувати потенційно новим терапевтичним підходом до лікування хвороб людини, пов'язаних з оксидативним стресом різного генезу.

Особистий внесок здобувача. Автором проведено науковий пошук та обґрунтування вибраного напрямку досліджень, аналіз літературних джерел, поставлено задачі роботи, виконано заплановані експериментальні дослідження, статистично оброблено, проаналізовано та узагальнено отримані результати. Планування експерименту, інтерпретація отриманих даних і формулювання висновків проведено спільно з науковим керівником. Деякі експерименти були здійснені разом із співробітниками Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, які є співавторами опублікованих робіт.

Апробація результатів дисертації. Результати роботи були представлені на засіданні сектора вісцеральних систем Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця, Київ, 26 жовтня 2016; VI Пленумі Наукового товариства патофізіологів України та Науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів «Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології», Вінниця, 23-25 вересня 2014; XIX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченому 90-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка, 24-26 травня 2015, Львів; X Україно-Польсько-Білоруській Конференції “Physiology and Pathology of Respiration: Advances in Basic Research and Clinic Applications”, 10-13 жовтня, 2013, Київ; III Всеукраїнській науковій конференції молодих учених “Фізіологія: від молекул до організму”, 24-25 жовтня 2013, Київ; IX Міжнародному симпозиумі “Актуальные проблемы биофизической медицины”, 12-15 травня 2016, Київ; Міжнародній науково-практичній конференції «Кислород и свободные радикалы», 19-20 травня 2016, Гродно, Білорусь; науково-практичній конференції „Трансфер новітніх технологій в практику охорони здоров'я України”, 1-3 жовтня 2016, Київ; VII Національному конгресі патофізіологів України «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції», Харків, 5-7 жовтня 2016; Підсумкова LX науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (присвяченої 60-річчю ТДМУ), Тернопіль, 14 червня 2017.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових праць, у тому числі 6 статей у рекомендованих ДАК України фахових журналах та 10 тез доповідей на конгресах, з'їздах, конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, опису методів досліджень, результатів досліджень, аналізу й узагальнення результатів, висновків, списку використаних літературних джерел, що включає 217 посилань. Робота викладена на 129 сторінках машинописного тексту, містить 2 таблиці, проілюстрована 28 рисунками.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Моделі та об'єкти дослідження.

Експериментальні дослідження проводили на первинній культурі ізольованих кардіоміоцитів, виділених із шлуночків серця 50 новонароджених щурів лінії Вістар (маса – $20,0 \pm 4$ г) та 40 статевозрілих щурах-самках лінії Фішер (маса – 200-250 г). Тварини знаходились у віварії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де вони утримувалися на стандартному харчовому раціоні та в цілому перебували у схожих умовах. Всі маніпуляції з тваринами проводили відповідно вимог Європейської конвенції (Страсбург, 1985).

Виділення та культивування неонатальних кардіоміоцитів.

Виділення і культивування неонатальних кардіоміоцитів щурів здійснювали відповідно до модифікованої методики Nagibin V. et al (2009). Шляхом цервікальної дислокації щури знерухомлювалися та анестезувалися. Після цього через передній поздовжній розріз виймали серце. Шлуночки відокремлювали від передсердь і двічі відмивали у стерильному буферному сольовому розчині (pH 7,4) наступного складу: HEPES – 20 ммоль/л, KCl – 5,4 ммоль/л, NaCl – 116,4 ммоль/л, глюкоза – 5,5 ммоль/л, Na_2HPO_4 – 0,4 ммоль/л та K_2HPO_4 – 0,4 ммоль/л. Ферментативне розщеплення проводили у середовищі виділення, яке на основі зазначеного буферу містило колагеназу II типу (95 ОД/мл) та панкреатин (0,6 мг/мл). Клітини осаджувалися шляхом центрифугування при 400 g протягом 60 с, після чого їх ресуспендували у живильному середовищі культивування такого складу: середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище 199 (співвідношення DMEM/199 - 4 : 1), теляча сироватка - 8%, Na_2CO_3 – 4,2 ммоль/л, HEPES - 15 ммоль/л та антибіотики (стрептоміцин – 100 мкг/мл, гентаміцин – 0,05 мг/мл, пеніцилін – 100 ОД/мл). Кількість живих та загиблих клітин визначали за допомогою методу фарбування клітин 0,2 % розчином трипанового синього. Отримані клітини розміщували на скельця, покриті 2 % розчином желатину, виготовленому на буфері, що входить до складу середовища виділення, із щільністю 200 000 на 1 cm^2 . Культивування проводили у живильному середовищі вищезазначеного складу при 37°C у газовому середовищі, яке містило 5% CO_2 та 95% атмосферного повітря.

Моделювання оксидативного стресу в культурі неонатальних кардіоміоцитів та у дорослих щурів за допомогою доксорубіцину та його корекція куркуміном.

Для моделювання оксидативного стресу в неонатальних кардіоміоцитах проводили інкубацію неонатальних кардіоміоцитів з доксорубіцину гідрохлоридом (SigmaAldrich) в концентрації 0,5 мкмоль/мл у середовищі для культивування DMEM+199 протягом 24 годин. Для корекції оксидативного стресу куркумін (Sigma Aldrich) використовували в концентрації 20 мкмоль/мл, додаючи його також на 24 години у середовище культивування. Для моделювання та корекції оксидативного стресу у дорослих щурів доксорубіцин в концентрації 4 мг/кг і куркумін - 50 мг/кг вводили внутрішньоочеревинно за схемою: премедикація куркуміном тричі через день, а потім введення куркуміну і доксорубіцину разом через день тричі протягом тижня. Через 24 години після останньої ін'єкції тварини були декапітовані відповідно до прийнятих біоетичних норм та вимог.

Оцінка життєздатності кардіоміоцитів у культурі (фарбування мітохондрій прижиттєвим барвником Mitotracker, МТТ-тест).

Для кількісної оцінки життєздатності кардіоміоцитів та функціональної спроможності мітохондрій використовували МТТ-тест (MTT Protocol, Wallertand Provost Lab). Кількість утвореного формагану визначали колориметричним методом після його розчинення в органічних розчинниках. Клітини саджали на 96-лункові планшети (20 тисяч клітин на лунку) та інкубували з доксорубіцину гідрохлоридом (Sigma Aldrich) в середовищі DMEM+199 24 години. Через добу в кожному лунку додавали по 20 мкл стокового розчину МТТ (5 мг МТТ (Sigma Aldrich) на 1 мл PBS) та інкубували 4 години. Результат оцінювали шляхом вимірювання на спектрофотометрі CFEX-45 ColorFlex (Hunter Lab Inc, США) оптичної щільності лізату в лунках, отриманого

за допомогою додавання в кожен лунку по 200 мкл DMSO, при довжині хвилі 570 нм. Для підрахунку кількості живих і загиблих клітин використовували методи забарвлення біс-бензимідом (Hoechst 33342) та пропідіум йодидом в концентрації 8,75 мкмоль/л та флуоресцентної мікроскопії (Nikon Eclipse E200), фільтр D/PI, довжина хвилі збудження 330-380 та 510-560 нм для Hoechst та пропідіум йодиду відповідно.

Дослідження скорочувальної активності неонатальних кардіоміоцитів за умов оксидативного стресу.

Для визначення і оцінки частоти спонтанних скорочень ізольованих неонатальних кардіоміоцитів використовували методику, описану в роботі Webster et al. (2000): кількість скорочень визначали візуально за 30-60 с у випадковим чином обраних клітинах. Скорочувальну здатність кардіоміоцитів оцінювали шляхом визначення таких показників: пік скорочення (ПС, або амплітуда скорочення, в мкм або у %), час досягнення ПС (ЧПС, мс), час відновлення довжини (ЧВД, мс), максимальна швидкість скорочення (МШС, мкм/с, або $-dL/dt$) і розслаблення (МШР, мкм/с, або $+dL/dt$) (Berdichevski A. et al., 2010; Bazan C. et al., 2011; Jung A. et al., 2006; Kandadi M. et al., 2010). Реєстрацію і аналіз скорочувальної функції клітин проводили за допомогою системи IonOptix, що здійснює сканування відхилення лінії краю кардіоміоцита при його скороченні (Mishra S. et al., 2011; Prasad S. et al., 2006; Rodriguez A. et al., 2011; Ren J. et al., 2000). На всіх етапах дослідження клітини спостерігали в мікроскопі Olympus, CKX 41 та на моніторі комп'ютера з використанням камери IonOptix MyoCam.

Оцінка параметрів кардіогемодинаміки у щурів при моделюванні оксидативного стресу.

Для оцінки параметрів кардіогемодинаміки у щурів при моделюванні оксидативного стресу застосовували систему Millar Instruments (США). Тварин наркотизували за допомогою введення уретану внутрішньоочеревинно (1,5 г/кг). Через праву сонну артерію у лівий шлуночок ретроградно вводили стандартний 2F мікрокатетер для реєстрації тиску (SPR-838; Millar Instruments, США), реєстрували показники кардіогемодинаміки за допомогою програми ChartTMv.5.4.2 (ADInstruments, Millar Instruments). Співвідношення тиску та об'єму лівого шлуночка аналізували за допомогою пакета програм PVAN 3.6 (ADInstruments, Millar Instruments) з конвертацією відносних одиниць об'єму (RVU) в абсолютні (за формулою, отриманою в ході попереднього калібрування мікрокатетеру, $\text{slope } 20,25 \cdot \text{RVU} - \text{intercept } 29,05$). Насосну функцію оцінювали за комплексом показників: ЧСС, фракція викиду, ударний об'єм, ударна робота. Діастолічну функцію аналізували за кінцево-діастолічними об'ємом і тиском та ізовольюмічною константою розслаблення Tau за методами Glantz (Barbier P., 1999; Weiss J.L., 1976). Систолічну функцію та скорочувальну активність оцінювали кінцево-систолічним об'ємом і тиском, максимальною швидкістю збільшення тиску в лівому шлуночку (dp/dt_{max}), залежною від об'єму кінцево-систолічною максимальною жорсткістю лівого шлуночка (E_{max}).

Виділення мітохондрій з культури неонатальних кардіоміоцитів щурів та з тканини серця дорослих щурів.

Мітохондрії (Mx) із міокарду виділяли загальноприйнятим методом диференційного центрифугування за умов зберігання нативності ізольованих органел (Kondrashova M.N. et al., 2001). Тварин забивали, відділяли серце, яке негайно охолоджували се-

редовищем для виділення мітохондрій (0,25 М сахарози і 1 мМ ЕДТА, рН 7,4). Відбирали 1 г тканини, яку гомогенізували в середовищі для виділення мітохондрій при t 2°C. Гомогенат центрифугували при 700 g. Супернатант, що містив мітохондрії, відділяли та центрифугували при 9000 g протягом 15 хв. Одержані в осаді мітохондрії відмивали холодним розчином 0,25 М сахарози та використовували для проведення досліджень.

Дослідження окислювального фосфорилування, рівня потенціал-чутливого флуоресцентного компоненту в мітохондріях, швидкості входу іонів калію до мітохондрій.

Процеси дихання та фосфорилування досліджували полярографічним методом із використанням закритого електрода Кларка і приладу Оксиграф (Standart Oxygraph System, Hansatech, England). Виділення Мх проводили при температурі 4°C. Середовище виділення Мх містило (в ммоль/л): 210 D mannitol, 70 sucrose, 2 EGTA, 1 мг/кг BSA, 10 HEPES (рН 7,4). Функціональний стан Мх досліджували методом Chance B. (1956). Середовище інкубації Мх міокарду містило (в ммоль/л): 120 KCl, 5 NaH_2PO_4 , 10 HEPES, рН 7,4. Як субстрат окислення використовували 5 ммоль/л сукцинату Na. Інгібітором мітохондріального ферментного комплексу I слугував ротенон - 2 мкмоль/л. Дихання стимулювали внесенням у полярографічну комірку 200 мкМ АДФ. Сукцинат Na додавали в середовище окремо перед внесенням Мх. Використовуючи одержані хроно-амперографічні криві, обчислювали параметри дихання Мх за Chance B.: в стані активного дихання при додаванні АДФ (V_3), контрольованого дихання (V_4^{ATP}), дихальний контроль (V_3/V_4^{ATP}), коефіцієнт ефективності фосфорилування (АДФ/О) за Estabrook R. (1976). Концентрацію білка визначали методом Lowry O. (1951). Оцінку швидкості АТФ-залежного входу К в мітохондрії (що характеризує активність мітоК_{АТФ}-каналів) визначали вищезазначеним полярографічним методом за різницею швидкості дихання мітохондрій у метаболічному стані 4 (V_4^{ATP}), яка реєструвалася в присутності і у відсутності 300 мкМ АТФ з додаванням 2 мкМ олігоміцину. Для кількісної оцінки швидкості АТФ-залежного входу іонів калію в мітохондрії використовували відомі стехіометричні коефіцієнти між поглинанням кисню та транспортом одновалентного катіону (1:7 при використанні сукцинату як субстрату окиснення) (Beavis A., 1987). Для опосередкованого визначення величини мітохондріального мембранного потенціалу використовували прижиттєвий флуоресцентний барвник Mitotracker DeepRedFM (Sigma Aldrich), розведений DMSO, в концентрації 100 нМ. Після додавання в культуру неонатальних кардіоміоцитів доксорубіцину, куркуміну чи обох речовин, клітини інкубували з барвником протягом 15 хв, після чого оцінювали інтенсивність забарвлення живих мітохондрій за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse E200 на довжині хвилі збудження 665-644 нм (Saad H. et al., 2008). Ступінь інтенсивності флуоресценції опосередковано свідчив про величину мітохондріального мембранного потенціалу (Chazotte B., 2011).

Методи оцінки активності про- та антиоксидантних систем мітохондрій в культурі неонатальних кардіоміоцитів та в серці дорослих щурів.

Для оцінки активності про- та антиоксидантних систем мітохондрій клітини з чашок знімали за допомогою 0,2% розчину натрієвої солі етилендіамінотетраоцтової кислоти (рН 8,1), який містив 0,15% трипсину, інкубуючи з вищевказаним розчином протягом 15 хв. Мітохондрії з тканини сердець щурів виділяли методом диферен-

ційного центрифугування. Середовище виділення містило: 0,5 М манітол, 0,5 М сахароза, 0,1 М ЕДТА, 0,1 М Tris HCl pH 7,4. Вміст білка визначали за методом Бредфорда (Bradford M., 1976). Ступінь оксидативного стресу оцінювали за вмістом у мітохондріях активних продуктів 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) та перекису водню, антиоксидантний захист – за активністю Mn-супероксиддисмутази (Mn-SOD) та каталази (КАТ). Вміст ТБК-АП визначали спектрофотометрично за методом Стальної І.Д. (1977) і виражали в нмоль/мг білка та розраховували з використанням коефіцієнта молярної екстинкції $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Вміст перекису водню (H_2O_2) визначали за методом Huwiler M., Kohler H. (1984) у системі лактопероксидаза/ H_2O_2 /йодид калію. Кількість H_2O_2 розраховували з використанням коефіцієнта молярної екстинкції $25,55 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ та виражали в мкмоль/хв/мг білка. Активність КАТ визначали спектрофотометрично за методом Корольок М.А. (1988). Активність ферменту розраховували з використанням коефіцієнта молярної екстинкції $22,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ та виражали в мкмоль/хв/мг білка. Активність Mn-SOD визначали спектрофотометрично (Misra H., Fridovich I., 1972). Активність Mn-SOD розраховували, зважаючи на те, що 50% інгібування реакції відповідає 1 умовній одиниці активності. Активність Mn-SOD виражали в ум.од./мг білка.

Виділення тотальної РНК.

Виділення тотальної РНК з культури неонатальних кардіоміоцитів і тканин серця щурів проводили з використанням фенол-хлороформного методу екстракції з використанням реагентів Sigma (США). Виділену РНК зберігали при температурі -35°C або негайно використовували для роботи після вимірювання її концентрації за допомогою спектрофотометра.

Напівкількісна зворотня транскрипція та полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР) у реальному часі.

Напівкількісну зворотню транскрипцію проводили, використовуючи набори для синтезу кДНК, що містять зворотну транскриптазу „RevertAid H Minus M-MuLV RT” (Thermo Scientific, США). Транскрипційна суміш містила 5 мкл тотальної РНК (500 нг – 1 мкг/мкл), 1 мкл Random Hexamer праймерів (0,5 мкг/мкл), 20 од. інгібітору рибонуклеаз, 20 мМ суміші дезоксирибонуклеотидів та 200 од. зворотної транскриптази. ПЛР проводили в термоциклері "Applied Biosystems 2700" ("Perkin Elmer", США) за індивідуальними програмами для кожного гену. ПЛР у реальному часі проводили в термоциклері “7500 Fast Real-Time PCR System”. Для генів HIF-1 α та HIF-3 α були використані ті ж самі праймери, що і для напівкількісної ПЛР: прямий 5'-AGA AAC CGC CTA TGA CGT G- 3', зворотній 5'- CCA CCT CTT TTT GCA AGC AT - 3'; прямий 5'- AGA GAA CGG AGT GGT GCT GT - 3'; зворотній 5'- ATC AGC CGG AAG AGG ACT TT - 3'; Експресію генів стандартизували відносно експресії гену GAPDH рибосомальної субодиниці (були використані праймери наступної послідовності: прямий 18S-F 5'-CTT AGA GGG ACA AGT GGC G-3' та зворотній 18S-R 5'-GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA-3'), та β -субодиниці актину як ендогенного контролю. ПЛР-ампліфікацію гену проводили у 10 мкл SYBR Green PCR Master Mix, що містив 30 пМ кожного праймеру. Об'єм доводили до 20 мкл деіонізованою водою. Програма ампліфікації починалася з попередньої активації AmpliTaq Gold® ДНК-полімерази протягом 10 хв при 95°C та складалася з 50 цик-

лів: денатурація – 95°C, 15 с, приєднання праймерів та елонгація – 64°C, 1 хв. Для контролю специфічності проводили стадію дисоціації – послідовне підвищення температури від 64 до 99°C із реєстрацією падіння інтенсивності флуоресценції комплексів двохланцюгових ДНК з SYBR Green. Аналіз отриманих даних проводили за допомогою програмного забезпечення 7500 Fast Real-time PCR Software. Для генів PDK-1, TERT та IGF-1 ПЛР-ампліфікацію проводили у 10 мкл SYBR Green PCR Master Mix, що містив 30 пМ кожного праймеру: PDK-1 – sense 5'-CAG GGT GTG ACT GAA TAC AAG G-3', antisense 5'-GAG ATG CGA CTC ATG TAG AAC C-3'; TERT – sense 5'-GAT TCC CCT TCT CCT TCA CAA G-3' antisense 5'-TGA GCT CCA CTC TGT GTG TCT C-3'; IGF-1 – sense 5'- TGC TCT TCA GTT CGT GTG-3', antisense 5'-ACA TCT CCA GTC TCC TCA G-3'. Об'єм доводили до 20 мкл деіонізованою водою. Програма ампліфікації та контроль специфічності не відрізнялися від викладених вище.

Статистична обробка результатів. Статистичну обробку результатів проводили з використанням програмного забезпечення "Microsoft® Excel 2003", а також програм ImageJ, Origin, 7500 Fast Real-Time PCR System Software, та SPSS Statistics (Version 17). Розраховували середні значення показників (M) та похибку середнього (m). Нормальність розподілів була перевірена за допомогою тесту Колмогорова-Смірнова. Міжгрупові різниці з нормальною вибіркою оцінювали за критерієм t Стюдента або ANOVA. Для розрахування похибки застосовували корекцію Bonferroni. Для вибірок, що не задовольняли критерій нормальності, було застосовано непараметричний критерій Манна-Уїтні. Для визначення корелятивних зв'язків між окремими показниками використовували коефіцієнт кореляції Пірсона (r) та методи кореляційно-регресійного аналізу (Лакин Г.Ф., 1980). Для визначення достовірності відмінностей між очікуваним розщепленням та отриманим використовували метод χ^2 . Результати вважалися статистично значимими при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Для визначення дози доксорубіцину, оптимальної для подальших досліджень, нами був проведений МТТ-тест. За його результатами можна зробити висновок про рівень цитотоксичності різних концентрацій доксорубіцину та життєздатність кардіоміоцитів. При інкубації з доксорубіцином в концентраціях 0,1; 0,5 та 1,0 мкМ кількість живих клітин відносно контролю зменшилась на $10,9 \pm 9,99$ %; $23,6 \pm 8,76$ % та $31,5 \pm 9,86$ % відповідно ($P < 0,05$ в усіх випадках). Це підтвердило літературні дані щодо кардіотоксичності антрациклінів та дало можливість вибрати середню дозу доксорубіцину 0,5 мкМ як оптимальну для подальших досліджень. Коефіцієнт кореляції між кількістю живих клітин та концентрацією доксорубіцину, що додавався в культуру, порівнював -0,95.

Дослідження клітинної смерті в культурі неонатальних кардіоміоцитів.

За допомогою методу подвійного фарбування клітин флуоресцентними барвниками Hoechst 33342 та пропідіум йодид було показано, що після інкубації культури неонатальних кардіоміоцитів з доксорубіцином (0,5 мкМ) частка живих клітин зменшилась на $30,4 \pm 0,015$ %, а кількість загиблих збільшилась в 4,5 рази порівняно з контролем ($P < 0,05$) (рис. 1). Загибель клітин відбувалася головним чином шляхом некрозу, показником чого були втрата цілісності плазматичної мембрани клітин та її

розриви (Kroemer G., 2005). При цьому, застосування доксорубіцину з куркуміном призводило до підвищення життєздатності клітин на $9,4 \pm 0,01$ %, а кількість загиблих клітин зменшувалась на $19,5 \pm 0,01$ % порівняно із застосуванням лише доксорубіцину.

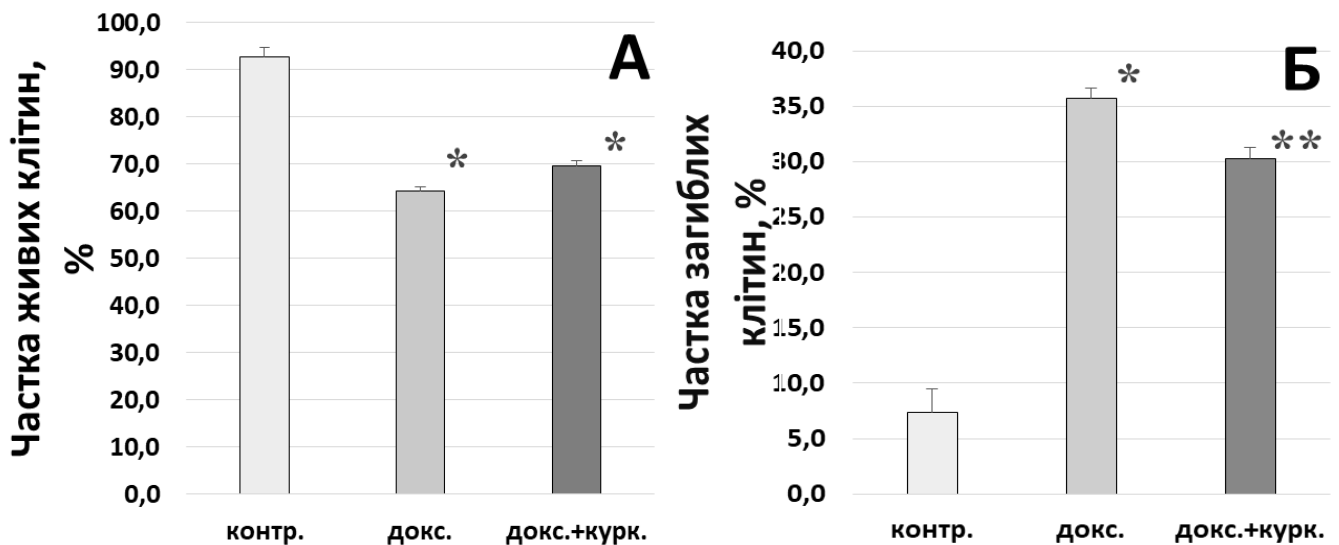


Рис. 1. Відсоток живих (А) та пропідіум йодид позитивних (Б) клітин при використанні 0,5 мкМ доксорубіцину окремо, та з 20 мкМ куркуміну за даними флуоресцентної мікроскопії. * - $P < 0,05$ порівняно з контролем, ** - $P < 0,05$ порівняно з введенням доксорубіцину.

Некроз традиційно вважається нерегульованою загибеллю клітини, на відміну від регульованої (апоптоз), але в останнє десятиріччя накопичуються дані про те, що некроз є також формою регульованої клітинної загибелі (програмований некроз, або некроптоз) (Li J., 2012; Murphy J., 2013; Shin H-J., 2015), молекулярні механізми якої наразі інтенсивно вивчаються. Наші дані відносно доксорубіцин-індукованого некрозу кардіоміоцитів повністю співпадають з дослідженнями доксорубіцин-індукованого некрозу в клітинах нирок (Shin H-J., 2015).

Дослідження рівня потенціал-чутливого флуоресцентного компоненту в мітохондріях культури неонатальних кардіоміоцитів щурів.

Мітохондріальний мембранний потенціал може бути оцінений за допомогою визначення рівня ряду потенціал-чутливих флуоресцентних компонентів *in vitro* та *in vivo*. Флуоресцентний барвник Mitotracker є хімічно активним і потенціал-залежним, оскільки проникає в мітохондрії живих клітин в залежності від величини мітохондріального мембранного потенціалу. Тому активність його флуоресценції може опосередковано свідчити про величину мітохондріального потенціалу (Kholmukhamedov A. et al., 2013). Використовуючи флуоресцентний метод (рис. 2), ми виявили значне зниження інтенсивності забарвлення мітохондрій під впливом доксорубіцину – на 42% порівняно з контролем ($P < 0,05$), що цілком підтверджує дані про пошкоджуючий вплив доксорубіцину на мітохондріальний апарат. Сумісна інкубація клітин з куркуміном і доксорубіцином призводила до значного підвищення інтенсивності флуоресценції мітохондрій (в 2 рази, порівняно із застосуванням лише доксорубіцину).

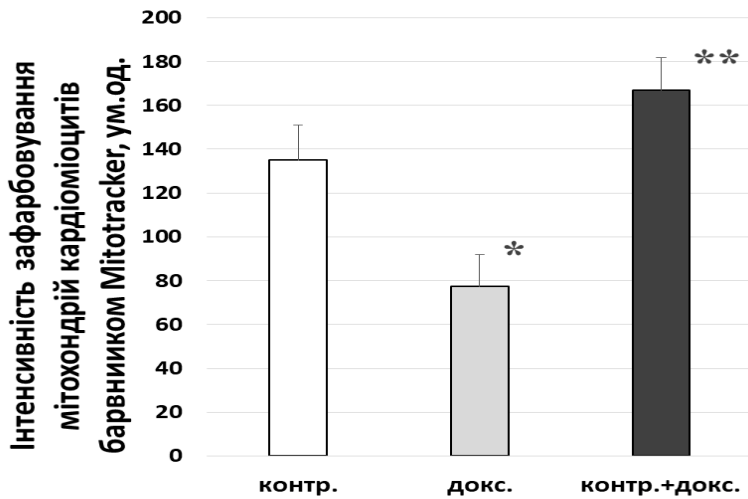


Рис. 2. Інтенсивність флуоресценції мітохондрій в культурі неонатальних кардіоміоцитів при інкубації барвника Mitotracker з доксорубіцином (0,5 мкМ), куркуміном (20 мкМ) та при застосуванні їх разом.* - $P < 0,05$ порівняно з контролем, ** - $P < 0,05$ порівняно з дією доксорубіцину.

Отримані дані свідчать про здатність куркуміну підвищувати життєздатність культури неонатальних кардіоміоцитів та підвищу-

вати або підтримувати вихідну величину мітохондріального мембранного потенціалу за умов окисдативного пошкодження. Можна зробити висновок, що куркумін є потенційним кардіопротектором, в першу чергу, за рахунок своїх антиоксидантних властивостей та здатності підтримувати мітохондріальний мембранний потенціал, збільшуючи синтез АТФ у мітохондріях.

Дослідження показників про- та антиоксидантної системи у мітохондріях, виділених з неонатальних кардіоміоцитів та з міокарду щурів.

Наші дослідження показали, що доксорубіцинова інтоксикація призводить до значного підвищення в кардіоміоцитах рівня вторинних продуктів перекисного окислення ліпідів (ТБК-АП) у 3,6 рази та перекису водня на 64% на відміну від контрольної групи ($P < 0,05$) (рис. 3), що свідчить про інтенсифікацію вільно-радикального окиснення (ВРО). Тривале введення доксорубіцину знижувало ферментативну активність Мп-СОД на 32%, при цьому активність каталази зростала на 72% у порівнянні з контролем ($P < 0,05$) (рис. 4). Це можна пояснити компенсаторним підвищенням активності даного ферменту у відповідь на збільшення продукції H_2O_2 , який, як відомо, виступає в якості субстрату для антиперекисних ферментів (Misra H. et al., 1972). Також нами було встановлено зв'язок між життєздатністю неонатальних кардіоміоцитів та рівнем ВРО в цих клітинах під впливом доксорубіцину. Вперше проведений кореляційно-регресійний аналіз зв'язку між рівнем живих кардіоміоцитів та вмістом ТБК-АП, H_2O_2 й активністю каталази дозволив встановити негативну залежність між вказаними показниками. Зокрема, коефіцієнт кореляції r для ТБК-АП становив - 0,97, для H_2O_2 – -0,63, а для каталази – -0,62. Тобто, чим вищий рівень показників окисдативного окиснення, тим нижчою була життєздатність кардіоміоцитів. Додавання куркуміну в дозі 20 мкМ до клітинної культури кардіоміоцитів сприяло підвищенню активності Мп-СОД на 14%, каталази - на 23% у порівнянні з контролем ($P < 0,05$), що підтверджує інші дослідження про властивості даної речовини як антиоксиданта (Srivastav G., Mehta J.L., 2009). При додаванні в культуру неонатальних кардіоміоцитів 20 мкМ куркуміну на 24 години відбувалося підвищення рівня ТБК-АП і H_2O_2 , а саме: рівень ТБК-АП зріс в 1,4 рази порівняно з контролем ($P < 0,05$), а рівень H_2O_2 підвищився на 20% ($P < 0,05$) (рис. 3). Інкубація культури кардіоміоцитів з доксорубіцином і куркуміном в призводила до значного зниження рівня вільно-радикальних процесів на відміну від доксорубіцинової інтоксикації.

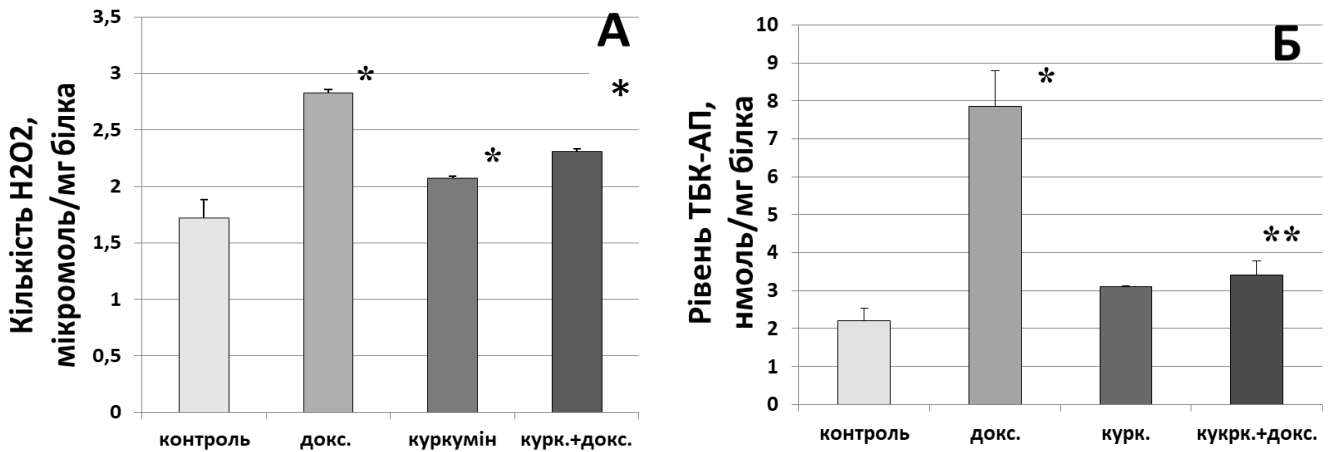


Рис.3. Кількість H_2O_2 (А) та ТБК-АП (Б) в культурі неонатальних кардіоміоцитів при інкубації з доксорубіцином (0,5 мкМ), куркуміном (20 мкМ) та при застосуванні їх разом. * - порівняно з контролем ($P<0,05$), ** - порівняно з дією доксорубіцину ($P<0,05$).

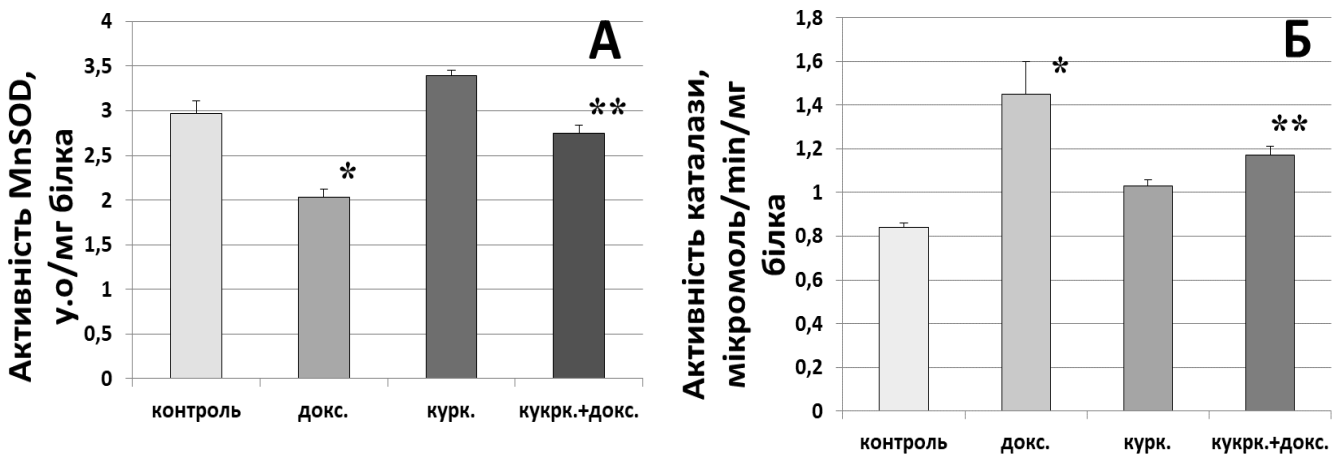


Рис. 4. Активність Mn-SOD (А) та каталази (Б) в культурі неонатальних кардіоміоцитів при інкубації з доксорубіцином (0,5 мкМ), куркуміном (20 мкМ) та при застосуванні їх разом. * - $P<0,05$ порівняно з контролем, ** - $P<0,05$ порівняно з дією доксорубіцину.

Зменшення вмісту ТБК-АП та H_2O_2 (на 56,7 та 18,4%, відповідно, $P<0,05$) (рис. 3), при зниженні гіперактивації каталази (на 19%, $P<0,05$) та зростанні активності Mn-SOD (на 35%, $P<0,05$) (рис. 4) свідчить про ознаки відновлення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у кардіоміоцитах. Таким чином, додавання куркуміну до культури кардіоміоцитів за умов доксорубіцинової інтоксикації мало позитивний коригуючий вплив на вільно-радикальні процеси та антиоксидантний захист. При дослідженні оксидативного стресу в кардіоміоцитах щурів, котрі отримували ін'єкції доксорубіцину та куркуміну (разом) й доксорубіцину окремо, були отримані подібні дані (рис. 5): вплив доксорубіцину призвів до підвищення в мітохондріях кардіоміоцитів вмісту ТБК-АП на 21 та перекису водню на 76 % порівняно до контролю ($P<0,05$), що свідчить про інтенсифікацію ВРО.

Вважається, що мітохондріальна Mn-SOD відіграє найбільш суттєву роль в антирадикальному захисті, підтримуючи безпечний рівень супероксид-аніона, а активація експресії СОД захищає клітини від оксидативного стресу різного генезу (Swamy A. et al., 2012]. У нашій роботі тривале введення доксорубіцину вірогідно знижувало ферментативну активність Mn-SOD на 14 %, при цьому активність каталази зростала на 80% порівняно з контролем. Застосування доксорубіцину та куркуміну разом

призводило до значного зниження рівня ВРО на відміну від окремого впливу доксорубіцину. Зниження вмісту ТБК-АП та H_2O_2 (на 14 та 26 %, відповідно), при зменшенні активації каталази (на 28 %) та зростанні активності Mn-SOD (на 9 %) вказує на тенденцію до відновлення про- та антиоксидантної рівноваги в мітохондріях кардіоміоцитів. Таким чином, ці результати свідчать про гальмування розвитку оксидативного стресу при застосуванні куркуміну як у модельних експериментах *in vitro*, так і при введенні тваринам *in vivo*.

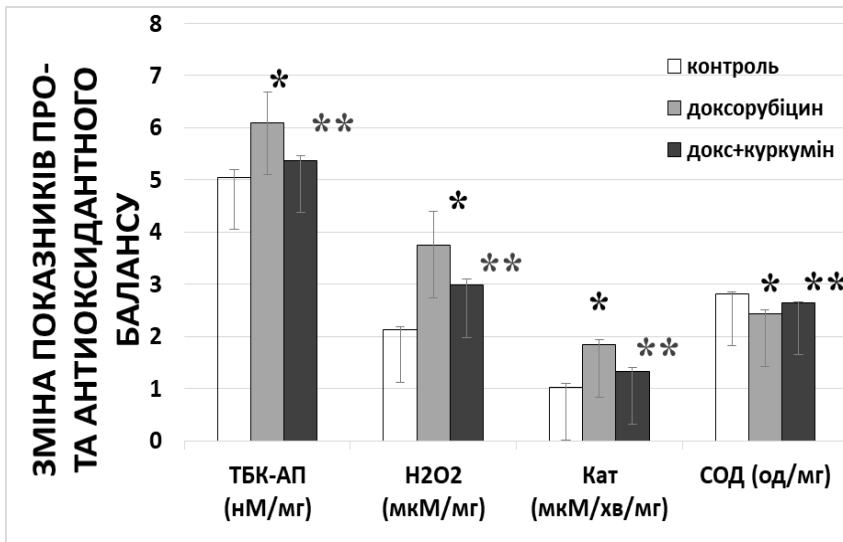


Рис.5. Показники про- та антиоксидантного балансу мітохондрій кардіоміоцитів щурів при введенні доксорубіцину (4 мкг/кг), куркуміну (50 мкг/кг) та при їх застосуванні разом. * - $P < 0,05$ порівняно з контролем, ** - $P < 0$, порівняно з введенням доксорубіцину.

Оцінка змін параметрів дихання і фосфорилювання мітохондрій, виділених з неонатальних кардіоміоцитів та з міокарду щурів.

При оцінці параметрів ди-

хання та фосфорилювання в мітохондріях, виділених з кардіоміоцитів щурів, виявлено наступні зміни: в мітохондріях щурів, котрі отримували ін'єкції доксорубіцину, показник активного дихання V_3 знизився на 43,8%, показник ступеня спряженості окислення з фосфорилюванням V_3/V_4^{ATP} знизився на 47%, а коефіцієнт ефективності фосфорилювання ADP/O також зменшився на 31,7% порівняно з контролем (табл. 1). Ці дані свідчать про зниження ефективності роботи дихального ланцюга та використання O_2 в процесах фосфорилювання, порушення рівня енергетичної регуляції дихання мітохондрій, зменшення спряженості дихання і фосфорилювання, що є показниками доксорубіцин-індукованого порушення процесів окислювального фосфорилювання в мітохондріях.

Ми дослідили роль мітохондріальних K_{ATP} -каналів в регуляції енергетичного метаболізму мітохондрій щурів. Вивчення швидкості транспорту іонів калію показало, що при дії доксорубіцину вхід K в мітохондрії знизився на 27,7 % порівняно з контролем (табл.1). Тобто, можна припустити, що доксорубіцин пригнічує вхід K через K_{ATP} -канали.

Для перевірки цієї гіпотези ми дослідили вплив класичного інгібітора АТФ-залежних мітохондріальних калієвих каналів 5-гідроксидекааноату і отримали схожі результати: вхід K в мітохондрії достовірно знизився на 21% у порівнянні з контролем, причому показники окислювального фосфорилювання також змінювалися аналогічним чином. В той же час, після застосування доксорубіцину з куркуміном показники мітохондріального дихання покращувалися порівняно із такими при використанні лише доксорубіцину. Так, V_3 підвищився на 25%, показник ступеня спряженості окислення з фосфорилюванням V_3/V_4^{ATP} підвищився на 18%, а коефіцієнт ефективності фосфорилювання також зріс на 12%. Швидкість входу іонів K в міто-

хондрії зросла на 22,5 % порівняно з такою при дії доксорубіцину (табл.1). Таким чином, отримані дані свідчать про те, що за умов введення куркуміну відбувається реактивація мітохондріальних K_{ATP} -каналів.

Таблиця 1.

Показники окислювального фосфорилування та швидкості входу іонів калію у мітохондріях міокарду щурів. Субстрат окиснення: 5 мМ сукцинату Na

Показники	Контроль	Доксорубіцин	Доксорубіцин + куркумін
V_3 нмоль·хв ⁻¹ /мг білка	63,7±3,44	35,8±2,77*	44,7±2,13*#
V_4^{ATP} нмоль·хв ⁻¹ /мг білка	22,1±2,23	23,5±2,11	24,9±2,18
V_3/V_4^{ATP}	2,88±0,19	1,52±0,09*	1,8±0,11*#
ADP/O	1,67±0,12	1,14±0,05*	1,28±0,04*#
Швидкість входу K, мкмоль·хв ⁻¹ /мг	52,2±2,57	37,6±2,2*	46,07±2,05 *#

Примітка * - $P < 0,05$ порівняно з контролем, # - $P < 0,05$ порівняно з введенням доксорубіцину; $n=12$.

Отже, в механізмах дії доксорубіцину та куркуміну на енергетичний метаболізм мітохондрій міокарду щурів за умов експериментально викликаного введенням доксорубіцину оксидативного стресу значну роль відіграє транспорт іонів калію в мітохондріальний матрикс через K_{ATP} -канали. Їх активація має призводити до зниження перенавантаження кальцієм матрикса мітохондрій, зменшення продукції ROS та інгібування мітохондріальної пори, що разом спричиняє кардіопротекторний ефект (Струтинський Р.Б., Пивовар С.І., Мойбенко О.О., 2006). Отримані нами дані свідчать про здатність куркуміну покращувати електронтранспортну функцію мітохондрій, посилювати спряженість й ефективність процесів дихання та фосфорилування для запобігання пошкодженню клітин при оксидативному стресі.

Експресія мРНК HIF-1 α , HIF-3 α та їх генів-мішеней (PDK-1, TERT, IGF-1) в мітохондріях, виділених з культури неонатальних кардіоміоцитів та з міокарду щурів.

При дослідженні рівня експресії гіпоксія-індукованого фактора HIF-1 α та його генів-мішеней TERT, IGF-1 та PDK-1 в культурі неонатальних кардіоміоцитів встановлено, що рівень мРНК HIF-1 α знижувався при введенні доксорубіцину на 50,3% в порівнянні з контролем, при поєднаному впливі доксорубіцину з куркуміном експресія гену HIF-1 α знизилась на 55,7%, порівняно з додаванням лише доксорубіцину (рис. 6, А).

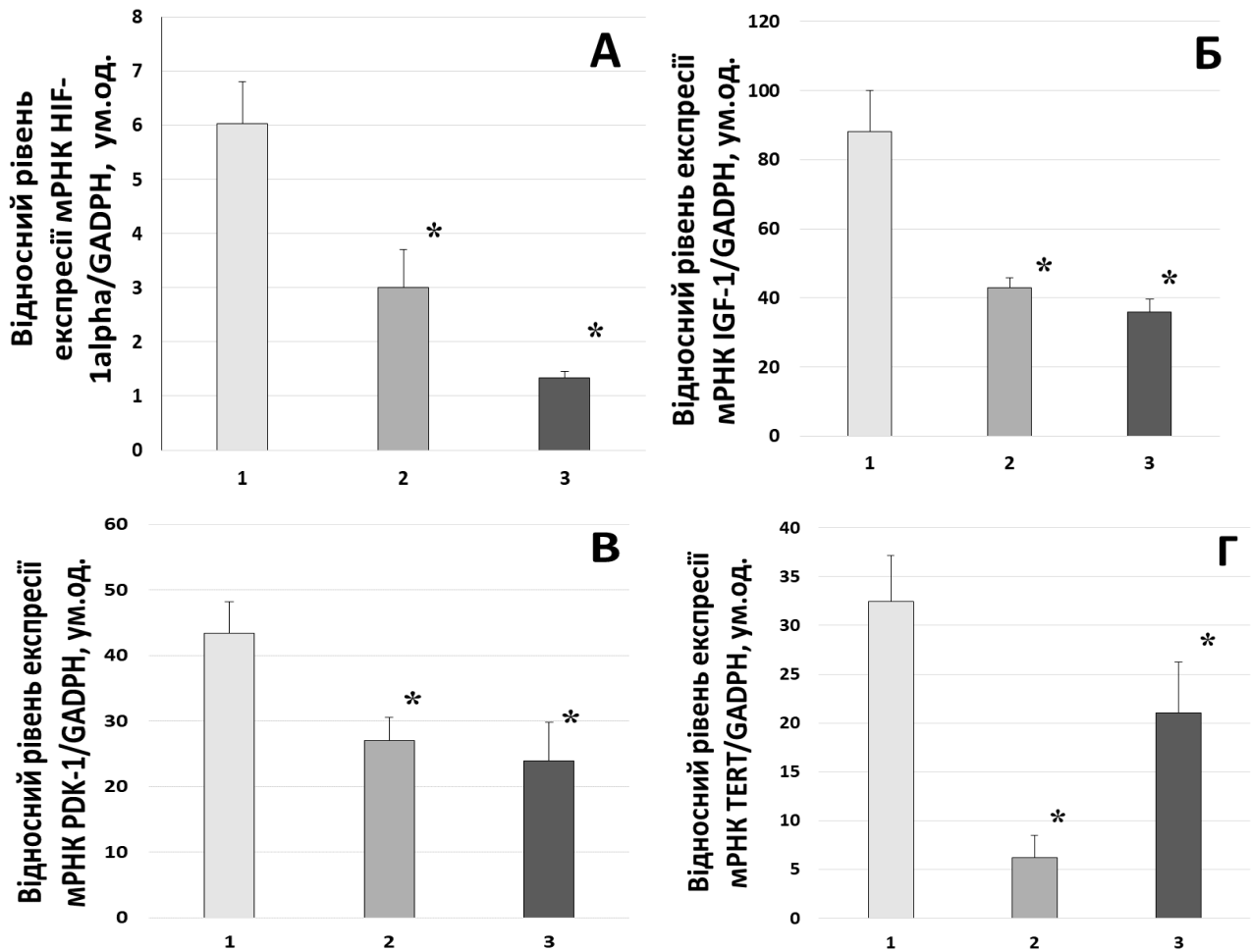


Рис. 6. Експресія мРНК HIF-1α (А), та його генів-мішеней IGF-1(Б), PDK-1 (В) та TERT (Г), в культурі неонатальних кардіоміоцитів щурів при ПЛР у реальному часі: 1-контроль; 2-після інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл); 3- з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл) та куркуміном (20 мкмоль/мл) * - $P < 0,05$ порівняно з контролем, ** - $P < 0,05$ порівняно з доксорубіцином.

Експресія гену-мішені IGF-1 значно знижувалась під дією доксорубіцину на 51,3% порівняно з контролем. Застосування доксорубіцину з куркуміном разом викликало незначне зниження експресії цього гену (на 16,5%), порівняно з дією доксорубіцину окремо (рис. 6, Б).

PDK-1 є одним із генів-мішеней HIF, який призводить до зменшення надходження пірувату в мітохондрії, тим самим протидіючи зниженню ефективності електронного транспорту за гіпоксичних умов, що в іншому випадку могло б підвищити продукцію ROS (Kirito K. et al., 2009). У нашому дослідженні рівень експресії PDK-1 під дією доксорубіцину знижувався на 37,7% порівняно з контролем. При цьому застосування куркуміну з доксорубіцином незначно знижувало експресію цього гену – лише на 11,3% порівняно із застосуванням доксорубіцину окремо (рис. 6, В).

Ген-мішень HIF теломераза (TERT), за даними літератури, сприяє підвищенню життєздатності як пухлинних, так і стовбурових клітин завдяки зниженню рівня продукції активних форм кисню, та діє як транскрипційний кофактор в Wnt- β -катеніновому шляху (Mattiussi M. et al., 2012). В наших дослідках спостерігалось значне зниження рівня експресії гену-мішені TERT під дією доксорубіцину – на 80,8%

порівняно з контролем. А застосування доксорубіцину з куркуміном викликало підвищення експресії (на 24% (порівняно з контролем) та в 3,4 рази (порівняно з дією доксорубіцину окремо) (рис. 6, Г). Це дозволяє припустити, що погіршення життєздатності неонатальних кардіоміоцитів при використанні доксорубіцину пов'язане зі зменшенням експресії гену теломерази.

Надалі при дослідженні експресії гіпоксія-індукованого фактора HIF-1 α та HIF-3 α та генів-мішеней TERT, IGF-1 та PDK-1 в міокарді щурів ми отримали наступні дані. Показано, що рівень мРНК HIF-1 α в міокарді знижується при введенні доксорубіцину на 49,7% порівняно з контролем. При поєднаному впливі доксорубіцину і куркуміну експресія гену знизилась на 6,8 % порівняно з додаванням лише доксорубіцину (рис. 7, А). При цьому рівень експресії гену HIF-3 α при введенні доксорубіцину зростає в 2,6 рази (рис. 7, Б). Це можна пояснити тим, що HIF-3 α є супресором HIF-1 α (Torii S. et al., 2015). При поєднаному впливі доксорубіцину і куркуміну експресія HIF-3 α знизилась в 3,5 рази порівняно з використанням доксорубіцину. Експресія гену-мішені IGF-1 значно знижувалась під дією доксорубіцину на 81,7% порівняно з контролем, а застосування доксорубіцину і куркуміну разом викликало незначне підвищення експресії цього гену (на 13,3%), порівняно з дією доксорубіцину окремо (рис.7, В).

Рівень експресії гену PDK-1 під дією доксорубіцину знижувався на 30,3% порівняно з контролем. При цьому привертає увагу його підвищення при введенні доксорубіцину та куркуміну на 34,7% порівняно з введенням лише доксорубіцину (рис.7, Г). Такий ефект дії куркуміну може цілком логічно пояснити механізми його антиоксидантного впливу. Експресія гену TERT значно підвищувалась під дією доксорубіцину на 64,9% порівняно з контролем (рис. 7, Д). При цьому, поєднане застосування доксорубіцину і куркуміну викликало значне зниження рівня експресії (на 83,6%), порівняно з дією доксорубіцину. Пояснення такого явища потребує подальших досліджень.

Отже, аналіз молекулярно-генетичних змін (на рівні системи HIF) в кардіоміоцитах щурів при застосуванні доксорубіцину та куркуміну свідчить про те, що доксорубіцин інгібує експресію не тільки гену HIF-1 α , а і його важливих генів-мішеней (PDK-1, TERT, IGF-1). Можна припустити, що погіршення життєздатності кардіоміоцитів при використанні доксорубіцину частково обумовлено зменшенням здатності кардіоміоцитів протистояти розвитку оксидативного стресу за рахунок зниження цитопротекторних властивостей цих генів. Так, зниження експресії гену PDK-1, може стимулювати продукцію ROS в мітохондріях (Kirito K., 2009); зменшення експресії TERT, крім цього ефекту, впливає на величину мітохондріального мембранного потенціалу (Li J., 2013). Щодо зниження рівня експресії гену IGF-1 після застосування доксорубіцину, то можна припустити, що воно гальмує вираженість протиапоптотичного захисту (Wu W., 2000).

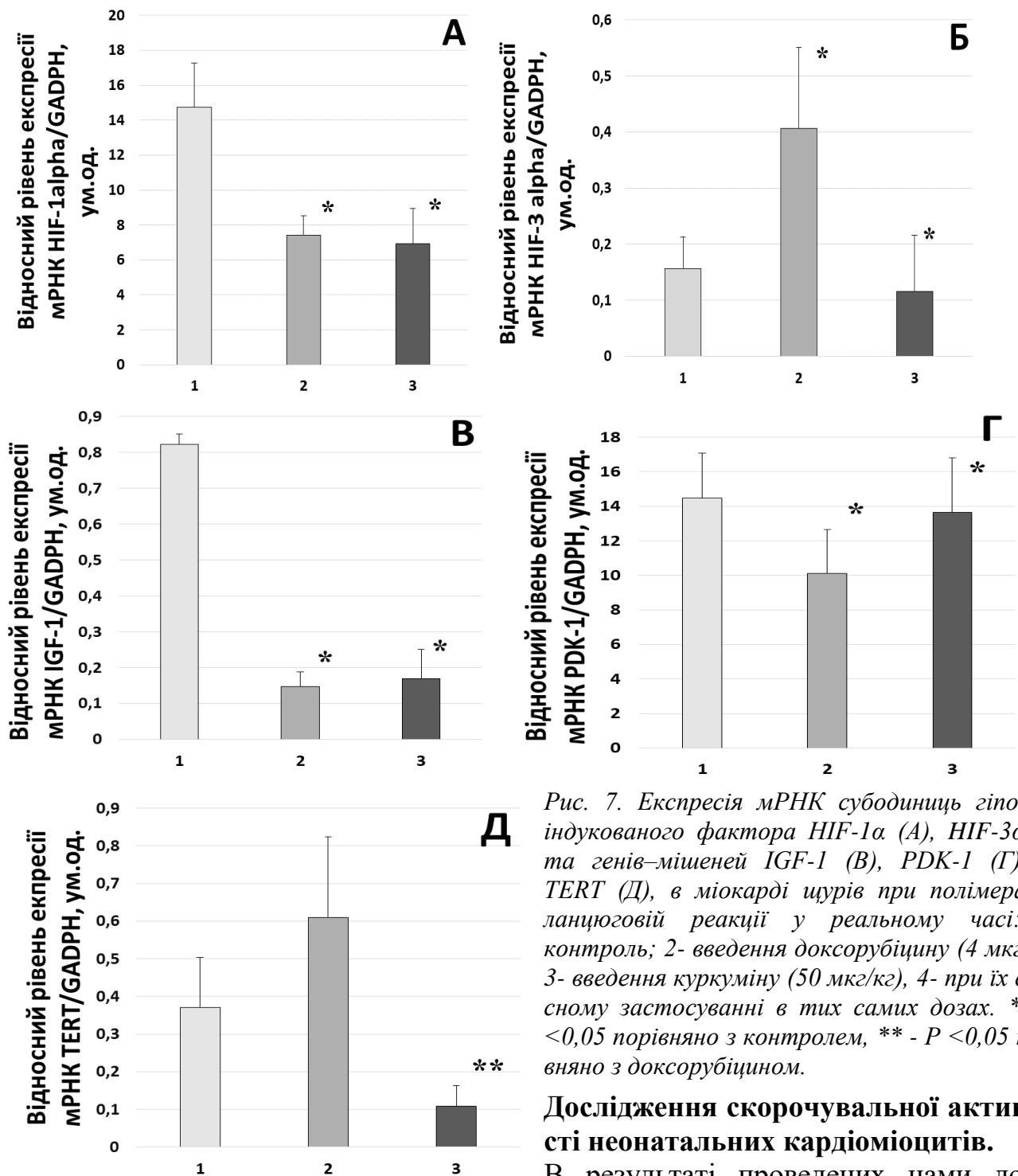


Рис. 7. Експресія мРНК субодиниць гіпоксія-індукованого фактора HIF-1α (А), HIF-3α (Б) та генів-мішеней IGF-1 (В), PDK-1 (Г) та TERT (Д), в міокарді щурів при полімеразній ланцюговій реакції у реальному часі: 1- контроль; 2- введення доксорубіцину (4 мкг/кг); 3- введення куркуміну (50 мкг/кг), 4- при їх сумісному застосуванні в тих самих дозах. * - $P < 0,05$ порівняно з контролем, ** - $P < 0,05$ порівняно з доксорубіцином.

Дослідження скорочувальної активності неонатальних кардіоміоцитів.

В результаті проведених нами досліджень на культурі неонатальних кардіоміоцитів встановлено, що доксорубіцин викликає значні зміни всіх параметрів їх скорочувальної активності порівняно з контролем. А саме: збільшення частоти спонтанних скорочень в 2 рази, порушення їх ритмічності (коливання від $0,98 \pm 0,25$ до $3,32 \pm 0,8$ с), зниження амплітуди ($0,98 \pm 0,1$ мкм) та відсотку вкорочення (зменшення до $4,07 \pm 0,47$ %), підвищення максимальної швидкості скорочення і розслаблення (на 20,5 та 19,5 %, відповідно) без значних змін тривалості цих процесів (рис. 8). Зниження скорочувальної функції кардіоміоцитів неонатальних кардіоміоцитів та втрата ними ритмічності під впливом доксорубіцину може пояснюватись порушенням нормального перерозподілу Ca^{2+} між депо і саркоплазмою клітин. Згідно даних літератури, доксорубіцин знижує ак-

тивність SERCA та концентрацію Ca^{2+} в саркоплазматичному ретикулумі (СПР) (Jung A.S. et al., 2006), що може сприяти активації Ca^{2+} / кальмодулін залежної кінрази II (CaMKII) і підвищувати витік Ca^{2+} з СПР, знижуючи кальцієву керованість кардіоміоцитів (Kandadi M. et al., 2010).

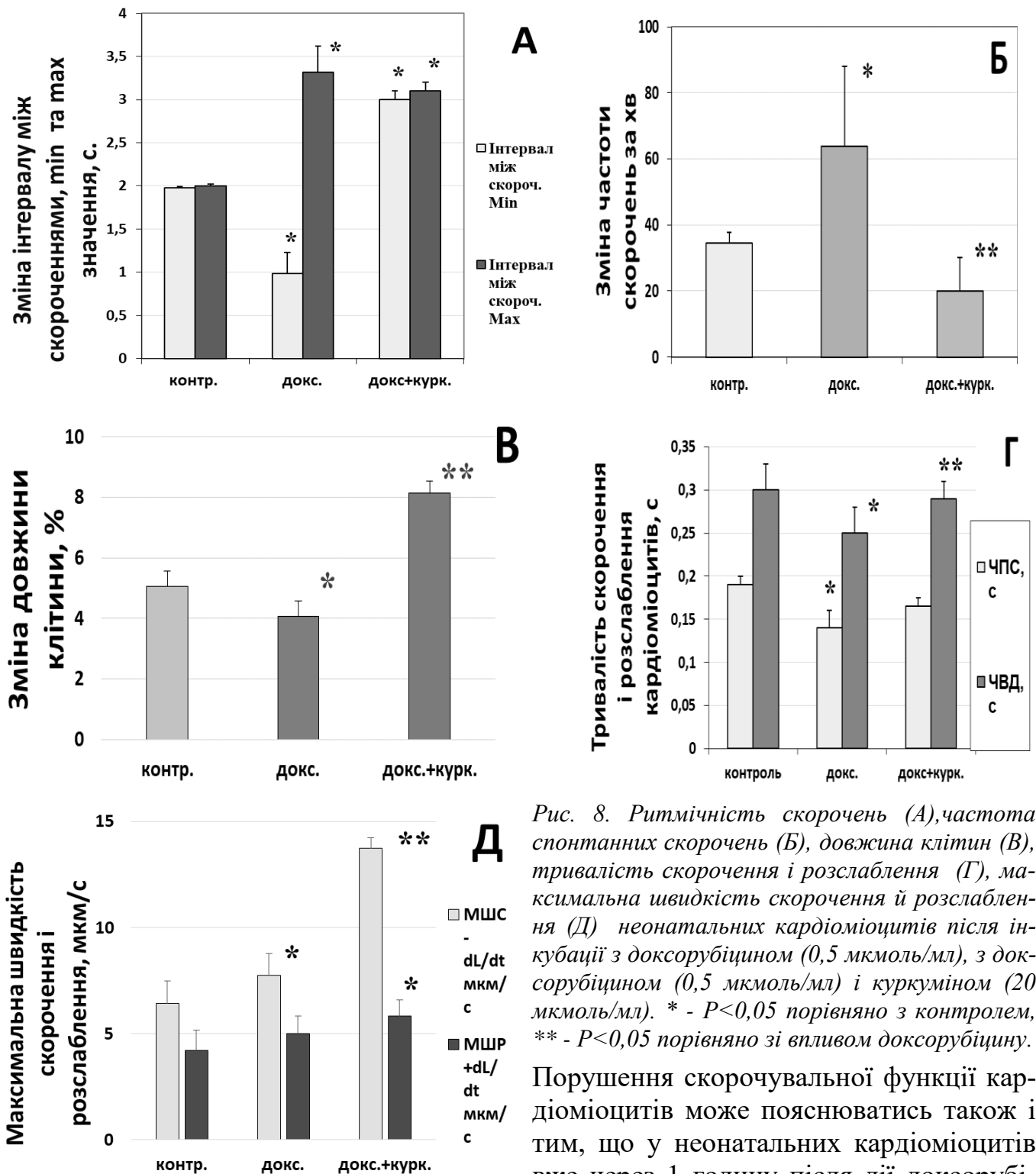


Рис. 8. Ритмічність скорочень (А), частота спонтанних скорочень (Б), довжина клітин (В), тривалість скорочення і розслаблення (Г), максимальна швидкість скорочення й розслаблення (Д) неонатальних кардіоміоцитів після інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл), з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл) і куркуміном (20 мкмоль/мл). * - $P < 0,05$ порівняно з контролем, ** - $P < 0,05$ порівняно зі впливом доксорубіцину.

Порушення скорочувальної функції кардіоміоцитів може пояснюватись також і тим, що у неонатальних кардіоміоцитів вже через 1 годину після дії доксорубіцину підвищується активність кальпаїну, який стимулює деградацію тітину (Mishra S. et al., 2011). Крім того, як було встановлено нами, доксорубіцин інгібує мітохондріальні K_{ATP} -канали, зменшує синтез АТФ, знижує мітохондріальний мембранний

потенціал і зменшує спряженість дихання і фосфорилювання в мітохондріях, що відображається на скорочувальній здатності кардіоміоцитів.

Інкубація з доксорубіцином і куркуміном призводила до значного зниження частоти спонтанних скорочень (в 3 рази), відновлення їх ритмічності, підвищення амплітуди та відсотку вкорочення в 2 рази, збільшення максимальної швидкості скорочення в 1,8 рази і підвищення швидкості розслаблення на 16 %, без значних змін тривалості цих процесів порівняно з моноінкубацією з доксорубіцином (рис. 8). Ці зміни можна пояснити тим, що куркумін має кардіопротективний ефект при пошкодженнях міокарду (Srivastav G. et al., 2009), впливаючи на активність цитокінів, ензимів та транскрипційних факторів, пов'язаних із розвитком оксидативного стресу (Ströfer M. et al., 2011). Куркумін відновлює енергетичні процеси в мітохондріях, активує мітохондріальні K_{ATP} -канали, а також значно зменшує токсичний вплив доксорубіцину на серце за рахунок його антиоксидантних властивостей (Swamy A. et al., 2012).

Порушення кардіогемодинаміки у щурів при моделюванні оксидативного стресу за допомогою доксорубіцину.

При визначенні кардіогемодинамічних показників було встановлено суттєві відмінності між досліджуваними групами тварин. Показники насосної функції у групі щурів з доксорубіцин-індукованим оксидативним стресом значно відрізнялись від контрольних: ЧСС зросла на 19%, фракція викиду знизилась на 46%, серцевий викид на 18%, ударна робота на 45%, а ударний об'єм на 18% ($P < 0,05$). При цьому, кінцево-сistolічний об'єм зростав на 75% порівняно з контролем ($P < 0,05$), що може свідчити про перерозтягнення міокарду лівого шлуночка.

Показники діастолічної функції серця були вищими за контрольні: кінцево-діастолічний об'єм був збільшений на 53%, кінцево-діастолічний тиск збільшився в 13 разів ($P < 0,05$), а ізovolюмічна константа розслаблення Тау знизилась на 15%, що може свідчити про порушення процесів розслаблення та розвиток діастолічної дисфункції. Кінцево-сistolічний тиск та dP/dt_{max} були нижчими у групі щурів, котрі отримували доксорубіцин на 42 та 48% відповідно ($P < 0,05$), що, при зниженні E_{max} (на 18%, $P < 0,05$), свідчить про зниження систолічної функції міокарду та пригнічення скорочувальної здатності серцевого м'яза у цих тварин.

Тобто, можна стверджувати наявність значного пошкоджуючого ефекту доксорубіцину не лише на клітинному, а й на рівні цілого організму. В літературі є дані щодо здатності доксорубіцину призводити до дилатаційної кардіоміопатії при тривалому використанні цього антибіотику (Li-yuan Shen et al., 2016). Причому, ця здатність залежить від дози і тривалості введення препарату. В нашому випадку середню дозу доксорубіцину вводили протягом тижня, що виявилось достатнім для спричинення не лише оксидативного стресу, а й початку розвитку дилатаційної кардіоміопатії.

ВИСНОВКИ

На підставі проведених досліджень отримано нові наукові дані про вплив антрациклінового антибіотику доксорубіцину на життєздатність кардіоміоцитів у культурі, про- та антиоксидантний баланс, окислювальне фосфорилювання і мітохондріальний мембранний потенціал, транспорт іонів калію, а також на рівень експресії кисень-чутливих генів міокарду. Досліджено вплив доксорубіцину на скорочувальну

активність неонатальних кардіоміоцитів і параметри кардіогемодинаміки у дорослих щурів і доведено ефективність фармакологічної корекції порушень мітохондріального апарату кардіоміоцитів за допомогою куркуміну при дії доксорубіцину. Відповідно до поставлених завдань і отриманих результатів зроблено наступні висновки.

1. Визначено рівень цитотоксичності різних концентрацій доксорубіцину та їх вплив на життєздатність кардіоміоцитів і встановлено оптимальну (0,5 мкМ) для досліджень доксорубіцин-індукованого оксидативного стресу *in vitro*.

2. Показано, що кількість загиблих клітин після інкубації культури неонатальних кардіоміоцитів з доксорубіцином збільшилась в 4,5 рази порівняно з контролем ($P < 0,05$). Застосування доксорубіцину з куркуміном призводило до підвищення життєздатності кардіоміоцитів на $9,4 \pm 0,01$ %, а кількість загиблих клітин зменшувалась на $19,5 \pm 0,01$ % порівняно із застосуванням лише доксорубіцину ($P < 0,05$).

3. В культурі неонатальних кардіоміоцитів і в міокарді щурів показано, що вплив доксорубіцину призводить до індукції оксидативного стресу і зростання активності його маркерних показників у мітохондріях. Застосування доксорубіцину з куркуміном призводило до значного зниження маркерів вільно-радикальних процесів та відновлення про- та антиоксидантного балансу в мітохондріях кардіоміоцитів. Встановлено негативну кореляційну залежність між кількістю живих кардіоміоцитів й вмістом ТБК-АП, H_2O_2 та активністю каталази ($r = -0,97, -0,63, -0,62$ відповідно).

4. Виявлено, що вплив доксорубіцину на мітохондрії кардіоміоцитів *in vivo* призводив до зниження ефективності роботи дихального ланцюга та використання O_2 у процесах фосфорилування, порушення рівня енергетичної регуляції дихання мітохондрій, зменшення спряження дихання і фосфорилування, зниження швидкості входу іонів К до ізольованих мітохондрій міокарду. Застосування доксорубіцину з куркуміном значно покращувало ці показники і запобігало розвитку мітохондріальної дисфункції при оксидативному стресі: V_3 підвищився на 25%, V_3/V_4^{ATP} - на 18%, а коефіцієнт ефективності фосфорилування - на 12%, а швидкість входу іонів К в мітохондрії зросла на 22,5 % порівняно з такою при дії доксорубіцину ($P < 0,05$).

5. Рівень потенціал-чутливого флуоресцентного компонента в мітохондріях (який характеризує зміни мітохондріального мембранного потенціалу) неонатальних кардіоміоцитів достовірно знижувався на 42% під впливом доксорубіцину. Інкубація клітин з куркуміном і доксорубіцином підвищувала життєздатність культури неонатальних кардіоміоцитів (в 2 рази, порівняно із застосуванням лише доксорубіцину), сприяючи зростанню або підтримці вихідної величини мітохондріального мембранного потенціалу.

6. Показано, що доксорубіцин достовірно ($P < 0,05$) знижує експресію не тільки гену HIF-1 α , а і його важливих генів-мішеней (PDK-1, TERT, IGF-1), одночасно підвищуючи експресію гену HIF-3 α в кардіоміоцитах щурів.

7. Встановлено, що доксорубіцин порушує скорочувальну здатність неонатальних кардіоміоцитів ($P < 0,05$). Застосування доксорубіцину з куркуміном достовірно ($P < 0,05$) підвищувало скорочувальну активність клітин (зменшувало частоту спонтанних скорочень, відновлювало їх ритмічність, амплітуду піку та відсоток вкорочення), що може бути пов'язано зі зменшенням проявів оксидативного стресу в кардіоміоцитах.

8. Виявлено виражені порушення кардіогемодинаміки у щурів з доксорубіцин-індукованим оксидативним стресом: достовірне зниження показників насосної функції, діастолічної функції серця та скорочувальної функції міокарду ($P < 0,05$), що вказувало на розвиток патологічного ремоделювання та ознаки початкових стадій дилатаційної кардіоміопатії у цих тварин.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. Тарасова К. В. Сучасні підходи до виділення, культивування і реєстрації скорочень кардіоміоцитів тварин різного віку. /Тарасова К. В., Лагодич Т. С., Лінник О.О., Шевчук В. Г. //Пробл. старения и долголетия. – 2011. – т. 20. – № 3. – С.273-91. *(Особисто дисертантом проведені дослідження і аналіз літератури).*
2. Лінник О. О. Вплив доксорубіцину на культуру ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щурів. /Лінник О.О., Древицька Т.І., Чорний С.А., Досенко В.Є., Маньковська І.М. //Вісник морфології. – 2014. – №2. – т.18. – С.383-87. *(Особисто дисертантом проведені дослідження, аналіз літератури, інтерпретація отриманих результатів, формулювання висновків, оформлення статті).*
3. Лінник О.О. Механізми порушень про- та антиоксидантного балансу кардіоміоцитів при дії доксорубіцину. /О.О. Лінник, Т.І. Древицька, О.О. Гончар, С.А. Чорний, О.М. Ковальов, І.М. Маньковська. //Фізіол.журн. – 2015. – 61. – №5. – С.90-98. *(Особисто дисертантом проведені дослідження, аналіз літератури, інтерпретація отриманих результатів, формулювання висновків, оформлення статті).*
4. Лінник О.О. Порушення скоротливої активності кардіоміоцитів за дії доксорубіцину. /О.О. Лінник, Т.І. Древицька, К.В. Тарасова, Г.В. Портніченко, В.Є. Досенко, І.М. Маньковська. //Фізіол. журн. – 2016. – Т.62. – №6. – С. 65-71. *(Особисто дисертантом проведені дослідження, аналіз літератури, інтерпретація отриманих результатів, формулювання висновків, оформлення статті).*
5. Лінник О.О. Вплив куркуміну на мітохондріальну функцію кардіоміоцитів при доксорубіцин-індукованому оксидативному стресі. /О.О. Лінник, О.О. Гончар, В.І. Носар, Т.І. Древицька, О.М. Ковальов, І.М. Маньковська. //Фізіол.журн. – 2017. – 63. – №1. – С.19-25. *(Особисто дисертантом проведені дослідження, аналіз літератури, інтерпретація отриманих результатів, формулювання висновків, оформлення статті).*
6. Тарасова К.В. АТФ-залежні калієві канали – спільна мішень кардіопротекторного впливу куркуміну і фторовмісного аналогу діазоксиду в умовах оксидативного стресу. /К.В.Тарасова, О.О.Лінник, І.М.Маньковська, Л.В.Братусь, В.І.Носар, І.Г.Строкіна, І.М.Карвацький. //Серце і судини. –2017. – №1. –С.75-82. *(Особисто дисертантом проведені дослідження, інтерпретація отриманих результатів і аналіз літератури).*

Тези доповідей:

- Linnyk O. Is it necessary HIF-3 α activation? In vitro and in vivo study. /Drevytska T, Gavenauskas B, Linnyk O, Drozdovska S, Mankovska I, Dosenko V. // Матеріали III Всеукраїнської наукової конференції молодих учених “\Фізіологія: від молекул до організму”. – Київ. – 2013. *Участь у постерній сесії.*
- Лінник О.О. Дослідження HIF-залежних процесів на культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура. /Древицька Т.І., Лінник О.О., Досенко В.Є., Мань-

ковська І.М. //Матеріали VI пленуму товариства патофізіологів України «Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології». – Вінниця. –2014. – С.17-19.

- Древицька Т.И. Роль транскрипционного фактора HIF в развитии ответа на повреждение кардиомиоцитов при моделировании аноксии/реоксигенации. /Древицька Т.И., Линник О.А., Досенко В.Е., Маньковская И.Н. //Матеріали XIX з'їзду Українського фізіологічного товариства ім.П.Г.Костюка з міжнародною участю. – Львів.– 2015.– Фізіол. журн. – 60 (3, додаток). – С.86-87.

- Тарасова К.В. Фармакологічна активація КАТФ каналів відновлює показники скоротливої активності ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура в умовах оксидативного стресу. Тарасова К.В., Лінник О.О., Древицька Т.І., Карвацький І.М. // Матеріали науково-практичної конференції: «Трансфер новітніх технологій в практику охорони здоров'я України». – Київ. – 2016.

- Древицька Т.І. Исследование HIF-зависимых процессов в культуре изолированных неонатальных кардиомиоцитов крыс. /Древицька Т.И., Линник О.А., Досенко В.Е., Маньковская И.Н. // Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції «Кислород и свободные радикалы». – Гродно, Білорусь. – 2016. – С.52-54.

- Древицька Т.І. Встановлення ефектів активації та блокування HIF-залежних процесів в культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура. /Древицька Т.І., Лінник О.О., Досенко В.Є., Маньковська І.М. // Матеріали VII Національного конгресу патофізіологів України «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції». – Харків.– 2016. – С.78-79.

- Лінник О.О. Нові аспекти кардіопротекції при оксидативному стресі. /Лінник О.О., Тарасова К.В., Носар В.І., Древицька Т.І. // Матеріали підсумкової LX науково-практичної конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (присвяченої 60-річчю ТДМУ). – Тернопіль. – 2017. – С. 316-18.

АНОТАЦІЯ

Лінник О.О. Порушення мітохондріального апарату кардіоміоцитів при доксорубіцин-індукованому оксидативному стресі: механізми та корекція. - На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. - Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2018.

Дисертація присвячена дослідженню порушень функцій мітохондрій кардіоміоцитів під впливом оксидативного стресу та можливості їх корекції куркуміном *in vitro* та *in vivo*. І в культурі неонатальних кардіоміоцитів, і в міокарді щурів показано, що вплив доксорубіцину призводить до індукції оксидативного стресу, зниження ефективності роботи дихального ланцюга та використання O₂ у процесах фосфорилювання, порушення рівня енергетичної регуляції дихання мітохондрій, зниження швидкості входу іонів K до ізольованих мітохондрій. Також показано, що доксорубіцин знижує експресію не тільки гену HIF-1α, а і його важливих генів-мішеней (PDK-1, TERT, IGF-1), одночасно підвищуючи експресію гену HIF-3α в кардіоміоцитах. Ці ефекти доксорубіцину негативно відображалися на скорочувальній активності кардіоміоцитів та кардіогемодинаміці щурів, вказуючи на початок розвитку дилатаційної кардіоміопатії. Застосування доксорубіцину й куркуміну разом призводило до значного зниження рівня вільно–радикальних процесів та відновлення

про— та антиоксидантної рівноваги в мітохондріях кардіоміоцитів, значно покращувало показники ефективності роботи дихального ланцюга, збільшувало швидкість входу іонів К, сприяючи підтримці вихідної величини мітохондріального мембранного потенціалу, та значно покращувало скорочувальну активність клітин.

Ключові слова: мітохондрії, кардіоміоцити, оксидативний стрес, доксорубіцин, куркумін, HIF.

АННОТАЦИЯ

Линник О.А. Нарушения митохондриального аппарата кардиомиоцитов при доксорубицин-индуцированном оксидативном стрессе: механизмы и коррекция. - На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04 - патологическая физиология. - Институт физиологии им.А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена исследованию нарушений функций митохондрий кардиомиоцитов под влиянием оксидативного стресса и возможности их коррекции куркумином *in vitro* и *in vivo*. Для решения вопросов, поставленных в диссертации, было оценено влияние доксорубицина на жизнеспособность неонатальных кардиомиоцитов в первичной культуре и определена выраженность оксидативного стресса в митохондриях (по изменениям интенсивности перекисного окисления липидов, активности антиоксидантных ферментов, уровню генерации перекиси водорода), выделенных из культуры изолированных неонатальных кардиомиоцитов и миокарда крыс, под воздействием доксорубицина. И в культуре неонатальных кардиомиоцитов, и в миокарде крыс показано, что влияние доксорубицина приводит к индукции оксидативного стресса. Установлено изменения параметров окислительного фосфорилирования, уровня потенциал-чувствительного флуоресцентного компонента в митохондриях (характеризующего изменения митохондриального мембранного потенциала) и скорости входа ионов К в изолированные митохондрии миокарда при доксорубициновой интоксикации. Выявлено, что воздействие доксорубицина на митохондрии кардиомиоцитов приводило к снижению эффективности работы дыхательной цепи и использования O_2 в процессах фосфорилирования, нарушению уровня энергетической регуляции дыхания митохондрий, уменьшению сопряжения дыхания и фосфорилирования, величины митохондриального мембранного потенциала (на 42%) и снижению скорости входа К в изолированные митохондрии миокарда. Произведена оценка экспрессии мРНК HIF-1 α и его генов-мишеней (PDK-1, TERT, IGF-1), а также экспрессии мРНК другой α -субъединицы HIF (HIF-3 α) в кардиомиоцитах при действии доксорубицина. Показано, что доксорубицин ингибирует экспрессию гена HIF-1 α и его генов-мишеней (PDK-1, TERT, IGF-1), одновременно повышая экспрессию гена HIF-3 α в кардиомиоцитах.

Совместное применение доксорубицина и куркумина приводило к значительному снижению уровня свободно-радикальных процессов и восстановлению про- и антиоксидантного равновесия в митохондриях кардиомиоцитов, существенно улучшало показатели эффективности работы дыхательной цепи и использования O_2 , увеличивало скорость входа ионов К в митохондрии, способствовало поддержке исходной величины митохондриального мембранного потенциала. При исследовании функциональной активности неонатальных кардиомиоцитов показано, что доксорубицин

снижает все показатели их сократительной способности и вызывает выраженные нарушения кардиогемодинамики у крыс с доксорубицин-индуцированным оксидативным стрессом. А совместное применение доксорубицина и куркумина существенно улучшало сократительную активность кардиомиоцитов (уменьшало частоту спонтанных сокращений, восстанавливало их ритмичность, амплитуду пика и процент укорочения), что может быть связано с уменьшением проявлений оксидативного стресса в кардиомиоцитах.

Ключевые слова: митохондрии, кардиомиоциты, оксидативный стресс, доксорубицин, куркумин, HIF.

SUMMARY

O.A. Linnik. Disturbances of mitochondrial apparatus of cardiomyocytes under doxorubicin-induced oxidative stress: mechanisms and correction. – Manuscript.

Thesis for a candidate of medical science degree by speciality 14.03.04 – pathological physiology. – Bogomoletz Institute of Physiology of the NAS of Ukraine, Kyiv, 2018.

Dissertation is devoted to investigation of mitochondrial function violations in cardiomyocytes under the influence of the doxorubicin-induced oxidative stress and the possibility of their correction by curcumin in vitro and in vivo. In the neonatal cardiomyocytes culture and rat myocardium, there was shown that doxorubicin exposure leads to induction of oxidative stress, the respiratory chain efficiency reduction, a decrease in energetic regulation of mitochondrial respiration, declining of the rate of K^+ entry to the isolated mitochondria. Also, it was shown, that doxorubicin inhibits not only the gene HIF-1 α expression but its important target genes (PDK-1, TERT, IGF-1) too, while increasing the gene HIF-3 α expression in rat cardiomyocytes. These negative effects of doxorubicin impact on the cardiomyocyte contractile activity and the rat cardiohemodynamic. The combined use of doxorubicin and curcumin led to a significant reduction in the free radical processes level and the pro- and antioxidant balance recovery in the mitochondria, significantly improving the functions of the respiratory chain, increasing the K^+ entry rate into mitochondria, helping to support mitochondrial membrane potential value and improving the cardiomyocytes contractile activity.

Keywords: mitochondria, cardiomyocytes, oxidative stress, doxorubicin, curcumin, HIF.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

HIF – hypoxia-inducible factor;

IGF-1 – insulin growth factor;

PDK-1 – pyruvate dehydrogenase kinase 1;

ROS – reactive oxygen species;

RT-PCR – reverse transcription - polymerase chain reaction;

TERT – telomerase reverse transcriptase;

АФК – активні форми кисню;

ВРО – вільно-радикальне окиснення;

НАД – нікотинамідаденіндинуклеотид;

мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота;

ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів;

СОД – супероксиддисмутаза;

ЧСС – частота серцевих скорочень.

