

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

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Лінник Оксана Олександрівна**

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

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**Порушення мітохондріального апарату кардіоміоцитів при  
доксорубіцин-індукованому оксидативному стресі:**

**механізми та корекція**

14.03.04 – патологічна фізіологія

Медичні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, текстів і результатів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Науковий керівник

Маньковська Ірина Микитівна, доктор медичних наук,  
професор

**Київ – 2018**

## АНОТАЦІЯ

**Лінник О.О. Порухення мітохондріального апарату кардіоміоцитів при доксорубіцин-індукованому оксидативному стресі: механізми та корекція. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

*Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук (доктора філософії) за спеціальністю 14.03.04 «Патологічна фізіологія». - Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2018.*

Дисертація присвячена дослідженню функціональних порушень мітохондріального апарату кардіоміоцитів щурів *in vitro* та *in vivo* та можливості їх корекції за допомогою куркуміну за умови доксорубіцин-індукованого оксидативного стресу у співставленні з показниками активності про- та антиоксидантної системи, а також експресії генів редокс-чутливих факторів транскрипції (HIF-1 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ , PDK-1, TERT, IGF-1), що приймають участь у регуляції мітохондріального метаболізму.

І в культурі неонатальних кардіоміоцитів, і в міокарді щурів показано, що вплив доксорубіцину погіршує функціональний стан клітин і призводить до індукції оксидативного стресу, зниження ефективності роботи дихального ланцюга та використання O<sub>2</sub> у процесах фосфорилування, порушення рівня енергетичної регуляції дихання мітохондрій, зниження швидкості входу іонів K до ізольованих мітохондрій. Ці ефекти доксорубіцину негативно відображалися й на скорочувальній активності кардіоміоцитів та кардіогемодинаміці щурів, вказуючи на початок розвитку дилатаційної кардіоміопатії. Вперше показано, що доксорубіцин інгібує експресію гену HIF-1 $\alpha$  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 змен-

шує 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.

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 $\alpha$  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.

**Ключові слова:** мітохондрії, кардіоміоцити, оксидативний стрес, доксорубіцин, куркумін, 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 (PhD) 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 $\alpha$  expression but its important

target genes (PDK-1, TERT, IGF-1) too, while increasing the gene HIF-3 $\alpha$  expression in rat cardiomyocytes. These negative effects of doxorubicin affect 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<sup>+</sup> entry rate into mitochondria, helping to support mitochondrial membrane potential value and improving the cardiomyocytes contractile activity.

The obtained results may be practical for the development of new means of correction of oxidative stress and mitochondrial disorders in cardiomyocytes in a number of pathological conditions (oncological, neurodegenerative, ischemic diseases, etc.). In addition, the disclosure of molecular, genetically determined mechanisms (changes in the expression of HIF-1,3 $\alpha$  genes and their target genes) in the development and correction of oxidative mitochondrial disorders can serve as a potentially new therapeutic approach to the treatment of human diseases associated with oxidative stress of different genesis.

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

## АННОТАЦИЯ

**Линник О.А. Нарушения митохондриального аппарата кардиомиоцитов при доксорубин-индуцированном оксидативном стрессе: механизмы и коррекция. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.**

*Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук (доктора философии) 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 доксорубина на жизнеспособность неонатальных кардиомиоцитов в первичной культуре и определена выраженность оксидативного стресса в митохондри-

ях (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  $K$  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 ионов  $K$  в изолированные митохондрии миокарда.

Произведена оценка экспрессии мРНК HIF-1 $\alpha$  и его генов-мишеней (PDK-1, TERT, IGF-1), а также экспрессии мРНК другой  $\alpha$ -субъединицы HIF (HIF-3 $\alpha$ ) в кардиомиоцитах при действии доксорубицина. Показано, что доксорубицин ингибирует экспрессию гена HIF-1 $\alpha$  и его генов-мишеней (PDK-1, TERT, IGF-1), одновременно повышая экспрессию гена HIF-3 $\alpha$  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  $K$  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.

## СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Основні наукові результати:

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 доксорубіцина. /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).*

#### **Апробація матеріалів дисертації:**

1. Drevytska T. Role of hypoxia-inducible factor 3 $\alpha$  (HIF-3 $\alpha$ ) in physical endurance of rats. Drevytska T, Gavenauskas B, Nosar V, Linnyk O, Drozdovska S, Mankovska I, Dosenko V. /Матеріали Х Україно-Польсько-Білоруської Конференції “Physiology and Pathology of Respiration: Advances in Basic Research and Clinic Applications”.– Київ. – 2013. *Публікація тез.*
2. Linnyk O. Is it necessary HIF-3 $\alpha$  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.*
3. Лінник О.О. Дослідження HIF-залежних процесів на культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура. /Древицька Т.І., Лінник О.О., Досенко В.Е.,

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

4. Древицкая Т.И. Роль транскрипционного фактора HIF в развитии ответа на повреждение кардиомиоцитов при моделировании аноксии/реоксигенации. /Древицкая 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. *Публікація тез, доповідь.*

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

6. Розова Е.В. Влияние различных концентраций доксорубина на структурно-динамические особенности митохондриального аппарата и ультраструктуру миокарда крыс. /Розова Е.В., Линник О.А.// Матеріали IX Міжнародного симпозіума "Актуальные проблемы биофизической медицины". – Київ. – 2016. – С.89-90. *Публікація тез.*

7. Древицька Т.И. Исследование HIF-зависимых процессов в культуре изолированных неонатальных кардиомиоцитов крыс. /Древицкая 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. *Публікація тез, доповідь.*

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



9. 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. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
10. Тарасова К.В. Функціональні та метаболічні ефекти впливу фторовмісного аналога діазоксиду на моделі оксидативного стресу. /Тарасова К.В., Лінник О.О., Носар В.І., Карвацький І.М. // Матеріали підсумкової LX науково-практичної конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (присвяченої 60-річчю ТДМУ). – Тернопіль. – 2017. – С. 360-62. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

	10
<b>АНОТАЦІЯ</b>	2
<b>ЗМІСТ</b>	10
<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ</b>	13
<b>ВСТУП</b>	15
<b>ОСНОВНА ЧАСТИНА</b>	23
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b>	23
1.1. Мітохондріальна дисфункція та оксидативний стрес.	23
1.1.1 Зміни структури і функцій мітохондрій кардіоміоцитів під впливом оксидативного стресу.	23
1.1.2. Використання антрациклінових антибіотиків (зокрема доксорубіцину) для моделювання оксидативного стресу та кардіоміопатії.	31
1.2. Роль транскрипційного фактора HIF в розвитку відповіді на пошкодження кардіоміоцитів щурів при моделюванні оксидативного стресу.	35
1.2.1. Загальні відомості про фактор, що індукується гіпоксією (HIF), та його значення в нормі та патології.	35
1.2.2. Структура транскрипційних факторів HIF та регуляція активності HIF у відповідь на гіпоксію.	36
1.3. Можливість корекції оксидативного стресу в кардіоміоцитах щурів, спричиненого доксорубіцином, різними методами.	43
1.3.1. Фармакологічні та нефармакологічні методи кардіопротекції при застосуванні доксорубіцину.	43
1.3.2. Роль змін експресії транскрипційного фактора HIF в регуляції вільнорадикальних процесів в кардіоміоцитах щурів та значення цих змін для кардіопротекції.	47
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ</b>	49
2.1. Моделі та об'єкти дослідження.	49

	11
2.2. Виділення та культивування неонатальних кардіоміоцитів.	49
2.3. Моделювання оксидативного стресу в культурі неонатальних кардіоміоцитів та у дорослих щурів за допомогою доксорубіцину та його корекція куркуміном.	50
2.4. Оцінка життєздатності кардіоміоцитів у культурі (фарбування мітохондрій прижиттєвим барвником Mitotracker, МТТ-тест).	51
2.5. Дослідження скорочувальної активності неонатальних кардіоміоцитів за умов оксидативного стресу.	51
2.6. Оцінка параметрів кардіогемодинаміки у щурів при моделюванні оксидативного стресу.	53
2.7. Виділення мітохондрій з культури неонатальних кардіоміоцитів щурів та з тканини серця дорослих щурів.	54
2.8. Дослідження окислювального фосфорилування, рівня потенціал-чутливого флуоресцентного компонента в мітохондріях, швидкості входу іонів калію до мітохондрій.	55
2.9. Методи оцінки активності про- та антиоксидантних систем мітохондрій в культурі неонатальних кардіоміоцитів та в серці дорослих щурів.	56
2.9.1. Оцінка вмісту ТБК-АП та $H_2O_2$ .	57
2.9.2. Визначення активності каталази (КАТ) і Мп-супероксиддисмутази (Мп-СОД).	57
2.10. Виділення тотальної РНК.	58
2.11. Напівкількісна зворотня транскрипція та полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР) у реальному часі.	59
2.12. Статистична обробка результатів.	61
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	63
3.1. Визначення дозозалежної дії доксорубіцину на життєздатність клітин в культурі неонатальних кардіоміоцитів.	63
3.2. Дослідження клітинної смерті в культурі неонатальних кардіоміоцитів.	64

	12
3.3. МТТ-тест культури неонатальних кардіоміоцитів.	65
3.4. Дослідження скорочувальної активності неонатальних кардіоміоцитів.	65
3.5. Порухення кардіогемодинаміки у щурів при моделюванні оксидативного стресу за допомогою доксорубіцину.	69
3.6. Дослідження показників про- та антиоксидантної системи у мітохондріях, виділених з неонатальних кардіоміоцитів та з міокарду щурів.	71
3.7. Оцінка змін параметрів дихання і фосфорилування мітохондрій, виділених з неонатальних кардіоміоцитів та з міокарду щурів.	77
3.8. Дослідження рівня потенціал-чутливого флуоресцентного компоненту в мітохондріях культури неонатальних кардіоміоцитів щурів.	78
3.9. Експресія мРНК HIF-1 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ і їх генів-мішеней (PDK-1, TERT, IGF-1) в мітохондріях, виділених з культури неонатальних кардіоміоцитів та з міокарду щурів.	80
<b>РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ</b>	87
<b>ВИСНОВКИ</b>	103
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</b>	105
<b>Додаток 1</b>	
<b>СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ</b>	130

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ANT– adenine nucleotide translocator;  
 AP-1 – activator protein – 1;  
 ATF/CREB - activating transcription factor;  
 ARNT – aryl hydrocarbon nuclear translocator;  
 cAMP – cyclic adenosine monophosphate;  
 CBP - cAMP response element binding protein;  
 COX – cytochrome c oxidase;  
 HIF – hypoxia-inducible factor;  
 HRE – hypoxic response element;  
 NF-κB – nuclear factor;  
 MAP – Mitogen-Activated Protein;  
 MAPK – mitogen-activated protein kinase;  
 MTF-1 – metal regulated transcription factor;  
 ODD – oxygen dependent degradation domain;  
 PARP1 – (полі-(АДФ-рібоза)-полімерази 1;  
 PDK-1 – pyruvate dehydrogenase kinase 1;  
 PHD – пролілгідроксилаза;  
 PI3K – phosphatidylinositol 3-kinase;  
 pVHL – protein von Hippel – Lindau;  
 ROS – reactive oxygen species;  
 RT-PCR – reverse transcription - polymerase chain reaction;  
 SAPK – stress activated protein kinase;  
 TERT – telomerase reverse transcriptase;  
 VEGF – vascular endothelial growth factor;  
 АФК – активні форми кисню;  
 ВРО – вільно-радикальне окиснення;

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

ІГТ – інтервальне гіпоксичне тренування;

НАД – нікотинамідаденіндинуклеотид;

ОМБ – окисна модифікація білків;

мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота;

ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів;

СОД – супероксиддисмутаза.

## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми дослідження

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 відповідальні 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 [1].

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 [2,3].

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 [4]. Нещодавно було показано, що HIF грає критичну роль в регуляції продукції ROS у мітохондріях завдяки різним механізмам [5,6]. Доведено, що при збільшенні утворення ROS мітохондріями підвищується експресія HIF-1 $\alpha$  та його генів-мішеней. Список цільових генів, експресія яких активується за дії HIF-1, постійно збільшується [7,8]. Одну групу становлять гени, продукти яких приймають участь в антиоксидантному захисті клітин, наприклад, піруват-дегідрогенази кіназа-1 (PDK-1) та теломераза (TERT) [6,9]. Ще одну групу становлять гени, продукти яких регулюють проліферацію та виживання клітин, зокрема інсуліноподібний фактор росту-1 (IGF-1) [7]. Розробка фармакологічних підходів до пригнічення експресії HIF може мати терапевтичне значення в лікуванні онкологічних 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 [10], що може бути ще одним фактором оксидативного пошкодження кардіоміоцитів. Недослідженим залишається питання про роль різних  $\alpha$ -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- $\alpha$  відіграє специфічну регуляторну роль при оксидативному стресі іншого генезу, який супроводжує гіпоксію навантаження [11]. 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 [12], одночасно впливаючи на активність цитокінів, ензимів та транскрипційних факторів, пов'язаних із розвитком оксидативного стресу [13]. Також куркумін зменшує токсичний вплив доксорубіцину на серце за рахунок його потужних антиоксидантних властивостей [14].

### **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).

**Метою** роботи є дослідження клітинних та молекулярно-генетичних механізмів порушень мітохондріальної системи кардіоміоцитів при доксорубіцин-індукованому оксидативному стресі та можливості фармакологічної корекції цих порушень.

Для вирішення цієї мети були поставлені наступні **завдання**:

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 іонів К до ізо-

льованих мітохондрій міокарду при доксорубіциновій інтоксикації.

4. Оцінити експресію мРНК HIF-1 $\alpha$  та його генів-мішеней (PDK-1, TERT, IGF-1), а також експресію мРНК іншої  $\alpha$ -субодиниці HIF (HIF-3 $\alpha$ ) 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 (оцінка параметрів кардіогемодинаміки у щурів при моделюванні оксидативного стресу, дослідження скорочувальної активності неонатальних кардіоміоцитів за умови оксидативного стресу), біохімічні (оцінка активності про- та антиоксидантних систем мітохондрій в культурі неонатальних кардіоміоцитів та в серці дорослих щурів), молекулярно-генетичні (виділення тотальної РНК напівкількісна зворотня транскрипція та полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР) у реальному часі), цитологічні (оцінка життєздатності кардіоміоцитів у культурі (фарбування мітохондрій прижиттєвим барвником Mitotracker, МТТ-тест), біофізичні (дослідження окислювального фосфорилування, рівня потенціал-чутливого флуоресцентного компонента в мітохондріях, швидкості входу іонів калію до мітохондрій) та статистичні (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 непараметрич-

ний критерій Манна-Уїтні; для визначення корелятивних зв'язків між окремими показниками використовували коефіцієнт кореляції Пірсона ( $r$ ) та методи кореляційно-регресійного аналізу; для визначення достовірності відмінностей між очікуваним розщепленням та отриманим використовували метод  $\chi^2$ ; результати вважалися статистично значимими при  $P < 0,05$ ).

### **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 умови доксорубіцин-індукованого оксидативного стресу у співставленні з показниками активності про- та антиоксидантної системи, а також експресії генів редокс-чутливих факторів транскрипції (HIF-1 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ , PDK-1, TERT, IGF-1), що приймають участь у регуляції мітохондріального метаболізму. Встановлено, що інкубація неонатальних кардіоміоцитів з доксорубіцином погіршує функціональний стан клітин, зокрема змінюються параметри їх скорочувальної активності. А при дослідженні *in vivo* спостерігалось погіршення показників кардіогемодинаміки у щурів, котрі отримували ін'єкції доксорубіцину. Вперше показано, що доксорубіцин інгібує експресію гену HIF-1 $\alpha$  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 $\alpha$  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.

Автор висловлює велику подяку за керівництво та цінні поради під час виконання та написання роботи провідному науковому співробітнику відділу по вивченню гіпоксичних станів Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця, доктору медичних наук, професору Маньковській І.М., завідувачу відділу загальної та молекулярної патофізіології, доктору медичних наук, професору Досенко В.Є., за керівництво та допомогу у виконанні експериментів – старшому науковому співробітнику відділу загальної та молекулярної патофізіології, кандидату біологічних наук Древицькій Т.І. та старшим науковим співробітникам відділу по вивченню гіпоксичних станів - кандидатам біологічних наук Гончар О.О. та Носар В.І.

### **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 й 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.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Мітохондріальна дисфункція та оксидативний стрес.

#### 1.1.1. Зміни структури і функцій мітохондрій кардіоміоцитів під впливом оксидативного стресу.

Відомо, що мітохондрії – це хондріосоми, які постійно присутні в клітинах тварин і рослин, забезпечують клітинне дихання, у результаті чого енергія вивільнюється або акумулюється в легко використовуваній формі [15]. Вони відрізняються рядом характерних морфологічних, біохімічних та функціональних властивостей, до яких можна віднести розмір, форму, здатність зафарбовуватись, специфічну структурну організацію, ліпопротеїдний склад та вміст великої кількості ферментів і коферментів, які разом приймають участь в процесах трансформації енергії в клітині.

Мітохондрія оточена внутрішньою та зовнішньою мембранами, які побудовані з подвійного шару фосфоліпідів і білків. Зовнішня мітохондріальна мембрана містить численні інтегральні білки – поріни та ферменти, які приймають участь у подовженні жирних кислот, окисленні адреналіну і біодеградації триптофану. Внутрішня мітохондріальна мембрана містить білки з такими видами функцій:

1. Білки, що відповідають за окислювальні реакції респіраторного ланцюжка.
2. АТФ-синтаза, яка виробляє в матриксі АТФ.
3. Специфічні транспортні білки, які забезпечують транспорт речовин.
4. Системи імпорту білків та АТФ.

Крім того, внутрішня мембрана містить фосфоліпід кардіоліпін. На відміну від зовнішньої мембрани, внутрішня мембрана не містить поринів і тому має низьку проникність для різних речовин; всі іони і молекули вимагають спеціальних мембранних транспортних білків для проникнення до та з матриксу. Саме завдяки наявності внутрішньої мембрани підтримується мембранний потенціал. На сьогоднішній день було проведено багато досліджень поринів мітохондрій. Так, встановлено існування

mPTP (mitochondrial permeability transition pore) – повільного каналу, що з'єднує зовнішню і внутрішню мембрани, пропускає іони та речовини з молекулярною масою до 1,5 kDa та має в своєму складі матриксний білок циклофілін D (CypD). Вона відкривається повільно у відповідь на високий рівень pH, перевантаження клітини  $\text{Ca}^{2+}$  та велику кількість ROS. Відповідно, низький рівень pH перешкоджає відкриттю mPTP, захищаючи клітину при ішемії. Також є дані щодо АТФ-чутливого калієвого каналу (mKATP) внутрішньої мембрани мітохондрій, можлива роль якого полягає в продукції ROS, а саме супероксидного аніона [16].

Важлива роль у переносі речовин крізь мітохондріальну мембрану відводиться ANT (adenine nucleotide translocator) – транслокатору аденінових нуклеотидів. Він забезпечує обмін між АТР, синтезованим в мітохондрії, та цитозольним ADP та є необхідним для активації PGC-1alfa (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha), транскрипційного коактиватора ядерних рецепторів. Доведено, що PGC-1-alfa знижує рівень генерації внутрішньоклітинних ROS завдяки підвищенню експресії антиоксидантних генів [17]. Нещодавно було досліджено ще один мітохондріальний порін – VDAC (voltage dependent anion-channel), протеїн, розташований на зовнішній мембрані. Основною його функцією є контроль обміну мітохондріальних метаболітів та участь у мітохондріально-опосередкованому апоптозі [18]. Матрикс мітохондрій містить близько сотні ферментів, мітохондріальні рибосоми, тРНК і декілька копій мітохондріальної ДНК, незалежних від ДНК, розташованої у ядрі клітини, тобто має свій власний генетичний матеріал і системи для виробництва власної РНК і білків. Ця нехромосомна ДНК кодує нечисленні мітохондріальні пептиди (13 у людини), що використовуються у внутрішній мембрані разом з білками, які кодуються генами клітинного ядра. Головні функції ферментів - окислення пірувату та жирних кислот і участь у циклі трикарбонових кислот. Основна функція мітохондрій – транспорт енергетичних субстратів (жирні кислоти, піруват, вуглеводний скелет амінокислот) із цитоплазми та їх окислювальне розщеплення з утворенням  $\text{CO}_2$  і  $\text{H}_2\text{O}$ , спряжене з синтезом АТФ (рис. 1.1).



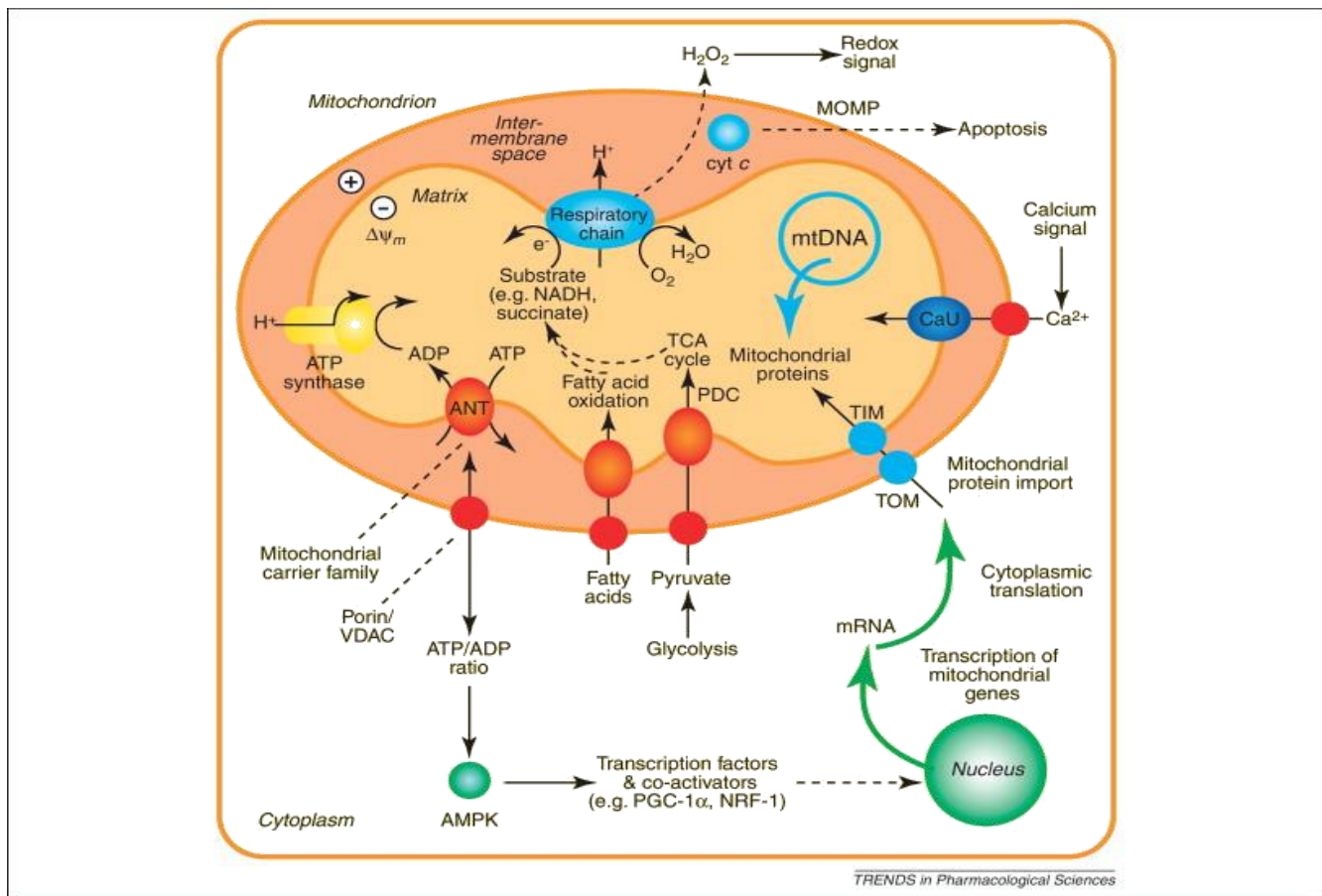


Рисунок 1.1 Метаболічні функції та транспортні системи мітохондрій [15].

Кількість та якість мітохондрій в клітині контролюється процесами мітохондріальної аутофагії, так званої мітофагії. Цей процес координується протеїном зовнішньої мембрани мітохондрій ATG32 (protein autophagy-related gene 32) і необхідний для вилучення пошкоджених мітохондрій [19]. Проведені дослідження показали, що порушення процесів мітофагії можуть призводити до розвитку нейродегенеративних захворювань [20]. Також мітохондрії грають важливу роль в інших внутрішньоклітинних процесах, наприклад:

1. Апоптоз — запрограмована смерть клітини.
2. Ексайтотоксичне пошкодження нейронів за допомогою глутамату.
3. Клітинний ріст.

4. Регуляція окислювально-відновлювального стану.
5. Синтез гему (відбувається під контролем транскрипційних кофакторів Nrf-1,-2,-3).

Є новітні дані щодо впливу гіпоксії на синтез гему. А саме, доведено значення фактора, що індукується гіпоксією (HIF) і впливає на основні зміни, що виникають при гіпоксії (активація експресії генів-контролерів гомеостазу заліза в організмі: трансферину і його рецепторів, церулоплазміну та гемоксигенази-1 [21]). І, напевно, найважливішою функцією мітохондрій є перетворення енергії в дихальному ланцюзі (рис. 1.2).

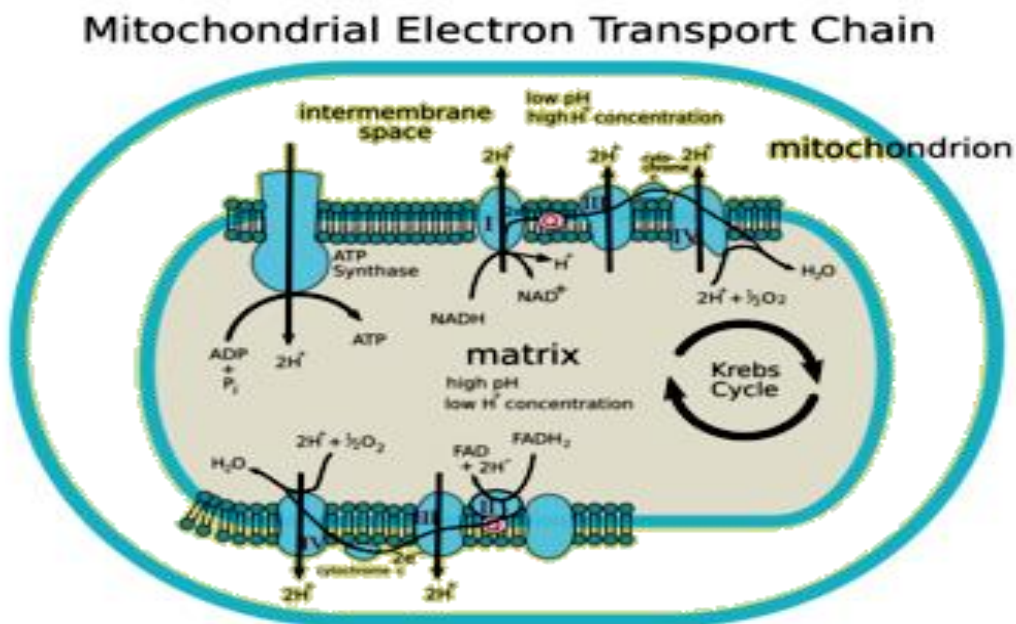


Рисунок 1.2. Електронтранспортний ланцюг [22].

До складу основних компонентів дихального ланцюга входять два флавопротеїдних фермента (сукцинат- і ДПН-дегідрогенази), чотири цитохроми, а також негемове залізо, мідь і кофермент Q. У трьох точках цього ланцюга за рахунок енергії електронів з АДФ і фосфату утвориться АТФ. Робота дихального ланцюга мітохондрій клітини пов'язана з переносом електронів уздовж, а протонів крізь внутрішню мембрану, яка містить низку ферментів оксидоредуктаз, а також допоміжні фактори, до кисню — кін-

цевого акцептору відновних еквівалентів ( $e^-$  та  $H^+$ ) — з утворенням води. Відновні еквіваленти надходять від відновлених форм коферментів (часто від НАД $\cdot$ H) та поступово пересуваються уздовж дихального ланцюга від більш електронегативної ланки до більш електропозитивної; при цьому на деяких ділянках ланцюга енергія окиснення використовується АТФ-синтетазою для утворення АТФ. Останнє відбувається при перенесенні протонів із міжмембранного простору мітохондрій через АТФ-синтетазу назад до матрикса [23].

За несприятливих умов, наприклад, при оксидативному стресі, спостерігаються порушення структури та функції мітохондрій. Так, за допомогою електронно-мікроскопічного дослідження мітохондрій кардіоміоцитів щурів виявляються ушкодження, які полягають в набуханні, вакуолізації та частковій редукції крист. У ядрі структурні порушення проявляються гіперхроматозом і руйнуванням ядра. При ушкодженні мембран лізосом відбувається вихід активних протеолітичних лізосомальних ферментів в цитозоль; їх руйнівна дія посилюється на фоні дефіциту макроергів. Також спостерігаються порушення функціонування цитоплазматичних і ендоплазматичних мембран, які можуть проявлятися у вигляді порушення їх проникності, зниження величини потенціалу спокою клітинної мембрани, зміни функціонування транспортних систем, порушення окислювального фосфорилування зі зниженням міри зв'язаності цього процесу [24].

У результаті окисно-відновних реакцій в організмі тварин постійно відбувається генерація активних форм кисню (АФК:  $O_2^-$ ,  $OH^-$ ,  $RO_2^-$ ,  $HO_2$ ,  $H_2O_2$  та ін.), які відіграють важливу роль у багатьох фізіологічних і біохімічних процесах. За нормальних фізіологічних умов АФК не нагромаджуються у клітинах. При підвищенні концентрації супероксидний радикал піддається спонтанній або ензиматичній дисмутації з утворенням пероксиду водню. Будь-яка стресова реакція організму в нормі супроводжується короточасним збільшенням кількості АФК. Це зумовлено адаптацією організму до екстремальних умов, за яких АФК відіграють роль вторинних месенджерів, беручи

участь у сигнальній трансдукції та активації факторів транскрипції і відповідних генів, зокрема тих, що кодують антиоксидантні ферменти [25]. АФК беруть участь у метаболізмі клітин, як вторинні месенджери при передачі регуляторного сигналу від міжклітинних сигнальних молекул і їх мембранних рецепторів на внутріклітинні регуляторні системи, які контролюють експресію генів [26]. У мітохондріях клітин утворення АФК зростає під дією TNF- $\alpha$  і IL-1 [27]. Участь інтерлейкіну та інтерферону у сигнальній трансдукції пов'язують з утворенням супероксидного радикалу, а TNF- $\alpha$  — з пероксиду водню [25].

АФК впливають на стан  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів, що приводить до звільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ендотеліальних клітин судин, саркоплазматичного ретикулуму скелетних та серцевого м'язів. Інгібування активності АТФ-залежного  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса саркоплазматичного ретикулуму спричиняє зростання пасивного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  і зростання його концентрації у цитозолі [28]. АФК активують також експресію генів, які відповідають за міжклітинну взаємодію і стан міжклітинного матриксу. Основна регуляторна система, яка контролює експресію генів під дією АФК, представлена в клітині MAP (Mitogen-Activated Protein) кіназами. АФК активують MAP-кіназний каскад, регулюючи активність транскрипційних факторів NF- $\kappa\text{B}$ , AP-1 и ATF-2. Високі концентрації АФК (NO, OH) можуть гальмувати активність MAP-кіназ [29]. Дія АФК, як сигнальних молекул у метаболізмі тканин, здійснюється за рахунок впливу на різні ланки метаболізму: фосфорилювання білків, проникливість мембран для іонів кальцію, активацію фосфоліпази A2, регуляцію факторів транскрипції [30].

Стаціонарний рівень ВРО і ПОЛ в організмі підтримується завдяки активності ферментних і неферментних антиоксидантних систем (АОС). Початкові стадії процесу ВРО контролюються супероксиддисмутазою (СОД), яка дезактивує супероксидний радикал і відповідно зменшує загальний токсичний ефект активних форм кисню. Пероксид водню, що утворюється при дисмутації супероксидного аніону, розкладається каталазою. Гідропероксили ліпідів відновлюються селеннезалежною глутатіонпероксидазою і глутатіонтрансферазою [31]. Жирнокислотні радикали і радикали кисню мо-

жуть інактивуватись антиоксидантами, що знаходяться як у гідрофобному мембранному (токоферол, ретиноїди, каротиноїди, убіхінони), так і гідрофільному внутрішньоклітинному (аскорбінова кислота, селенові похідні, тіолові сполуки, водорозчинні феноли, гістамін) середовищі [32]. Під дією АФК у клітинах проходить активація експресії редокс-чутливих генів, багато з яких необхідні для захисту клітин від токсичної дії окиснювального стресу, зокрема глутатіонпероксидази, хінонредуктази, каталази, супероксиддисмутази, глутатіонредуктази, глутамілцистеїнсинтетази [31]. Пошкодження антиоксидантного захисту внаслідок будь-якого екзогенного впливу призводить до посилення вільно-радикального окислення і ПОЛ (рис. 1.3). Це супроводжується зміною конформації ліпідів, що, в свою чергу, призводить до порушення структурних і функціональних властивостей мітохондрій, підвищення їх лабільності та проникності [33], розбалансування мембранолокалізованих ферментних систем, порушення електронтранспортних ланцюгів мітохондрій [34].

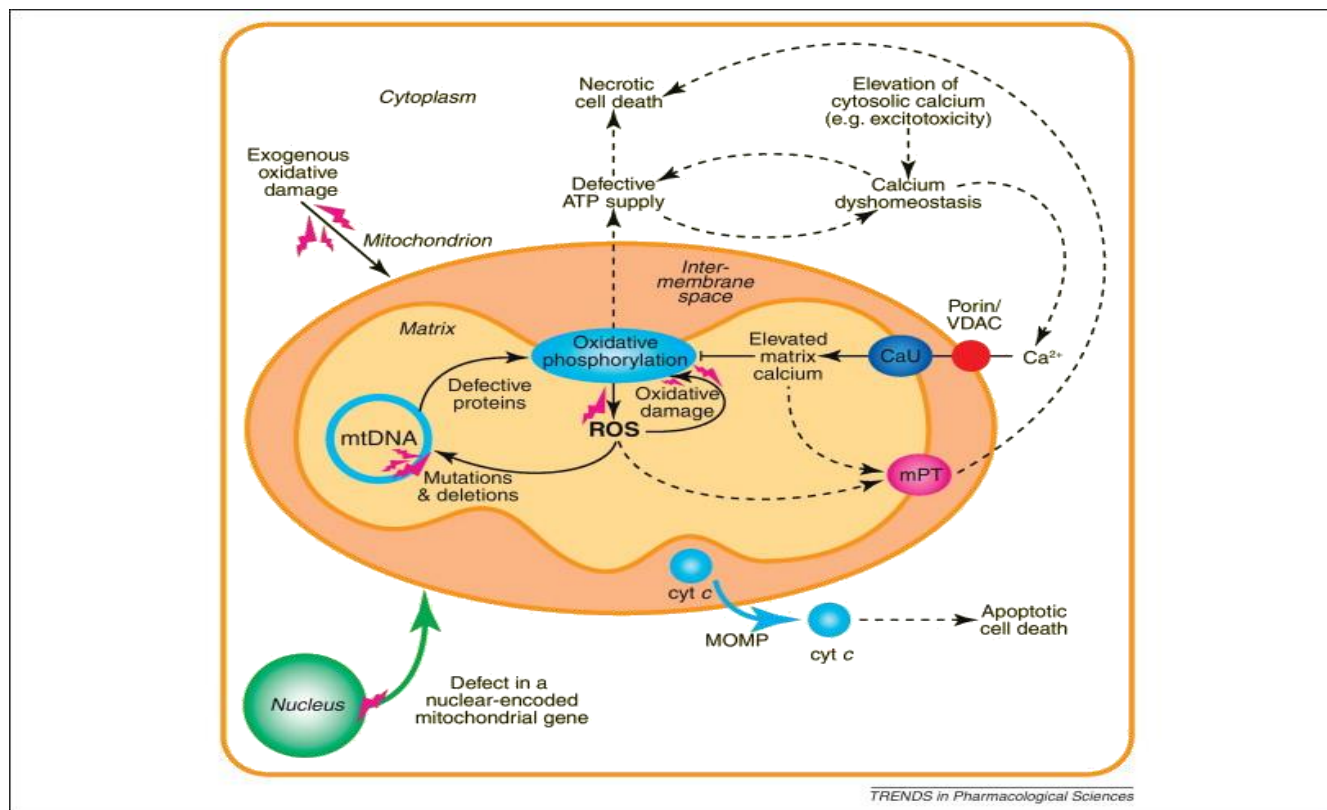


Рисунок 1.3. Механізми гіпоксичних змін у мітохондріях [15].

Мембранопшкоджуюча дія продуктів ліпопероксидації і подальші порушення клітинного метаболізму є провідною ланкою патогенезу майже усіх токсичних (гепато-, нефро-, кардіо-, нейротоксичного) ефектів, в тому числі й віддалених наслідків дії (ембріотоксичної, тератогенної, мутагенної, канцерогенної тощо) [35]. У людини оксидативний стрес є причиною або важливою складовою багатьох розповсюджених і тяжких захворювань, таких як атеросклероз [36,37], хвороба Паркінсона [38], гіпертензія [39], хвороба Альцгеймера [40], діабет [41], а також є однією з складових процесу старіння [42].

Оскільки біоенергетичні процеси в міокарді, оптимальні для функціонування серцевого м'яза, забезпечуються виключно аденозинтрифосфатом (АТФ), який синтезується в мітохондріях у результаті окисного фосфорилування за наявності молекулярного кисню [43], то за умови раптової ішемії міокарду зупиняється синтез АТФ у мітохондріях, і в клітинах відбувається швидке зниження рівня креатинфосфату, а згодом і АТФ [44].

За даними останніх досліджень, утворені окисномодифіковані білки в основному не відновлюються і повинні бути вилучені шляхом протеолітичної деградації. Ряд досліджень показав наявність MAD (mitochondria-associated degradation) шляху, котрий регулює якість мітохондріальних протеїнів. Внутрішньоклітинні білки переносяться на зовнішню мембрану мітохондрії, з'єднуються з Е3-убіквітином та акумулюються на зовнішній мембрані. Надалі під контролем ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation), Cdc48 (cell division cycle 42/p97) убіквітин-зв'язані протеїни знищуються протеасомами [45]. Тому зниження протеолізу може призвести до підвищення клітинного вмісту окисно змінених білків. В роботах [46,47] показано, що оксидативний стрес викликає безліч внутрішньоклітинних змін, включаючи апоптоз. Поєднання модифікації і деградації хімічно змінених білків входить у коло нормальних обмінних реакцій білків *in vivo*, тобто протеасомальна деградація є одним із проявів програмованої клітинної смерті [48].

### **1.1.2. Використання антрациклінових антибіотиків (зокрема доксорубіцину) для моделювання оксидативного стресу та кардіоміопатії.**

Активація вільно-радикального окиснення є одним із провідних патогенетичних механізмів ушкодження серця антрациклінами, антибіотиками, які широко використовують при лікуванні пухлин, що на сьогоднішній день особливо актуально у зв'язку зі зростанням серцево-судинної та онкологічної патології. Найчастіше в клінічній практиці застосовують природні антрацикліни I класу — даунорубіцин, доксорубіцин, карміноміцин; новий антибіотик II класу - акларубіцин; їх напівсинтетичні похідні - фарморубіцин, ідарубіцин і синтетичні похідні (антрацендіони) — мітоксантрон. Токсичний вплив на серце протипухлинних антрациклінових антибіотиків обумовлений пригніченням ними синтезу нуклеїнових кислот і як наслідок — блокадою поділу клітин головним чином в S і G2-фазах мітотичного циклу. У різних біологічних об'єктів антрацикліни можуть пригнічувати синтез переважно ДНК або РНК або однаковою мірою інгібувати їх утворення [49].

Вбудовуючись між сусідніми нуклеотидами, ці цитостатики порушують процеси реплікації і транскрипції нуклеїнових кислот, впливають на експресію генів, фосфорилювання білків [50], крім того, вони гальмують дію топоізомерази II — ферменту, що бере участь у відновленні розривів подвійних ланцюгів ДНК [51]. Ушкодження нуклеїнових кислот можуть спричиняти вільні радикали, що утворюються під впливом антрациклінів. Результати дослідження показали, що високореактивні метаболіти кисню індуюють одноланцюгові розриви ДНК [52]. Цитостатичний ефект цих антибіотиків, імовірно, реалізується і за рахунок їхньої прямої ушкоджуючої дії на цитоплазматичну мембрану [53]. Особливістю антрациклінів є те, що, крім характерних для переважної більшості цитостатиків побічних явищ, дані препарати мають значно виразнішу токсичну дію на серце [54].

Вже в терапевтичних дозах ці засоби спричиняють деструктивно-дистрофічні зміни в міокарді тварин: набрякання окремих м'язових волокон, дегенерацію міофібрил, гомо-

генізацію, вакуолізацію і резорбцію саркоплазми, порушення структури ядер [55]. Доксорубіцин має найбільшу кардіотоксичну дію порівняно з іншими антрациклінами. Вищезазначені зміни призводять до дисфункції міокарду і розвитку серцевої недостатності. Останніми роками інтенсивно вивчаються реакції ПОЛ як найімовірніший механізм кардіотоксичної дії антрациклінів. Вільні радикали, що утворюються при застосуванні цих цитостатиків, негативно впливають на серцевий м'яз і особливо на функцію та структуру мембран кардіоміоцитів [56]. Активація вільно-радикального окиснення є одним із провідних патогенетичних механізмів ушкодження серця цитостатиками. Окиснювальне ушкодження мітохондрій при розвитку антрациклінових кардіоміопатій підтверджує і дослідження Барабоє В. [57].

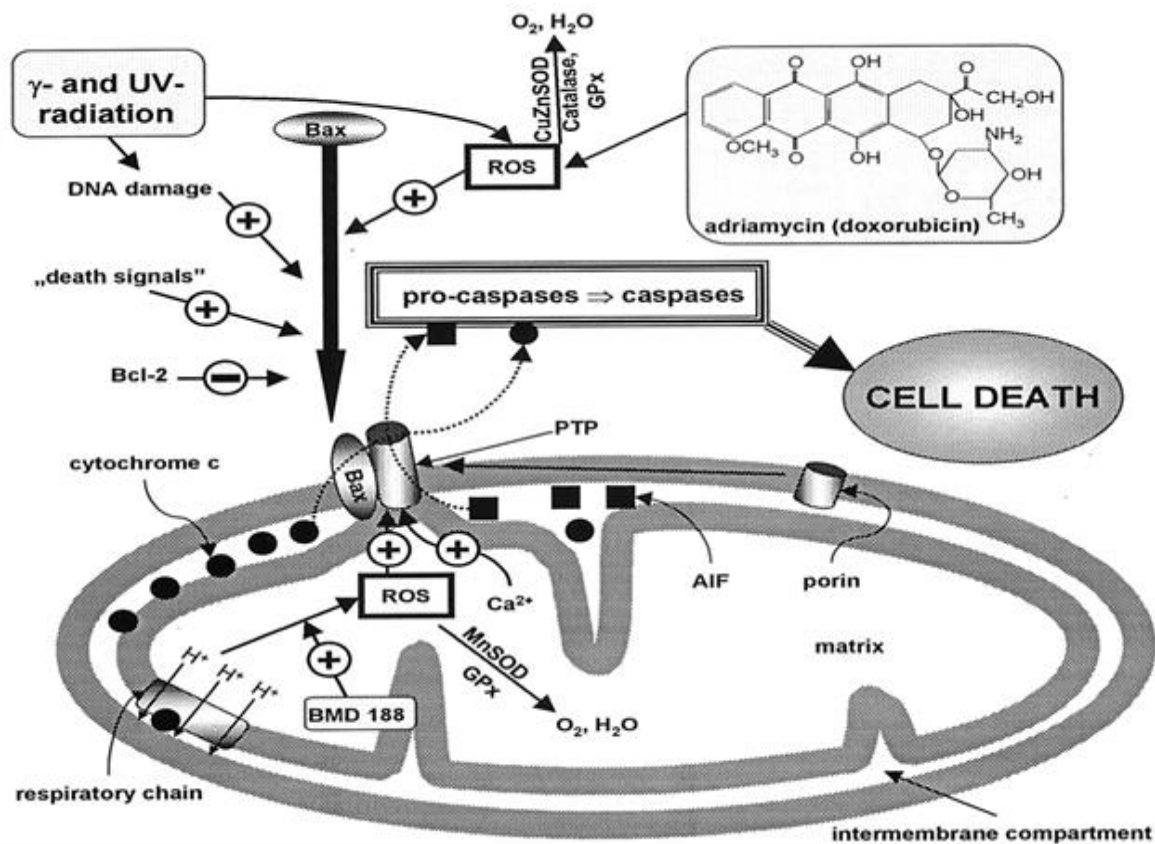


Рисунок 1.4. Схематичне зображення шляхів клітинної смерті в результаті різних варіантів пошкодження, зокрема при впливі доксорубіцину [58].

Підтверджено порушення структури мітохондрій кардіоміоцитів у процесі ушкодження серця антрацикліновими антибіотиками (рис. 1.4). Під їх впливом пригнічується ди-



хальний ланцюг мітохондрій клітин міокарду і знижується концентрація в них макроергічних фосфорних сполук [59]. Відзначено, що найбільш чутливою до ушкоджувальної дії цитостатиків є внутрішня мембрана мітохондрій. Припускають, що причиною такої вибіркової дії антрациклінів є їх спорідненість з кардіоліпіном, багатим на поліненасичені жирні кислоти, через що він найбільше піддається впливу інтенсифікації вільнорадикальних реакцій. Комплекс, що утворюється, «кардіоліпін-доксорубіцин» супроводжується такими конформаційними змінами фосфоліпиду, які порушують його взаємодію з сусідніми молекулами. Безпосереднім наслідком цього може бути ушкодження внутрішньої мітохондріальної мембрани, що призводить до різкого збільшення її проникності до відновленого нікотинаміддиніуклеотиду (НАДН) та іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , а також збільшення швидкості поглинання кисню. Цей процес супроводжується інактивацією ключових ензимів дихального ланцюга і порушенням окисно-відновних процесів у кардіоміоцитах [60]. Антрацикліни пригнічують креатин-активоване дихання мітохондрій серця або шляхом руйнування зв'язку комплексу «кардіоліпін-креатинкіназа», через що мітохондріальний ізоензим креатинкіназа втрачає структурний зв'язок із мембраною і може дифундувати в цитоплазму, або перешкоджати зв'язуванню креатинкінази з внутрішньою мембраною цих органел. Втрата цього ферменту призводить до порушення зв'язку між синтезом АТФ у мітохондріях і утворенням фосфокреатину [61]. Капелько В.І. та співавтори [62] встановили невідповідність між рівнем  $\text{Ca}^{2+}$  під час систоли і значенням систолічного тиску в серцях щурів, які одержували доксорубіцин. Це свідчить про пригнічення антибіотиком інотропної активності міофібрил внаслідок зниження енергетичних запасів міокарду. Ацидоз і накопичення фосфату значно знижують кальцієву активацію міофібрил, і це може бути причиною порушення співвідношення між  $\text{Ca}^{2+}$  і систолічним тиском. Крім того, з огляду на спорідненість доксорубіцину з кардіоліпіном та властивістю мітохондрій депонувати велику кількість  $\text{Ca}^{2+}$ , можна припустити, що на дію цього препарату органели клітини відповідають підвищеним накопиченням  $\text{Ca}^{2+}$  [63].

В іншому дослідженні [64], навпаки, відзначено зниження здатності мітохондрій із сердець щурів, що одержували доксорубіцин, акумулювати іони кальцію. Мабуть, доксорубіцин збільшує проникність внутрішньої мітохондріальної мембрани серця, а це, в свою чергу, супроводжується збільшенням чутливості кальцій-залежних каналів внутрішньої мітохондріальної мембрани до кальцію, що призводить до зниження мембранного потенціалу і вивільнення попередньо накопичених іонів [63].

Дискутується кілька можливих механізмів токсичного впливу антрациклінів на ДНК. По-перше, включення антрациклінового кільця між суміжними ділянками спіралі ДНК із порушенням її матричної функції. По-друге, деструкція ДНК може бути обумовлена дією реактивних субстанцій кисню. При цьому відзначено, що кисневі вільні радикали продукуються антрациклінами безпосередньо в геномному матеріалі й атакують практично всі його компоненти [65].

Інкубація культури клітин кардіоміоцитів з доксорубіцином призводить до швидкого селективного зниження експресії кардіальних м'язово-специфічних генів, що передуює іншим змінам, характерним для антрациклінової кардіоміопатії. Зокрема, доксорубіцин селективно знижував рівні м-РНК для генів саркомерів, а-актину, тропоніну-1 і легких ланцюгів міозину, а також м'язово-специфічну, але несаркомерну М-ізоформу креатинкінази. У той же час він не впливав на транскрипцію нем'язових генів (піруваткіназу, тяжкий ланцюг феритину і b-актин). При цьому неантрацикліновий антибіотик актиноміцин Д — інгібітор ДНК-залежної РНК-полімерази — не спричиняв подібного селективного зниження м'язово-специфічної мРНК. Ефект доксорубіцину на експресію м'язових генів був обмежений тільки серцевим м'язом, культура скелетних м'язів була резистентною до його впливу при 100-кратному збільшенні дози, що обумовлює зміни у мРНК кардіоміоцитів [66].

Все це стало причиною використання доксорубіцинової моделі для відтворення оксидативного стресу *in vitro* та кардіоміопатії *in vivo* та дало можливість дослідження глибинних генетично-молекулярних механізмів впливу антрациклінових антибіотиків на мітохондріальний апарат кардіоміоцитів.

## **1.2. Роль транскрипційного фактора HIF в розвитку відповіді на пошкодження кардіоміоцитів щурів при моделюванні оксидативного стресу.**

### **1.2.1. Загальні відомості про фактор, що індукується гіпоксією (HIF), та його значення в нормі та патології.**

Важливе значення мають молекулярні механізми адаптації до кисневої недостатності різного походження. Так, генетично обумовлені регуляторні механізми, які складають фундаментальну основу біологічної відповіді на гіпоксію, наразі активно досліджуються. Великим кроком у цій області було відкриття регуляторного кисеньчутливого протеїнового комплексу, який має транскрипційну активність – фактора, що індукується гіпоксією (hypoxia-inducible factor, HIF) [67,68]. Він одним з перших реагує на нестачу кисню, в тому числі й на підвищення продукції вільних радикалів кисню у мітохондріях [4,69]. При дослідженні регуляції мітохондріального метаболізму за допомогою HIF-1 показано, що при гіпоксії та, відповідно, при збільшенні утворення ROS мітохондріями, підвищується експресія HIF-1 $\alpha$  та його генів-мішеней. Отже, з одного боку, HIF-1 спричиняє розвиток клітинної адаптації до гіпоксії шляхом активного зниження споживання кисню в мітохондріях через дію свого гена-мішені PDK-1, що за гіпоксичних умов стимулює гліколітичні процеси у клітині та запускає процес аутофагії через BNIP3. З іншого боку, HIF-1 впливає на експресію miR-210, що здатна знижувати вираженість апоптозу та регулювати експресію субодиниці COX-4, пов'язану з активністю цитохром с-оксидази, продукцією АТФ, швидкістю споживання кисню та утворенням ROS у мітохондріях, тобто HIF-1 регулює гомеостатичну відповідь, яка оптимізує функцію мітохондріального дихання при зниженні PO<sub>2</sub> та підвищенні генерації ROS у клітинах. Інший ген-мішень HIF, теломераза (TERT), окрім загально відомих властивостей щодо подовження теломер у клітинах, що здатні до поділу, згідно сучасних даних, виконує ще і так звані неканонічні функції у клітинах, що не діляться (кардіоміоцити, нейрони) [70]. Так, Mattiussi зі співавторами показали, що теломераза сприяє підвищенню життєздатності як пухлинних, так і стовбурових клітин завдяки

зниженню рівня продукції активних форм кисню, та діє як транскрипційний кофактор в Wnt- $\beta$ -катеніновому шляху [9].

### 1.2.2. Структура транскрипційних факторів HIF та регуляція активності HIF у відповідь на гіпоксію.

Фактор, що індукується гіпоксією (HIF) – гетеродимерний транскрипційний комплекс, який впливає на широкий діапазон клітинних функцій, таких як еритропоез, ангиогенез, гліколіз, метаболізм заліза, диференціація клітин, ріст, апоптоз тощо. За новітніми даними, HIF – димерний транскрипційний комплекс, який складається з  $\alpha$ -субодиниці (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  або HIF-3 $\alpha$ ) та  $\beta$ -субодиниці (також відомої як ARNT - aryl hydrocarbon nuclear translocator 1, ARNT2 та ARNT3) [71,72]. Активність транскрипційного фактора HIF регулюється на декількох етапах, таких як транскрипція, процесінг, трансляція і посттрансляційні модифікації білка HIF-1 $\alpha$ , внутрішньоклітинна локалізація, димеризація та взаємодія з транскрипційними коактиваторами. Існує декілька механізмів для пояснення того, яким саме чином працюють сенсори кисню та яким чином запускається деградація або активація HIF (рис. 1.5). Субодиниця HIF-1 $\alpha$  містить ODD домен (oxygen dependent degradation) і є кисень-чутливою, вона виконує специфічну функцію генної регуляції, що стимулюється гіпоксією і є мішенню для кисень-чутливих сигнальних шляхів. Причому, стабільність HIF-1 $\alpha$  залежить від внутрішньоклітинних концентрацій активних форм кисню та O<sub>2</sub>. Субодиниця HIF-1 $\beta$  експресується конститутивно і є кисень-нечутливим ядерним протеїном [73]. Обидві субодиниці HIF-1 експресуються постійно, але за нормоксичних умов 1 $\alpha$  субодиниця комплексу гідроксидується по двох залишках проліну (Pro402 і Pro564). Це гідроксидування пролінів каталізується родиною внутрішньоклітинних проліл-гідроксилаз, що позначаються PHD/HPH. Гідроксидування слугує сигналом для розпізнавання  $\alpha$ -субодиниці фактором von Hippel-Lindau – білком-супресором пухлин (VHL), компонентом E3 комплексу убіквітинлігази, це забезпечує деградацію субодиниці HIF-1 $\alpha$  убіквітин-протеасомним шляхом [74-76]. За гіпоксичних умов гідроксидування про-

лінів HIF-1 $\alpha$ , яке залежить від концентрації молекулярного кисню в цитоплазмі, блокується. Це дозволяє HIF-1 $\alpha$  уникнути VHL-контрольованої протеасомної деградації [77].

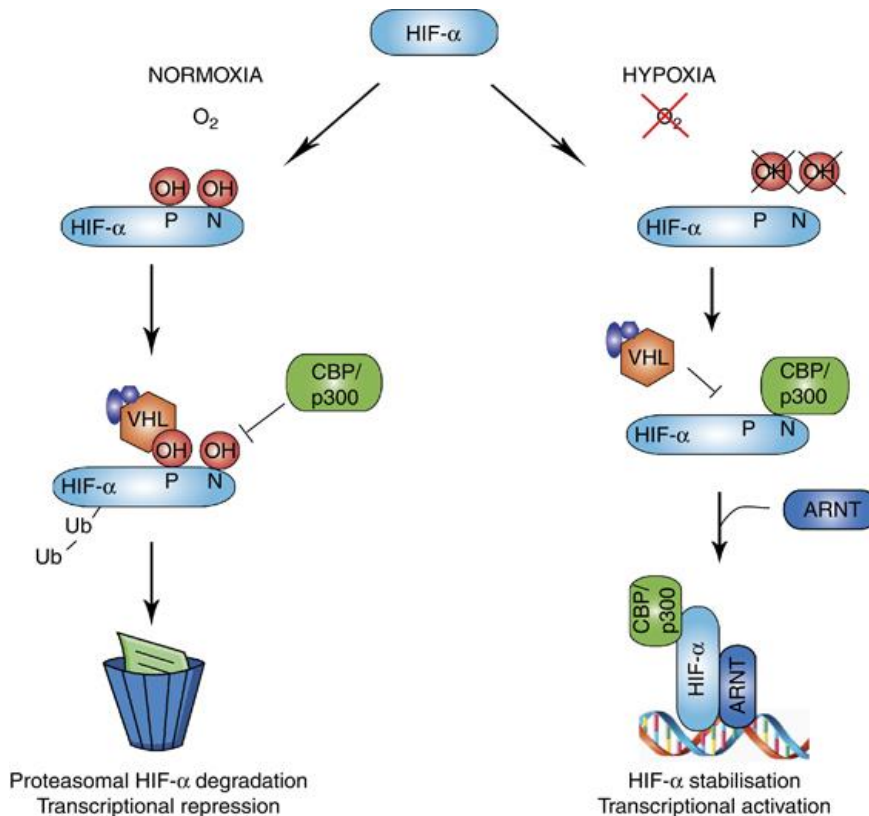


Рисунок 1.5. Схематичне зображення регуляції HIF-1 при гіпоксії та нормоксії [78].

Інший механізм регуляції активності експресії фактора HIF пов'язаний з кіназним шляхом передачі. Після утворення АФК відбуваються окисно-відновні модифікації сульфгідрильних груп сенсорних білків, які передають сигнал по регуляторним каскадам, робота яких залежить від активації специфічних рецепторів. В подальшому активуються кіназні каскади, які включають наступні кінази – MAPK, ERK, SAPK, змінюється робота іонних каналів тощо. В результаті за рахунок фосфорилування відбувається активація відповідних факторів транскрипції – HIF, AP-1 (activator protein – 1), NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B), які індукують гени репаративних та стрес-білків, а також „гіпоксичних білків” [79-81]. Крім того, відомо, що залізо-сірчаний кластер, який входить до складу HIF-1 $\alpha$ , може виконувати функції рецептору АФК. При нестачі кисню в

мітохондріях підвищується синтез АФК, під дією яких відбувається дисоціація та окислення зв'язаних з HIF-1 $\alpha$  іонів двовалентного заліза. В результаті, протеолітична деградація субодиниці HIF-1 $\alpha$  стає неможливою і вона, завдяки зв'язуванню з ядерним транслокатором ARNT, переміщується в ядро [82,83]. Гіпоксія призводить до зменшення рівня енергетичних субстратів та підвищення рівнів шкідливих метаболітів та активних форм кисню, проте HIF-1 дуже швидко запускає реалізацію компенсаторних реакцій через експресію своїх генів-мішеней. Наприклад, при переключенні з аеробного на анаеробний метаболізм HIF-1 активує експресію ряду факторів, які приймають участь у метаболізмі та транспорті глюкози [84]. В умовах гіпоксії піруват перетворюється на лактат, ця реакція каталізується цільовим геном HIF – лактатдегідрогеназою 1 [85]. Крім того, показано, що активація транскрипційного фактора HIF призводить до оптимізації мітохондріального дихання через регуляцію експресії білків комплексу COX (cytochrome C oxidase). Було доведено, що HIF активує транскрипцію генів COX4/2 та мітохондріальної протеази LON, що призводить до збільшення мРНК COX4/2, синтезу білка та збільшення протеолізу COX4/1. Як HIF-1 $\alpha$ , так HIF-2 $\alpha$  вносять вклад у регуляцію експресії гена LON [86].

Щодо HIF-3 $\alpha$ , то однією із найбільш вивчених сплайс-ізоформ HIF-3 $\alpha$  є IPAS (inhibitory PAS domain protein), домінант-негативний варіант альфа-субодиниці HIF [87,88]. IPAS має два домени: bHLH та PAS, але не має трансактивційного домену. Він може димеризуватися з HIF-1 $\beta$ , що зменшує можливість взаємодії HIF-1 $\alpha$  з HIF-1 $\beta$ , оскільки такий комплекс не здатен зв'язуватися з HRE. Підвищення рівня мРНК HIF-3 $\alpha$  за гіпоксії виявляється уже через дві години. Високі рівні HIF-3 $\alpha$  спостерігаються у тимусі [89], активно досліджується його роль при гіпоксії в легенях [90,91]. При цьому вплив HIF-3 $\alpha$  на тканину серця при оксидативному стресі залишається мало дослідженим [92].

Транскрипційний фактор HIF приймає участь у ключових фізіологічних та патофізіологічних процесах, відповідає за регуляцію важливих фізіологічних процесів,

пов'язаних з ростом, розвитком та виживанням організму через транскрипційну активування ряду генів-мішеней (рис. 1.6). Трансактивація цільових генів також вносить вклад у розвиток захисних або патологічних відповідей: при певних захворюваннях HIF активує гени, які регулюють цілий ряд адаптивних відповідей на зниження напруженн якисню в клітині. Цей транскрипційний фактор зв'язується з генами-мішенями, які містять в своєму складі елементи відповіді на гіпоксію (HRE – hypoxia response element) в клітинах ссавців і, таким чином, ініціюють експресію відповідних генів. В перелік генів-мішеней, який постійно поповнюється, входять гени, які приймають участь у вищеописаних різноманітних клітинних процесах, а також в окислювальному фосфорилюванні, метаболізмі глюкози, вільно- радикальних процесах, онтогенезі тощо [79].

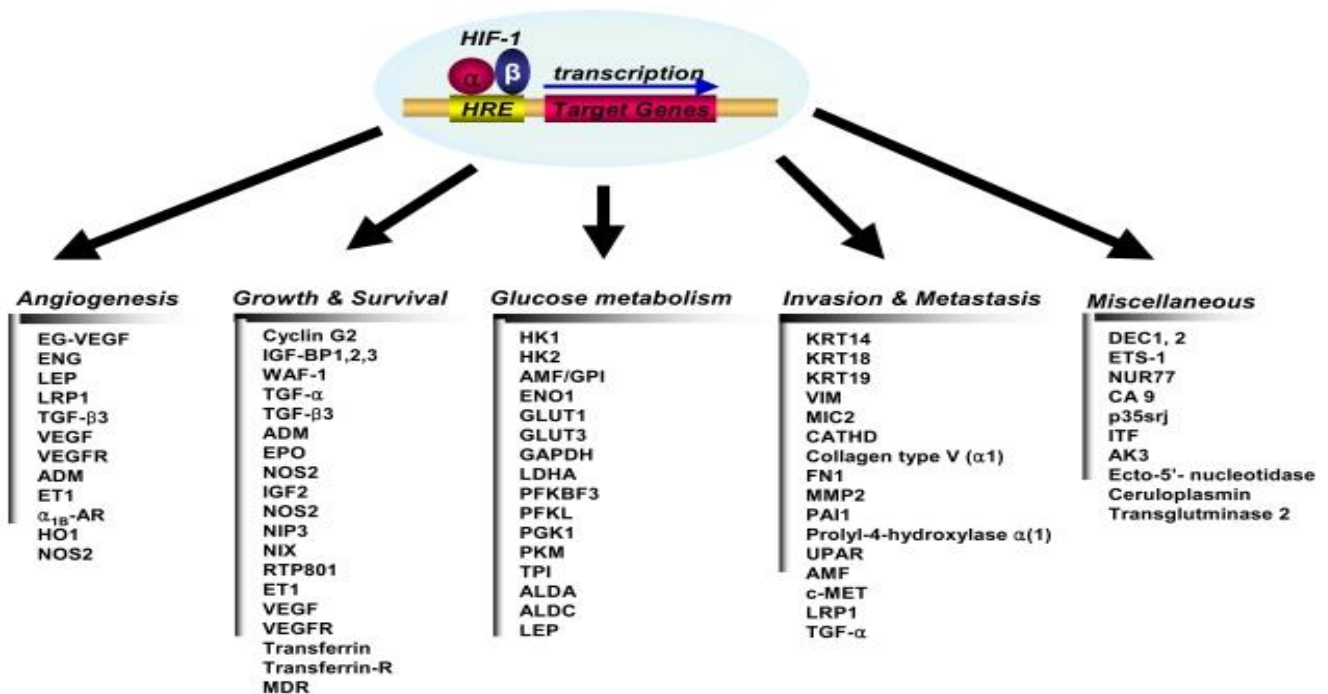


Рисунок 1.6. Вибірка генів-мішеней HIF, які приймають участь у різноманітних адаптивних процесах [93].

З моменту відкриття HIF було встановлено зв'язок цього фактора з багатьма патологічними процесами, спричиненими гіпоксією [94]. Зокрема: міокардальною ішемією [72,95], мозковою ішемією [96,97,5], ретинальною ішемією [5], легеневою гіпертензією

[98,99], гірською хворобою [100,101], хворобою Паркінсона [102], онкологічними захворюваннями [103].

Першим описаним геном-мішенню HIF був ген EPO, який кодує еритропоетин-глікопротеїновий гормон, який контролює еритропоез і підтримує гомеостаз заліза в нашому організмі. У дорослої людини він утворюється переважно в нирках, а в ембріональному періоді практично повністю - в печінці плода. Зменшення вмісту доступного кисню в крові, що досягає нирок, підвищує вироблення еритропоетину, що, в свою чергу, викликає збільшення швидкості утворення і диференціювання клітин еритроїдного ряду в кістковому мозку. Еритропоетин, таким чином, бере участь в фізіологічному відповіді організму на анемію і гіпоксію [104]. Рівень EPO контролюється HIF-1 і HIF-2 [105]. При гіпоксії, інтерстиціальні фібробласти в нирках стабілізують ці ізоформи. Потім вони гетеродімеризуються з HIF-1 $\beta$ , транслокуються до ядра, де зв'язуються з HRE елементом на промоторі гену EPO і підвищують його експресію [106]. Після запуску в циркуляторне русло, EPO взаємодіє з рецептором EPOR незрілих еритроцитарних попередників і сприяє їх виживанню і дозріванню [107]. В результаті, це збільшує кількість червоних кров'яних клітин, зменшує рівень тканинної гіпоксії, а також збільшує деградацію HIF, що, в свою чергу, зменшує експресію EPO. За допомогою цього механізму нирка і EPO служать в якості датчиків для підтримання кисневого гомеостазу.

Одним з найважливіших генів, що регулює анаеробний гліколіз, є кіназа піруват дегідрогенази (pyruvate dehydrogenase kinase 1 – PDK-1). PDK-1 - поліпептидний ланцюг, котрий складається з 429 аміно-залишків і має молекулярну масу 48.6 kDa [108]. На сьогодні ідентифіковано 4 ізоформи PDK, експресія яких є тканинно-специфічною. Так, PDK-1 виявлено в серці, панкреатичних острівцях і скелетних м'язах; PDK-2 експресується в усіх тканинах; PDK-3 знайдено в нирках, яєчках та мозку; PDK-4 наявний в серці, скелетних м'язах, нирках та панкреатичних острівцях. В дослідженні Masato et al. було припущено можливість використання PDK-4 як ліків



при діабеті 2 типу [109]. Тканинна специфічність ізоензимів PDK, їх різноманітна активність та вибіркова чутливість до ефекторів та метаболітів забезпечує координовану регуляцію метаболізму та гомеостазу глюкози в організмі [110]. PDK-1 фосфорилує піруват дегідрогеназу PDH (мітохондріальний мультиферментний комплекс, який каталізує окисне декарбоксилування пірувату і є одним із головних ферментів, відповідальним за регуляцію гомеостазу вуглеводних джерел енергії у ссавців), що призводить до її інактивації, і, як наслідок, – до зменшення надходження пірувату до мітохондрій. Зменшуючи кількість пірувату в мітохондріях PDK-1 тим самим протидіє зниженню ефективності електронного транспорту при гіпоксичних умовах, що в іншому випадку могло б підвищити продукцію ROS. Також завдяки цьому утилізується глюкоза, котра є субстратом для окисного фосфорилування [111].

Весь цей процес контролюється транскрипційним фактором HIF. Наприклад, під час гіпоксії HIF-1 знижує продукцію гіпоксично-індукованих мітохондріальних АФК завдяки активації PDK-1 [6]. Також HIF-1 супресує функцію органел, модулюючи реципрокні взаємовідношення між гліколізом та окисним фосфорилуванням. Переключення між ними контролюється двома ферментами — лактатдегідрогеназою (LDH) та піруватдегідрогеназою (PDH); активність останнього, у свою чергу, залежить від кінази PDK-1. З'ясовано, що зниження рівня HIF-1 інактивує PDK-1 навіть за умови нормоксії і тим самим гальмує цикл Кребса, зменшуючи утворення ацетил-СоАз пірувату та дихання мітохондрій [111-113].

Ще одним широко досліджуваним геном-мішенню HIF є теломераза (TERT). Це ДНК-полімераза, котра добудовує 3'-кінці лінійних молекул ДНК хромосом короткими (6-8 нуклеотидів) повторюваними послідовностями (у хребетних TTAGGG). Крім білкових субодиниць теломераза містить РНК, що виконує роль матриці для нарощування ДНК повторами. Довжина теломеразної РНК коливається від 150 нуклеотидів у найпростіших до 1400 нуклеотидів у дріжджів; у людини - 450 нуклеотидів. Сам факт наявності в РНК послідовності, з якої йде матричний синтез частини ДНК, дозволяє віднести теломеразу до своєрідної зворотної транскриптази, тобто ферменту, здатного

проводити синтез ДНК матриці РНК. Експресія теломерази грає важливу роль в клітинному старінні, так як вона, як правило, виявляється в репресованих постнатальних соматичних клітинах в результаті прогресивного вкорочення теломер. Порушення регуляції експресії теломерази в соматичних клітинах можуть бути однією з причин онкогенезу. Дослідження, проведені на щурах, дозволяють припустити, що теломераза також бере участь в репарації хромосом, так як *de novo* синтезовані теломерні повторення можуть відбуватися при двониткових розривах [114]. В той же час теломераза грає величезну роль в захисті мітохондріальної ДНК та білків від вільно-радикального окислення. Зокрема, було показано, що активність теломерази підвищується у відповідь на оксидативний стрес [115]. Також TERT може сприяти проліферації пухлинних [116] та стовбурових клітин [117] завдяки зниженню рівня АФК і виступаючи як транскрипційний кофактор в Wnt- $\beta$ -катенін сигнальному шляху або за допомогою активації спільно p53 / HIF-1 $\alpha$  [70,9]. Є дані про зв'язок між зростаючим впродовж часу пошкодженням ДНК в результаті оксидативного стресу при хронічних захворюваннях та збільшенням активності теломерази [118,119]. На сьогоднішній день дослідження активності теломерази є одним з найактуальніших напрямків молекулярної патофізіології.

Як ми вже писали, HIF-1 $\alpha$  напряму чи опосередковано впливає на різноманітні фактори росту, зокрема фактори TNF, VEGF, EPO, тощо. Одним із таких генів-мішеней є IGF-1, фактор росту, що приймає участь в метаболізмі інсуліну. Білок, який кодується цим геном подібний інсуліну за функцією і структурою, і є членом сімейства білків, що беруть участь в опосередкуванні зростання і розвитку. IGF-1 переноситься до серця з циркулюючою кров'ю або може секретуватись безпосередньо в міокарді, таким чином, діючи за ендокринним або паракринно/аутокринним типом, відповідно. Незалежно від джерела, IGF-1 зв'язується з рецептором (IGF-1R), активуючи антиапоптотичні сигнальні шляхи і сприяючи виживанню кардіоміоцитів [120]. Є докази того, що IGF-1 регулює синтез і активність білка HIF-1 в процесі загоєння діабетичних ран. IGF-1 стимулював фосфотиділінозитол 3-кінази в діабетичних фібробластах, які, в свою чер-

гу, активували трансляцію регуляторного білка, p70 S6 кінази. Крім того, поліпшення загоєння діабетичних ран шляхом додавання рекомбінантного IGF-1 білка було пов'язано зі збільшенням синтезу білка HIF-1 при дослідях *in vivo* [121].

Підсумовуючи вищенаписане, можна стверджувати, що HIF грає неабияку роль в адаптації організму до гіпоксії й оксидативного стресу, в тому числі, спричинених використанням антрациклінових антибіотиків. В нашій роботі ми зосередились на дослідженні генів HIF-1 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  і їх генів-мішеней TERT, PDK-1 та IGF-1, як на найбільш адаптативно-значущих при оксидативному стресі [122]. Крім того, в експериментальних роботах останніх років [123] доведено здатність доксорубіцину блокувати роботу транскрипційного фактора HIF і пригнічувати експресію HIF-залежних генів. Інгібування PDH за допомогою PDK-1 зменшує доставку NADH до дихального ланцюга і споживання кисню у мітохондріях, таким чином забезпечуючи протективний механізм проти підвищеної продукції АФК у мітохондріях. На підтримку цього положення можна вказати такий факт, що ембріональні фібробласти миші, в яких відсутній ген HIF-1 $\alpha$ , гинуть у результаті накопичення АФК, тому що в них немає механізмів індукції PDK-1 [8]. А враховуючи тенденцію до зростання кількості онкологічних захворювань, котрі лікуються за допомогою антрациклінових антибіотиків, пошук методів фармакологічної та нефармакологічної кардіопротекції залишається надзвичайно актуальним.

### **1.3. Можливість корекції оксидативного стресу в кардіоміоцитах щурів, спричиненого доксорубіцином, різними методами.**

#### **1.3.1. Фармакологічні та нефармакологічні методи кардіопротекції при застосуванні доксорубіцина.**

Як ми вже писали, доксорубіцин має значну кардіотоксичну дію. Вищезазначені зміни призводять до дисфункції міокарду і розвитку серцевої недостатності. Вільні ра-

дикали, що утворюються при застосуванні цих цитостатиків, негативно впливають на серцевий м'яз і особливо на функцію та структуру мембран кардіоміоцитів [56]. Активация вільнорадикального окислення є одним із провідних патогенетичних механізмів ушкодження серця антрациклінами - антибіотиками, які наразі широко використовують при лікуванні онкологічних захворювань в якості апоптоз-промотуючих факторів. У зв'язку з розповсюдженістю онкологічної патології на сьогоднішній день особливо актуально попередити розвиток побічної дії цих препаратів на серцево-судинну систему. З метою фармакопрофілактики патології серцево-судинної системи та розладів кровообігу доцільним є застосування так званих кардіопротекторів — різноманітних фармакологічних та нефармакологічних засобів, які запобігають негативним змінам у серцевому м'язі, обумовленим застосуванням доксорубіцину. До кардіопротекторів належить широкий спектр лікарських засобів, що відносяться до різноманітних груп фармакологічних препаратів – бета-адреноблокаторів, антагоністів кальцію, інгібіторів АПФ, статинів, блокаторів ангіотензинових рецепторів, органічних нітратів, препаратів рослинного походження, а також засобів, що складають новий клас препаратів кардіопротекторної дії за рахунок покращення метаболічних процесів міокарду (триметазидин, мілдронат тощо) [124]. Зменшення метаболічних проявів токсичного ураження серця антрациклінами відзначено при застосуванні L-карнітину, лікарського засобу з кардіопротекторними властивостями [125]. Клінічне дослідження триметазидину свідчить про те, що цей препарат ефективно запобігає токсичному впливу антрациклінових антибіотиків на міокард [126]. Також, нещодавно, з'явилися дані щодо кардіопротективного ефекту таких препаратів, як: метформіну [127], спіринолактону [128], олеанової [129] та  $\alpha$ -ліноленової кислот [130]. А використання хелаторів заліза – дефероксаміну або деферипрону – дозволяє перервати ланцюг вільнорадикальних реакцій на етапі утворення комплексу антрациклін –  $Fe^{3+}$  і в такий спосіб запобігти ушкодженню серця [131].

За останній час значно зросла кількість робіт, присвячених дослідженню куркуміна – антиоксиданта рослинного походження. Куркумін – це жовтий пігмент, основний

поліфенольний куркуміноїд, отриманий з коренів рослини *Curcuma longa*. В організмі людини ця речовина впливає на велику кількість транскрипційних факторів, цитокінів, ензимів, тощо, і тим самим регулюючи різноманітні фізіологічні та патологічні процеси (рис. 1.7). Повідомлялося, що він має протективний ефект при пошкодженні міокарда та допомагає збереженню функцій серця [132], впливає на активність цитокінів, ензимів та транскрипційних факторів, асоційованих із запаленням [133], здатний блокувати активацію та транслокацію із цитоплазми в ядро фактора NF- $\kappa$ B за рахунок перешкоджання деградації його інгібітора [134,14]. Крім того, куркумін зменшує токсичний вплив доксорубіцину на тканини серця, печінки та нирки за рахунок своїх антиоксидантних властивостей [135,12].

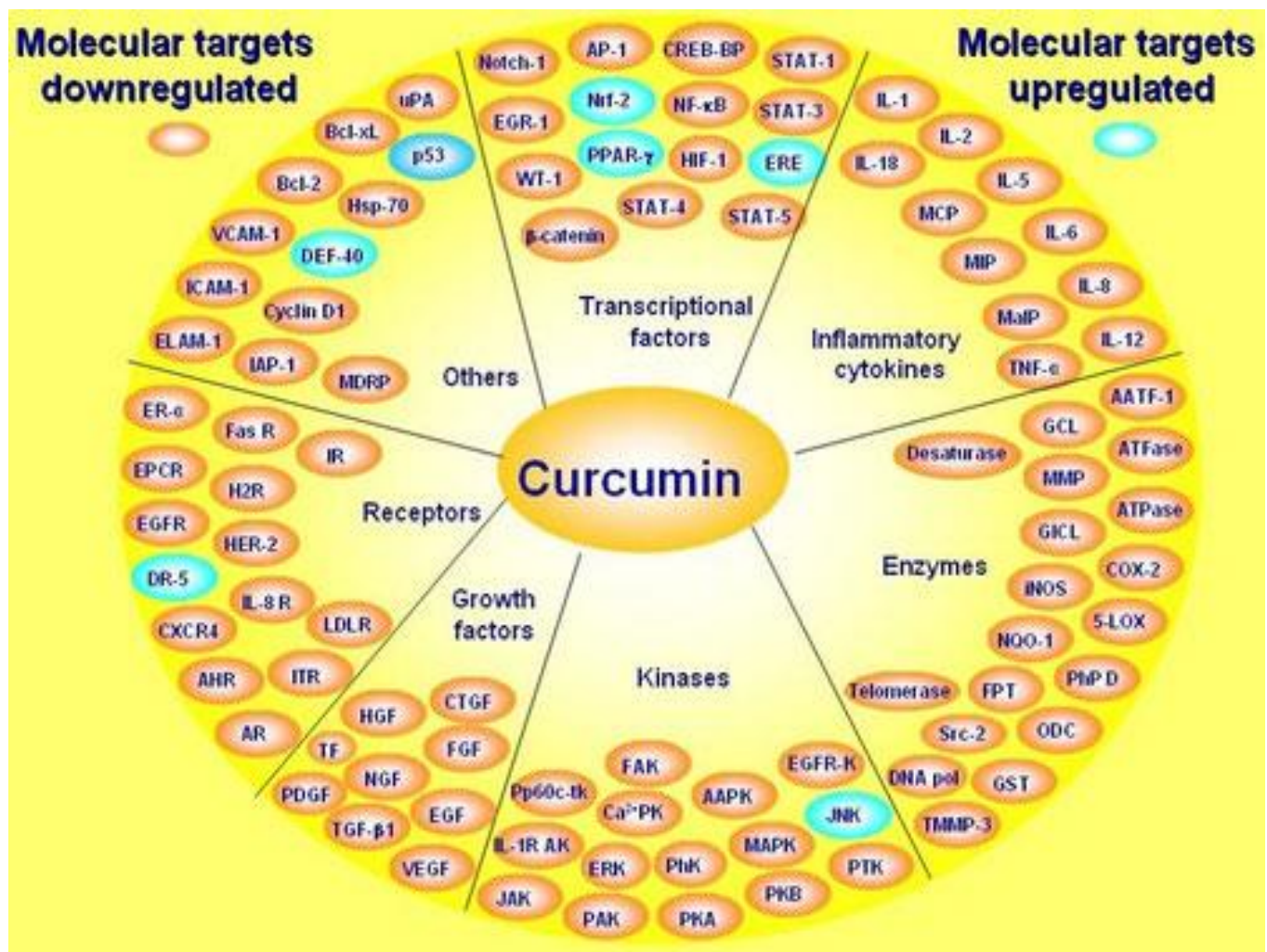


Рисунок 1.7. Молекулярні мішені впливу куркуміну [136].

Антиоксидантні механізми куркуміну можуть включати в себе один або більше з наступних взаємодій: нейтралізація вільних радикалів [137], інгібування цитохром Р450 [138], зменшення доступності кисню до окисних реакції, взаємодія з окислювальним каскадом і запобігання його наслідкам [139], зменшення окисних властивостей іонів металів, таких як залізо [140,141]. Таким чином, куркумін ефективно запобігає пошкодженню тканин за рахунок зменшення окислювального стресу та відновлення антиоксидантного статусу. Також, відома здатність куркуміну пригнічувати транскрипцію фактора HIF [], що має особливе значення при різноманітних онкологічних патологіях, коли гіперекспресія HIF може сприяти росту і поширенню ракових клітин.

З нефармакологічних методів кардіопротекції при оксидативному стресі широко досліджуються методи інтервальних гіпоксичних тренувань (ІГТ). Ці методи дають змогу обмежувати надмірне посилення вільнорадикального окиснення за рахунок активації власних захисних систем організму шляхом періодичного, обмеженого за інтенсивністю прооксидантного впливу [143]. Було показано, що довготривалі періоди гіпоксії/нормоксії в сеансах ІГТ здатні запобігати пошкоджувальним впливам екстремальних чинників — стресу, надмірних фізичних навантажень, гіпобаричної гіпоксії. Результати досліджень, проведених в нашому відділі, довели, що періодично діюча помірна гіпоксія/гіпероксія в сеансах ІГТ мала позитивний корегуючий вплив на процеси ПОЛ та ступінь оксидативної модифікації білків у мітохондріях міокарда за умови стресорної дії гострої гіпоксії. Ефективне функціонування ферментативної та неферментативної ланок антиоксидантної системи мітохондрій в адаптованих до окиснювального впливу тварин приводило до формування ендогенних рівнів захисту, що сприяло підвищенню стійкості міокарда до впливу надзвичайних подразників [144].

### **1.3.2. Роль змін експресії транскрипційного фактора HIF в регуляції вільно-радикальних процесів в кардіоміоцитах щурів та значення цих змін для кардіопротекції.**

Напевно, молекулярно-генетичні методи кардіопротекції варто виділити окремим пунктом, так як це направлення досі залишається мало дослідженим, хоч і перспективним. Зокрема, в останніх публікаціях з'явилися дані щодо використання міРНК як маркерів оксидативного стресу в кардіоміоцитах, спричиненого доксорубіцином, причому, зміни в їх експресії з'являлись раніше, ніж зміни рівня ЛДГ [145].

РНК-інтерференція є новим методом нокдауну генів, залучених в різні механізми адаптації до фізичних вправ і гіпоксії. Одним з найважливіших у цьому процесі є фактор HIF, який регулює транскрипцію багатьох генів-мішеней, що кодують білки, які беруть участь в молекулярній адаптації до гіпоксії. В нашому відділі досліджували як міРНК індукований нокдаун субодиниці HIF-3 $\alpha$  впливатиме на фізичну витривалість щурів та на розподіл типів клітинної загибелі в культурі ізолюваних неонатальних кардіоміоцитів щура [146]. Ми прийшли до висновку, що нокдаун HIF-3 $\alpha$  збільшує витривалість щурів, ефективність фосфорилування і дихальний коефіцієнт і виживання культивованих неонатальних кардіоміоцитів. Ці результати можуть являти собою потенційний терапевтичний підхід для підвищення ефективності підготовки спортсменів на витривалість, а також для корекції станів, пов'язаних з гіпоксією і оксидативним стресом.

Як ми вже писали, антрацикліни впливають на рівень експресії HIF (рис. 1.8). Так, Lee із співавт. вважають, що доксорубіцин має здатність інгібувати HIF-1-опосередковані відповіді через блокування його зв'язку з ДНК [123] шляхом пригнічення здатності гетеродимера зв'язуватись з чутливим до гіпоксії консенсусним -RCGTG- елементом регуляторних ділянок [147,148], що є надзвичайно важливим при пухлинних процесах і, опосередковано, дає можливість змінювати експресію генів-мішеней HIF.

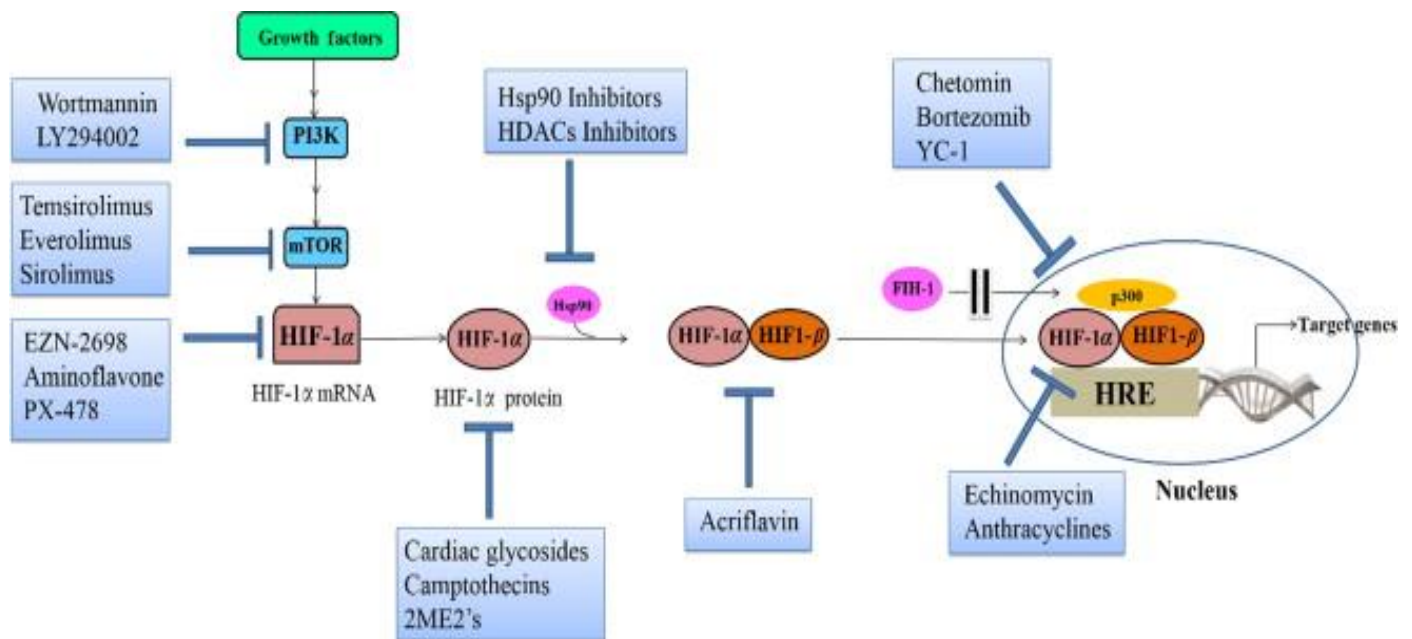


Рисунок 1.8. Схематичне зображення інгібування HIF-1α [149].

Можна зробити висновок, що ранній вплив на ці патогенетичні ланки та зменшення процесу лізису клітинних мембран, наприклад, за допомогою регуляції експресії HIF та використання антиоксидантів екзогенного походження (зокрема, куркуміну) сприятиме покращенню клітинного метаболізму і зниженню ризику виникнення кардіоміопатій.



## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

### 2.1. Моделі та об'єкти дослідження.

Експериментальні дослідження було проведено на кардіоміоцитах, виділених із шлуночків 50 щурів лінії Вістар (маса –  $20,0 \pm 4$  г) віком 2-3 доби та 40 статевозрілих щурах-самках лінії Фішер (маса – 200-250 г) віком 2-4 місяці. 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. Евтаназію проводили шляхом швидкої декапітації з дотриманням вимог гуманного відношення до експериментальних тварин. Всі маніпуляції з тваринами проведено відповідно міжнародних принципів Європейської конвенції (Страсбург, 1985).

### 2.2. Виділення та культивування неонатальних кардіоміоцитів.

Виділення і культивування неонатальних кардіоміоцитів здійснювалось відповідно до модифікованої методики [150]. Шляхом цервікальної дислокації щури знерухомлювалися та анестезувалися. Після цього через передній поздовжній розріз виймалося серце. Шлуночки відокремлювалися від передсердь і двічі відмивалися у стерильному буферному сольовому розчині (рН 7,4) наступного складу: HEPES – 20 ммоль/л, KCl – 5,4 ммоль/л, NaCl – 116,4 ммоль/л, глюкоза – 5,5 ммоль/л,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0,4 ммоль/л та  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,4 ммоль/л. Після цього вони механічно подрібнювалися ножицями до отримання шматочків тканини розміром близько  $1\text{мм}^3$ . Ці шматочки міокарду підлягали ферментативному розщепленню у середовищі виділення, яке на основі зазначеного буферу містило колагеназу II типу (95 ОД/мл) та панкреатин (0,6 мг/мл). Перетравлення відбувалося у п'ять циклів по десять хвилин кожний. Під час цього процесу шматочки міокарду перемішувалися у середовищі виділення за допомогою магнітного перемішувача. Після кожного з циклів шматочкам міокарду давали осісти, а надосадове середовище зливали. Починаючи з третього циклу, шматочки міокарду додатково підлягали процесу механічного суспендування шляхом піпетування, після чого середовище виділення збиралося у пробірку. Клітини осаджувалися шляхом центрифугування при

400 g протягом 60 с, після чого клітини ресуспендувались у живильному середовищі культивування такого складу: середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище 199 (співвідношення DMEM/199 - 4:1), теляча сироватка - 8%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 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, виготовленим на буфері, що входить до складу середовища виділення, із щільністю 200 000 на 1 см<sup>2</sup>. Культивування проводили у живильному середовищі вищезазначеного складу при 37°C у газовому середовищі, яке містило 5%  $\text{CO}_2$  та 95% атмосферного повітря.

### **2.3. 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 (Sigma Aldrich) 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.

## **2.4. 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), котрий базується на здатності живих клітин перетворювати блідо-жовтий водорозчинний 3-(4,5-диметилтіазолін-2)-2,5-дифенілтетразолійбромід (МТТ) в блакитні кристали формазану (МТТ-ф), нерозчинні у воді. Кількість утвореного формазану 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).

## **2.5. Дослідження скорочувальної активності неонатальних кардіоміоцитів, для оцінки їх функціонального стану в умовах оксидативного стресу.**

Методи оцінки скорочувальної активності неонатальних кардіоміоцитів були досконально досліджені в нашій попередній роботі [151]. Для визначення і оцінки частоти спонтанних скорочень ізольованих неонатальних кардіоміоцитів (КМЦ) в даному дослідженні нами було використано методику, описану в роботі D.R.Webster et al.: кількість скорочень визначали візуально за 30-60 с у випадковим чином обраних клітинах [152]. В наших експериментах використовувалися лише поодинокі розташовані КМЦ,

до утворення кластерів, починаючи з появи спонтанних скорочень у більшості клітин (після 2 діб культивування), що було необхідною умовою для реєстрації цілого ряду параметрів скоротливої активності. Механічні властивості КМЦ оцінювали шляхом визначення таких показників: пік скорочення (ПС, або амплітуда скорочення, в мкмоль або у % по відношенню до довжини клітини в стані розслаблення), час досягнення ПС (ЧПС, мс), час відновлення довжини (ЧВД, мс), максимальна швидкість скорочення (МШС, мкмоль/с, або  $-dL/dt$ ) і розслаблення (МШР, мкмоль/с, або  $+dL/dt$ ) [153-158]. Реєстрацію і аналіз скоротливої функції КМЦ проводили за допомогою системи Ion-Optix, що здійснює сканування відхилення лінії краю КМЦ при його скороченні (рис. 2.1) [157-160].

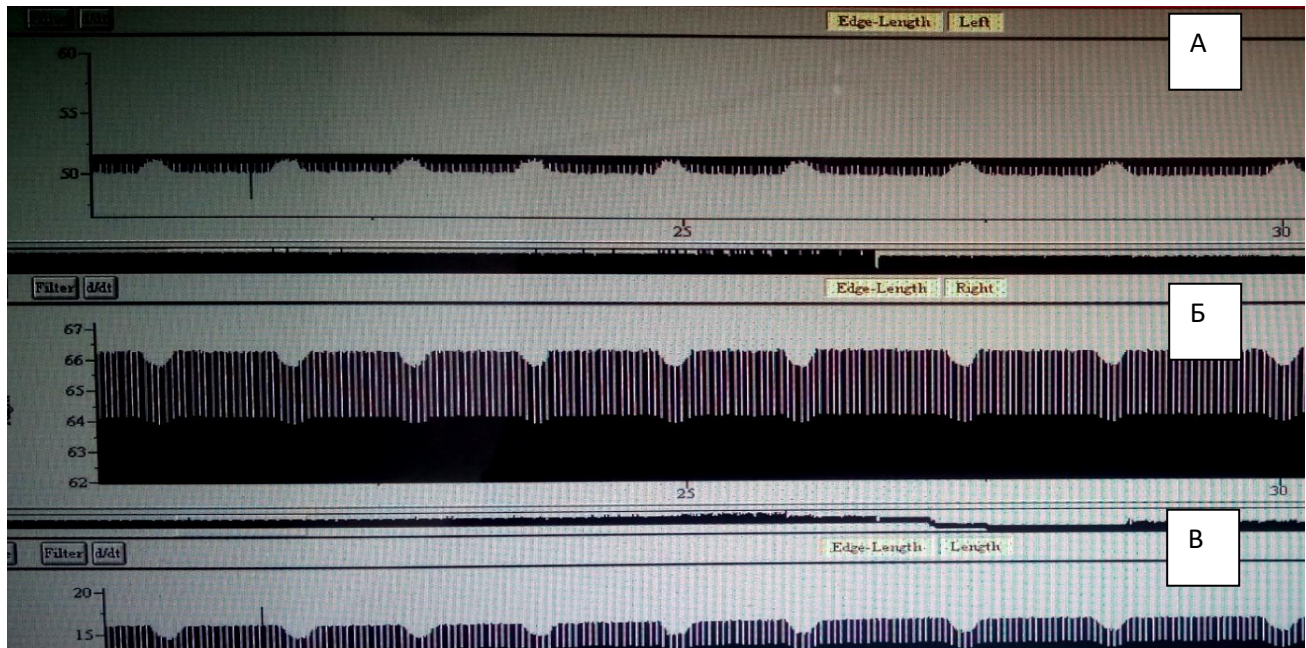


Рисунок 2.1. Типова крива запису спонтанних скорочень ізолюваного неонатального КМЦ щура. А. Відхилення лівого краю. Б. Відхилення правого краю.

В. Зміна довжини клітини під час скорочення.

Для визначення і оцінки впливу досліджуваних речовин на параметри спонтанних скорочень КМЦ, що прикріпилися до дна чашок Петрі, використано методику, описану в роботі D.R.Webster et al.: після реєстрації скорочення у випадковим чином обраних клітинах, клітини обробляли досліджуваним препаратом і повертали на столик мікро-

скопа. Осередки, які будуть враховуватися, обирали у випадковому порядку, таку ж кількість клітин досліджували, препарат-вміщуюче середовище змивали, клітини інкубували протягом ще 2 год, і втретє здійснювали визначення вищевказаних параметрів [152]. На всіх етапах дослідження клітини спостерігали за допомогою мікроскопа Olympus, CKX 41 (для визначення довжини клітини вибирали горизонтально розміщені КМЦ) і одночасно клітини відображалися на моніторі комп'ютера з використанням камери IonOptix MyoCam (рис. 2.2).



Рисунок 2.2. Поодинокі скорочення ізолюваного неонатального КМЦ щура. Ця система швидко сканує області зображення, що дозволяє, як вважають J. Ren et al., точно записати амплітуду та швидкість скорочення і розслаблення [160]. З аналізу виключали КМЦ, що проявляли або занадто часті спонтанні скорочення або вкорочувалися менш ніж на 5% від вихідної довжини.

## 2.6. 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, slope  $20,25 \cdot RVU$  - 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 ізоволюмічною константою розслаблення  $\tau$  за методами Glantz і Weiss [161,162]. 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 ( $E_{max}$ ). Для дослідження скоротливої функції серця здійснювали тимчасову оклюзію нижньої порожнистої вени через невеликий розріз нижче мечоподібного відростка (рис. 2.3).

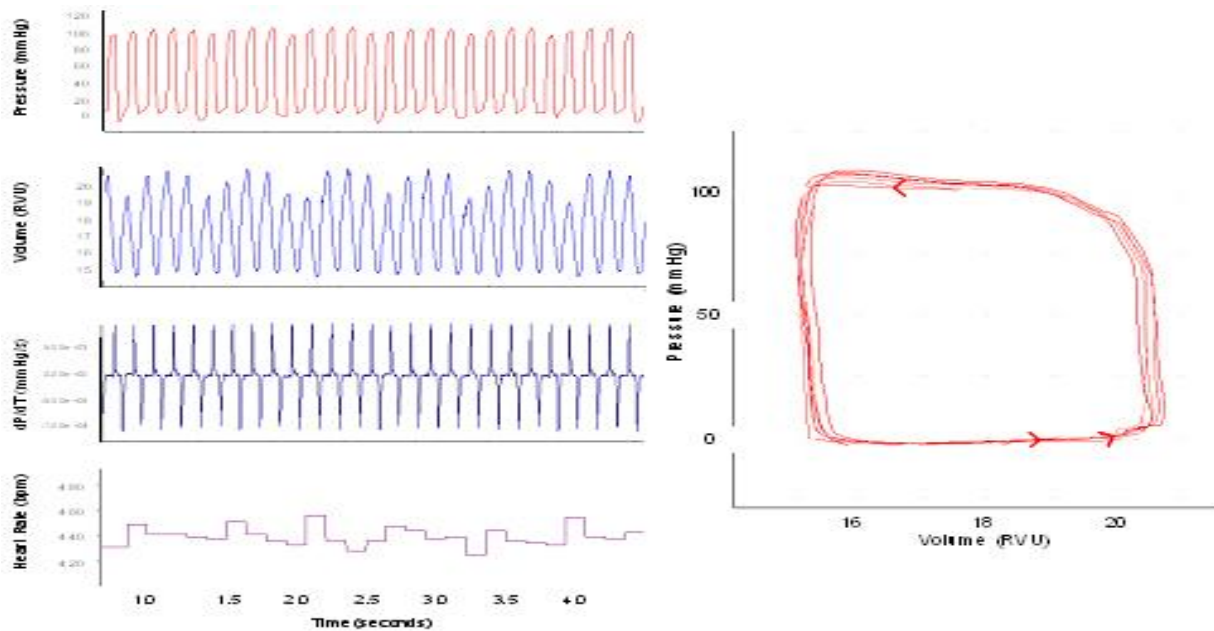


Рисунок 2.3. Схематичне зображення петлі, що характеризує співвідношення тиску й об'єму.

## 2.7. Виділення мітохондрій з культури неонатальних кардіоміцитів щурів та з тканини серця дорослих щурів.

Мітохондрії (Мх) із міокарду виділяли загальноприйнятим методом диференційного центрифугування за умови зберігання нативності ізольованих органел [163].

Тварин забивали, відділяли серце, яке негайно охолоджували середовищем для виділення мітохондрій (0,25 М розчин сахарози і 1 мМ розчин 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.

## **2.8. Дослідження окислювального фосфорилування, рівня потенціал-чутливого флуоресцентного компонента в мітохондріях, швидкості входу іонів калію до мітохондрій.**

Процеси дихання та окислювального фосфорилування досліджували полярографічним методом із використанням закритого електрода Кларка і приладу Оксиграф (Standart Oxygraph System, Hansatech, England). Виділення мітохондрій (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 В.Chance [164]. Середовище інкубації Мх міокарду містило (в ммоль/л): 120 KCl, 5  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 HEPES, рН 7,4. Як субстрат окислення використовували 5 ммоль/л сукцината Na. Інгібітором мітохондріального ферментного комплексу I слугував ротенон - 2 мкмоль/л. Дихання стимулювали внесенням у полярографічну комірку 200 мкмоль АДФ. Сукцинат Na додавали в середовище окремо перед внесенням Мх. Класичний інгібітор АТФ-залежних мітохондріальних калієвих каналів 5-гідроксидеканоат (5-ГДК) (10 мкмоль, тривалість експозиції на фоні куркуміну становила 30 хвилин) вводили безпосередньо в суспензію мітохондрій. Використовуючи одержані хроно-амперографічні криві, обчислювали швидкість транспорту іонів калію й параметри дихання Мх (за Чансом) [164]: в стані активного дихання при додаванні АДФ ( $V_3$ ), контрольованого дихання ( $V_4^{\text{ATP}}$ ), дихальний кон-



троль ( $V_3/V_4^{ATP}$ ), коефіцієнт ефективності фосфорилування (АДФ/О) за Estabrook R. [165]. Концентрацію білка визначали методом О.Н. Lowry [166].

Оцінку швидкості АТФ-залежного входу іонів К в мітохондрії (що характеризує активність мітоК<sub>АТФ</sub>-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 мкмоль АТФ з додаванням 2 мкмоль 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) [167]. 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 [168]. Ступінь інтенсивності флуоресценції опосередковано свідчив про величину мітохондріального мембранного потенціалу [169].

## **2.9. 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 хвилин. Мітохондрії з тканини сердець щурів виділяли методом диференційного центрифугування. Середовище виділення містило: 0,5 М манітол, 0,5 М сахароза, 0,1 М ЕДТА, 0,1 М Tris HCl рН 7,4. Промитий та очищений від сполучної тканини серцевий м'яз подрібнювали та гомогенізували. Після декількох серій центрифугу-



вань при 10000 об/хв осад мітохондрій ресуспендували в мінімальному об'ємі середовища виділення. Вміст білка оцінювали за методом Бредфорда [170]. Метод базується на здатності барвника кумасі зв'язуватись з аргініном та гідрофобними амінокислотними залишками. Зв'язана форма має блакитне забарвлення із максимумом поглинання 595 нм.

Ступінь оксидативного стресу кардіоміоцитів оцінювали за вмістом активних продуктів 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) та перекису водню, антиоксидантний захист – за активністю марганцевої супероксиддисмутази (Mn-SOD) та каталази (КАТ).

### **2.9.1. Оцінка вмісту ТБК-АП та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Вміст ТБК-АП визначали спектрофотометрично за методом Стальної І.Д. [171]. Метод базується на здатності 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК) реагувати з малоновим діальдегідом (МДА) при високій температурі з утворенням забарвлених продуктів реакції із спектром поглинання 532 нм. Вміст ТБК-АП виражали в нмоль/мнг білка та розраховували з використанням коефіцієнта молярної екстинкції  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Вміст перекису водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) визначали за методом Huwiler M., Kohler H. [172] у системі лактопероксидаза/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/йодид калію. Реакційна суміш містила 50 мМ Тріс-буфер (рН 7,3), 100 мМ йодид калію, розчин лактопероксидази (10 мкг/мл). Реакцію ініціювали додаванням 50 мкл мітохондріального білка. На 1-й хв реєстрували оптичну щільність проб при довжині хвилі 353 нм. Кількість H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> розраховували з використанням коефіцієнта молярної екстинкції  $25,55 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  та виражали в мкмоль/хв/мг білка.

### **2.9.2. Визначення активності каталази (КАТ) і Mn-супероксиддисмутази (Mn-SOD).**

Активність каталази визначали за методом Корольок М.А. спектрофотометрично [173]. Метод базується на здатності солей молібдену утворювати забарвлений комплекс із пероксидом водню. Зниження інтенсивності забарвлення визначалось при до-

вжині хвилі 410 нм. 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 [174]. Метод ґрунтується на здатності Mn-SOD гальмувати аутоокислення адреналіну при рН 10,2. Зміну екстинкції фіксували при довжині хвилі 480 нм протягом 5 хв щохвилино. 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.

## 2.10. 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). РНК виділяли відповідно протоколу з виконанням наступних етапів:

1. В пробірки загальним об'ємом 1,5 мл вносили по 100 мкг подрібненої тканини, що досліджується, додавали 1 мл суміші гуанідинтіоціонату та фенолу й інтенсивно перемішували вміст до утворення гомогенної емульсії. Інкубували пробірки при 4°C протягом 5 хв.

2. Додавали в пробірки 200 мкл суміші хлороформу та ізоамілового спирту у співвідношенні об'ємів 49:1 та інтенсивно перемішували вміст пробірок. Пробірки інкубували при 4°C протягом 5 хв.

3. Центрифугували (центрифуга MiniSpin, „Eppendorf”, Німеччина) пробірки з сумішню 5 хвилин при 14000 об/хв для розділення фаз.

4. Прозору верхню фазу з РНК обережно переносили в стерильну пробірку загальним об'ємом 1,5 мл, намагаючись не задіти пограничну між фазами білу плівку з ДНК та білками.

5. Додавали в пробірки рівний об'єм ізопропанолу, приблизно 300 мкл.

6. Інтенсивно перемішували вміст пробірок та переносили пробірки в морозиль-

ну камеру („Whirlpool”, Швеція) при  $-20^{\circ}\text{C}$  на 30 хв.

7. Центрифугували пробірки з сумішшю 15 хвилин при 14000 об/хв.

8. Повністю видаляли супернатант перевертанням пробірки.

9. Додавали в пробірку 1 мл холодного 75% етилового спирту, перемішували вміст пробірки перевертанням 4-5 разів, центрифугували пробірки з сумішшю 5 хв при 14000 об/хв та обережно видаляли супернатант.

10. Просушували осад 3 хв при температурі  $65^{\circ}\text{C}$ .

11. Додавали в пробірки 50-100 мкл реагенту ExtraGene E.

12. Суспендували вміст на вортексі 15-20 с та залишали при кімнатній температурі на 15-20 хв, або підігрівали при  $65^{\circ}\text{C}$  5 хв.

13. Суспендували вміст пробірок на вортексі.

Виділену РНК зберігали при температурі  $-35^{\circ}\text{C}$  або негайно використовували для роботи після вимірювання її концентрації за допомогою спектрофотометра.

### **2.11. 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” („Fermentas”, Литва). Транскрипційна суміш містила 5 мкл тотальної РНК (500 нг – 1 мкг/мкл), 1 мкл праймерів „Random Hexamer” (0,5 мкг/мкл), 20 од. інгібітора 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 на термоциклері “7500 Fast Real-Time PCR System”. Для гену HIF-1 $\alpha$  були використані ті ж самі праймери, що і для напівкількісної ПЛР: sense 5'-AGA AAC CGC CTA TGA CGT G- 3', antisense 5'- CCA CCT CTT TTT GCA AGC AT - 3', для гену HIF-3 $\alpha$ : sense 5'- AGA GAA CGG AGT GGT GCT GT - 3'; antisense 5'- ATC AGC CGG AAG AGG ACT TT - 3'. Експресію генів стандартизували

відносно експресії гена GADPH 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  $\beta$ -субодиниці актину як ендogenous 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<sup>®</sup> ДНК-полімерази протягом 10 хв при 95°C та складалася з 50 циклів: денатурація – 95°C, 15 с, приєднання праймерів та елонгація – 64°C, 1 хв. Для контролю специфічності проводили стадію диссоціації – послідовне підвищення температури від 64 до 99°C із реєстрацією зменшення інтенсивності флуоресценції комплексів двохланцюгових ДНК з SYBR<sup>®</sup>Green. Аналіз отриманих даних проводився за допомогою програмного забезпечення 7500 Fast Real-time PCR Software (рис. 2.4).

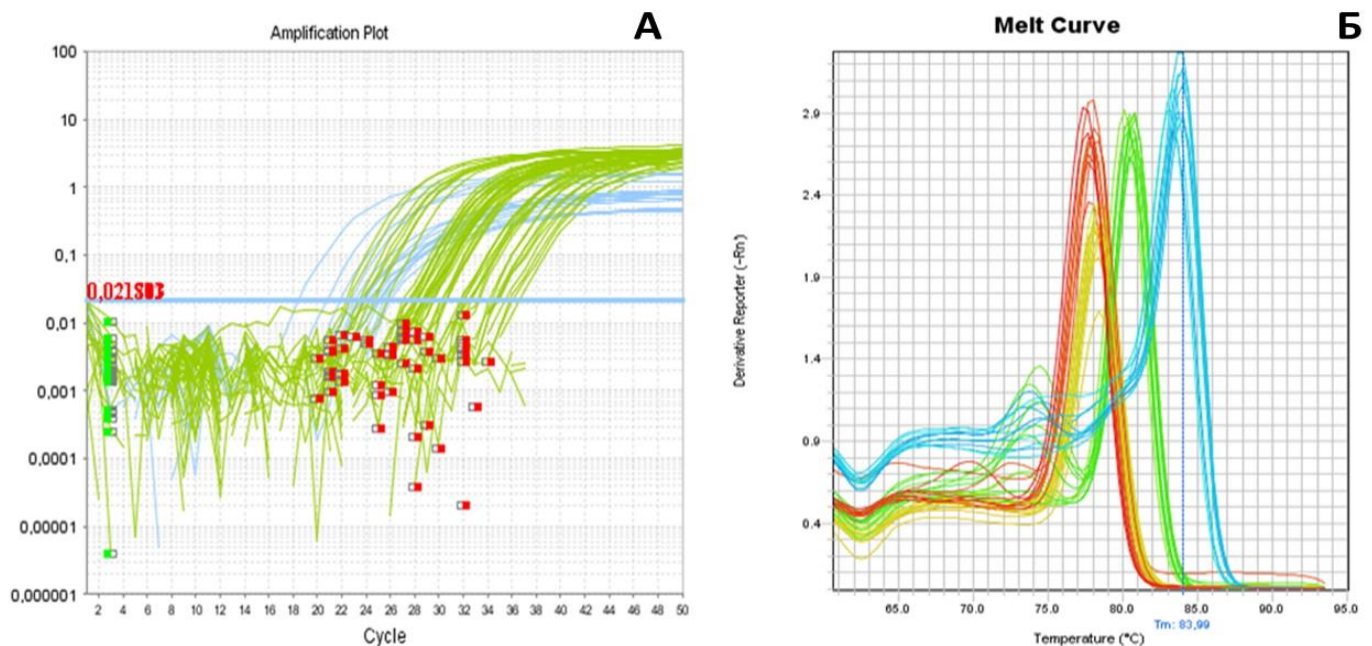


Рисунок 2.4. Результат ампліфікації генів TERT, PDK-1, актин.

А - графік приросту флуоресценції, Б - криві дисоціації.

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'-TGAGCTCCACTCTGTGTGTCTC-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 починалася з попередньої активації AmpliTaqGold® ДНК-полімерази протягом 10 хв при 95°C та складалася з 50 циклів: 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 зниження інтенсивності флуоресценції комплексів двохланцюгових ДНК з SYBR®Green. Аналіз отриманих результатів експресії генів проводили за допомогою програмного забезпечення 7500 Fast Real-time PCR Software.

## 2.12. 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 [175]. Для визначення достовірності відмінностей між очікуваним розщепленням та отриманим використовували метод  $\chi^2$ . Результати вважалися статистично значимими при  $P < 0,05$ .

Для обробки результатів скорочувальної активності кардіоміоцитів використовували методичний підхід, викладений в роботі [176]: усереднювали дані кожного експерименту серед КМЦ, що знаходились в полі зору мікроскопа, а також дані декількох по-

вторів і різних експериментів з однаковими умовами проведення. Отримані величини представлені як «середнє  $\pm$  похибка середнього» ( $M \pm m$ ). Дані обробляли статистично з використанням програми Excel 2000 та Origin 8.0. Вірогідність різниці середніх величин визначали за критерієм t Ст'юдента. Значення  $P < 0,05$  вважали вірогідним.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 3.1. Визначення дозозалежної дії доксорубіцину на життєздатність клітин в культурі неонатальних кардіоміоцитів.

Для визначення дози доксорубіцину, оптимальної для подальших досліджень, нами був проведений МТТ-тест [177]. За його результатами можна зробити висновок про рівень цитотоксичності різних концентрацій доксорубіцину (Sigma) та життєздатність кардіоміоцитів. При інкубації з доксорубіцином в дозах 0,1; 0,5 та 1,0 мкмоль кількість живих клітин відносно контролю зменшилась на  $10,9 \pm 9,99\%$ ;  $23,6 \pm 8,76\%$  та  $31,5 \pm 9,86\%$  відповідно (рис. 3.1).

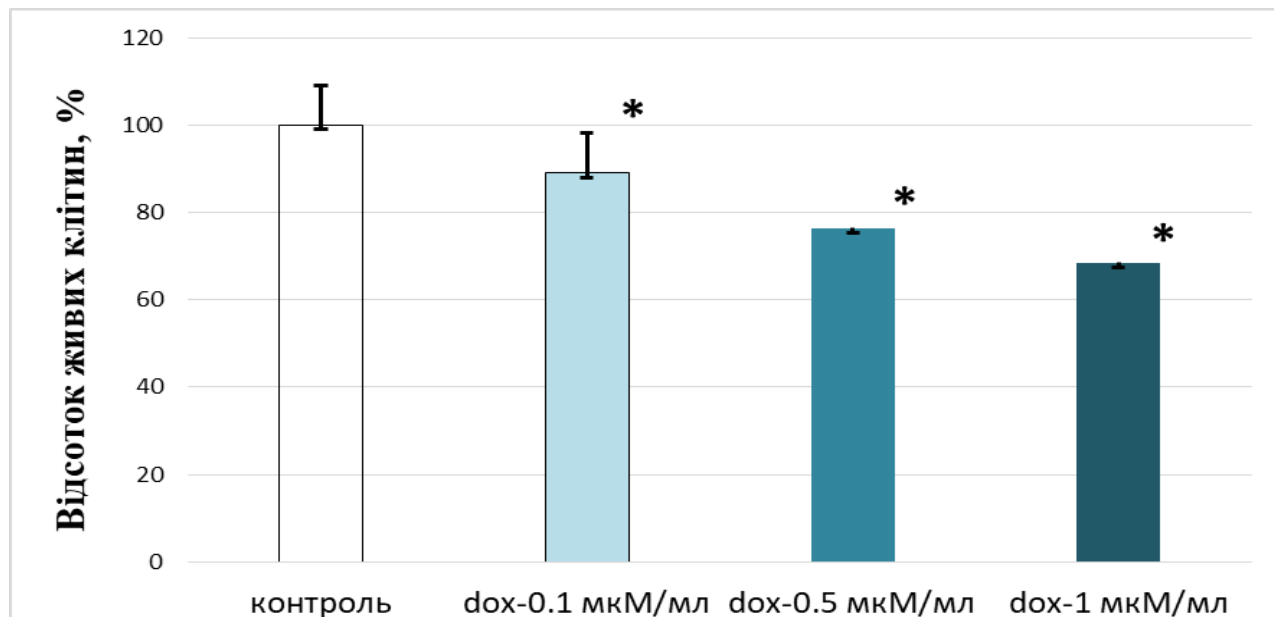


Рисунок 3.1. Відсоток живих клітин при використанні різних доз доксорубіцину за даними МТТ-тесту. \* -  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

Це підтвердило дані літератури щодо кардіотоксичності антрациклінів та дало можливість вибрати дозу доксорубіцину 0,5 мкмоль як оптимальну для подальших досліджень. Коефіцієнт кореляції між кількістю живих клітин та дозою доксорубіцину, що додавалася в культуру, дорівнював -0,95. Для подальших досліджень ми використовували середню дозу - 0,5 мкмоль. Вона вже викликала зміни, характерні для оксидативного пошкодження, але ще не призводила до суттєвої загибелі кардіоміоцитів.

### 3.2. Дослідження клітинної смерті в культурі неонатальних кардіоміоцитів.

За допомогою методу подвійного фарбування клітин флуоресцентними барвниками Hoechst та пропідіум йодид ми дослідили розподіл варіантів клітинної смерті за умови окремого та сумісного використання доксорубіцину й куркуміну в культурі неонатальних кардіоміоцитів з метою дослідження рівня загибелі клітин та можливості її протекції. Було показано, що після інкубації культури неонатальних кардіоміоцитів з доксорубіцином у дозі 0,5 мкмоль 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. 3.2).

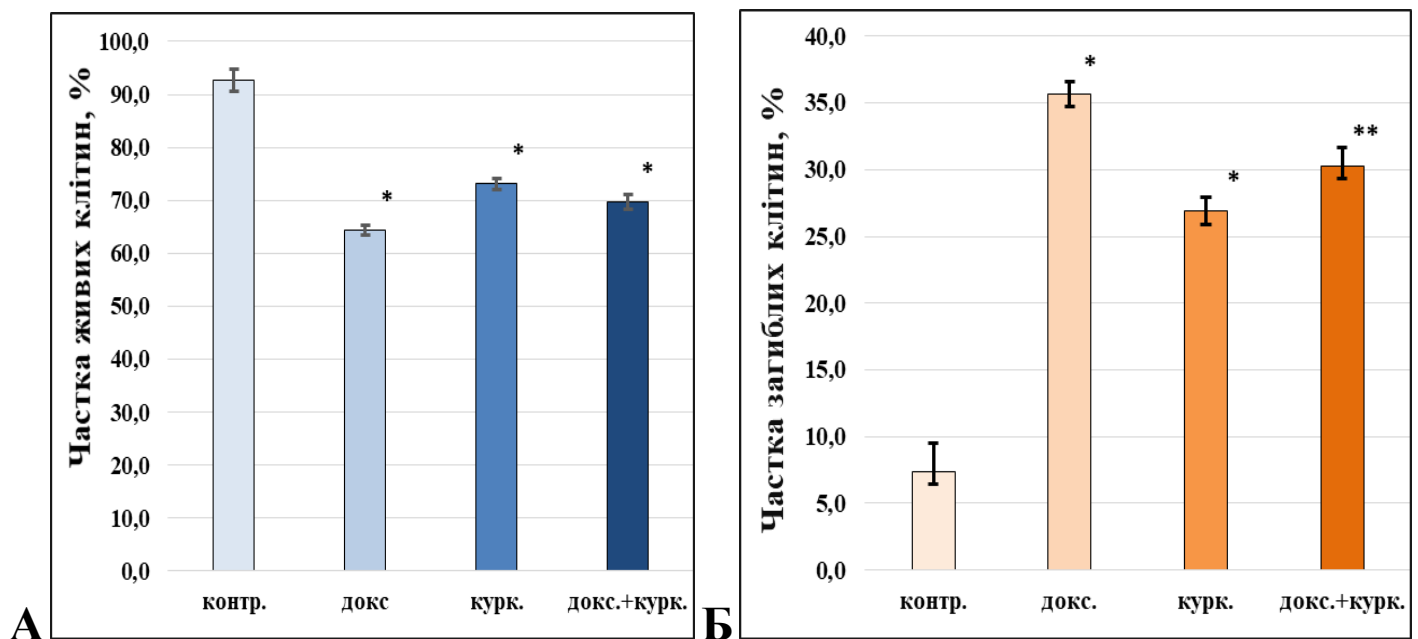


Рисунок 3.2. Відсоток живих (А) та пропідіум йодид позитивних (Б) клітин при використанні 0,5 мкмоль доксорубіцину і куркуміну у дозі 20 мкмоль окремо, та з 20 мкмоль куркуміну за даними флуоресцентної мікроскопії. \* -  $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* -  $P < 0,05$  порівняно з введенням доксорубіцину.

Після інкубації з куркуміном у дозі 20 мкмоль, кількість живих клітин зменшилась на  $19,6 \pm 0,014\%$ , а рівень загиблих зріс в 3,25 рази ( $P < 0,05$ ) відносно контролю, що може бути зумовленим проапоптотичним впливом куркуміну на культуру неонатальних кардіоміоцитів при його безпосередньому застосуванні. При цьому, застосування доксорубіцину і куркуміну разом призводило до підвищення життєздатності клітин на



9,4±0,01%, а кількість загиблих клітин зменшувалась на 19,5±0,01% порівняно із застосуванням лише доксорубіцину.

### 3.3. МТТ-тест культури неонатальних кардіоміоцитів.

Результати МТТ-тесту дали нам можливість зробити висновок про зміну рівня цитотоксичності доксорубіцину окремо та в поєднанні з куркуміном в культурі неонатальних кардіоміоцитів [178]. А саме, при інкубації з доксорубіцином в дозі 0,5 мкмоль кількість живих клітин відносно контролю зменшилась на 50,4%. При інкубації клітин з доксорубіцином та куркуміном в дозі 20 мкмоль разом відсоток загиблих клітин зменшився на 7,7% порівняно з використанням лише доксорубіцину (рис. 3.3). Це підтвердило дані літератури щодо кардіопротекторних властивостей куркуміну.

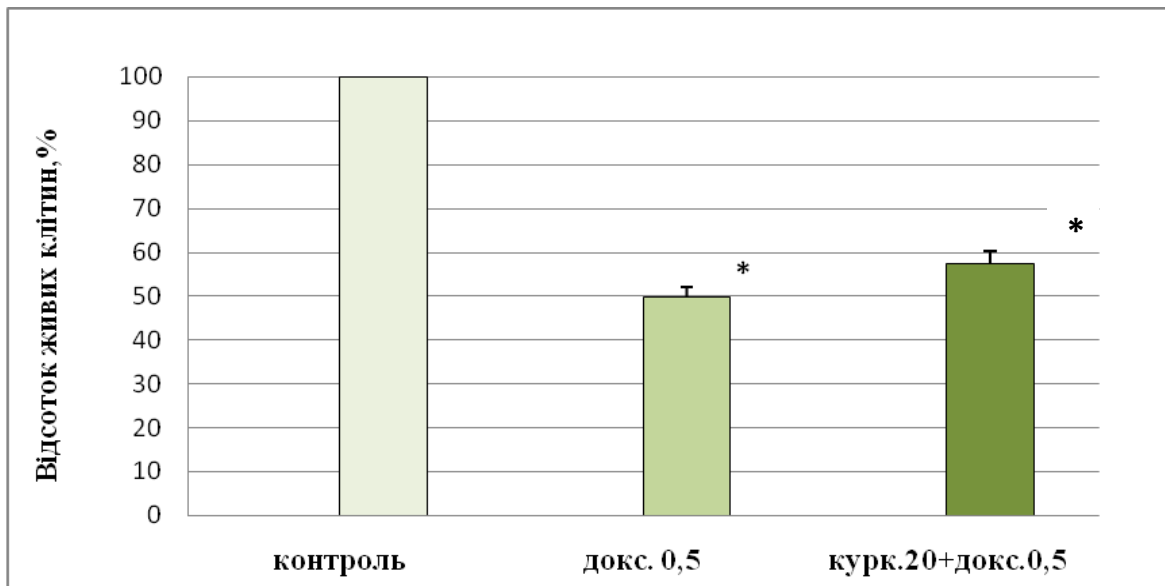


Рисунок 3.3. Відсоток живих клітин при використанні доксорубіцину в дозі 0,5 мкмоль/мл та при поєднанні доксорубіцину з куркуміном у дозі 20 мкмоль/мл за даними МТТ-тесту. \* -  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

### 3.4. Дослідження скорочувальної активності неонатальних кардіоміоцитів.

В результаті проведених досліджень [179] 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 ( $0,98 \pm 0,1$  мкмоль) та % 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 ( $P < 0,05$ ) (рис. 3.4-3.9).

Інкубація з куркуміном викликала зниження частоти спонтанних скорочень на 11%, порушення їх ритмічності (коливання від  $1,18 \pm 0,09$  до  $2,9 \pm 0,14$  с), зниження амплітуди на 15%, а % вкорочення на  $4,3 \pm 0,18\%$ , зменшення максимальної швидкості скорочення і розслаблення (на 4 та 28%, відповідно) без значних змін тривалості цих процесів порівняно з контролем ( $P < 0,05$ ) (рис. 3.4 - 3.9).

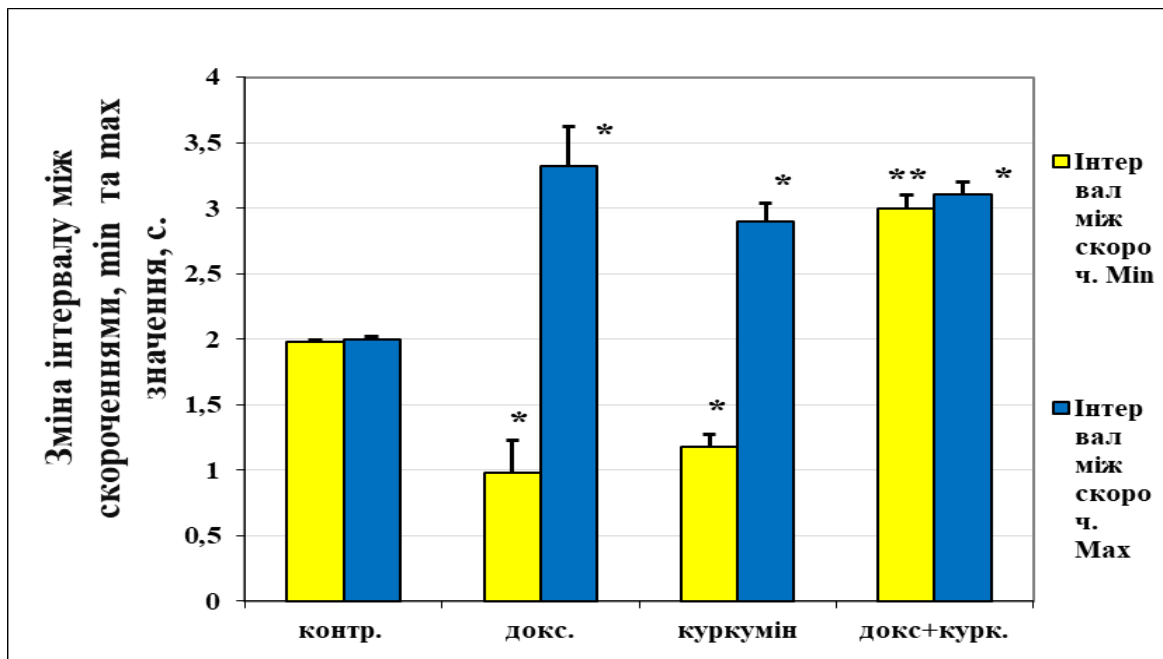


Рисунок 3.4. Зміна ритмічності скорочень неонатальних кардіоміоцитів після інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл), куркуміном (20 мкмоль/мл), з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл) і куркуміном (20 мкмоль/мл) разом. \* -  $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* -  $P < 0,05$  порівняно зі впливом доксорубіцину.

Сумісна інкубація з доксорубіцином і куркуміном викликала значне 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 ( $P < 0,05$ ) (рис. 3.4-3.9).

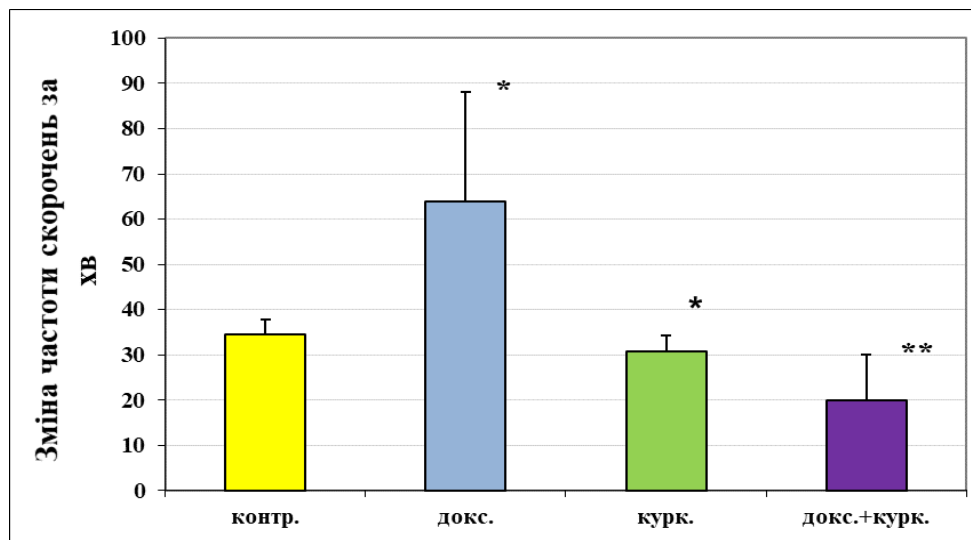


Рисунок 3.5. Зміна частоти спонтанних скорочень ізольованих КМЦ після інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл), куркуміном (20 мкмоль/мл), з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл) і куркуміном (20 мкмоль/мл) разом. \* -  $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* -  $P < 0,05$  порівняно зі впливом доксорубіцину.

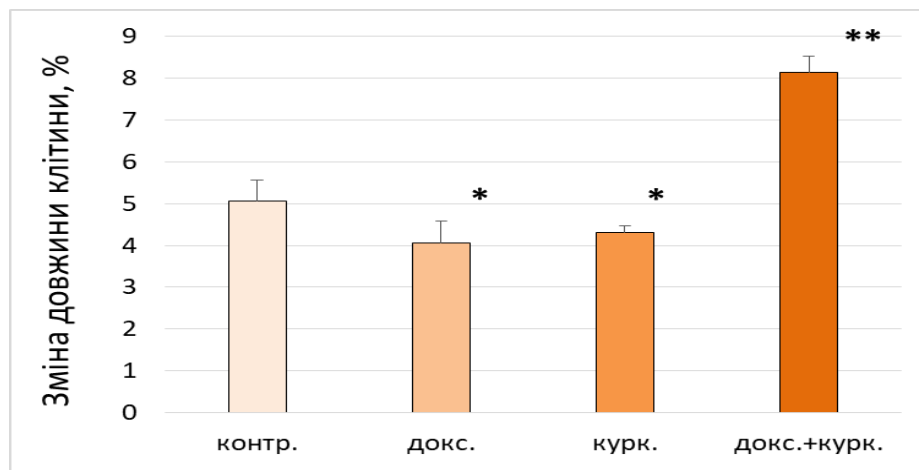


Рисунок 3.6. Зміни довжини клітин після інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл), куркуміном (20 мкмоль/мл), з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл) і куркуміном (20 мкмоль/мл) разом. \* -  $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* -  $P < 0,05$  порівняно зі впливом доксорубіцину.

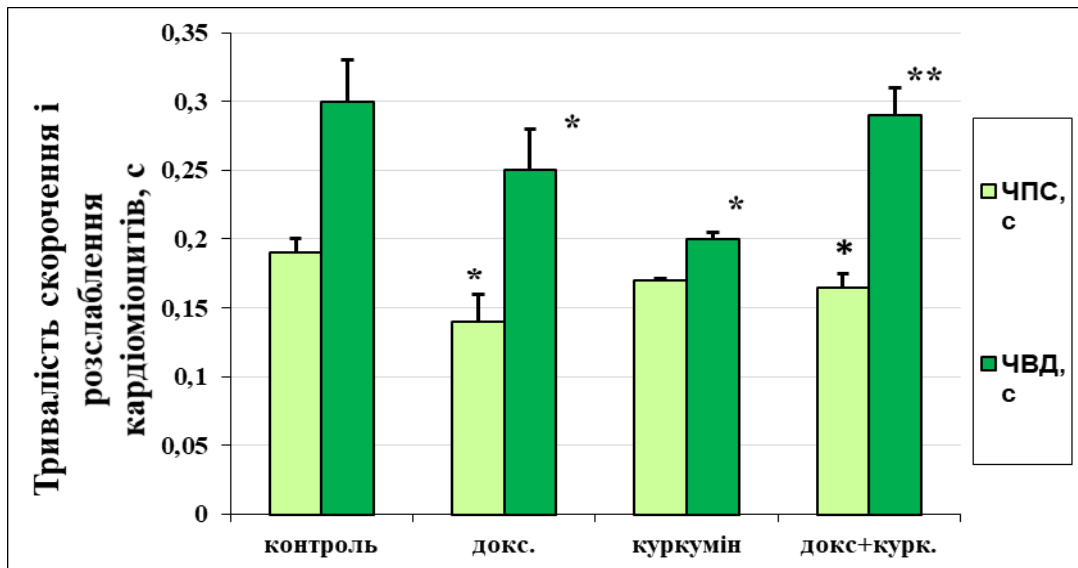


Рисунок 3.7. Зміна тривалості скорочення і розслаблення неонатальних кардіоміоцитів після інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл), куркуміном (20 мкмоль/мл), з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл) і куркуміном (20 мкмоль/мл) разом. \* -  $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* -  $P < 0,05$  порівняно зі впливом доксорубіцину.

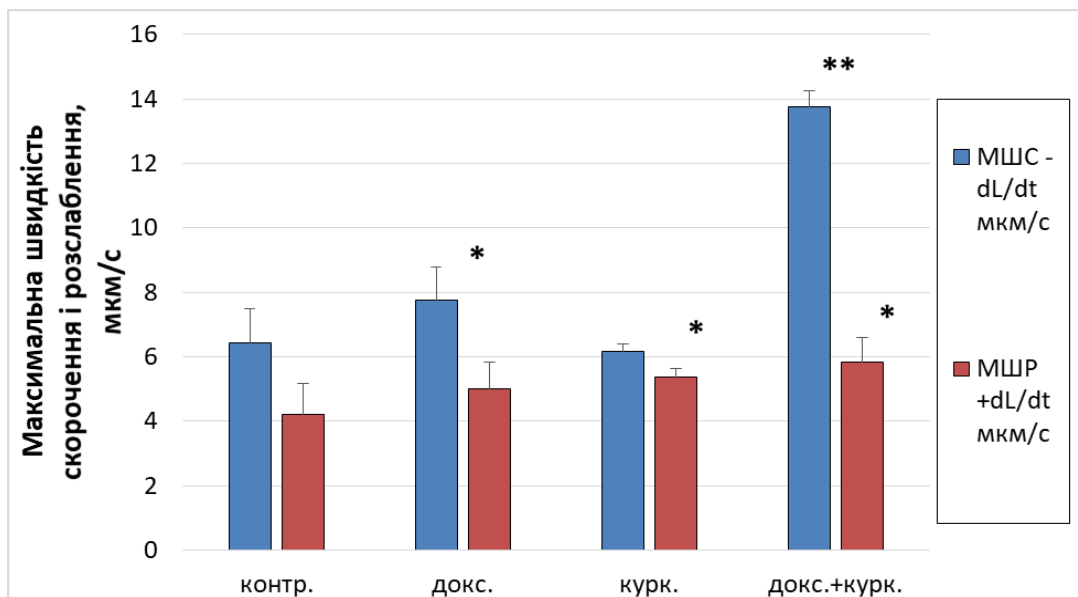


Рисунок 3.8. Зміна максимальної швидкості скорочення й розслаблення кардіоміоцитів після інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл), куркуміном (20 мкмоль/мл), з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл) і куркуміном (20 мкмоль/мл) разом. \* -  $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* -  $P < 0,05$  порівняно зі впливом доксорубіцину.

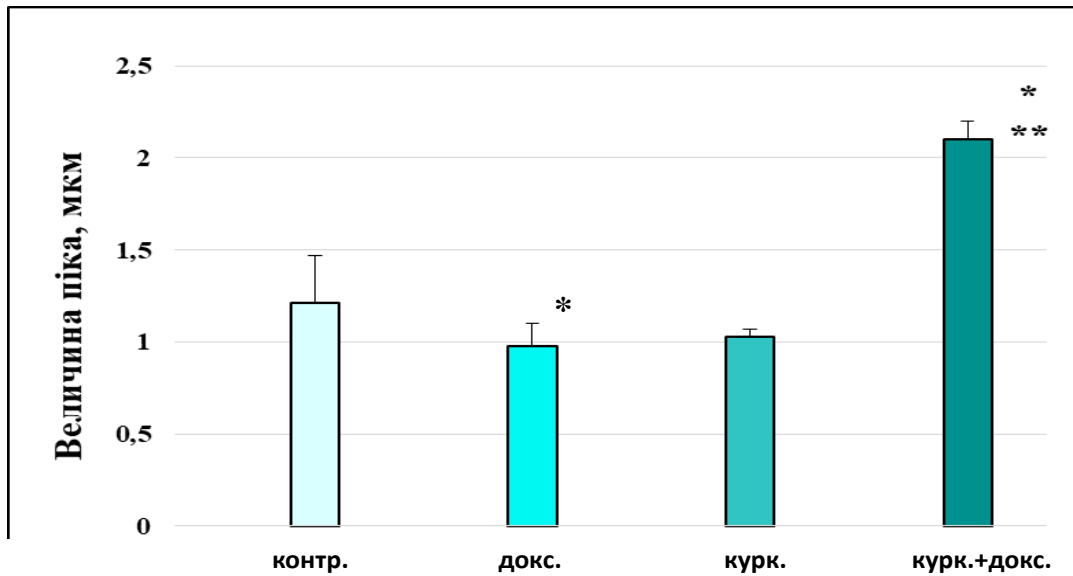


Рисунок 3.9. Зміна величини амплітуди піка неонатальних кардіоміоцитів після інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл), куркуміном (20 мкмоль/мл), з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл) і куркуміном (20 мкмоль/мл) разом. \* -  $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* -  $P < 0,05$  порівняно зі впливом доксорубіцину.

### 3.5. Порухення кардіогемодинаміки у щурів при моделюванні оксидативного стресу за допомогою доксорубіцину.

При визначенні кардіогемодинамічних показників було встановлено суттєві відмінності між досліджуваними групами тварин [180]. 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 (табл. 1).

Таблиця 1.

Показники кардіогемодинаміки у щурів на фоні доксорубіциніндукованого оксидативного стресу,  $M \pm m$

Показник	Контроль	Доксорубіцин
Частота серцевих скорочень (уд./хв)	281,63±12,44	306,58±59,57 *
Кінцево-сistolічний об'єм (мкл)	150,82±29,13	264,47±69,24 *
Кінцево-діастолічний об'єм (мкл)	185,17±21,80	283,10±75,37 *
Кінцево-сistolічний тиск (мм.рт.ст.)	104,97±32,85	60,95±7,88 *
Кінцево-діастолічний тиск (мм.рт.ст)	0,06±5,58	0,80±1,70 *
Ударний об'єм (мкл)	54,59±11,78	44,65±16,52 *
Фракція викиду (%)	28,07±4,44	15,08±2,86 *
Серцевий викид (мкл/хв)	15401,89±3574,40	12722,53±2111,95 *
Ударна робота (мм.рт.ст.*мкл)	4240,36±1045,55	2335,44±960,91 *
Артеріальна еластичність (Еа) (мм.рт.ст./мкл)	1,92±0,38	1,49±0,34 *
dPdt max (мм.рт.ст/с)	8095,71±1835,08	4189,50±906,33 *
Tau_w (мс)	9,25±1,73	7,94±1,29 *
E <sub>max</sub>	4,56±2,35	3,32±1,40 *

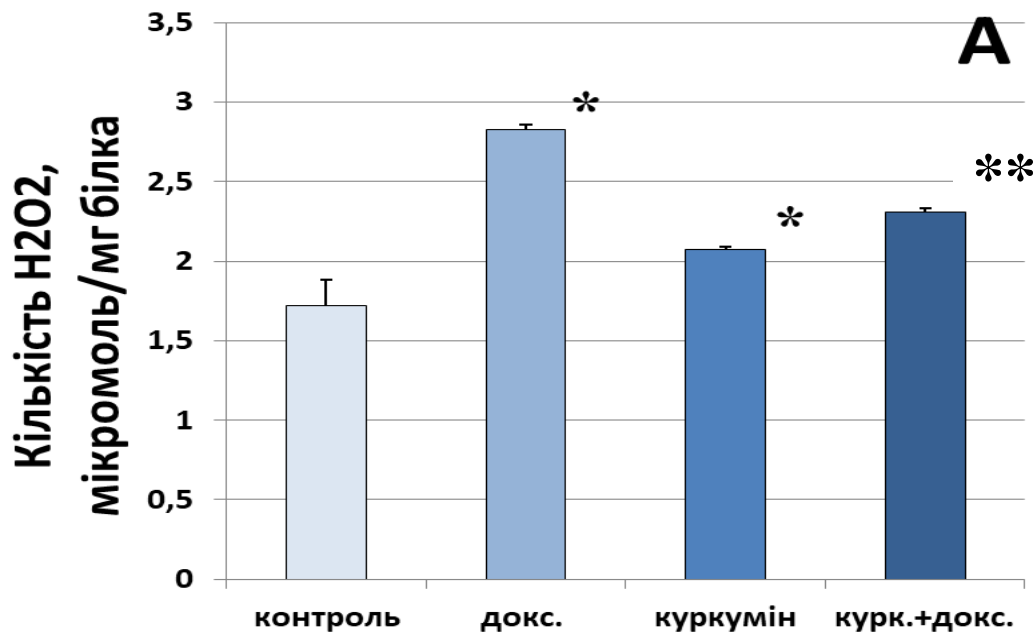
Примітка. \*  $P < 0,05$  при порівнянні контрольної групи та групи тварин, котрі отримували ін'єкції доксорубіцину (4мг/кг).

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 ізовольюмічна константа розслаблення  $Tau$  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.

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

Наші дослідження [178] 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. 3.10), що свідчить про інтенсифікацію вільно-радикальних процесів (ВРО) та зміни у структурній організації клітин міокарда.



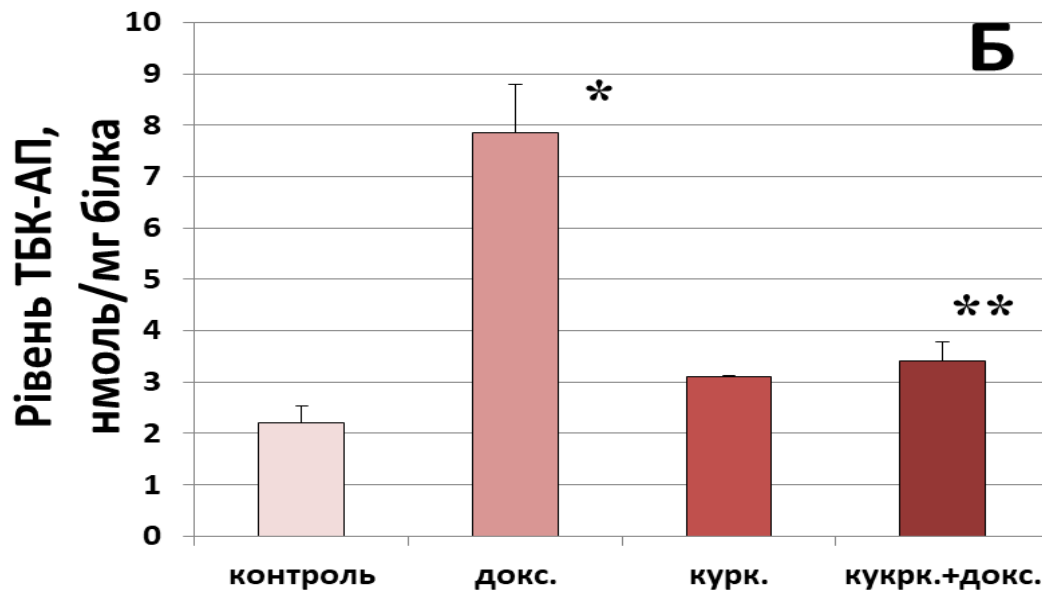


Рисунок 3.10. Зміна кількості  $\text{H}_2\text{O}_2$  (А) та ТБК-АП (Б) в культурі неонатальних кардіоміоцитів при інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл), куркуміном (20 мкмоль/мл), з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл) і куркуміном (20 мкмоль/мл) разом. \* -  $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* -  $P < 0,05$  порівняно зі впливом доксорубіцину.

Тривале введення доксорубіцину знижувало ферментативну активність Mn-SOD на 32%, при цьому активність каталази зростала на 72% у порівнянні з контролем ( $P < 0,05$ ) (рис. 3.11). Це можна пояснити компенсаторним підвищенням активності даного ферменту у відповідь на збільшення продукції  $\text{H}_2\text{O}_2$ , яка, як відомо, виступає в якості субстрату для антиперекисних ферментів [174].

Додавання куркуміну в дозі 20 мкмоль до клітинної культури кардіоміоцитів сприяло підвищенню активності Mn-SOD на 14%, каталази - на 23% у порівнянні з контролем ( $P < 0,05$ ), що підтверджує інші дослідження про властивості даного препарату як антиоксиданта [12].



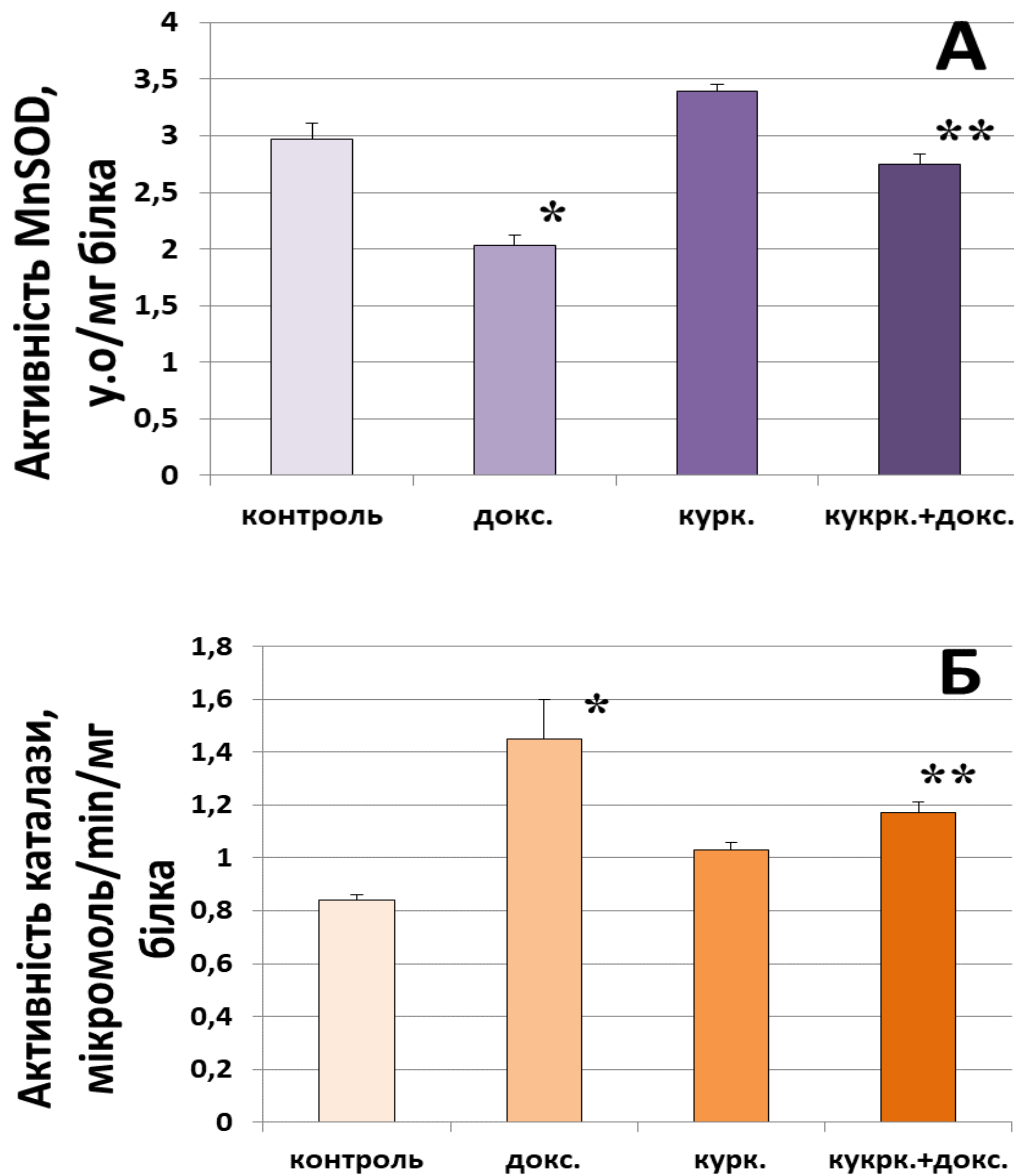


Рисунок 3.11. Зміна активності Mn-SOD (А) та каталази (Б) в культурі неонатальних кардіоміоцитів при інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл), куркуміном (20 мкмоль/мл), з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл) і куркуміном (20 мкмоль/мл) разом. \* -  $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* -  $P < 0,05$  порівняно зі впливом доксорубіцину.

При додаванні в культуру неонатальних кардіоміоцитів 20 мкмоль куркуміну на 24 години ці процеси відбувалися на тлі деякого 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. 3.10). Інкубація культури кардіоміоцитів з доксорубіци-

ном і куркуміном призводила до значного зниження активності вільно-радикальних процесів на відміну від доксорубіцинової інтоксикації. Зменшення вмісту ТБК-АП та  $H_2O_2$  (на 56,7% та 18,4%, відповідно,  $P<0,05$ ) (рис. 3.11), при зниженні гіперактивації каталази (на 19%,  $P<0,05$ ) та зростанні активності Mn-SOD (на 35%,  $P<0,05$ ) (рис. 3.12) свідчить про появу тенденції до відновлення прооксидантно-антиоксидантного балансу кардіоміоцитів. Таким чином, додавання куркуміну до культури кардіоміоцитів за умови доксорубіцинової інтоксикації мало позитивний коригуючий вплив на вільно-радикальні процеси та антиоксидантний захист.

При дослідженні оксидативного стресу в клітинах міокарду щурів [181], котрі отримували ін'єкції доксорубіцину та куркуміну (сумісно) й доксорубіцину окремо, були отримані наступні дані (рис. 3.12): вплив доксорубіцину призвів до підвищення в мітохондріях кардіоміоцитів вмісту активних продуктів тіобарбітурової кислоти на 21 та перекису водню на 76% порівняно з контролем ( $P<0,05$ ), що свідчить про інтенсифікацію вільно-радикального окиснення.

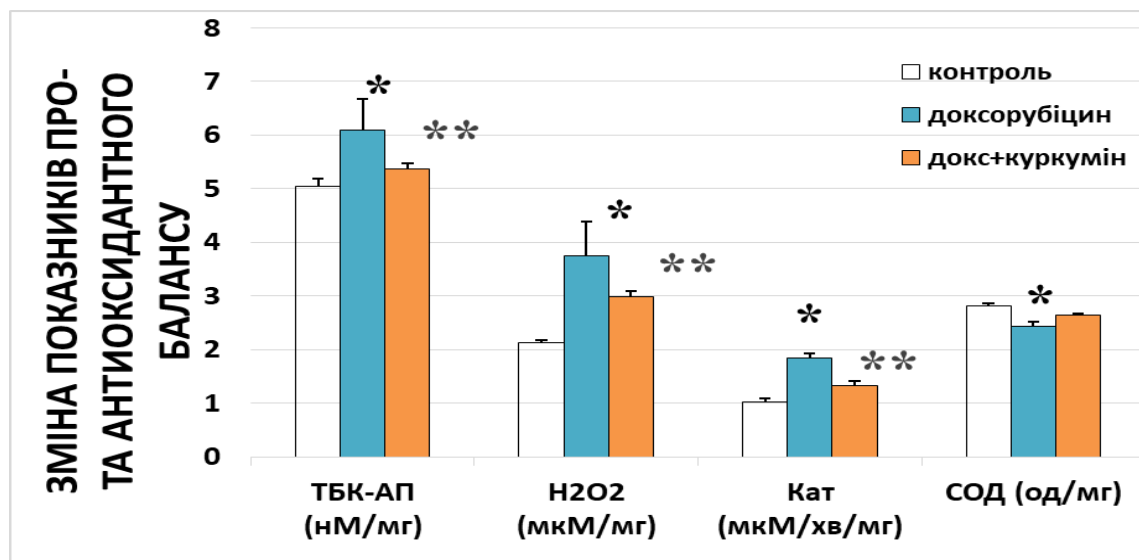


Рисунок 3.12. Зміна показників про- та антиоксидантного балансу мітохондрій кардіоміоцитів щурів при додаванні доксорубіцину (4 мкг/кг), куркуміну (50 мкг/кг) та при застосуванні їх разом. \* -  $P<0,05$  порівняно з контролем, \*\* -  $P<0,05$  порівняно з введенням доксорубіцину.

Вважається, що мітохондріальна Mn-SOD відіграє найбільш суттєву роль в антирадикальному захисті, підтримуючи безпечний рівень супероксид-аніона, а активація експресії SOD захищає клітини від оксидативного стресу різного генезу [14]. У нашій роботі тривале введення доксорубіцину знижувало ферментативну активність Mn-SOD на 14%, при цьому активність каталази зростала на 80% порівняно з контролем. Це можна пояснити компенсаторним підвищенням активності цього ферменту у відповідь на збільшення продукції  $H_2O_2$ , який, як відомо, виступає як субстрат для антиперекисних ферментів [12]. Сумісне застосування доксорубіцину та куркуміну призводило до значного зниження активності вільно-радикальних процесів на відміну від окремого впливу доксорубіцину. Зниження вмісту ТБК-АП та  $H_2O_2$  (на 14 та 26%, відповідно), при зниженні гіперактивації каталази (на 28%) та зростанні активності Mn-SOD (на 9%) свідчить про тенденцію до відновлення про-антиоксидантної рівноваги в мітохондріях кардіоміоцитів.

Також нами було встановлено зв'язок між життєздатністю неонатальних кардіоміоцитів та рівнем ВРО в цих клітинах під впливом доксорубіцину (рис. 3.13). Кореляційно-регресійний аналіз зв'язку між інтенсивністю флуоресценції барвника Mitotracker в кардіоміоцитах 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.

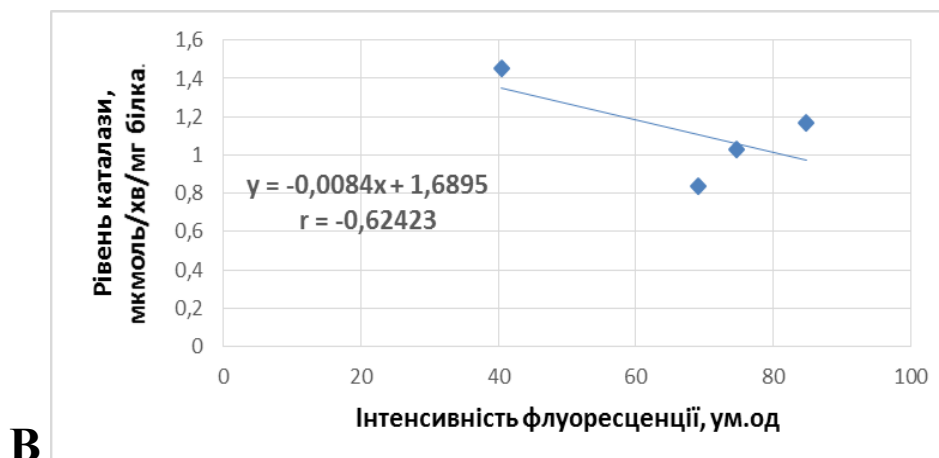
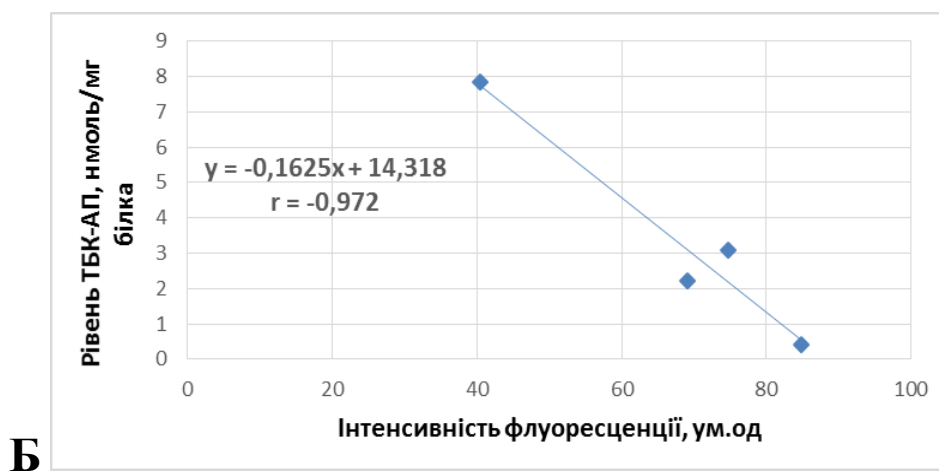
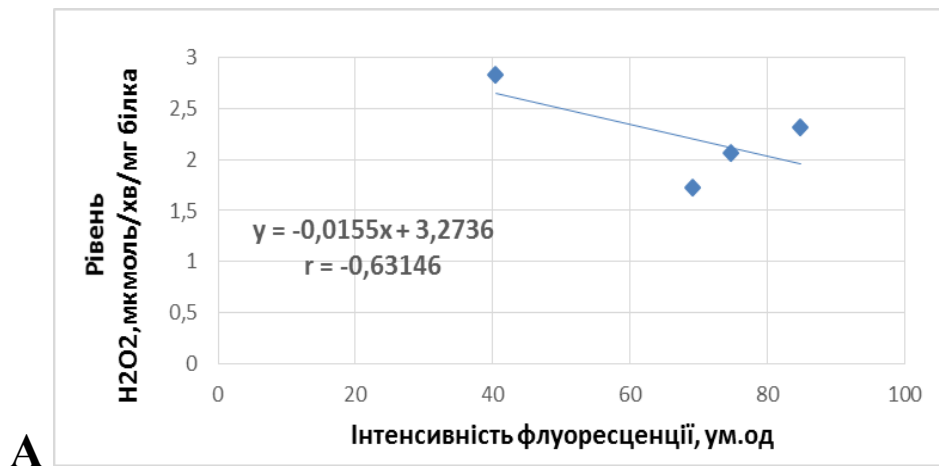


Рисунок 3.13. Кореляційні зв'язки між рівнем  $H_2O_2$  (А), ТБК-АП (Б), каталазою (В) та інтенсивністю флуоресценції барвника Mitotracker в кардіоміocyтах.

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

При оцінці параметрів дихання та фосфорилювання в мітохондріях, виділених з кардіоміоцитів щурів, виявлено наступні зміни [181]: 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. 2).

Таблиця 2.

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

Показники	Контроль	Доксорубіцин	Доксорубіцин + куркумін	Доксорубіцин + куркумін+5ГДК
$V_3$ нмоль·хв <sup>-1</sup> /мг білка	63,7±3,44	35,8±2,77*	44,7±2,13*#	39,4±2,1 <sup>L</sup>
$V_4^{ATP}$ нмоль·хв <sup>-1</sup> /мг білка	22,1±2,23	23,5±2,11	24,9±2,18	24,5±1,91
$V_3/V_4^{ATP}$	2,88±0,19	1,52±0,09*	1,8±0,11*#	1,61±0,05 <sup>L</sup>
$ADP/O$	1,67±0,12	1,14±0,05*	1,28±0,04*#	1,19±0,03 <sup>L</sup>
Швидкість входу К, мкмоль·хв <sup>-1</sup> /мг	52,2±2,57	37,6±2,2*	46,07±2,05*#	41,4±1,87 <sup>L</sup>

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

Вивчення швидкості транспорту іонів калію через мітохондріальні  $K_{ATP}$ -канали показало, що при дії доксорубіцину вхід іонів К в мітохондрії знизився на 27,7% порівняно

з контролем (табл. 2). Тобто, можна припустити, що доксорубіцин пригнічує вхід К через  $K_{ATP}$ -канали.

При дослідженні впливу класичного інгібітора АТФ-залежних мітохондріальних калієвих каналів 5-гідроксидеканоату були отримані схожі результати: вхід іонів К в мітохондрії достовірно знизився на 21% у порівнянні з контролем, причому показники окислювального фосфорилування 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 фосфорилуванням  $V_3/V_4^{ATP}$  підвищився на 18%, а коефіцієнт ефективності фосфорилування також зріс на 12%. Швидкість входу іонів К в мітохондрії зросла на 22,5% порівняно з такою при дії доксорубіцину (табл. 2). Таким чином, отримані дані свідчать про те, що за умови введення куркуміну відбувається реактивація мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів.

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

При дослідженні мітохондріального мембранного потенціалу неонатальних кардіоміоцитів флуоресцентним методом (рис. 3.14) було виявлено 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, що цілком підтверджує дані про пошкоджуючий вплив доксорубіцину на мітохондріальний апарат. Також відмічалось зменшення кількості живих клітин (рис. 3.15).

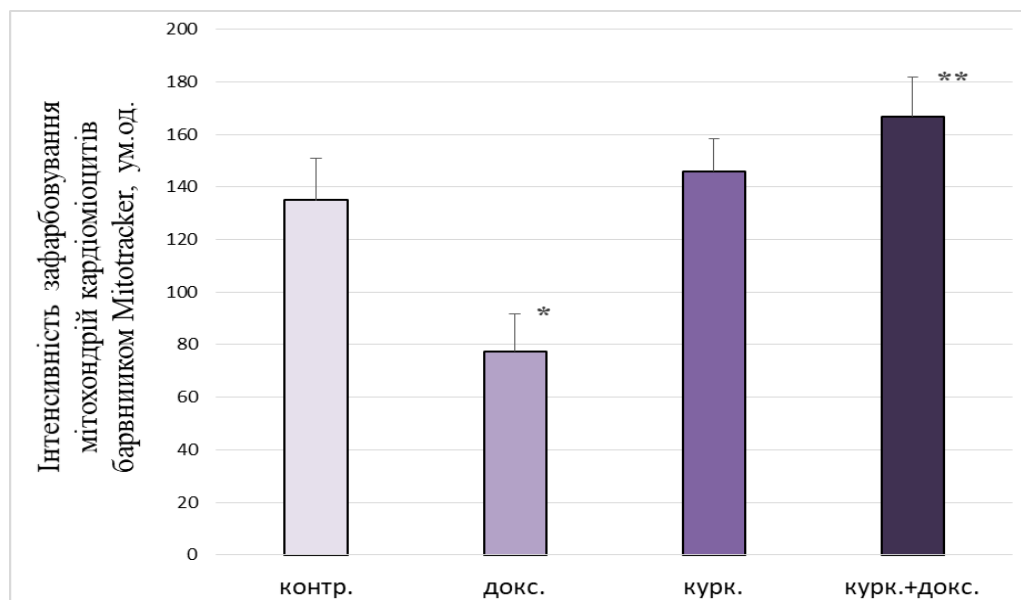


Рисунок 3.14. Зміна інтенсивності флуоресценції мітохондрій в культурі неонатальних кардіоміоцитів флуоресцентним барвником Mitotracker при інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл), куркуміном (20 мкмоль/мл), з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл) і куркуміном (20 мкмоль/мл) разом. \* -  $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* -  $P < 0,05$  порівняно зі впливом доксорубіцину.

Після інкубації клітин з куркуміном інтенсивність флуоресценції мітохондрій зросла на 8% порівняно з контролем. При цьому кількість живих клітин не збільшилась, що може пояснюватись проапоптичним впливом куркуміну. Інкубація клітин з куркуміном і доксорубіцином призводила до значного підвищення інтенсивності флуоресценції мітохондрій (в 2,2 рази, порівняно із застосуванням лише доксорубіцину), а також збільшувала кількість живих клітин [179].

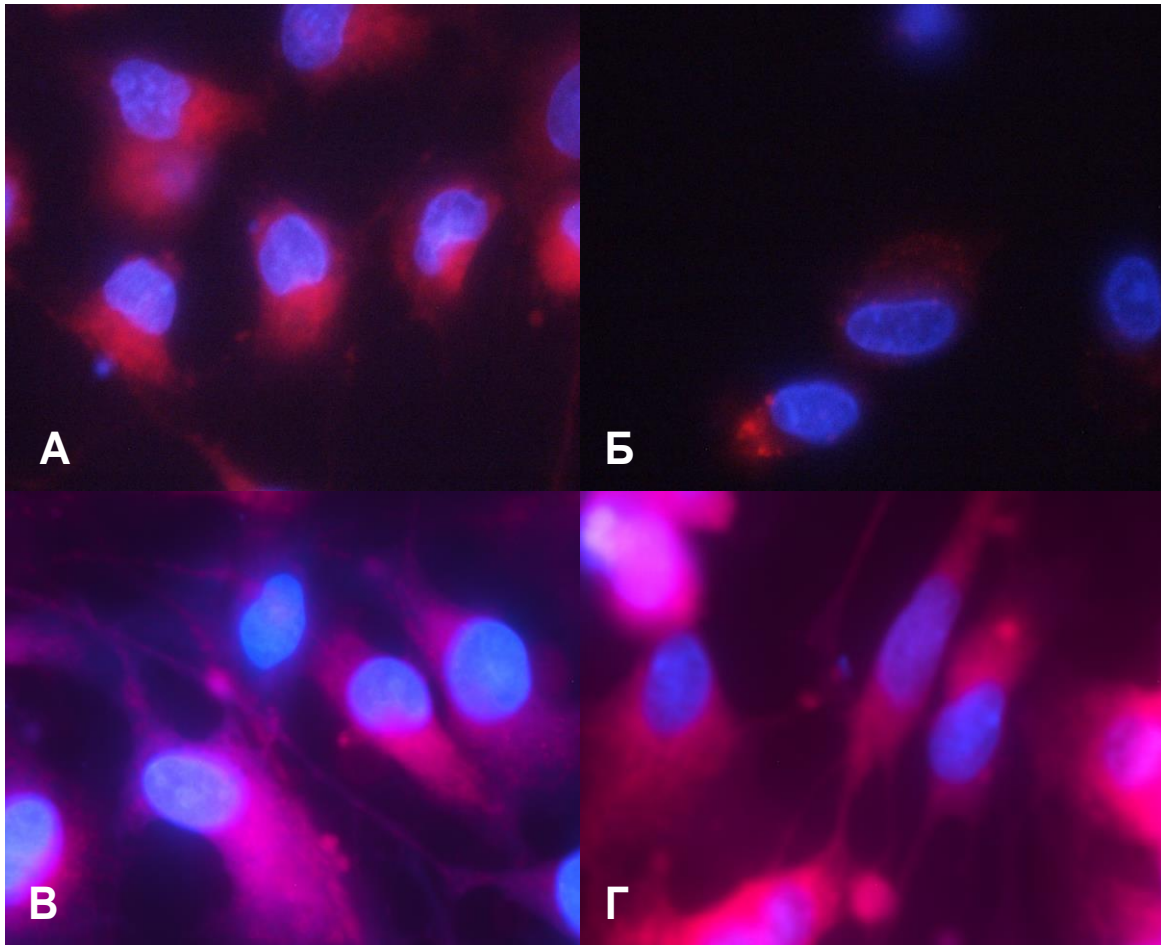


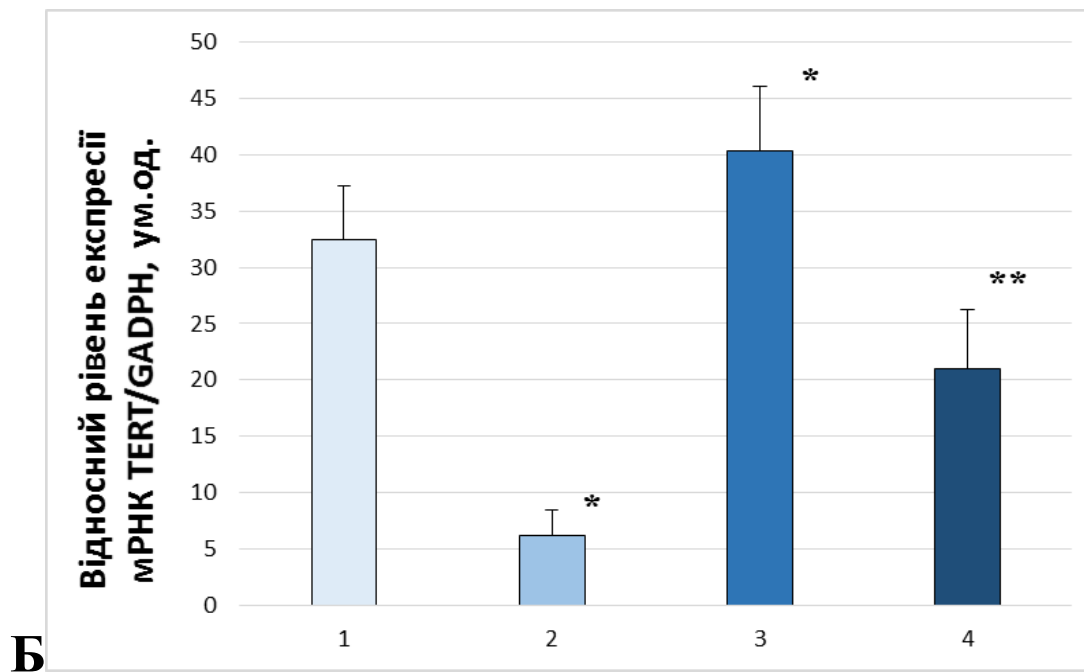
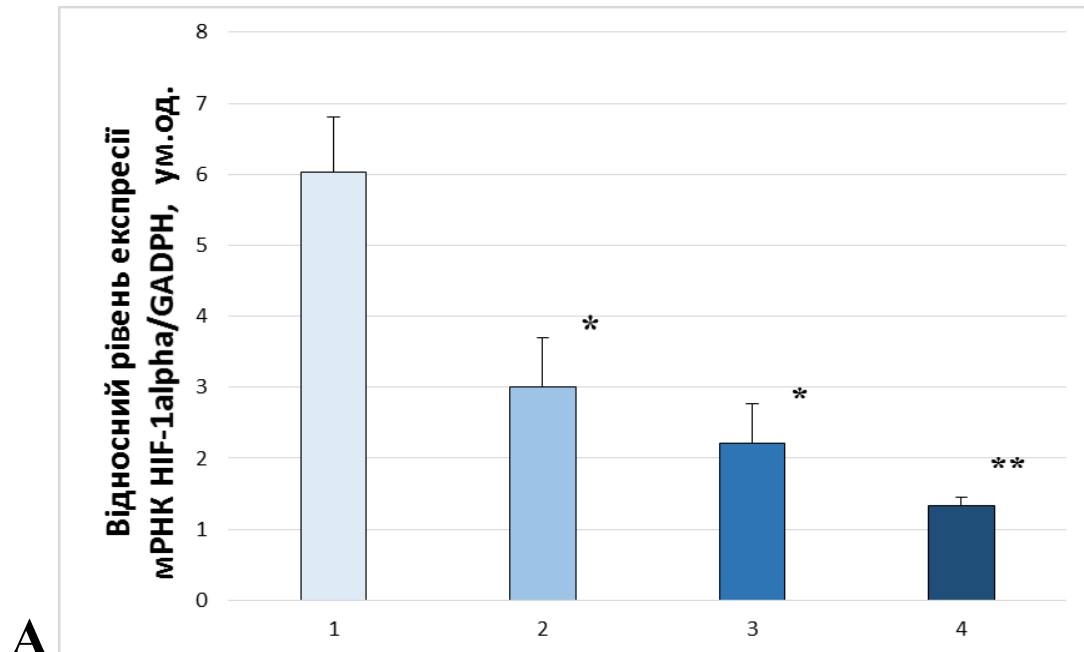
Рисунок 3.15. Зміна інтенсивності флуоресценції мітохондрій в культурі неонатальних кардіоміоцитів (фарбування барвниками Mitotracker DeepRed FM та Hoechst 33342). А- контроль; Б- після інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл); В- з куркуміном (20 мкмоль/мл), Г- при застосуванні їх разом в тих самих дозах. Флуоресцентний мікроскоп, збільшення  $\times 40000$ .

### **3.9. Експресія мРНК HIF-1 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ та їх генів-мішеней (PDK-1, TERT, IGF-1) в мітохондріях, виділених з культури неонатальних кардіоміоцитів та з міокарду щурів.**

При дослідженні експресії гіпоксія-індукованого фактора HIF-1 $\alpha$  та його генів-мішеней TERT, IGF-1 та PDK-1 в культурі неонатальних кардіоміоцитів щурів були отримані наступні дані [182]. Рівень мРНК HIF-1 $\alpha$  знижувався в усіх групах: при вве-



денні доксорубіцину на 50,3%, куркуміну у монорежимі на 63,2% (порівняно з контролем). А при їх поєднаному впливі експресія гену HIF-1 $\alpha$  знизилась на 55,7% порівняно з додаванням лише доксорубіцину (рис. 3.16).



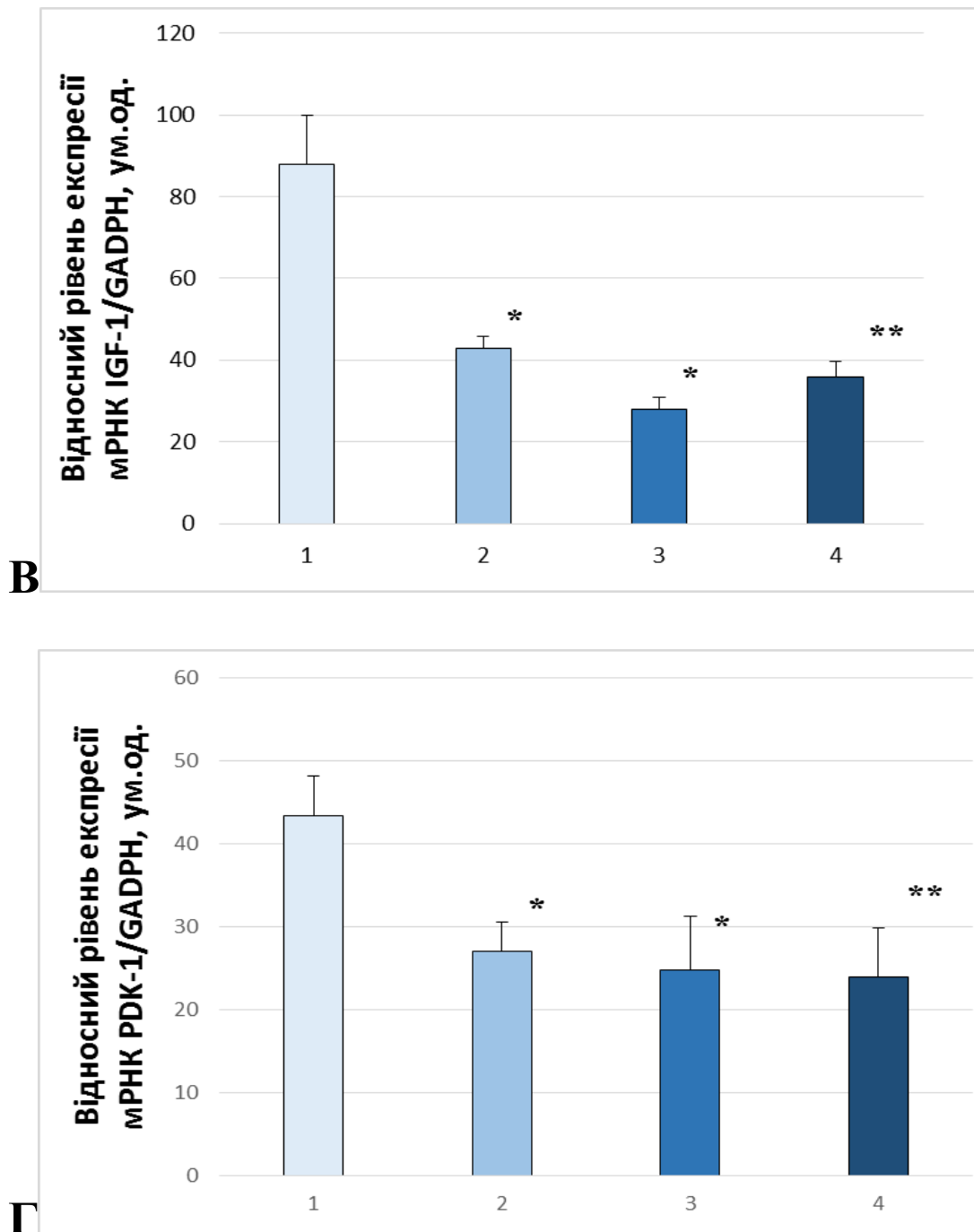
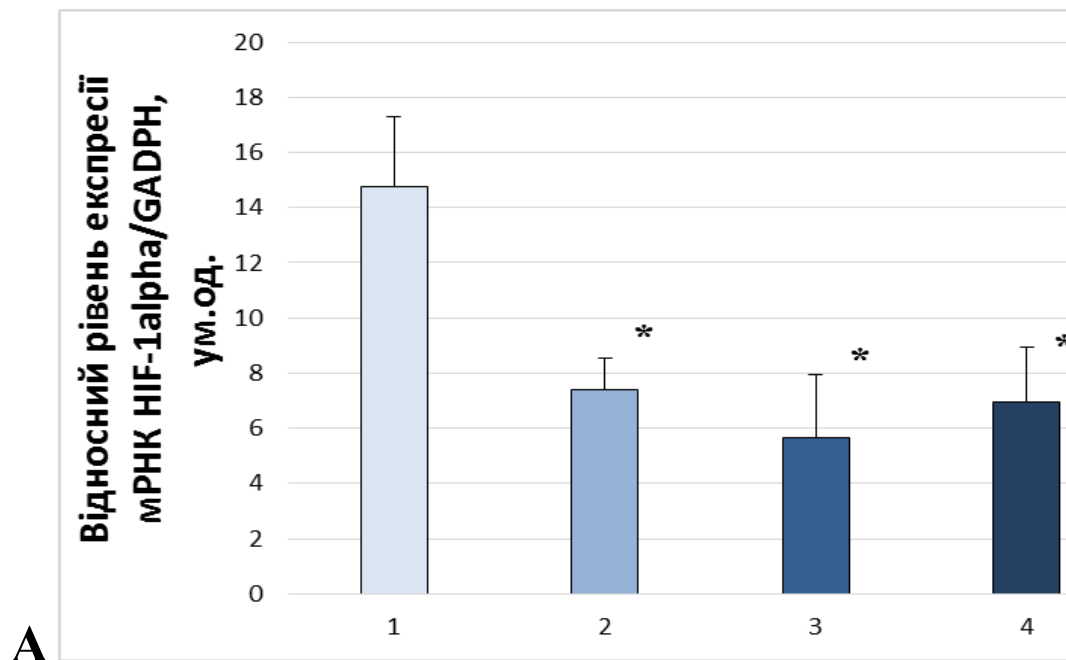


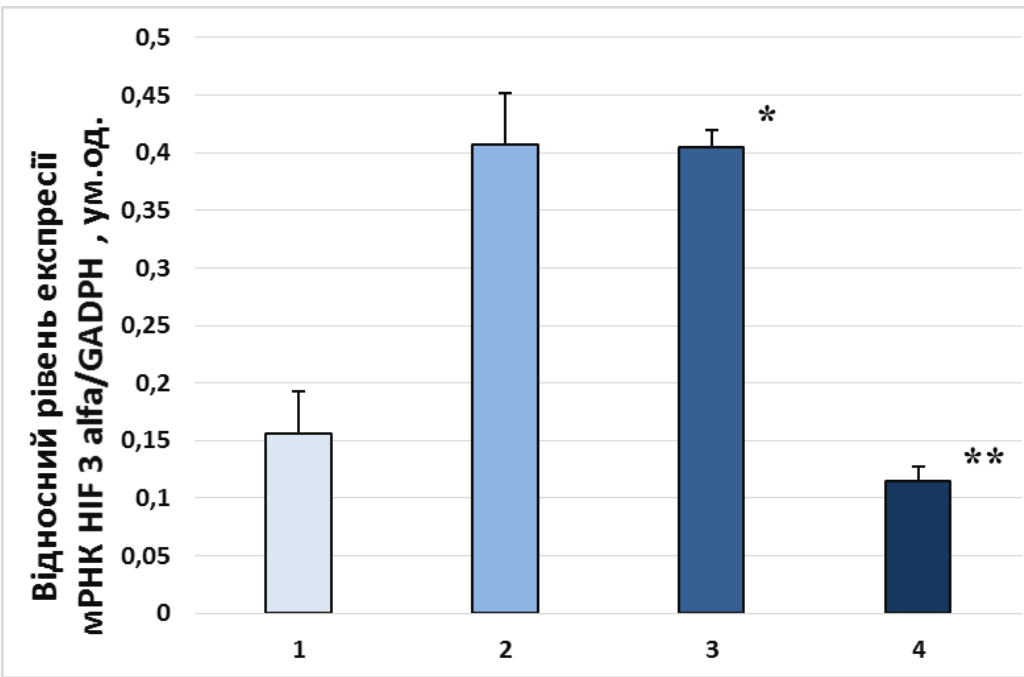
Рисунок 3.16. Зміни експресії мРНК HIF-1 $\alpha$  (А) та його генів-мішеней TERT (Б), IGF-1 (В), та PDK-1 (Г) в культурі неонатальних кардіоміоцитів щурів при полімеразній ланцюговій реакції у реальному часі: 1-контроль; 2-після інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл); 3- з куркуміном (20 мкмоль/мл), 4- при застосуванні їх разом в тих самих дозах. \* -  $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* -  $P < 0,05$  порівняно з доксорубіцином.

Спостерігалось значне зниження рівня експресії гену-мішені TERT під дією доксорубіцину – на 80,8% порівняно з контролем. При цьому, додавання куркуміну і сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну викликало значне підвищення експресії (на 24% (порівняно з контролем) та в 3,4 рази (порівняно з дією доксорубіцину окремо). Експресія гену-мішені IGF-1 значно знижувалась в усіх досліджуваних групах: під дією доксорубіцину і куркуміну на 51,3% та 68,1%, відповідно, порівняно з контролем. Сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну викликало незначне зниження експресії цього гену (на 16,5%), порівняно з дією доксорубіцину окремо. Рівень експресії PDK-1 також знижувався: під дією доксорубіцину та куркуміну окремо на 37,7% та 43,1%, відповідно, порівняно з контролем. При цьому сумісне застосування куркуміну і доксорубіцину незначно знижувало експресію цього гену – лише на 11,3% порівняно із застосуванням доксорубіцину окремо (рис. 3.16).

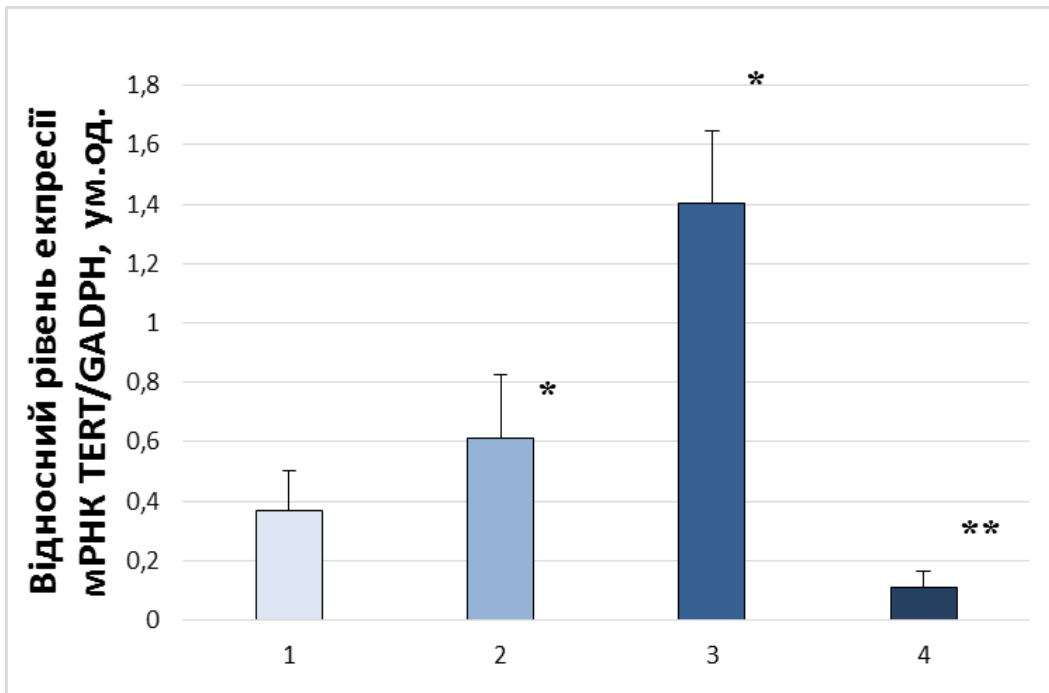
Надалі при дослідженні експресії гіпоксія-індукованого фактора HIF-1,  $3\alpha$  та його генів-мішеней TERT, IGF-1 та PDK-1 в міокарді щурів ми отримали наступні дані (рис. 3.17).



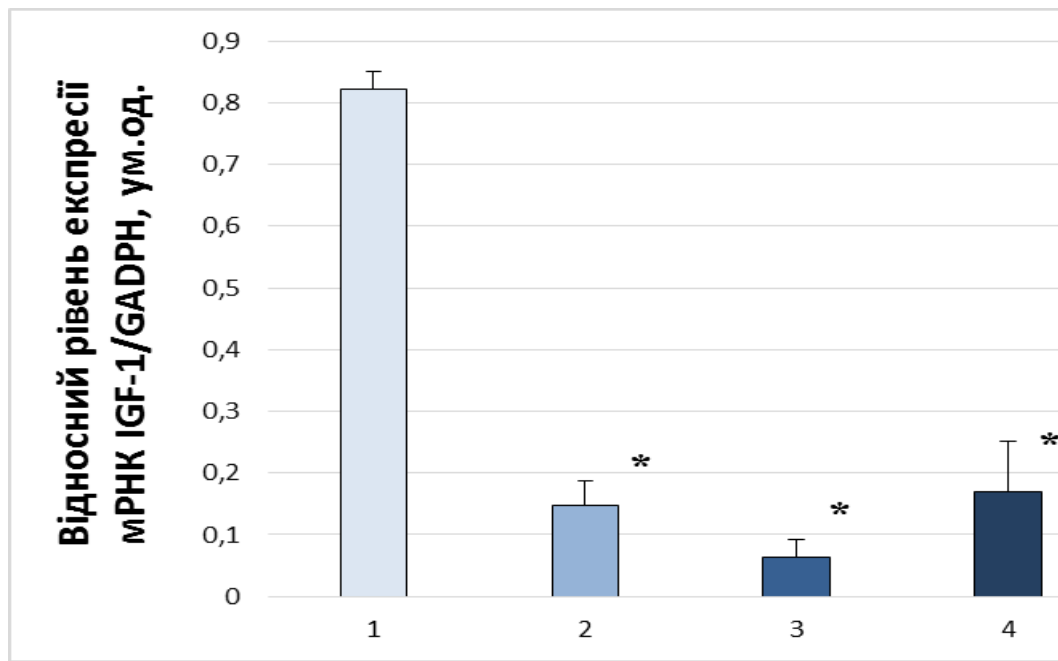
Б



В



Г



Д

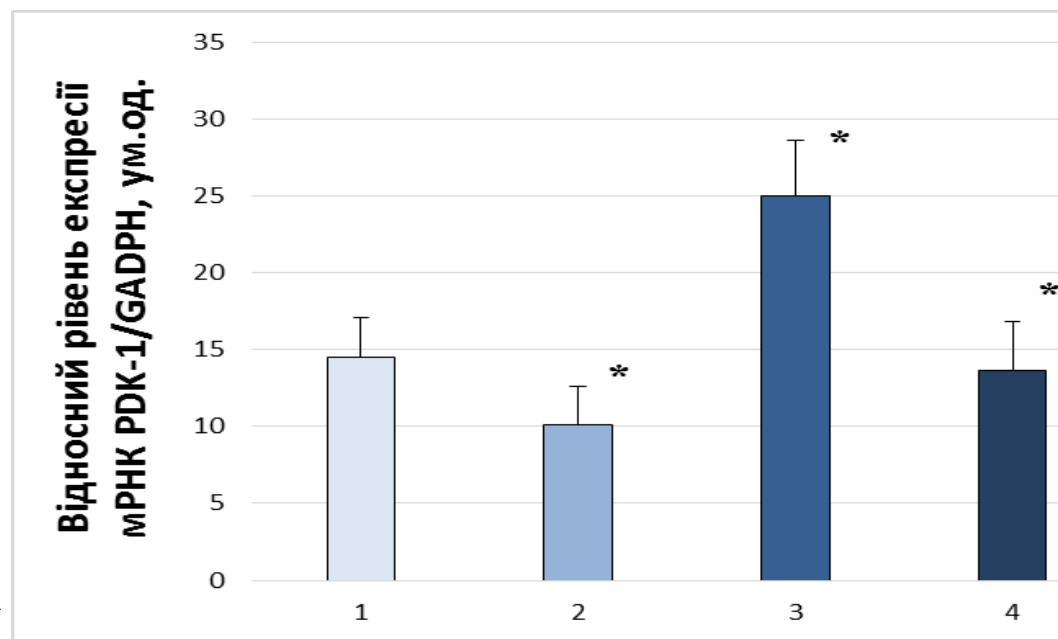


Рисунок 3.17. Зміни експресії мРНК субодиниці гіпоксія-індукованого фактора HIF-1 $\alpha$  (А), HIF-3 $\alpha$  (Б) та його генів-мішеней TERT (В), IGF-1 (Г), та PDK-1 (Д) в міокарді щурів при полімеразній ланцюговій реакції у реальному часі: 1-контроль; 2- введення доксорубіцину (4 мкг/кг); 3- введення куркуміну (50 мкг/кг), 4- при застосуванні їх разом в тих самих дозах. \* -  $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* -  $P < 0,05$  порівняно з доксорубіцином.

Показано, що рівень мРНК HIF-1 $\alpha$  в міокарді знижується при введенні доксорубіцину на 49,7%, куркуміну у монорежимі на 61,6% порівняно з контролем. При їх використанні разом експресія знизилась на 6,8% порівняно з додаванням лише доксорубіцину. При цьому рівень експресії гену HIF-3 $\alpha$  при введенні доксорубіцину зростав в 2,6 рази. А при поєднаному впливі доксорубіцину і куркуміну експресія HIF-3 $\alpha$  знизилась в 3,5 рази порівняно з використанням доксорубіцину. Експресія гену TERT значно підвищувалась під дією як доксорубіцину, так і куркуміну (на 64,9% та в 3,8 рази, відповідно), порівняно з контролем. При цьому, сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну викликало значне зниження експресії (на 83,6%), порівняно з дією доксорубіцину. Експресія гену-мішені IGF-1 значно знижувалась під дією як доксорубіцину, так і куркуміну (на 81,7% та 92,7%, відповідно), порівняно з контролем. А застосування доксорубіцину і куркуміну разом викликало незначне підвищення експресії цього гену (на 13,3%), порівняно з дією доксорубіцину окремо. Рівень експресії гену PDK-1 під дією доксорубіцину знижувався на 30,3% порівняно з контролем. При цьому привертає увагу його значне підвищення при введенні куркуміну – на 72,4% (порівняно з контролем) і дещо менше (на 34,7%) порівняно з введенням лише доксорубіцину. Такий ефект дії куркуміну може цілком логічно пояснити механізми його антиоксидантного впливу.

## РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

До теперішнього часу накопичено багато даних про те, що оксидативний стрес і мітохондріальна дисфункція дуже щільно взаємопов'язані та є важливими ланками патогенезу важких нейродегенеративних захворювань, кардіоміопатій, атеросклерозу, ожиріння, діабету, тощо. Встановлено, що активація вільно радикального окислення є одним із провідних патогенетичних механізмів ушкоджень кардіоміоцитів антрацикліновими антибіотиками, які широко використовують при лікуванні пухлин, що на сьогоднішній день особливо актуально у зв'язку з великим зростанням серцево-судинних та онкологічних захворювань. Однак треба підкреслити, що при експериментальному відтворенні оксидативного стресу за допомогою антрациклінових антибіотиків, виконане нами розгорнуте дослідження структурних та функціональних змін мітохондріального апарату в кардіоміоцитах *in vivo* та на культурі клітин у співставленні з розподілом видів клітинної загибелі, експресії специфічних генів, що приймають участь у регуляції продукції вільних радикалів, активності антиоксидантних ферментів дотепер не проводилось. Ми вважаємо, що ці дані можуть відкрити великі перспективи для подальшого вивчення функціональних, мембранних, морфологічних, стереометричних, динамічних та генетичних характеристик мітохондрій при розвитку кардіоміопатій та інших хвороб людини, пов'язаних з порушенням функціонального стану мітохондрій.

Найчастіше при лікуванні онкологічних захворювань використовується антрацикліновий антибіотик доксорубіцин, який є особливо кардіотоксичним та має здатність до потенціювання і кумуляції [55,1]. Це стало причиною використання нами саме доксорубіцинової моделі для відтворення оксидативного стресу *in vitro* та *in vivo* та дало можливість дослідження глибоких генетично-молекулярних механізмів впливу антрациклінових антибіотиків на мітохондріальний апарат клітин серця.

Відомо, що доксорубіцин здатний безпосередньо ушкоджувати цитоплазматичну мембрану [53]. Особливістю доксорубіцину є те, що, крім характерних для переважної

більшості цитостатиків побічних явищ, даний препарат має значно виразнішу токсичну дію саме на серце [54]. Він спричиняє деструктивно-дистрофічні зміни в міокарді тварин: набрякання окремих м'язових волокон, дегенерацію міофібрил, гомогенізацію, вакуолізацію і резорбцію саркоплазми, порушення структури ядер [55,183], що, в свою чергу, негативно впливає на скорочувальну здатність кардіоміоцитів. Вищезазначені зміни призводять до дисфункції міокарду і розвитку серцевої недостатності.

На жаль, в літературі є великий розкид щодо дози доксорубіцину, яку застосовують для моделювання доксорубіцин-індукованого оксидативного стресу в культурі кардіоміоцитів [66,184]. Тому, по-перше, нам потрібно було визначити концентрацію доксорубіцину, яка викликатиме зміни, характерні для оксидативного пошкодження, але ще не призводитиме до суттєвої загибелі кардіоміоцитів. Як відомо, МТТ-тест характеризує інтенсивність окисно-відновних процесів в клітинах культури і опосередковано характеризує активність біомаси. За його результатами можна зробити висновок про рівень цитотоксичності різних доз доксорубіцину та життєздатність кардіоміоцитів. При інкубації з доксорубіцином (Sigma Aldrich) в дозах 0,1; 0,5 та 1,0 мкмоль кількість живих клітин відносно контролю зменшилась дозозалежним чином. Це підтвердило дані літератури щодо кардіотоксичності антрациклінів та дало можливість вибрати середню дозу доксорубіцину 0,5 мкмоль як оптимальну для наших досліджень [177].

Оскільки біоенергетичні процеси в міокарді, оптимальні для функціонування серцевого м'яза, забезпечуються виключно аденозинтрифосфатом (АТФ), який синтезується в мітохондріях у результаті окисного фосфорилування за наявності молекулярного кисню [43], то за умови оксидативного стресу, зокрема, в результаті впливу доксорубіцину, пригнічується синтез АТФ у мітохондріях, і в клітинах відбувається швидке зниження рівня креатинфосфату, а згодом і АТФ [185]. При цьому, виявлено, що метаболічна активність та сарколемальна  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза (SERCA) пригнічується [186]. Всі ці порушення можуть призводити до захворювань серцево-судинної системи і тому пошук механізмів можливої кардіопротекції є надзвичайно актуальним. Наразі, в якості



протекторів при оксидативному стресі, викривують різноманітні речовини, як хімічного, так і рослинного походження. Зокрема, використовуються такі речовини, як L-карнітин [125], триметазидин [126], метформін [127], похідні бурштинової кислоти [187], та інші. Після аналізу сучасних досліджень, ми вирішили зупинитись на використанні рослинного антиоксиданту куркуміну в якості можливого кардіопротектора при оксидативному стресі, так як саме ця речовина має протективний ефект при пошкодженнях міокарду та допомагає збереженню функцій серця [12], одночасно впливаючи на активність цитокінів, ензимів та транскрипційних факторів, пов'язаних із розвитком оксидативного стресу [13] (тобто зменшує його явища) і гіпоксії, а також зменшує токсичний вплив доксорубіцину на серце за рахунок його потужних антиоксидантних властивостей [14].

Спираючись на те, що доксорубіцин-індукований оксидативний стрес є причиною загибелі кардіоміоцитів різними шляхами (апоптоз, аутофагія, некроз), а використання куркуміну окремо, в свою чергу, є як антиоксидантним, так і апоптоз-провокуючим фактором, ми дослідили рівень загибелі неонатальних кардіоміоцитів в культурі. За допомогою методу подвійного фарбування клітин флуоресцентними барвниками Hoechst та пропідіум іодид було показано, що після інкубації культури неонатальних кардіоміоцитів з доксорубіцином у дозі 0,5 мкмоль частка живих клітин значно зменшилась, а кількість загиблих збільшилась в 4,5 рази порівняно з контролем ( $P < 0,05$ ). Загибель клітин відбувалася головним чином шляхом некрозу, показником чого були втрата цілості плазматичної мембрани клітин та її розриви [188]. Після інкубації з куркуміном у дозі 20 мкмоль, кількість живих клітин зменшилась незначно, а рівень загиблих зріс в 3,25 рази ( $P < 0,05$ ) відносно контролю, що може бути зумовлене проапоптотичним впливом куркуміну на культуру неонатальних кардіоміоцитів при його безпосередньому застосуванні. При цьому, сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну підвищувало життєздатність клітин, а кількість загиблих клітин відповідно зменшувалась. Незважаючи на те, що некроз традиційно вважається нерегульованою загибеллю клітини, на відміну від регульованої (апоптоз), в останнє десятиріччя нако-

пичуються дані про те, що некроз є також формою регульованої клітинної загибелі (програмований некроз, або некроптоз) [189-191], молекулярні механізми якої наразі інтенсивно вивчаються. Наші дані відносно доксорубіцин-індукованого некрозу кардіоміоцитів повністю співпадають з дослідженнями доксорубіцин-індукованого некрозу в клітинах нирок [191]. Автори встановили, що ця форма некрозу опосередковується дією PARP1 (полі-(АДФ-рібоза)-полімерази 1 – ядерного протеїну, який індукує пригнічення синтезу АТФ, генерацію ROS, пошкодження ДНК, зупинку клітинного циклу [192].

Крім того, результати МТТ-тесту дали нам можливість зробити висновок про зміну рівня цитотоксичного впливу доксорубіцину окремо та в поєднанні з куркуміном на неонатальні кардіоміоцити [178]. А саме: інкубація з доксорубіцином в дозі 0,5 мкмоль призвела до значної загибелі живих клітин. А інкубація клітин з доксорубіцином та куркуміном (в дозі 20 мкмоль) разом сприяла зменшенню відсотку загинувших клітин порівняно з використанням лише доксорубіцину. Це підтвердило дані літератури щодо кардіопротекторних властивостей куркуміну.

Як ми вже згадували, порушення окисно-відновного стану клітини викликає підвищений рівень генерації активних форм кисню (ROS), надмірне утворення яких призводить до розвитку оксидативного стресу з його потужним пошкоджувальним ефектом на метаболічні процеси, структурні компоненти клітин, зокрема мітохондрії та їх геном [193,27]. Згідно з нашими дослідженнями [178], вплив доксорубіцину призводить до значного підвищення в кардіоміоцитах вмісту активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) та перекису водню. Це свідчить про інтенсифікацію вільно-радикального окиснення, яке може призводити до змін у структурній організації клітин міокарду. Ступінь деструктивно-метаболічних порушень кардіоміоцитів за цих умов залежить від стану ферментних і неферментних антиоксидантних систем, узгоджена дія яких тримає під контролем як утворення, так і інактивацію активних форм кисню. Важливе значення у цих системах належить ферментам СОД та каталазі [194,195], що діють у взаємозв'язку. Початкові стадії процесу вільно-радикального окиснення кон-

тролюються СОД, яка дезактивує супероксидний радикал і, відповідно, зменшує загальний токсичний ефект ROS. Пероксид водню, що утворюється при дисмутації супероксидного аніона, розкладається каталазою. Вважається, що Mn-СОД відіграє найбільш суттєву роль у антирадикальному захисті, підтримуючи безпечний рівень супероксид-аніона, а активація експресії СОД захищає клітини від окисного стресу різного генезу [196]. У нашій роботі тривала інкубація кардіоміоцитів з доксорубіцином знижувала ферментативну активність Mn-СОД, при цьому активність каталази зростала на 72% порівняно з контролем. Це можна пояснити компенсаторним підвищенням активності цього ферменту у відповідь на збільшення продукції  $H_2O_2$ , який, як відомо, виступає як субстрат для антиперекисних ферментів [194]. Додавання куркуміну до клітинної культури кардіоміоцитів сприяло підвищенню активності Mn-СОД та каталази, що підтверджує дані інших досліджень про властивості цього препарату як антиоксиданта [14]. Відомо, що використання куркуміну поліпшує антиоксидантний статус і, тим самим, запобігає пошкодженню серця в основному через його помірну антиоксидантну дію [12]. Антиоксидантні механізми куркуміну можуть включати в себе один або більше з наступних взаємодій: нейтралізація вільних радикалів [137], інгібування цитохром Р450 [138], зменшення доступності кисню до окисних реакції, взаємодія з окисним каскадом і запобігання його наслідкам [139], зменшення окисних властивостей іонів таких металів, як залізо [140,141]. Таким чином, куркумін ефективно запобігає пошкодженню тканин за рахунок зменшення окисного стресу та відновлення антиоксидантного статусу. Однак, в наших експериментах при додаванні в культуру неонатальних кардіоміоцитів 20 мкмоль/мл куркуміну на 24 години ці процеси відбувалися на тлі деякого підвищення вмісту ТБК-АП і  $H_2O_2$ . Сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну в культурі кардіоміоцитів призводило до значного зниження активності вільно-радикальних процесів на відміну від впливу доксорубіцину. Зниження вмісту ТБК-АП та  $H_2O_2$  при усуненні гіперактивації каталази та зростанні активності Mn-СОД свідчить про відновлення про- та антиоксидантного балансу кардіоміоцитів. Таким чином, додавання куркуміну до культури кардіоміоцитів за умови застосування

доксорубіцину мало позитивний коригуючий вплив на вільно-радикальні процеси та антиоксидантний захист. Питання про незначне підвищення ПОЛ за дії куркуміну наразі не має чітких пояснень. В літературі є дані лише про підвищення ПОЛ на фоні сумісного застосування куркуміну і різних пошкоджуючих агентів (в тому числі, доксорубіцину). А щодо незначного підвищення  $\text{H}_2\text{O}_2$  за дії куркуміну, то це можна пояснити тим, що Mn-SOD захищає від вільно-радикальних пошкоджень шляхом конвертації  $\text{O}^{2-}$  радикалу в  $\text{H}_2\text{O}_2$  і запобігає утворенню OH радикалів через реакцію Фентона, а  $\text{H}_2\text{O}_2$  далі може бути видалений за допомогою каталази [14].

При введенні доксорубіцину і куркуміну щурам *in vivo* були отримані схожі результати [181]. Але, зогляду на дані, отримані на культурі [178], куркумін окремо тварини не отримували, а лише як протективний засіб при введенні доксорубіцину. При дослідженні оксидативного стресу в клітинах міокарду щурів, котрі отримували ін'єкції доксорубіцину та куркуміну (разом) й доксорубіцину окремо, були отримані наступні дані: вплив доксорубіцину призвів до підвищення в мітохондріях кардіоміоцитів вмісту активних продуктів тіобарбітурової кислоти та перекису водню порівняно з контролем, що свідчить про інтенсифікацію вільно-радикального окиснення. Введення доксорубіцину дещо знижувало ферментативну активність Mn-SOD, при цьому активність каталази зростала на 80% порівняно з контролем. Ці дані повністю співпадали з результатами, отриманими на культурі клітин, що свідчить про підвищення активності антиперекисних ферментів у відповідь на оксидативний стрес як на клітинному рівні, так і на рівні цілісного організму [194]. Сумісне застосування доксорубіцину та куркуміну призводило до значного зниження активності вільно-радикальних процесів на відміну від окремого впливу доксорубіцину. Зниження вмісту ТБК-АП та  $\text{H}_2\text{O}_2$  при усуненні гіперактивації каталази та зростанні активності Mn-SOD свідчить про відновлення про- та антиоксидантного балансу в мітохондріях кардіоміоцитів. Таким чином, результати дослідження розвитку доксорубіцин-індукованого оксидативного стресу в мітохондріях кардіоміоцитів свідчать про його гальмування при застосуванні куркуміну як у модельних експериментах *in vitro*, так і при введенні тваринам *in vivo*.

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 обернену 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 оксидативного окиснення, тим нижчою була життєздатність кардіоміоцитів.

Відомо, що неонатальні кардіоміоцити здатні спонтанно скорочуватись. Згідно літературних даних, доксорубіцин знижує активність SERCA та концентрацію  $Ca^{2+}$  в саркоплазматичному ретикулумі (СПР) [155], що може сприяти активації  $Ca^{2+}$ / кальмодулін залежної кінази II (CaMKII) і підвищувати витік  $Ca^{2+}$  з СПР, знижуючи кальцієву керованість кардіоміоцитів [156].

В результаті проведених досліджень на культурі неонатальних кардіоміоцитів нами встановлено, що доксорубіцин викликає значні зміни всіх параметрів їх скорочувальної активності порівняно з контролем [179,197]. А саме: збільшення частоти спонтанних скорочень в 2 рази, порушення їх ритмічності, зниження амплітуди та відсотку вкорочення, підвищення максимальної швидкості скорочення і розслаблення без значних змін тривалості цих процесів. Зниження амплітуди скорочень неонатальних кардіоміоцитів та втрата ними ритмічності під впливом доксорубіцину може пояснюватись порушенням нормального перерозподілу  $Ca^{2+}$  між депо і міоплазмою клітин. А порушення скоротливої функції кардіоміоцитів може пояснюватись також і тим, що у неонатальних кардіоміоцитів вже через 1 годину після дії доксорубіцину ( $1 \text{ мкмоль/л}$ ) втричі підвищується активність кальпаїну, який стимулює деградацію тітіну (ефект був подібний до кальцієвого іонофору іономіцину) [157].

Інкубація з куркуміном викликала достовірне зменшення частоти спонтанних скорочень, максимальної швидкості скорочення і розслаблення, зниження амплітуди та відсотку вкорочення, порушення їх ритмічності. Як видно з результатів, інкубація клітин з куркуміном окремо також погіршувала функціональний стан неонатальних кардіоміо-

цитів порівняно з контролем, що може пояснюватись проапоптотичними властивостями куркуміну [139].

Сумісна інкубація з доксорубіцином і куркуміном викликала значне зниження частоти спонтанних скорочень (в 3 рази), відновлення їх ритмічності, підвищення амплітуди в 2 рази та відсотку вкорочення, збільшення максимальної швидкості скорочення в 1,8 рази і підвищення швидкості розслаблення, без значних змін тривалості цих процесів порівняно з моноінкубацією з доксорубіцином. Сумісне застосування препаратів значно покращувало скорочувальну активність клітин, що може бути пов'язано зі зменшенням проявів оксидативного стресу в кардіоміocyтах. А саме, зменшувало частоту спонтанних скорочень (наближало до контрольних значень), відновлювало їх ритмічність, амплітуду піку та відсоток вкорочення. Ці явища можна пояснити тим, що куркумін має протективний ефект при пошкодженнях міокарду та допомагає збереженню функцій серця [12], впливаючи на активність цитокінів, ензимів та транскрипційних факторів, пов'язаних із розвитком оксидативного стресу [13], а також значно зменшує токсичний вплив доксорубіцину на серце за рахунок його антиоксидантних властивостей [14].

В літературі є дані щодо здатності доксорубіцину призводити до дилатаційної кардіоміопатії при тривалому використанні цього антибіотику [198,3]. При чому, ця здатність залежить від дози і тривалості введення препарату. В нашому випадку середню дозу доксорубіцину вводили протягом тижня, що було достатнім для спричинення оксидативного стресу і призводило до патологічного ремоделювання і початку формування ознак дилатаційної кардіоміопатії. Так, при визначенні кардіогемодинамічних показників було встановлено суттєві відмінності між досліджуваними групами тварин [180].

Показники насосної функції у групі щурів з доксорубіцин-індукованим оксидативним стресом значно відрізнялись від контрольних, відмічалось зростання ЧСС на тлі зниження фракції викиду, серцевого викиду, ударної роботи та ударного об'єму ( $P < 0,05$ ).

При цьому, кінцево-сistolічний об'єм зростав порівняно з контролем ( $P < 0,05$ ), що може свідчити про перерозтягнення міокарду лівого шлуночка.

Показники діастолічної функції серця були вищими за контрольні: спостерігалось збільшення кінцево-діастолічного об'єму та кінцево-діастолічного тиску ( $P < 0,05$ ). В той же час, ізоволюмічна константа розслаблення Тау знижувалась, 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 ( $P < 0,05$ ), що, при зниженні  $E_{max}$ , 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, що підтверджувалось порушенням скоротливості як окремих неонатальних кардіоміоцитів, так і початковою стадією доксорубіцин-індукованої дилатаційної кардіоміопатії (перерозтягнення міокарду лівого шлуночка) в цілому серці.

В подальших дослідженнях ми оцінювали ступінь впливу оксидативного стресу на життєздатність кардіоміоцитів та функціональну активність їх мітохондрій (дихання та окисне фосфорилування мітохондрій, величина мітохондріального мембранного потенціалу, швидкість транспорту іонів калію) [181].

При оцінці параметрів дихання мітохондрій кардіоміоцитів щурів (за Чансом) виявлено наступні зміни: в мітохондріях щурів, котрі отримували ін'єкції доксорубіцину, показник активного дихання  $V_3$  знизився майже вдвічі, показник ступеня спряженості окислення з фосфорилуванням  $V_3/V_4^{ATP}$  та коефіцієнт ефективності фосфорилування також зменшились порівняно з контролем. Ці дані свідчать про зниження ефективності роботи дихального ланцюга та використання  $O_2$ , порушення рівня енергетичної регуляції дихання мітохондрій, зменшення спряження дихання і фосфорилування, що є показниками доксорубіцин-індукованого порушення процесів окисного фосфорилування в мітохондріях. Очевидно, що доксорубіцин викликає пригнічення роботи дихального ланцюга та синтезу АТФ як основного енергетичного субстрату. В той же час, після

сумісного застосування доксорубіцину та куркуміну показники мітохондріального дихання ( $V_3$ ,  $V_3/V_4^{ATP}$ , коефіцієнт ефективності фосфорилування) значно покращувались порівняно із такими при використанні лише доксорубіцину.

З метою знаходження можливого механізму дії куркуміну на фоні доксорубіцину ми провели дослідження з визначенням ролі  $K_{ATP}$ -каналів в регуляції енергетичного метаболізму мітохондрій щурів [199]. Ми виходили з того, що введення доксорубіцину викликає ушкодження внутрішньої мітохондріальної мембрани, що призводить до різкого збільшення її проникності для іонів  $Ca^{2+}$  та перевантаження кардіоміоцитів цими катіонами. Відомо також, що транспорт іонів кальцію знаходиться в тісному спряженні з енергозалежним транспортом іонів калію в мітохондрії [200]. Вивчення швидкості транспорту іонів калію показало, що за умови дії доксорубіцину вхід іонів  $K$  в мітохондрії знизився порівняно з контролем, що може свідчити про пригнічення енергетичного обміну [201]. При сумісній дії доксорубіцину та куркуміну він зростав порівняно з доксорубіцином, а при застосуванні інгібітора  $ATP$ -залежних калієвих каналів (5-ГДК) на тлі дії доксорубіцину з куркуміном незначно знижувався порівняно з сумісною дією доксорубіцину й куркуміну.

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що введення куркуміну може реактивувати мітохондріальні  $K_{ATP}$ -канали. Отже, в механізмах дії доксорубіцину та куркуміну на енергетичний метаболізм мітохондрій міокарду щурів за умови експериментально викликаного введенням доксорубіцином оксидативного стресу значну роль відіграє транспорт іонів калію в мітохондріальний матрикс через  $K_{ATP}$ -канали. Їх активація призводить до зниження перенавантаження кальцієм матрикса мітохондрій, зменшує продукцію ROS та інгібує мітохондріальну пору, що разом спричиняє кардіопротекторний ефект [202]. Можна також, зробити висновок про здатність куркуміну покращувати електронтранспортну функцію мітохондрій, посилювати спряженість й ефективність процесів дихання та фосфорилування для запобігання пошкодженню клітин при оксидативному стресі.



За даними літератури, найбільш чутливою до ушкоджувальної дії цитостатиків є внутрішня мембрана мітохондрій за рахунок утворення комплексу «кардіоліпін-доксорубіцин». Безпосереднім наслідком цього може бути ушкодження внутрішньої мітохондріальної мембрани, що призводить до різкого збільшення її проникності до відновленого нікотинаміддинуклеотиду (НАДН) та іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , а також збільшення швидкості поглинання кисню. Цей процес супроводжується інактивацією ключових ензимів дихального ланцюга, порушенням окисно-відновних процесів у кардіоміоцитах, зміною рівня мітохондріального мембранного потенціалу [61]. 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, так як проникає в мітохондрії живих клітин в залежності від величини мітохондріального мембранного потенціалу, тому активність його флуоресценції може опосередковано свідчити про величину мітохондріального потенціалу [203]. Використовуючи флуоресцентний метод, 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). Отримані дані свідчать про здатність куркуміну підвищувати життєздатність культури неонатальних кардіоміоцитів та підвищувати або підтримувати вихідну величину мітохондріального мембранного потенціалу за умови оксидативного 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 [179].

Сталість кількості живих клітин може пояснюватись тим, що куркумін активує p53 модулятор апоптозу (PUMA) і NOXA, який, в свою чергу, активує проапоптотичний Multi

домен BCL-2 членів сім'ї Bax, Bim, Bak і пригнічує Bcl-2 і Bcl-xl. Втрата рівноваги між про- і антиапоптотичними Bcl-2 білками викликає потік кальцію в мітохондрії і зниження проникності зовнішньої мітохондріальної мембрани (MOMP), що дозволяє цитохрому c проникати в цитоплазму, призводячи до активації каскаду каспаз, формування апоптосом та викликаючи апоптоз [13,204].

Незважаючи на значний прогрес в останні роки у вивченні клітинних, тканинних та системних механізмів розвитку гіпоксичних станів, генетично обумовлені регуляторні механізми, які складають фундаментальну основу біологічної відповіді на гіпоксію, остаточно не вивчені. Крім того, нещодавно з'явилися відомості про можливість не лише доксорубіцину, а і куркуміну інгібувати активність HIF-1 та, відповідно, рівень експресії його генів-мішеней внаслідок стимуляції протеасомної деградації субодиниці HIF-1 $\beta$  (ARNT) окисленням та убіквітинізацією в пухлинних клітинах []. Але дослідження зміни експресії HIF та його генів-мішеней за умови подвійного та послідовного впливу доксорубіцину та куркуміну на непухлинні клітини досі не проводили. Недослідженим залишається питання про роль різних  $\alpha$ -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- $\alpha$  відіграє специфічну регуляторну роль при оксидативному стресі іншого генезу, який супроводжує гіпоксію навантаження [11,206].

Як ми вже визначали, 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 [6]. Так, в своїх дослідженнях Hui припускає, що PDK-1 може бути мішенню для протипухлинної терапії, оскільки вона збільшує виживання пухлинних клітин в умовах кисневої депривації, завдяки активації гліколізу [207].

Інший ген-мішень HIF, теломераза, сприяє підвищенню життєздатності як пухлинних, так і стовбурових клітин завдяки зниженню рівня продукції активних форм кисню, та діє як транскрипційний кофактор в Wnt- $\beta$ -катеніновому шляху [9]. В нашому відділі

раніше було показано, що теломераза експресується в культурі неонатальних кардіоміоцитів і що рівень її експресії при оксидативному стресі та моделюванні аноксії-реоксигенації змінювався [208]. Отримані нами дані дозволяють припустити, що погіршення життєздатності неонатальних кардіоміоцитів при використанні доксорубіцину пов'язане із зменшенням експресії як гену теломерази, так і гену PDK-1. Таке припущення базується на ряді експериментальних даних, в яких підтверджується цитопротекторні властивості як теломерази, так і PDK-1. В свою чергу, Li зі співавт. отримали дані про те, що теломераза має нейропротекторну дію за умови кисневої та глюкозної депривації, механізми якої наразі залишаються невідомими [209]. Однак припускають, що це пов'язано зі зниженням співвідношення Bcl-2/Bax, підсиленням продукції ROS та зниженням мітохондріального потенціалу ( $\Psi_m$ ). Таким чином, наші дані певною мірою пояснюють механізми збільшення некротичної загибелі клітин при інкубації з доксорубіцином в культурі неонатальних кардіоміоцитів.

Відомо, що інсуліноподібний фактор росту (IGF-1) захищає кардіоміоцити від апоптозу [210], надекспресія цього гену знижує рівень загибелі клітин серця у мишей при інфаркті, протидіючи дилатації шлуночків і гіпертрофії серця [211]. Крім того, було показано, що IGF-1 підвищує проліферацію й виживання кардіальних стовбурових клітин (CPCs) [212]. І, хоч Моралес та співавтори показали, що IGF-1 не здатний протидіяти осмотичному стресу в кардіоміоцитах, викликаному дією доксорубіцину [213], в той же час, інші дослідники довели кардіопротекторну дію цього фактора при апоптозі кардіоміоцитів, викликаному доксорубіцин-індукованим оксидативним стресом [214,215], що повністю підтверджено нашими дослідженнями. Також, впливаючи на регуляцію експресії IGF-1R і IGFBP-3, доксорубіцин інгібує реакцію H9c2 клітин на ці ключові фактори для виживання при апоптозі [215]. Таким чином, можна стверджувати, що вивчення молекулярно-генетичних механізмів змін у мітохондріях при гіпоксії та оксидативному стресі має велику перспективу і потребує подальших досліджень. Залишається також необхідність дослідження шляхів впливу куркуміну на рівень

експресії HIF та його генів-мішеней для підтвердження ефективності цього методу протекції міокарду на молекулярно-генетичному рівні при використанні антрациклінів.

Для вирішення цих питань ми дослідили зміни рівня експресії гіпоксія-індукованих факторів HIF-1 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  та їх генів-мішеней TERT, IGF-1 та PDK-1 в культурі неонатальних кардіоміоцитів та в міокарді дорослих щурів методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. При дослідженні експресії в культурі неонатальних кардіоміоцитів щурів були отримані наступні дані: рівень мРНК HIF-1 $\alpha$  значно знижувався при введенні доксорубіцину та куркуміну у монорежимі (порівняно з контролем). А при їх поєднаному впливі експресія знизилась вдвічі порівняно з додаванням лише доксорубіцину. Ці результати ще раз підтверджують дані щодо здатності доксорубіцину й куркуміну інгібувати експресію HIF-1 $\alpha$  [123,142], що є надзвичайно важливим при ракових захворюваннях. А у випадку доксорубіцин-індукованого стресу в неракових клітинах – це підтверджує величезні антиоксидантні можливості куркуміну.

Нами було відмічено значне зменшення рівня експресії гену-мішені TERT під дією доксорубіцину – на 80,8% порівняно з контролем, що може бути результатом зниження рівня експресії HIF-1 $\alpha$ . При цьому, додавання куркуміну і сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну викликало значне підвищення експресії цього гену, що свідчить про значні антиоксидантні властивості теломерази та куркуміну.

Експресія гену-мішені IGF-1 значно знижувалась під дією доксорубіцину і куркуміну, порівняно з контролем. А застосування доксорубіцину і куркуміну разом викликало лише незначне зменшення експресії цього гену, порівняно з дією доксорубіцину окремо. Щодо куркуміну, є дані, що він має значний антипухлинний вплив при канцері шкіри завдяки пригніченню експресії IGF-1 [216], і, як ми виявили, відповідне інгібування спостерігається і при доксорубіцин-індукованому оксидативному стресі в неракових клітинах.

Рівень експресії PDK-1 також знижувався під дією доксорубіцину та куркуміну окремо, порівняно з контролем. При цьому застосування цих речовин разом незначно знижувало експресію цього гену, порівняно із застосуванням доксорубіцину окремо. Ці

результати цілком відповідають очікуванню, так як рівень мРНК HIF-1 $\alpha$  знижувався в усіх досліджуваних групах, а PDK-1 є його геном-мішенню.

З наведених результатів досліджень фактора HIF-1 $\alpha$  та його генів-мішеней TERT, IGF-1 та PDK-1 *in vitro* можна зробити висновок про необхідність подальших досліджень для підтвердження цих даних в кардіоміоцитах дорослих щурів за умови доксорубіцин-індукованого оксидативного стресу і визначення, чи є використання куркуміну ефективною стратегією для запобігання кардіотоксичності антрациклінів на рівні цілого організму.

Надалі при дослідженні експресії гіпоксія-індукованого фактора HIF-1,3 $\alpha$  та його генів-мішеней TERT, IGF-1 та PDK-1 в міокарді щурів ми отримали наступні дані. Показано, що рівень мРНК HIF-1 $\alpha$  в міокарді знижується при введенні доксорубіцину на 49,7% порівняно з контролем. При поєднаному впливі доксорубіцину і куркуміну експресія знизилась на 6,8 % порівняно з додаванням лише доксорубіцину. При цьому рівень експресії гену HIF-3 $\alpha$  при введенні доксорубіцину зростав в 2,6 рази. Це можна пояснити тим, що HIF-3 $\alpha$  є супресором HIF-1 $\alpha$  [217]. А при поєднаному впливі доксорубіцину і куркуміну експресія HIF-3 $\alpha$  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. 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. 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. При цьому, застосування доксорубіцину і куркуміну разом викликало значне зниження 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 дозволяє стверджувати наступне: вперше показано, що доксорубіцин може інгібувати експресію не тільки гену HIF-1 $\alpha$ , а і його генів-мішеней (PDK-1, TERT, IGF-1). Це дозволяє 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 [6]; зменшення експресії TERT, крім цього ефекту, знижує величину мітохондріального потенціалу [209]. Щодо зменшення експресії гену IGF-1 після застосування доксорубіцину, то можна стверджувати, що воно гальмує вираженість протиапоптотичного захисту [214]. Також, ми показали, що механізми збільшення загибелі кардіоміоцитів різними шляхами при дії доксорубіцину теж пов'язані з HIF-залежними процесами і встановили молекулярно-генетичні шляхи корекції доксорубіцин-індукованої мітохондріальної дисфункції в кардіоміоцитах за допомогою куркуміну.

## ВИСНОВКИ

На підставі проведених досліджень отримано нові наукові дані про вплив антрациклінового антибіотика доксорубіцину на життєздатність кардіоміоцитів у культурі, про- та антиоксидантний баланс, окислювальне фосфорилування 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 рівня 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 фосфорилювання, 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 фосфорилювання - 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 компоненту 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 $\alpha$ , а і його важливих генів-мішеней (PDK-1, TERT, IGF-1), одночасно підвищуючи експресію гену HIF-3 $\alpha$  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 ДЖЕРЕЛ ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Lemoniatis M. Adriamycine-Induced Cardiomyopathy. /Lemoniatis M.// J Med Cases. – 2015. – № 6(5). – P. 226-228;
2. Mavinkurve-Groothuis A. Anthracycline-induced cardiotoxicity. Early detection with new strategies. Mavinkurve-Groothuis: дис. докт. / Mavinkurve-Groothuis A.M.C. – Radboud University Nijmegen, 2012;
3. Нагорна О.О. Вплив нікотинаміду на перекисне окислення ліпідів при моделюванні доксорубіцинової хронічної кардіоміопатії. / [Нагорна О.О., Чекман І.С., Горчакова Н.О., Юрженко Н.М., та ін.]// Ліки. – 2004. – № 1-2. – С. 116-119;
4. Semenza G. Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. /G.Semenza //Vascular Program. – 2011. – N. 1813 (7). – P.1263-8;
5. Fukuda R. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. / [R. Fukuda, H. Zhang, J. W. Kim, L. Shimoda, et al.] // Cell. – 2007. – Vol.129.– P. 111-122;
6. Kirito K. HIF-1 prevents the overproduction of mitochondrial ROS after cytokine stimulation through induction of PDK-1. / K. Kirito, Y. Hu, N. Komatsu. // Cell Cycle. – 2009. – Vol. 8. – N 17. – P. 2844-49;
7. Kaluz S. Regulation of gene expression by hypoxia: integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element. / S. Kaluz, M. Kaluzová, E. J. Stanbridge. // Clin Chim Acta. – 2008. – 395, N 1–2. – P. 6-13;
8. Weidemann A. Biology of HIF-1alpha. / A.Weidemann, R. S. Johnson // Cell Death Differ. – 2008. – 15, N 4. – P. 621-7;
9. Mattiussi M. Human telomerase represses ROS-dependent cellular responses to Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  without affecting NF- $\kappa$ B activation /M.Mattiussi, G.Tilman, S.Lenglez, A.Decottignies // Cell. Signal. – 2012. – N. 24 (3) – P.708-17;

10. Duyndam MC. Cisplatin and doxorubicin repress Vascular Endothelial Growth Factor expression and differentially down-regulate Hypoxia-inducible Factor I activity in human ovarian cancer cells. / MC Duyndam, MP van Berkel, JC Dorsman et al. // *Biochem Pharmacol.* – 2007. – 15. – N 74(2). – P. 191-201;
11. Drevytska T. HIF-3 mRNA expression changes in different tissues and their role in adaptation to intermittent hypoxia and physical exercise. / [Drevytska T., Gavenauskas B., Drozdovska S., Nosar V., Dosenko V., Mankovska I.] // *Pathophysiology.* – 2012. – №19. – P. 205-14;
12. Srivastav G. Currying the heart: curcumin and cardioprotection. / Srivastav G., Mehta JL. // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 2009. – N. 14. – P.22-7;
13. Ströfer M. Curcumin decreases survival of Hep3B liver and MCF-7 breast cancer cells: the role of HIF. / Ströfer M, Jelkmann W, Depping R. // *Strahlenther Onkol.* – 2011. – N. 187(7). – P.393-400;
14. Swamy AV. Cardioprotective effect of curcumin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in albino rats. / [Swamy AV, Gulliaya S, Thippeswamy A, et al.] // *Indian J Pharmacol.* – 2012. – N. 44. – P.73-77;
15. Smith Robin A.J. Mitochondrial pharmacology. / Robin A.J. Smith, Richard C. Hartley, Helena M. Cochemé, Michael P. Murphy // *Trends in Pharmacological Sciences.* – 2012. – N. 33. – Issue 6. – 295-352;
16. Penna C. Mitochondrial pathways, permeability transition pore and redox signaling in cardioprotection: therapeutic implications. / C Penna, MG Perrelli, P. Pagliaro // *Antioxid Redox Signal.* – 2013. – 10. – N 18(5). – P. 556-99;
17. Kim EH. ANT as a regulator of mitochondrial function: implication in the pathogenesis of metabolic syndrome. / EH Kim, EH Koh, JY Park, KU Lee // *Korean Diabetes J.* – 2010 – N. 34(3). – P. 146-53;
18. Shoshan-Barmatz V. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. / V Shoshan-Barmatz, V DePinto, M Zweckstetter, Z Raviv // *MolAspectsMed.* – 2010. – N 31(3). – P. 227-85;

- 19.Ashrafi G. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. / G Ashrafi, TL Schwarz. // Cell Death Differ. – 2013. – N 20(1). – 31-42;
- 20.Okamoto K. Mitochondria and autophagy: Critical interplay between the two homeostats. /Okamoto K, Kondo-Okamoto N. // Biochim Biophys Acta. – 2012. –N. 1820(5). – P. 595-600;
- 21.Chepelev NL. Regulation of iron pathways in response to hypoxia. /Chepelev NL, Willmore WG. // Free Radic Biol Med. – 2011. – N. 50(6). –P. 645-66;
- 22.Human Physiology [Электронный ресурс] // BIO 301 – Режим доступа до ресурса: <http://people.eku.edu/ritchisong/301notes1.htm>;
- 23.Garlid Keith D. Cardioprotective signaling to mitochondria. / [Keith D. Garlid, Alexandre D.T. Costa, Casey L. Quinlan, Sandrine V. Pierre, et al. // J Mol Cell Cardiol. – 2009. – N. 46(6). – P. 858-66;
- 24.Rozova E.V. Structure-functional relationships in rat myocardium under hypoxia and stress. / E.V. Rozova, I.N. Mankovskaya// Biological Motility: New facts and Hypotheses. – 2014. – P. 224-228;
- 25.Калинина Е. В. Изменение экспрессии генов антиоксидантных ферментов, гемоксигеназы-1, bcl-2, bcl-xl и уровня активных форм кислорода при формировании резистентности опухолевых клеток к доксорубину. /Калинина Е. В., Н. Н. Чернов, А. Н. Саприн. // Биохимия. — 2006. — N. 71(11). — P. 1475-1487;
- 26.Турпаев К. Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов. /Турпаев К. Т. // Биохимия. — 2002. — N. 67 (3). — P. 339-352;
- 27.Raha S. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. /Raha S., B. H. Robinson. // Trends Biochem Sci. — 2000. — V. 25. —N. 10. — P. 502-508;
- 28.Doan T. N. Hydrogen peroxide activates agonist-sensitive Ca (2+)-flux pathways in canine venous endothelial cells. /Doan T. N., D. L. Gentry, A. A. Taylor, S. J. Elliott. // Biochem J. — 1994. — V. 297 (1). — P. 209-215;

29. Rincon V. The JNK and P 38 MAP kinase signaling pathways in cell-mediated immune responses. / Rincon V., R. A. Flavell, R. A. Davis. // *Free Radic Biol Med.* — 2000. — V.28 (1). — P. 1328-1337;
30. Мишуніна Т.М. Вплив антиоксидантів на міжнуклеосомну фрагментацію ДНК у тканині щитоподібної залози хворих із різною тиреоїдною патологією. / Мишуніна Т.М., Калініченко О.В., Пількевич Л.І. // *Укр. Біохім. журн.* — 2007. — Т. 79, № 5. — С. 186-195;
31. Лановенко І.І. Взаємодія глутатіону еритроцитів і кисневотransпортної функції крові при гемічній гіпоксії залізодефіцитного генезу. / І. І. Лановенко, Г. П. Гащук. // *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.* — 2012. — № 12. — С. 178-185;
32. Колесова О. Е. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах. / Колесова О. Е., Маркин А. А., Федорова Т. Н. // *Лабор. дело.* — 1984. — № 9. — С. 540-546;
33. Racay P. Lipid peroxidation both inhibits  $[Ca^{2+}]$ -ATPase and increases  $Ca^{2+}$  permeability of endoplasmic reticulum membrane. / [Racay P., Kaplan P., Mezesova V. et al.] // *Biohem Mol Biol Int.* — 1997. — N. 41 (4). — P. 647-655;
34. Kantrow S. P. Release of cytochrome C from liver mitochondria during permeability transition. / Kantrow S. P., Piantadosi C. A. // *Biochem Biophys Res Commun.* — 1997. — N. 232 (3). — P. 669-671;
35. Kukielka E. DNA strand cleavage as a sensitive assay for the production of hydroxyl radicals by microsomes: role of cytochrome P-450 2E1 in the increased activity after ethanol treatment. / Kukielka E., Cederbaum A. I. // *Biochem J.* — 1994. — N. 302 (3). — P. 773-779;
36. Kaneto H. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. / Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M, Matsuoka TA. // [Електронний ресурс] // *Mediators Inflamm.* — 2010. — N. 2010. — Режим доступу до ресурсу: 10.1155/2010/453892;

- 37.Uno K. Biomarkers of inflammation and oxidative stress in atherosclerosis. /Uno K, Nicholls S.J. // Biomark Med. – 2010. – J4(3). – P. 361-73;
- 38.Requejo-Aguilar R. Mitochondrial control of cell bioenergetics in Parkinson's disease. /Requejo-Aguilar R, Bolaños JP. //Free Radic Biol Med. – 2016, – N. 100. – P. 123-137;
- 39.Rodrigo R. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. /Rodrigo R, González J, Paoletto F. //Hypertens Res. – 2011. – N. 34(4). – P. 431-40;
- 40.Bonda DJ. Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention. / [Bonda DJ, Wang X, Perry G, et al.] // Neuropharmacology. – 2010. – N. 59(4-5). – P. 290-4;
- 41.Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. /Brownlee M. // Circ Res. – 2010. – N. 107(9). – P. 1058-70;
- 42.Romano AD. Oxidative stress and aging. / [Romano AD, Serviddio G, de Matthaes A, Bellanti F, et al.] // J Nephrol. – 2010. – 23 Suppl 15:S29-36;
- 43.Park J. NecroX-7 prevents oxidative stress-induced cardiomyopathy by inhibition of NADPH oxidase activity in rats. / [Park J, Park E, Ahn BH, Kim HJ, et al.] // Toxicol Appl Pharmacol. – 2012. – N. 263(1). – P. 2-6;
- 44.Мохан Р. Биохимия мышечной деятельности и физической тренировки. /Мохан Р., Глессон М., Гринхафф П.Л. // К.: Олимпийская литература –2001. – Р. 295;
- 45.Taylor EB. Mitochondrial quality control by the ubiquitin-proteasome system. / Taylor EB, Rutter J. // Biochem Soc Trans. – 2011. – N. 39(5). – P. 1509-13;
- 46.Мещишен І.Ф. Основи обміну речовин та енергії. /Мещишен І.Ф. В.П.Пішак, Н.П.Григор'єва. // Чернівці: Медуніверситет – 2005. – Р. 187;
- 47.Ades P.A. Aerobic capacity in patients entering cardiac rehabilitation. / Ades P.A., Savage P.D., Brawner C.A. // Circulation. – 2006. – V. 113(23). – P. 2706-2712;
- 48.Thomas C. Relationships between maximal muscle oxidative capacity and blood lactate removal after supramaximal exercise and fatigue indexes in humans. / [Thomas C., Sirvent P., Perrey S., et al.] // J. Appl. Physiol. – 2004. – V. 97 (6). – P. 2132-2138;

- 49.Валвере В.Ю. Сравнительная оценка кардиотоксического действия противоопухолевых антибиотиков адриамицина и фарморубицина. /Валвере В.Ю., Инхвацабая Л.В., Нью-Тяу-де Г.Б. // Кардиология. – 1989. – Т 29, № 9. – С. 64-66;
- 50.Filyak O.S. Comparative study of ps3 expression in human carcinoma cell lines A549 and MCP7 under anticancer drug treatment. /Filyak O.S., Stoika R.S. // Укр. біох. журн. — 2005. – Т. 77, № 2 – Р. 136-140;
- 51.Liu L.F. DNA Topoisomerase poisons as antitumor drugs. / Liu L.F. // Annu Rev. Biochem. – 1989. – N. 58. – Р. 351-375;
- 52.Коваленко В.Н. Повреждение сердца цитостатиками. /Коваленко В.Н., Калинкина Н.В., Ватулин Н.Т. //Донецк: Изд-во УкрНТЭК. – 2002. – Р. 350;
- 53.Sakai T. Persistant release of noradrenaline caused by anticancer drug 4-epidoxorubicin in rat tail artery in vitro. / [Sakai T., Inagaki R., Taniguchi T. et al.] // Eur J Pharmacol – 1998. – Vol. 356. – Р. 25-30;
- 54.Wakasuyi S. Drug-induced myocardial disease adriamycin cardiotoxicity. /Wakasuyi S. // Nippon Rinsho. – 2000. – Vol. 58. – № 1. –Р. 204-211;
- 55.Zhang J. Doxorubicin induced apoptosis is in spontaneously hypertensive rats, differential effects in heart, kidney, intestine and inhibition by ICR I'187. / J. Zhang, J. R. Clark, E. H. Herman, V. J. Ferrans. // J Mol CellCardiol. – 1996. – Vol. 28. – Р. 1931-1943;
- 56.Minnoti G. Paradoxical inhibition of cardiac lipid peroxidation in cancer patients treated with doxorubicin Pharmacologic and molecular reappraisal of anthracycline cardiotoxicity. / [Minnoti G, Mancuso C, Frustac A et al.] //J Clin invest. — 1996. — V. 98. – Р. 650-661;
- 57.Барабой В.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и при патологии. /Барабой В А., Сутковой ДА // Под ред. акад. АМН Украины Ю.А. Зозули. К.: Чернобыльинтеринформ. – 1997. – С. 420;
- 58.Szewczyk A. Mitochondria as a pharmacological target. /Szewczyk A, Wojtczak L. // Pharmacol Rev. – 2002. – 54(1). – Р. 101-27;

- 59.Eidenschink A.B. Myocardial high-energy phosphate metabolism is altered after treatment with anthraicline in children. / [Eidenschink A.B., Schroter G., Muller Welhrich S. et al.] // *Cardiol Young*. – 2000. – N. 10. – P. 610-617;
- 60.Gille L. Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. /Gille L., Nohl H. // *Free Radic Biol Med* –1997. – N. 23. – P. 775-782;
- 61.Miura F. Adriamycin-Fe<sup>3+</sup>- induced mitochondrial protein damage with lipid peroxidation. / Miura F., Muraoka S., Ogiso T. // *Biol. Pharm. Bull.* – 1995. – N. 18. – P. 514-517;
- 62.Капелько В.И. Сократительная функция и адренореактивность сердца на ранней стадии адриамициновой кардиомиопатии. / [Капелько В.И., Швалев В.Н., Хаткевич А.Н. и соавт.] // *Кардиология*. – 1997. – Т. 37, № 3. – С. 56-62;
- 63.Чекман І. С. Нікотинамід. /Чекман І. С., Горчакова Н.О., Нагорна О.О., Небесна Т.Ю.// – 2008;
- 64.Nasser I.A. In vivo prevention of adriamycin cardiotoxicity by cyclosporine AFK 506. /Nasser I.A // *Toxicology*. – 1998. – N. 131. – P. 175-182;
- 65.Faure H. Hydroxymethyluracol excretion. Plasma TBARS and plasma antioxidant vitamins in adriamycin - treated patients. /Faure H., Coudray C. Mousse M. et al. // *Free Radic Med*. –1996. – N. 20. – P. 979-98;
- 66.Ito H. Doxorubicin selectively inhibition muscle gene expression in cardiac muscle cells in vivo and in vitro. / Ito H., Milller S.C., Billingham ME. // *Proc Natl Acad. Sci USA*. – 1990. – N. 87. – P. 4275-4279;
- 67.Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. / Semenza GL. // *Genes and Development*. – 2000. – Vol.14. – No. 16. – P. 1983 -1991;
- 68.Wang G.L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. / Wang G.L., Semenza G.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1993. – N.90. – P.4304-4308;
- 69.Mankovskaya I. Expression of transcriptional factor HIF subunits in rat tissues under acute and intermittent hypoxia. /I.Mankovskaya, T.Drevitskaya, V.Dosenko,

- B.Gavenauskas, E.Moiseenko. //Hypoxia Med J. Proceedings of the sixth international conference “Hypoxia in Medicine”. – 2006. – Milan, Italy. 1-2:35;
- 70.Cataldi A. p53 and telomerase control rat myocardial tissue response to hypoxia and ageing. / [A.Cataldi, S.Zara, M.Rapino, M.Zingariello, et al.] //Eur. J. Histochem. – 2009. – N. 53 (4). – P. 209-216;
- 71.Cockman M.E. Hypoxia inducible factor- binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. / [Cockman M.E., Masson N., Mole D.R. et al] // J. Biol. Chem. – 2000. – N. 275. – P.25733-25741;
- 72.Corn PG. Hypoxic regulation of miR-210. / Corn PG. //Cancer Biol Ther. – 2008. – Vol.7. – P.265-267;
- 73.Dann C.E. Structure of FIH-1: An asparaginyl hydroxylase involved in the hypoxic response pathway. / Dann C.E., Bruick R.K., Deisenhofer J. // Proc Natl Acad Sci. – 2002. – Vol.99. – P.15351-15356;
- 74.DiCarlo V.S. ETA-receptor antagonist prevents and reverses chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rat. / [DiCarlo V.S., Chen S.J., Meng Q.C. et al.] // Am J Physiol. – 1995. – Vol.269. – P. L690-L697;
- 75.Droma Y. Two hypoxia sensor genes and their association with symptoms of acute mountain sickness in Sherpas. / [Droma Y, Ota M, Hanaoka M. et al.] // Aviat Space Environ Med. – 2008. – Vol. 79(11). – P.1056-60;
- 76.Ehleben W. Cytochromes and oxygen radicals as putative members of the oxygen sensing pathway. / [Ehleben W., Bölling B., Merten E. et al.] // Respiration Physiology. – 1998. – Vol.114, Issue 1. – P.25-36;
- 77.Eiichi A. Effect of dioxins on regulation of tyrosine hydroxylase gene expression by aryl hydrocarbon receptor: a neurotoxicology study. / Eiichi A, Seiko Y, Saeko U, Mitsuko IS // Environmental Health. – 2009. – Vol.8. – P.1-14;
- 78.Martin S.K. The emerging role of hypoxia, HIF-1 and HIF-2 in multiple myeloma. /S.K. Martin, P. Diamond, S. Gronthos, D. J. Peet and A. C. W. Zannettino.// Leukemia. – 2011. – N. 25(10). – P.1533-42;



- 79.Dang YM. An experimental study on the influence of hypoxia induction factor-1alpha on the glycolysis of the rat myocardial cell under hypoxic condition. / [Dang YM, Huang YS, Zhou JL. et al] // *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* – 2005. – N.21 (5). – P.339-42;
- 80.Ema M. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1a regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. / Ema M., Taya S., Yokotani N. Et al // *Proc Natl Acad Sci. USA.* – 1997. – Vol.94. – P.4273-4278;
- 81.Emerling BM. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Required for Hypoxia Signaling. / [Emerling BM, Plata-nias LC, Black E. et al.] // *Mol Cell Biol.* – 2005. – Vol. 25(12). – P.4853-4862;
- 82.Erslev AJ. Erythropoietin. / Erslev AJ. // *N Engl J Med.* – 1991. – 324(19). – P.1339-44; Fandrey J. In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase. / Fandrey J, Bunn HF. // *Blood.* – 1993. – Vol.81 (3). – P.4853-4862;
- 83.Fandrey J. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. / Fandrey J. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2004. – Vol.286 (6). – P. 977-88;
- 84.Favaro E. Hypoxia inducible factor-1alpha inactivation unveils a link between tumor cell metabolism and hypoxia-induced cell death. / [Favaro E, Nardo G, Persano L. et.al] // *Am J Pathol.* – 2008. – Vol.173 (4). – P.1186-201;
- 85.Fish JE. MicroRNAs: Opening a New Vein in Angiogenesis / Fish JE, Srivastava D. // *Research. Sci Signal.* – 2009. – Vol.52. – P.1-7;
- 86.Flamme I. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1a and developmentally expressed in blood vessels. / Flamme I., Frohlich T., von Reutern M. et.al // *Mech Dev.* – 1997. – Vol.63. – P.51-60;

87. Makino Y. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. / [Makino Y., Cao R.H., Svensson K. et al.]//Nature (London). – 2001.–N. 414.– P. 550-554;
88. Makino Y. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 $\alpha$  locus. / [Makino Y., Kanopka A., Wilson W.J. et al.]// The Journal of Biological Chemistry. – 2002. – N. 277. – P. 32405-32408;
89. Lee J.-W. Hypoxia-inducible factor: its protein stability and biological functions. / [Lee J.-W., Bae S.-H., Jeong J.-W. et al.]// Experimental and Molecular Medicine. – 2004. – N. 36(1). – P. 1-12;
90. Серебровська Т. В. Гипоксия-индуцибельный фактор: роль в патофизиологии дыхания. /Серебровська Т. В. // Український пульмонологічний журнал. – 2005. – № 3 (додаток). – С. 81-77;
91. Портніченко В.І. Експресія HIF-1 $\alpha$  і HIF-3 $\alpha$  в легенях та метаболічні зміни при періодичній гіпоксії у щурів різного віку. /В.І. Портніченко, А.Г. Портніченко, В.Є. Досенко, А.М. Сидоренко. //Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2010. – №2. – С. 77-79;
92. Древицкая Т.И. Роль транскрипционного фактора HIF в развитии ответа на повреждение кардиомиоцитов при моделировании аноксии/реоксигенации. /Древицкая 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;
93. Bernhardt WM. Organ Protection by Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors. / Bernhardt WM, Warnecke C, Willam C, et al. // Methods in Enzymology. – 2007. – Vol.435. – P.220-245;
94. Frede S. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF- $\kappa$ B. / Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. // Biochem J. – 2006. – Vol.396 (Pt 3). – P.517-527;

95. Freedman S.J. Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1. / [Freedman S.J., Sun Z.Y., Poy F. et al] // *Proc Natl Acad Sci.* – 2002. – Vol.99. – P.5367-5372;
96. Chan D.A. Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1. / Chan D.A., Sutphin P.D., Denko N.C., Giaccia A.J. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol.277. – P.40112-40117;
97. Fu XS. Identification of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) polymorphism as a mutation in prostate cancer that prevents normoxia-induced degradation. / Fu XS, Choi E, Bubley GJ, Balk SP. // *Prostate.* – 2005. – Vol.63 (3). – P.215-21;
98. Gonchar O. Effect of moderate hypoxia/reoxygenation on mitochondrial adaptation to acute severe hypoxia. / Gonchar O., Mankovskaya I. // *Acta Biologica Hungarica.* – 2009. – Vol. 60. – №2. – P.185-194;
99. Gorlach A. Efficient translation of mouse hypoxia-inducible factor-1 under normoxic and hypoxic conditions. / Gorlach A., Camenisch G., Kvietikova I. et al // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol.1493. – 125-134;
100. Gu J. Molecular mechanism of hypoxia-inducible Factor 1-p300 interaction. / Gu J., Milligan J., Huang L.E. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol.276. – P.3550-3554;
101. Gu Y.Z. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 $\alpha$ . / Gu Y.Z., Moran S.M., Hogenesch J.B. et al. // *Gene Expr.* – 1998. – Vol.7. – P.205-213;
102. Gulyaeva N.V. Effects of normobaric hypoxic training on immunoreactive erythropoietin and transferrin levels in blood serum of healthy volunteers. / Gulyaeva N.V., Tkatchouk E.N. // *Hyp Med J.* – 1998. – V.6. – №1. – P.13-17;
103. Gunaratnam L. HIF in Kidney Disease and Development. / Gunaratnam L, Bonventre JV. // *J Am Soc Nephrol.* – 2009. – Vol.20. – P.1877-1887;
104. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. / Haase VH. // *Blood Rev.* – 2013. – N. 27(1). – P.41-53;

105. Древицька Т.І. Исследование HIF-зависимых процессов в культуре изолированных неонатальных кардиомиоцитов крыс. /Древицкая 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;
106. Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? / Ratcliffe PJ. // J Clin Invest. – 2007. – N. 117(4). – P.862-5;
107. Debeljak N. Erythropoietin and erythropoiesis stimulating agents. / Debeljak N, Sytkowski AJ. // Drug Test Anal. – 2012. – N. 4 (11). – P.805-12;
108. Storz P. 3'phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) in PI 3-kinase signaling. / Storz P, Toker A. // Front Biosci. – 2002. – N. 7. – P.886-902;
109. Masato Kato. Distinct Structural Mechanisms for Inhibition of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isoforms by AZD7545, Dichloroacetate, and Radicicol. / Masato Kato, Jun Li, Jacinta L. Chuang, David T. Chuang. – 2007;
110. Wigfield SM. PDK-1 regulates lactate production in hypoxia and is associated with poor prognosis in head and neck squamous cancer. / [Wigfield SM, Winter SC, Giatromanolaki A, Taylor J, et al.] // Br J Cancer. – 2008. – N. 98(12). – P. 1975-84;
111. Kim JW. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. / Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV // Cell Metab. – 2006.– N. – P. 3177–185;
112. Koukourakis M. Pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase expression in non small cell lung cancer and tumor-associated stroma. / [Koukourakis M., Giatromanolaki A., Sivridis E. et al.] // Neoplasia. — 2005. — 7, № 1. — P. 1-6;
113. Papandreou I. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. / [Papandreou I., Cairns R., Fontana L. et al.] // Cell Metab. — 2006. — 3, № 3. —P. 187-197;

114. Смекалова Е.М. Рекомбинантная форма *tert hansenula polymorpha* обладает ограниченной обратнотранскриптазной активностью. / Смекалова Е.М., Петрова О.А, Зверева М.Э., Донцова О.А. // *Acta naturae*. –20124.– N.1. – P.72–75;
115. López-Diazguerrero NE. Telomerase activity in response to mild oxidative stress. / [López-Diazguerrero NE, Pérez-Figueroa GE, Martínez-Garduño CM, Alarcón-Aguilar A. et al.] // *Cell Biol Int*. – 2012. – N. 36(4). – P.409-13;
116. Bernardes de Jesus B. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. / [Bernardes de Jesus B, Vera E, Schneeberger K, Tejera AM. et al] // *EMBO Mol Med*. – 2012. – N. 4(8). – P.691-704;
117. Nitta E. Telomerase reverse transcriptase protects ATM-deficient hematopoietic stem cells from ROS-induced apoptosis through a telomere-independent mechanism. / [ Nitta E, Yamashita M, Hosokawa K, Xian M, Takubo K, Arai F, Nakada S, Suda T. et al] // *Blood*. – 2011. – N. 117(16). – P.4169-80;
118. Cardin R. Oxidative dna damage correlates with cell immortalization and mir-92 expression in hepatocellular carcinoma. / [Cardin R, Piciocchi M, Sinigaglia A, Lavezzo E, et al] // *BMC Cancer*. – 2012. – N. 12(1). – P.177;
119. Kim YC. Thymosin  $\beta$  (10) Expression Driven by the Human TERT Promoter Induces Ovarian Cancer-Specific Apoptosis through ROS Production. / Kim YC, Kim BG, Lee JH. // *PLoS One*. – 2012. – N. 7(5). – P. 353:99;
120. Troncoso R. New insights into IGF-1 signaling in the heart. / [Troncoso R, Ibarra C, Vicencio JM, Jaimovich E, et al] // *Trends Endocrinol Metab*. – 2014. – N. 25. – P.128–137;
121. Yu DH. Effects of decreased insulin-like growth factor-1 stimulation on hypoxia inducible factor 1-alpha protein synthesis and function during cutaneous repair in diabetic mice. / [Yu DH, Mace KA, Hansen SL, Boudreau N, et al] // *Wound Repair Regen*. – 2007. – N. 15(5). – P.628-35;
122. Linnyk O. Is it necessary HIF-3 $\alpha$  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;
123. Lee K. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. / Lee K, Qian D, Rey S, Semenza G. // *Proc Nat Acad Sci. U S A.* – 2009. – N. 106(7). – P.2350-8;
  124. Моїсеєнко Є. В. Шляхи застосування фармакологічного захисту людини при порушеннях адаптації в антарктиці. /Моїсеєнко Є. В.// *УАЖ.* – 2010. – № 9. – С. 287-301;
  125. Sayed-Ahmed M.M. Propionyl-L-carnitine as potential protective agent against adriamycin-induced impairment of fatty acid beta-oxidation in isolated heart mitochondrial. / [Sayed-Ahmed M.M., Shouman S.A., Rezk B.M. et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2000. – Vol. 41. – P. 143–150;
  126. Tallarico D. Myocardial cytoprotection by trimetazidine against anthracyclin in anticancer chemotherapy. / [Tallarico D., Rizzo V., Di Mario F. et al.] // *Angiology.* – 2003. – Vol. 54. – P. 219–227;
  127. Tseng YT. Cardioprotective effect of metformin against doxorubicin cardiotoxicity in rats. /Tseng YT. // *Anatol J Cardiol.* – 2016. – N. 16(4). – P.242-243;
  128. Liu G. Spironolactone attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. / [Liu G, Liu Y, Wang R, Hou T, et al] // *Cardiovasc Ther.* – 2016. – N. 34(4). P.216-24;
  129. Goyal SN. Protective effect of oleanolic acid on oxidative injury and cellular abnormalities in doxorubicin induced cardiac toxicity in rats. / [Goyal SN, Mahajan UB, Chandrayan G, Kumawat VS, et al] // *Am J Transl Res.* – 2016. – 8(1). – P.60-9;
  130. Yu X.  $\alpha$ -Linolenic acid attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats through suppression of oxidative stress and apoptosis. / [Yu X1, Cui L, Zhang Z, Zhao Q, et al] // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* – 2013. – N. 45(10). – P.817-26;
  131. Hershko C. Prevention of anthracycline cardiotoxicity by iron chelation. / Hershko C., Pinson A., Linh G. // *Acta Haemomatsol.* – 1996. – Vol. 95. – P. 87-92;

132. Chen TH. Curcumin treatment protects against renal ischemia and reperfusion injury-induced cardiac dysfunction and myocardial injury. / Chen TH, Yang YC, Wang JC, Wang JJ. // *Transplant Proc.* – 2013. – N. 45(10). – P.3546-9;
133. Aggarwal S. Curcumin (diferuloylmethane) down regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I kappa B alpha kinase and Akt activation. / [Aggarwal S, Ichikawa H, Takada Y, Sandur S.K. et al] // *Mol Pharmacol.* – 2006. – N. 69(1). – P.195-206;
134. Reyes-Gordillo K. Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF-kB proinflammatory cytokines production and oxidative stress. / [Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Vergara P. et al] // *Biochem Biophys Acta.* – 2007. – N. 1770. – P.989-996;
135. Mohamad RH. The role of *Curcuma longa* against doxorubicin (adriamycin)- induced toxicity in rats. / [Mohamad RH, El-Bastawesy AM, Zekry ZK, et al.] // *J Med Food.* – 2009. – N. 12. – P.394-402;
136. Ramirez-Garcia A. *Candida albicans* and cancer: Can this yeast induce cancer development or progression? / [Ramirez-Garcia A., Rementería A., Aguirre-Urizar Jose Manuel, Moragues Maria Dolores, et al.] // *Critical Reviews in Microbiology.* – 2016. – V. 42. – Iss. 2;
137. Grisham M. Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. / Grisham M, McCord J. In: Taylor A, Matalon S, Ward P, editors. // *Physiology of oxygen radicals.* Bethesda: Am Physiol Soc. – 1986. – P. 1-18;
138. Appiah R. Inhibition of human recombinant cytochrome P450s by curcumin and curcumin decomposition products. / Appiah R, Commandeur JN, Vermeulen NP. // *Toxicology.* – 2007. – N. 235. – P.83-91;
139. Sandur SK. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). / [Sandur SK, Ichikawa H, Pandey MK, Kunnumakkara AB, et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2007. – N. 43 – P. 568-80;

140. Miriyala S. Cardioprotective effects of curcumin. /Miriyaala S, Panchatcharam M, Rengarajulu P. // Adv Exp Med Biol. – 2007. – N. 595. – P. 359-77;
141. Cremers NA. Curcumin-induced heme oxygenase-1 expression prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in wild type and heme oxygenase-2 knockout adipose-derived mesenchymal stem cells. / [Cremers NA, Lundvig DM, vanDalen SC, Schelbergen RF, et al.] // Int J MolSci. – 2014. – N. 8. – V. 15(10). – P.17974-99;
142. Bae MK. Curcumin inhibits hypoxia-induced angiogenesis via down-regulation of HIF-1. / [Bae MK, Kim SH, Jeong JW, Lee YM, et al.] // OncolRep. – 2006. –N. 15(6). – P. 1557-62;
143. Колчинская А.З. Нормобарическая интервальная гипоксическая тренировка в медицине и спорте. / Колчинская А.З., Цыганова Т.Н., Остапенко Л.А. // М.: Наука. – 2003. – P. 408-4;
144. Стешенко М.М. Оксидативні порушення мітохондрій при гіпоксії та їх корекція за допомогою інтервальних гіпоксично-гіпероксичних тренувань. / Стешенко М.М., Гончар О.О., Маньковська І.М. // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2010. – № 1. – P. 12-17;
145. Chaudhari U. MicroRNAs as early toxicity signatures of doxorubicin in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. / [Chaudhari U, Nemade H, Gaspar JA, Hescheler J, et al.] //Arch Toxicol. – 2016. – N. 90. – P. 3087-3098;
146. 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;
147. Rapisarda A. Overcoming disappointing results with antiangiogenic therapy by targeting hypoxia. /A.Rapisarda, G.Melillo. //Nature Reviews Clinical Oncology – 2012. – Vol.9 – P.378-390;



148. Tanaka T. Anthracycline Inhibits Recruitment of Hypoxia-inducible Transcription Factors and Suppresses Tumor Cell Migration and Cardiac Angiogenic Response in the Host /T.Tanaka, J.Yamaguchi, K.Shoji, M.Nangaku//J. Biol. Chem. – 2012. – Vol.287, №42. – P.34866-34882;
149. Georgina N. HIF-1 $\alpha$  pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. /Georgina N., Masoud Wei Li. // Acta Pharmaceutica Sinica. – 2015. – N. 5(5). – P. 378–389;
150. Nagibin V. Effect of a low dose of proteasome inhibitor on cell death and gene expression in neonatal rat cardiomyocyte cultures exposed to anoxia-reoxygenation / V.Nagibin, O.Surova, L.Tumanovskaya, V.Dosenko, A.Moibenko. //Exp. Clin. Cardiol. – 2009. – Vol.14, №2 – P.57-61;
151. 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;
152. Webster D.R. Beating rate of isolated neonatal cardiomyocytes is regulated by the stable microtubule subset. /Webster D.R. Patrick D.L. // AJP Heart. – 2000. – N. 278(5). – P.1653-1661;
153. Berdichevski A.O. TVP1022 protects neonatal rat ventricular myocytes against doxorubicin- induced functional derangements. / [Berdichevski A., Meiry G., Milman F., Reiter I., et al.] // JPharmExpTher. – 2010. – N. 332(2). – P.413-420;
154. Bazan C. Image processing techniques for assessing contractility in isolated neonatal cardiac myocytes. [Електронний ресурс] / C.Bazan, D. Barba, P. Blomgren, P. Paolini // International Journal of Biomedical Imaging. – 2011. – Режим доступу до ресурсу: doi:10.1155/2011/729732;
155. Jung A.S. Modulation of contractility by myocyte-derived arginase in normal and hypertrophied feline myocardium. / [Jung A.S., Kubo H., Wilson R., Houser S.R. et al.] //AmJPhysiol. – 2006. – N. 290(5). – P.1756-1762;

156. Kandadi M.R. Anthrax lethal toxin suppresses murine cardiomyocyte contractile function and intracellular Ca<sup>2+</sup> handling via a NADPH oxidase-dependent mechanism. / [Kandadi M.R., Hua Y., Ma H., Li Q., et al.] // PLoS One. – 2010. – N. 5(10). – P.1-5;
157. Mishra S. Interaction of annexin A6 with alpha actinin in cardiomyocytes. / [Mishra S., Chander V., Banerjee P., Oh J.G. et al.] //BMC cell biology. – 2011. – N. 12(1). – P.1-7;
158. Prasad S.M. Role of the sarcolemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channel in hyperkalemic cardioplegia-induced myocyte swelling and reduced contractility. / [Prasad S.M., Al-Dadah A.S., Byrd G.D., Flagg T.P., et al.] //Ann.Thorac.Surg. – 2006. – N. 81. – P.148-153;
159. Rodriguez A.G. Substrate stiffness increases twitch power of neonatal cardiomyocytes in correlation with changes in myofibril structure and intracellular calcium. /Rodriguez A.G., Han S.J., Regnier M., SniadeckN.J. // Biophys.J. – 2011. – N. 101(10). – P.2455-2464;
160. Ren J. Altered cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes from spontaneously diabetic BB rats. /Ren J., Bode A.M. // AJP–Heart. – 2000. – 279. – №1. – P.238-244;
161. Barbier P. Left Atrial Relaxation and Left Ventricular Systolic Function Determine Left Atrial Reservoir Function. / [Barbier P, Solomon NB, Schiller et al.] // Circulation. – 1999. – N. 100. – P.427-436;
162. Weiss J.L. Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure. /Weiss J.L., Frederiksen J.W., Weisfeldt M.L. // J Clin Invest. – 1976. – 58, N.3. – P.751-760;
163. Kondrashova MN. Preservation of native properties of mitochondria in rat liver homogenate. / [Kondrashova MN, Fedotcheva NI, Saakyan IR et al.] // Mitochondrion. – 2001. – N. 1(3). – P.249-67;

164. Chance B. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. /Chance B, Williams G. // Adv Enzymol. – 1956. – N. 17. – P.65-134;
165. Estabrook RW. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: Oratios. // Methods Enzymol. – 1967. – N. 10. – P.41-7;
166. Lowry O. Protein measurement with the Folin phenol reagent. /Lowry O, Rosebrough N, Fazz A, Randall R. // J Biol Chem. – 1951. – 193(1). – P.265-275;
167. Beavis Andrew D. Upper and Lower Limits of the Charge Translocation Stoichiometry of Cytochrome c Oxidase. / Beavis Andrew D. //The Journal of Biological Chemistry by The American Society of Biological Chemists, Inc. – 1987. – No. 13. – Vol. 262. – P. 6174-6181;
168. Saad H.A. An easy and inexpensive method for quantitative analysis of endothelial damage by using vital dye staining and Adobe Photoshop software. / [Saad H.A., Terry M.A, Shamie N., et al.]//Cornea. – 2008. – № 27(7). – P.818-24;
169. Chazotte B. Labeling mitochondria with MitoTracker dyes. /Chazotte B. //Cold Spring Harb Protoc. – 2011. – №8. – P.990-2;
170. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding. // Anal.Biochem. – 1976. –Vol. 72. – P.248-254;
171. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. /Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. // Современные методы в биохимии. – 1977. – С. 66-68;
172. Huwiler M. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/iodide system. / Huwiler M, Kohler H. // Eur J Biochem. – 1984. – N. 141 – P.69-74;
173. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы. /Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. // Лаб. Дело. –1988. – N. 1. – P.16-19;

174. Misra H. The role of superoxide anion in the autoxidation of Epinephrine and a simple assay superoxide dismutase. /Misra H, Fridovich I. // J Biol Chem. – 1972. – N. 247(10). – P.3170-3175;
175. Лакин Г.Ф. Биометрия. / Лакин Г.Ф. – Москва: Высшая школа, 1980. – 250;
176. Белостоцкая Г.Б. Оценка функционального состояния свежевыделенных и культивируемых кардиомиоцитов крыс в условиях окислительного стресса. /Белостоцкая Г.Б., Дарашина И.В., Голованова Т.А., Хрусталева Р.С. //Регион кровообр и микроциркул. – 2008. – N. 7(2). – С.85-92;
177. 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;
178. 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;
179. 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;
180. 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;
181. 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;
182. Лінник О.О. Дослідження HIF-залежних процесів на культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура. /Древицька Т.І., Лінник О.О., Досенко В.Є.,

- Маньковська І.М. //Матеріали VI пленуму товариства патофізіологів України «Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології». – Вінниця. – 2014. – С.17-19;
183. Розова Е.В. Влияние различных концентраций доксорубина на структурно-динамические особенности митохондриального аппарата и ультраструктуру миокарда крыс. /Розова Е.В., Линник О.А.// Матеріали IX Міжнародного симпозіума "Актуальные проблемы биофизической медицины". – Київ. – 2016. – С.89-90;
  184. JingXiao. Kaempferol protects against doxorubicininduced cardiotoxicity in vivo and in vitro. / [JingXiao, Gui-BoSun, BingSun, YingWu, et al.] // Toxicology. – 2012. – N. 292. – P.53-62;
  185. Mohan R. Biochemistry of muscles and physical training. /Mohan R, Glesson M, Greenhaff P. // Olympic Literature. – 2001. – P. 295;
  186. Dodd DA. Doxorubicin cardiomyopathy is associated with a decrease in calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in a chronic rabbit model. / [Dodd DA, Atkinson JB, Olson RD, Buck S, et al.] // J Clin Invest. –1993. – N. 91. – P.1697–705;
  187. Ракетська О. О. Експериментальні дослідження кардіопротекторних властивостей похідних бурштинової кислоти: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.03.05 "фармакологія" / О.О. Ракетська. – 2016. – С. 23;
  188. Kroemer G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. / [Kroemer G., El-Deiry WS., Golstein P., Peter ME., Vaux D., et al]// Cell Death Differ. – 200. – Suppl 2. – P.1463-7;
  189. Li J. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. / [Li J., McQuade T., Siemer AB., Napetschnig J., et al]// Cell. – 2012. – № 150(2). – P.339-50;

190. Murphy JM. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. / [Murphy JM., Czabotar PE., Hildebrand JM., et al.]// *Immunity*. – 2013. – № 39(3). – P. 443-53;
191. Shin EJ. N-Methyl, N-propynyl-2-phenylethylamine (MPPE), a Selegiline Analog, Attenuates MPTP-induced Dopaminergic Toxicity with Guaranteed Behavioral Safety: Involvement of Inhibitions of Mitochondrial Oxidative Burdens and p53 Gene-elicited Pro-apoptotic Change. / [Shin EJ., Nam Y., Lee JW., Nguyen PT. et al.]// *Mol Neurobiol*. – 2015. – № 53(9). – P. 6251-6269;
192. Kung G. Programmed Necrosis, Not Apoptosis, in the Heart. /Kung G., Konstantinidis K., Richard N. Kitsis.// *Circ Res*. – 2011. – №. 108(8). – P. 1017-36;
193. Cadenas E. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and ageing. /Cadenas E, Davis KJ. // *Free Rad Biol Med*. – 2000. – N. 29. – P.222–30;
194. Menshchikova E. Antioxidants and inhibitors of radical oxidation processes. /Menshchikova E, Zenkov N. // *Adv Mod Biol*. – 1993. – N. 113(4). – P.442-53;
195. Sazontova T. Role of reactive oxygen species and redox signaling in adapting to change of the oxygen content. /Sazontova T, Anchishkin N, Zhukov A. // *Fiziol Zh*. – 2008. – N. 54(2). – P.18-32;
196. Wang J. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase decreases ischemia-like astrocyte injury. /Wang J, Ma J, Giffard R. // *Free Radic Biol Med*. – 2005 – N. 38(8). – P.1112-8;
197. 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;
198. Li-yuan Shen. Developing a rat model of dilated cardiomyopathy with improved survival. /Li-yuan Shen, Shu Lu, Yong-hua Zhou. // *J Zhejiang Univ Sci B*. – 2016. – N. 17(12). – P.975-83;

199. 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;
200. Акопова О.В. Влияние АТФ-зависимого входа  $K^+$  на систему окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс / О.В. Акопова, В.И. Носарь, Л.И. Колчинская, И.Н. Маньковская, М.К. Малышева, В.Ф. Сагач // Фізіол. журн. – 2014. – Т. 60. – № 3 (дод.). – С. 5;
201. Тарасова К.В. Функціональні та метаболічні ефекти впливу фторовмісного аналога діазоксиду на моделі оксидативного стресу. /Тарасова К.В., Лінник О.О., Носар В.І., Карвацький І.М. // Матеріали підсумкової LX науково-практичної конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (присвяченої 60-річчю ТДМУ). – Тернопіль. – 2017. – С. 360-62;
202. Струтинський Р. Б. Ендогенні механізми кардіопротекції при активації АТФ-чутливих калієвих каналів фторвмісними активаторами / Р. Б. Струтинський, С.М.Пивовар, Р.А.Ровенець, О.О.Мойбенко // Матер. XVII з'їзду Українського фізіологічного т-ва з міжнар. участю.Присв. 125-річчю з дня народ. ак.О.О.Богомольця, 2006. Чернівці. – С. 99; Фізіол. журн. – 2006. – Т.52. – №2. – С. 99-100;
203. Kholmukhamedov Andaleb. MitoTracker Probes and Mitochondrial Membrane Potential. /Kholmukhamedov Andaleb, Schwartz Justin M., Lemasters John J. // Shock. – 2013. – 39(6). – P. 543;
204. Shankar S. Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol 30-kinase/AKT and mitochondrial p53 in curcumin (diferulolylmethane)-induced apoptosis in prostate cancer. / Shankar S, Srivastava R K. // Int J Oncol. – 2007. – N. 30. – P.905-18;
205. Hyunsung Choi. Curcumin inhibits hypoxia-inducible factor-1 by degrading aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: a mechanism of tumor growth inhibition. /

- [Hyunsung Choi, Yang-Sook Chun, Seung-Won Kim, Myung-Suk Kim, et al.] //Mol Pharmacol. –2006. – N. 70 – P.1664-1671;
206. Drevytska T. Role of hypoxia-inducible factor 3 $\alpha$  (HIF-3 $\alpha$ ) in physical endurance of rats. Drevytska T, Gavenauskas B, Nosar V, Linnyk O, Drozdovska S, Mankovska I, Dosenko V. /Матеріали X Україно-Польсько-Білоруської Конференції “Physiology and Pathology of Respiration: Advances in Basic Research and Clinic Applications”.– Київ. – 2013;
  207. Hur H. Expression of pyruvate dehydrogenase kinase-1 in gastric cancer as a potential therapeutic target. /H.Hur, Y.Xuan, Y.Kim, G.Lee, W.Shim, J.Yun, I.Ham, H.SU//Int. J. Oncol. – 2013. – Vol.42, №1 – P.44-54;
  208. Кедлян В. Р. Expression of TERT mRNA and TERC changes during anoxia-reoxygenation and myocardial infarction. /В.Р. Кедлян, Т.І. Древицька, В.Л. Гур'янова, В.С. Нагібін, В.Є. Досенко // Тези ”Physiology: from molecules to the body”.– 2013.– P.24-25;
  209. Li J. The neuroprotective role and mechanisms of TERT in neurons with oxygen-glucose deprivation. / [J.Li, Y.Qu, D.Chen, L.Zhang, et al.] //Neuroscience. – 2013. – Vol.252 – P.346-58;
  210. Li Q. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. / [Li Q, Li B, Wang X, Leri A, et al.] // J of Clin Invest. – 1997. – N. 100(8). – P.1991-9;
  211. Xiang FL. Cardiomyocyte-specific overexpression of human stem cell factor improves cardiac function and survival after myocardial infarction in mice. / [Xiang FL, Lu X, Hammoud L, Zhu P, et al] //Circulation. – 2009. – N. 120(12). – P.1065-74;
  212. Urbanek K. Doxorubicin Impairs the Insulin-Like growthfactor-1 System and Causes Insulin-likegrowth Factor-1 Resistance incardiomyocytes. / [Urbanek K, Rota M, Cascapera S, Bearzi C, et al.] // Circ Res. – 2005. – N. 108. – P.1467-1481;



213. Morales MP. IGF-1 regulates apoptosis of cardiac myocyte induced by osmotic-stress. / [Morales MP, Glvez A, Eltit JM, Ocaranza P, et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2000. – N. 270. – P.1029-1035;
214. Wu W. Expression of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase inhibits activation of caspase 3 and apoptosis of cardiac muscle cells. / [Wu W, Lee WL, Wu YY, Chen D, et al.] // *J Biol Chem.* – 2000. – N. 275. – P.40113–40119;
215. Fabbi P. Doxorubicin Impairs the Insulin-Like Growth Factor-1System and Causes Insulin-Like Growth Factor-1Resistance in Cardiomyocytes. / [Fabbi P, Spallarossa P, Garibaldi S, Barisione C, et al.] // *PLoS One.* – 2015. – N. 10(5);
216. Kim H. Chemopreventive effects of curcumin on chemically induced mouse skin carcinogenesis in BK5.insulin-like growth factor-1 transgenic mice. / [Kim H, Park J, Tak KH, Bu SY, et al.] // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* – 2014. – N. 50(9). – P.883-92;
217. Torii S. Involvement of inhibitory PAS domain protein in neuronal cell death in Parkinson's disease. / [Torii S., Kasai S., Suzuki A., Todoroki Y., et al.]// *Cell Death Discov.* – 2015. – № 1. – P. 15015.

## СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Основні наукові результати дисертації:

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).*

### **Апробація матеріалів дисертації:**

1. Drevytska T. Role of hypoxia-inducible factor 3 $\alpha$  (HIF-3 $\alpha$ ) in physical endurance of rats. Drevytska T, Gavenauskas B, Nosar V, Linnyk O, Drozdovska S, Mankovska I, Dosenko V. /Матеріали Х Україно-Польсько-Білоруської Конференції “Physiology and Pathology of Respiration: Advances in Basic Research and Clinic Applications”.– Київ. – 2013. *Публікація тез.*
2. Linnyk O. Is it necessary HIF-3 $\alpha$  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.*
3. Лінник О.О. Дослідження HIF-залежних процесів на культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура. /Древицька Т.І., Лінник О.О., Досенко В.Е., Маньковська І.М. //Матеріали VI пленуму товариства патофізіологів України «Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології». – Вінниця. –2014. – С.17-19. *Публікація тез.*
4. Древицкая Т.И. Роль транскрипционного фактора HIF в развитии ответа на повреждение кардиомиоцитов при моделировании аноксии/реоксигенации. /Древицкая 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. *Публікація тез, доповідь.*
5. Тарасова К.В. Фармакологічна активація КАТФ каналів відновлює показники скоротливої активності ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура в умовах оксида-

тивного 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. *Публікація тез, доповідь.*

6. Розова Е.В. Влияние различных концентраций доксорубина на структурно-динамические особенности митохондриального аппарата и ультраструктуру миокарда крыс. /Розова Е.В., Линник О.А.// Матеріали ІХ Міжнародного симпозіума "Актуальные проблемы биофизической медицины". – Київ. – 2016. – С.89-90. *Публікація тез.*

7. Древицька Т.І. Исследование HIF-зависимых процессов в культуре изолированных неонатальных кардиомиоцитов крыс. /Древицкая 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. *Публікація тез, доповідь.*

8. Древицька Т.І. Встановлення ефектів активації та блокування HIF-залежних процесів в культурі ізолюваних 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. *Публікація тез, доповідь.*

9. 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. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

10. Тарасова К.В. Функціональні та метаболічні ефекти впливу фторовмісного аналога діазоксиду на моделі оксидативного стресу. /Тарасова К.В., Лінник О.О., Носар В.І., Карвацький І.М. // Матеріали підсумкової LX науково-практичної конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (присвяченої 60-річчю ТДМУ). – Тернопіль. – 2017. – С. 360-62. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*