УДК: 612.275:576.311.347:577.182.54:615.322

Порушення про- та антиоксидантного балансу при застосуванні доксорубіцину та його корекція за допомогою куркуміну в культурі неонатальних кардіоміоцитів щурів

О.О. Лінник[1], Т.І. Древицька[1], О.О. Гончар[1], С.А. Чорний[2], О.М. Ковальов[3], І.М. Маньковська[1]

[1] Інститут фізіології О.О. Богомольця НАН України; [2] Інститут молекулярної біології та генетики НАН України; [3] Національний авіаційний університет, Київ; e-mail: newmulo@gmail.com

Досліджено вплив доксорубіцину на систему транскрипційного фактора індукованого гіпоксією (HIF), і про- та антиоксидантний баланс неонатальних кардіоміоцитів за умов застосування доксорубіцину та можливість корекції його порушень куркуміном. Виявлено, що рівень експресії мРНК HIF-1α при використанні доксорубіцину в дозі 0,5 мкмоль/мл становив 2,9 ± 0,8 ум.од., тобто він зменшувався на 20 % вірогідно відносно контролю. Рівень експресії гена-мішені HIF піруват-дегідрогенази кінази-1 (PDK-1) також достовірно зменшувався у 4 рази. При інкубації культури неонатальних кардіоміоцитів з доксорубіцином кількість живих клітин відносно контролю зменшилася на 50,4 %, а при сумісній дії доксорубіцину і куркуміну відсоток загиблих клітин зменшився на 7,7 порівняно з використанням лише доксорубіцину. Доксорубіцинова інтоксикація призводила до значного підвищення в кардіоміоцитах вмісту активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) у 3,6 раза та перекису водню на 64%. Також знижувалася ферментативна активність марганцевої супероксиддисмутази (Mn-СОД) на 32%, при цьому активність каталази зростала на 72% порівняно з контролем (P<0,05). Додавання куркуміну до клітинної культури кардіоміоцитів сприяло підвищенню активності Mn-СОД на 14%, каталази - на 23% . При цьому вміст ТБК-АП зріс в 1,4 раза порівняно з контролем, а H_2O_2 підвищився на 20%. Сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну значно знижувало рівень вільнорадикальних процесів на відміну від ефектів додавання самого доксорубіцину: відбувалося зниження вмісту ТБК-АП та H_2O_2 (на 56,7 та 18,4% відповідно) при зменшенні гіперактивації каталази (на 19%) та зростанні активності Mn-СОД (на 35%).

Ключові слова: окисний стрес; кардіоміоцити; індукований гіпоксією фактор (HIF-1α); доксорубіцин; куркумін.

ВСТУП

Порушення окисно-відновного стану клітини викликає підвищений рівень генерації таких активних форм кисню (АФК), як пероксиди і вільні радикали, надмірне утворення яких призводить до розвитку окисного стресу з його потужним пошкоджувальним ефектом на метаболічні процеси, структурні компоненти клітин, зокрема мітохондрії та їх геном [1,2]. У людини окисний стрес є причиною або важливою складовою частиною патогенезу багатьох захворювань, а саме: кардіоміопатія, атеросклероз, хвороба Паркінсона та інші нейродегенеративні захворювання, обструктивні захворювання легень, діабет, ожиріння, прискорене старіння тощо. Завдяки використанню сучасних молекулярно-генетичних технологій, стало відомо, що надзвичайно важливу роль у процесах вільнорадикального окиснення відіграють зміни експресії генів системи транскрипційного фактора, індукованого гіпоксією (HIF). Останній експресується в усіх видах клітин, у тому числі кардіоміоцитах, та є промотором десятків генів, задіяних у регуляції киснe-

© О.О. Лінник, Т.І. Древицька, О.О. Гончар, С.А. Чорний, О.М. Ковальов, І.М. Маньковська

вого гомеостазу, ангіогенезу, еритропоезу, виживання та загибелі клітини тощо [3]. Але лише нещодавно стало відомо, що HIF-1 має велике значення і в регуляції продукції АФК у мітохондріях завдяки різним механізмам: прямим – регуляція біогенезу та аутофагії мітохондрій, перебудова патерну експресії білків субодиниць цитохром С оксидази, а також опосередкованим – регуляція експресії піруватдегідрогеназикінази (PDK-1), яка фосфорилює та інактивує піруватдегідрогеназу (PDH). 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-1α, гинуть у результаті накопичення АФК, тому що в них немає механізмів індукції PDK-1 [4].

Активація вільнорадикального окиснення є одним із провідних патогенетичних механізмів ушкодження серця антрациклінами– антибіотиками, які наразі широко використовують при лікуванні онкологічних захворювань як апоптоз-промотуючі фактори. У зв'язку з розповсюдженістю онкологічної патології нині особливо актуально попередити розвиток побічної дії цих препаратів на серцево-судинну систему.

В експериментальних роботах останніх років [5] доведено спроможність антрациклінових антибіотиків блокувати роботу HIF і пригнічувати експресію залежних від нього генів. Але ще дуже мало відомо про молекулярно-генетичні механізми порушень про- та антиоксидантного балансу кардіоміоцитів за умов застосування антрациклінових антибіотиків, зокрема доксорубіцину.

Що стосується стратегії корекції порушень про- та антиоксидантного балансу кардіоміоцитів, то за останній час значно зросла кількість праць, присвячених дослідженню дії куркуміну – антиоксиданта рослинного походження. Він є жовтим пігментом, отриманим з коренів рослини Curcuma longa. Повідомлялося, що куркумін має протективний ефект при пошкодженні міокарда та допомагає збереженню функцій серця [6], впливає на активність цитокінів, ензимів та транскрипційних факторів, асоційованих із запаленням [7], здатний блокувати активацію та транслокацію із цитоплазми в ядро ядерного фактора kB (NF-kB) внаслідок перешкоджання деградації його інгібітора [8,9]. Крім того, куркумін зменшує токсичний вплив доксорубіцину на тканини серця, печінки та нирки за рахунок своїх антиоксидантних властивостей [10].

Метою нашої роботи було дослідити зміни експресії HIF та його генів-мішеней *in vitro* і стан про- та антиоксидантного балансу неонатальних кардіоміоцитів при застосуванні доксорубіцину, а також можливість корекції окисного стресу за допомогою куркуміну.

МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на культурі ізольованих кардіоміоцитів дводобових неонатальних щурів лінії Вістар. Виділення і культивування кардіоміоцитів здійснювали відповідно до модифікованої методики. За допомогою цервікальної дислокації щурів знерухомлювали, після чого через передній поздовжній розріз грудної клітки виймали серце та відокремлювали шлуночки з подальшим їх відмиванням в буферному розчині, що містить HEPES - 20, KCl – 5,4, NaCl – 116,4, глюкоза – 5,5, Na_2HPO_4 – 0,4 та K_2HPO_4 – 0,4 ммоль/л та подрібненням. Ферментативне розщеплення проводили у середовищі виділення, яке на основі вищезазначеного буферу містило колагеназу II типу (1,75 мг) та панкреатин (3 мг) на 5 мл розчину. Ресуспендували клітини у середовищі для культивування такого складу: Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), 199 (співвідношення DMEM/199 - 4:1), теляча сироватка - 8%, Na_2CO_3 – 4,2 ммоль/л, HEPES - 15 ммоль/л

та антибіотики (стрептоміцин – 100 мкг/мл, гентаміцин – 0,05 мг/мл, пеніцилін – 100 ОД/мл). Підрахунок виділених клітин проводили з використанням світлової мікроскопії після фарбування 0,2%-м розчином трипанового синього. Культивували протягом 1 доби при 37°С у газовому середовищі, яке містило 5% CO_2 та 95% атмосферного повітря. Після 24 год. інкубації в культуру додавали 0,5 мкмоль/мл доксорубіцину гідрохлориду (“Sigma Aldrich”, США), чи доксорубіцин у вказаній дозі разом з куркуміном (“Sigma Aldrich”, США) в дозі 20 мкмоль/мл.

Для кількісної оцінки життєздатності кардіоміоцитів, функціональної спроможності мітохондрій та впливу куркуміну використовували МТТ-тест (MTT Protocol, Wallertand Provost Lab), котрий базується на здатності живих клітин перетворювати блідо-жовтий водорозчинний 3-(4,5-диметилтіазолін-2)-5 дифенілтетразолійбромід (МТТ) у 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 тис. клітин на лунку) та інкубували з доксорубіцином (“Sigma Aldrich”, США) в дозі 0,5 мкмоль/мл і з куркуміном в дозі 20 мкмоль/мл (“Sigma Aldrich”, США), який додавали, за годину до доксорубіцина, в середовищі DMEM+199 впродовж 24 годин. Через добу до кожної лунки додавали по 20 мкл стокового розчину МТТ (5 мг МТТ (“Sigma Aldrigh”, США) на 1 мл фосфатного буферу PBS) та інкубували 4 год. Результат оцінювали вимірюванням на спектрофотометрі оптичної щільності лізату, отриманого за допомогою додавання до кожної лунки по 200 мкл DMSO, при довжині хвилі 570 нм.

Для біохімічних дослідженнь клітини з чашок знімали за допомогою 0,2%го розчину натрієвої солі етилендіамінотетраоцтової кислоти (рН 8,1), який містив 0,15% трипсину, протягом 15 хв. Ступінь окисного стресу кардіоміоцитів оцінювали за вмістом активних продуктів 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) [11] та перекису водню [12], антиоксидантний захист – за активністю Mn-супероксиддисмутази (Mn-СОД) [13] та каталази. [14]

Для оцінки змін експресії мРНК HIF-1α і PDK-1 при застосуванні доксорубіцину використовували метод полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР) [15]. Виділяли тотальну РНК з культури неонатальних кардіоміоцитів з використанням набору „Trizol RNA Prep 100” („Isogen”, Росія), який містить Trizol reagent (денатуруючий агент гуанідинтіоционат і фенол) та ExtraGene E (суспензія суміші іонообмінників). Оцінку експресії генів проводили з використанням напівкількісної зворотної транскрипції, використовуючи набори для синтезу кДНК із зворотньою транскриптазою „RevertAid H Minus M-MuLV RT” („Fermentas”, Литва). Транскрипційна суміш складалася з 5 мкл тотальної РНК (500 нг – 1 мкг/мкл), 1 мкл праймерів „RandomHexamer” (0,5 мкг/мкл), 20 од. інгібітора рибонуклеаз, 20 ммоль/л суміші дезоксирибонуклеотидів та 200 од. зворотної транскриптази. ПЛР проводили в термоциклері «AppliedBiosystems 2700» («PerkinElmer», США) за індивідуальними програмами для кожного гена. Для визначення експресії генів використовували метод ПЛР у реальному часі на термоциклері “7500 FastReal-Time PCR System”. Для гена PDK-1 ПЛР-ампліфікацію проводили у 10 мкл SYBR Green PCR Master Mix, що містив 30 пмоль/л кожного праймера: PDK-1 sense 5`-CAG GGT GTG ACT GAA TAC AAG G-3`, antisense 5`-GAG ATG CGA CTC ATG TAG AAC C-3`. Об’єм доводили до 20 мкл деіонізованою водою. Програма ампліфікації починалася з попередньої активації AmpliTaqGold® ДНК-полімерази протягом 10 хв при 95°С та складалася з 50 циклів: денатурація – 95°С (15 с), приєднання праймерів та елонгація – 64°С (1 хв). Для контролю специфічності проводили стадію дисоціації – послідовне підвищення температури від 64 до 99°С із реєстрацією

зниження інтенсивності флуоресценції комплексів дволанцюгових ДНК з SYBR®Green. Для визначення змін експресії гена HIF-1α використовували систему TaqMan Gene Expression Assay. Експресію стандартизували відносно гена GADPH (набір TaqMan®Assay Reagents Rat GADPH). Початкова денатурація при 95°С протягом 20 с, ампліфікація складалася з 65 наступних циклів: денатурація при 95°С 3 с, приєднання праймерів та елонгація – 60°С 30 с. Аналіз отриманих результатів експресії генів проводили за допомогою програмного забезпечення 7500 FastReal-time PCR Software.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням електронних таблиць «Microsoft® Excel 2013», а також програми Origin. Вірогідність відмінностей середніх значень ($P<0,05$) визначали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Раніше нами було проведено дослідження рівня цитотоксичності різних доз доксорубіцину (“Sigma Aldrich”, США) та життєздатність кардіоміоцитів за допомогою МТТ-тесту [15]. А саме, при інкубації культури неонатальних кардіоміоцитів з доксорубіцином в дозах 0,1; 0,5 та 1,0 мкмоль/мл кількість живих клітин відносно до контролю зменшилася на 10,9 ± 9,99 ; 23,6 ± 8,76 та 31,5 ± 9,86 %, відповідно. Це дало можливість вибрати дозу доксорубіцину 0,5 мкмоль/мл як оптимальну для подальших досліджень. У цій роботі ми використовували середню дозу доксорубіцину – 0,5мкмоль/мл, як таку, що вже викликала зміни, характерні для оксидативного пошкодження, але ще не призводила до суттєвої загибелі кардіоміоцитів [15].

Встановлено, що при використанні доксорубіцину в такій дозі суттєво змінюється експресія мРНК HIF-1α і PDK-1 у культурі неонатальних кардіоміоцитів (рис.1).

А саме, рівень експресії мРНК HIF-1α становив 3,6 ± 0,7 ум.од. у контролі і 2,9 ± 0,8 ум.од. при використанні доксорубіцину в зазначеній концентрації, тобто він зменшувався на 20 % відносно контролю ($P<0,05$). Водночас, рівень експресії гена-мішені HIF PDK-1 зменшувався у 4 рази порівняно з контролем ($P<0,05$).

Отримані результати підтверджують поодинокі літературні дані щодо можливості доксорубіцину пригнічувати HIF, котрий, в свою чергу, змінює рівень експресії свого

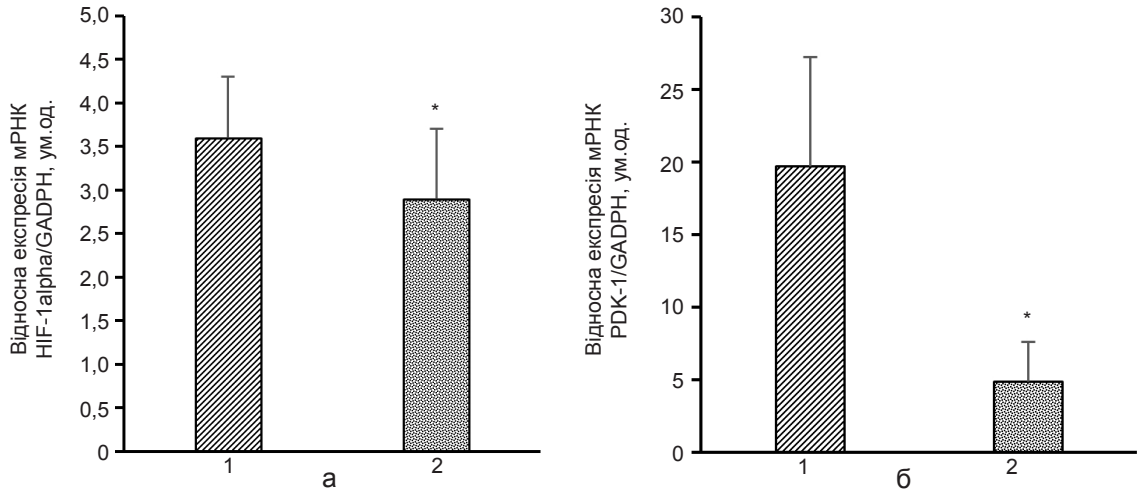

Рис.1. Зміни експресії мРНК фактора, індукованого гіпоксією-1α, (HIF-1α) (а) та піруватдегідрогеназикінази-1 (PDK-1) (б) при використанні 0,5 мкмоль/мл доксорубіцину в культурі неонатальних кардіоміоцитів при полімеразній ланцюговій реакції у реальному часі: 1-контроль; 2-після інкубації з доксорубіцином *$P<0,05$ вірогідні відмінності порівняно з контролем

гену мішені PDK-1. З'ясовано, що навіть за умов нормоксії HIF-1 може інактивувати PDK-1 і тим самим гальмувати цикл Кребса, зменшуючи утворення ацетил-*CoA* з пірувату, та дихання мітохондрій [16]. Lee із співавт. вважають, що доксорубіцин має здатність інгібувати HIF-1-опосередковані відповіді через блокування його зв'язку з ДНК пригніченням здатності гетеродимера зв'язуватися з чутливим до гіпоксії консенсусним елементом регуляторних ділянок -RCGTG- [17,18].

Крім того, нещодавно з'явилися відомості про можливість куркуміну інгібувати активність HIF-1 та, відповідно, рівень експресії його генів-мішеней внаслідок стимуляції протеасомної деградації субодиниці HIF-1β (ARNT) окисленням та убіквітинізацією в пухлинних клітинах [19]. Але дослідження зміни експресії HIF та його генів-мішеней за умов подвійного та послідовного впливу доксорубіцину та куркуміну на непухлинні клітини досі не проводили. Також, є необхідність дослідження змін експресії транскрипційного фактора HIF та його генів-мішеней за умов подвійного та послідовного впливу доксорубіцину та куркуміну як на культуру неонатальних кардіоміоцитів, так і in vivo для знаходження ефективних методів протекції міокарда на молекулярно-генетичному рівні при використанні антрациклінів.

За результатами МТТ-тесту можна оцінити інтенсивність окисно-відновних процесів у клітинах культури і опосередковано характеризувати активність біомаси. За отриманими нами результатами можна зробити висновок про зміну рівня цитотоксичності доксорубіцину окремо та в поєднанні з куркуміном на неонатальні кардіоміоцити. При інкубації з доксорубіцином кількість живих клітин відносно контролю зменшилась на 50,4 %, а з доксорубіцином та куркуміном відсоток загиблих клітин зменшився на 7,7 порівняно з використанням лише доксорубіцину (рис.2). Це підтвердило літературні дані щодо кардіопротекторних властивостей куркуміну [9].

Згідно з нашими дослідженнями, вплив доксорубіцину призводить до значного підвищення в кардіоміоцитах вмісту активних продуктів тіобарбітурової кислоти у 3,6 раза та перекису водню на 64% на відміну від контрольної групи ($P<0,05$; рис.3). Це свідчить про інтенсифікацію вільно-радикального окиснення, яке може призводити до змін у структурній організації клітин міокарда.

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 [20,21], що діють у взаємозв'язку. Початкові стадії процесу вільнорадикального окиснення контролюються СОД, яка дезактивує супероксидний радикал і, відповідно, зменшує загальний токсичний ефект АФК. 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 [22]. У нашій роботі тривала інкубація кардіоміоцитів з доксорубіцином знижувала ферментативну активність

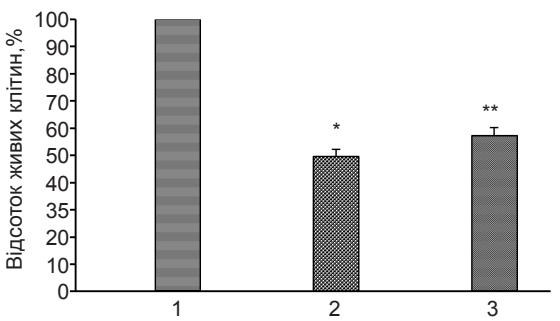

Рис.2. Відсоток живих клітин у культурі кардіоміоцитів за даними МТТ-тесту при використанні: 1- доксорубіцину в дозі 0,5 мкмоль/мл; 2- при поєднанні доксорубіцину з куркуміном у дозі 20 мкмоль/мл. *$P<0,05$ вірогідні відмінності порівняно з контролем, **$P<0,05$ вірогідні відмінності порівняно з дією доксорубіцину

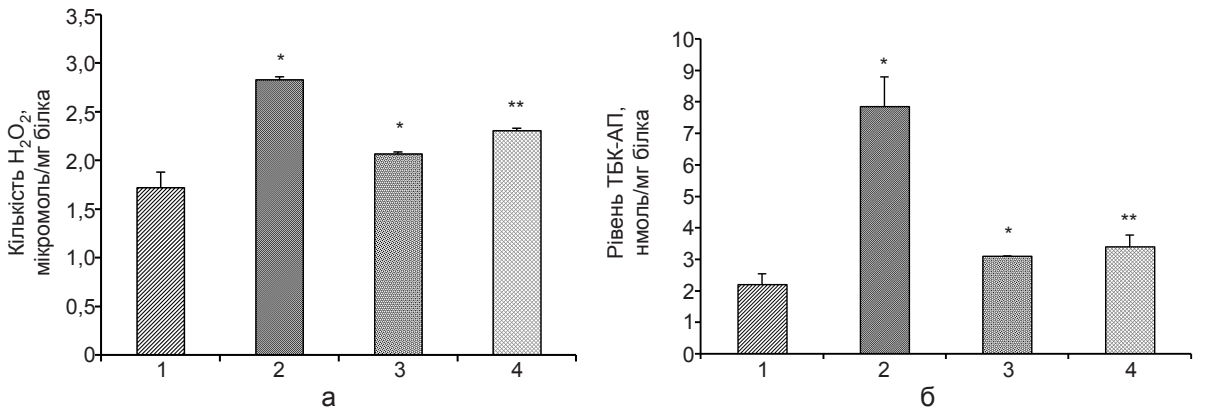

Рис.3. Зміна вмісту перекису водню (а) та активних продуктів тіобарбітурової кислоти (б) в культурі неонатальних кардіоміоцитів при: 1- інкубації з доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл), 2- куркуміном (20 мкмоль/мл), 3- при їх сумісному застосуванні в тих же дозах. *P<0,05 вірогідні відмінності порівняно з контролем , **P<0,05 вірогідні відмінності порівняно з дією доксорубіцину

Mn-СОД на 32%, при цьому активність каталази зростала на 72% порівняно з контролем (рис.4). Це можна пояснити компенсаторним підвищенням активності цього ферменту у відповідь на збільшення продукції H_2O_2, який, як відомо, виступає субстратом для антиперекисних ферментів [20].

Додавання куркуміну до клітинної культури кардіоміоцитів сприяло підвищенню активності Mn-СОД на 14%, каталази - на 23% порівняно з контролем, що підтверджує дані інших досліджень про властивості цього препарату як антиоксиданта [9].

Використання куркуміну поліпшує антиоксидантний статус і, тим самим, запобігає пошкодженню серця в основному через його помірну антиоксидантну дію [23]. Антиоксидантні механізми куркуміну можуть включати в себе один або більше з наступних взаємодій: нейтралізація вільних радикалів [24], інгібування цитохром P_{450} [25], зменшення доступності кисню до окисних реакції, взаємодія з окисним каскадом і запобігання його наслідкам [26], зменшення окисних властивостей таких іонів металів, як залізо [27, 28]. 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

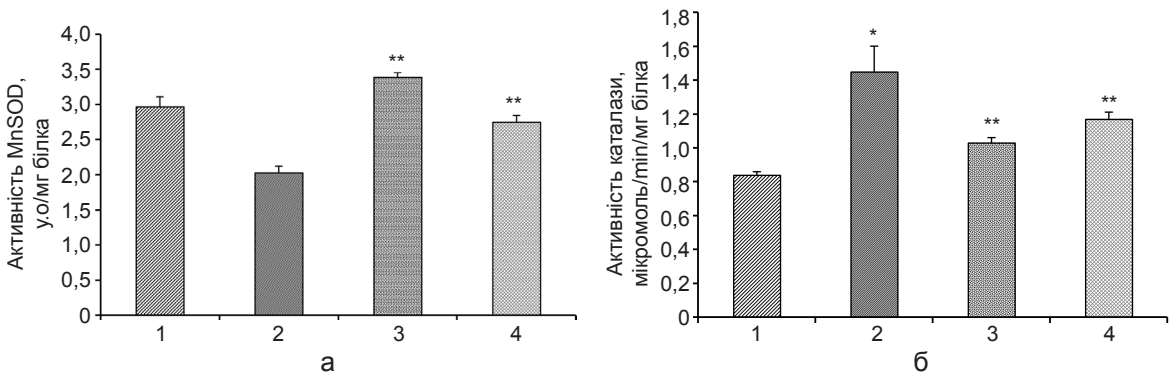

Рис.4. Зміна активності марганцевої супероксиддисмутази (а) та каталази (б) у культурі неонатальних кардіоміоцитів при інкубації з: 1- доксорубіцином (0,5 мкмоль/мл), 2- куркуміном (20 мкмоль/мл), 3- при їх сумісному застосуванні. *P<0,05 вірогідні відмінності порівняно з контролем, **P<0,05 вірогідні відмінності порівняно з дією доксорубіцину

год. ці процеси відбувалися на тлі деякого підвищення вмісту ТБК-АП і H_2O_2, а саме: вміст ТБК-АП зріс у 1,4 раза порівняно з контролем, а H_2O_2 підвищився на 20% (див. рис.3). Сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну в культурі кардіоміоцитів призводило до значного зниження рівня вільнорадикальних процесів на відміну від впливу доксорубіцину. Зниження вмісту ТБК-АП та H_2O_2 (на 56,7 та 18,4%, відповідно; див. рис.3), при зниженні гіперактивації каталази (на 19%) та зростанні активності Mn-СОД (на 35%; див. рис.4) свідчить про тенденцію до відновлення про–антиоксидантної рівноваги кардіоміоцитів. Таким чином, додавання куркуміну до культури кардіоміоцитів за умов застосування доксорубіцину мало позитивний коригувальний вплив на вільнорадикальні процеси та антиоксидантний захист.

ВИСНОВКИ

Показано, що рівень експресії мРНК HIF-1α у культурі неонатальних кардіоміоцитів при використанні доксорубіцину в дозі 0,5 мкмоль/мл становив 2,9 ± 0,8 ум.од., тобто він зменшувався на 20 % відносно контролю - 3,6 ± 0,7 ум.од. ($P<0,05$). Рівень експресії гена-мішені HIF PDK-1 також вірогідно зменшувався у 4 рази порівняно з контролем. За результатами МТТ-тесту при інкубації з доксорубіцином кількість живих клітин відносно контролю зменшилась на 50,4 %. А разом з куркуміном відсоток загиблих клітин зменшився на 7,7 % порівняно з використанням лише доксорубіцину. Додавання доксорубіцину призводило до значного підвищення в кардіоміоцитах вмісту активних продуктів тіобарбітурової кислоти у 3,6 рази та перекису водню на 64% порівняно з контролем ($P<0,05$). Також тривала інкубація клітин з доксорубіцином знижувала ферментативну активність Mn-СОД на 32%, при цьому активність каталази зростала на 72%. Додавання куркуміну до клітинної культури кардіоміоцитів сприяло підвищенню активності Mn-СОД на 14%, каталази - на 23% у порівнянні з контролем. При цьому вміст ТБК-АП зріс в 1,4 раза, а вміст H_2O_2 підвищився на 20% ($P<0,05$). Сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну призводило до значного зниження рівня вільно-радикальних процесів на відміну від ефектів застосування доксорубіцину per se. А саме, знижувався рівень ТБК-АП та H_2O_2 (на 56,7 та 18,4%, відповідно), при зменшенні гіперактивації каталази (на 19%) та зростанні активності Mn-СОД (на 35%). Пригнічення експресії генів HIF-1α і PDK-1 підвищує роль прооксидантної ланки в про-антиоксидантному статусі кардіоміоцитів за умов застосування доксорубіцину.

О.А. Линник, Т.И. Древицкая, О.А. Гончар, С.А. Черный, А.М. Ковалев, И.Н. Маньковская

НАРУШЕНИЕ ПРО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ДОКСОРУБИЦИНА ТА ЕГО КОРРЕКЦИЯ КУРКУМИНОМ В КУЛЬТУРЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС

Исследовано влияние доксорубицина на систему транскрипционного фактора, индуцированного гипоксией, HIF, и про-антиоксидантный баланс неонатальных кардиомиоцитов и возможность коррекции его нарушений с помощью куркумина. Выявлено, что уровень экспрессии мРНК HIF-1α при использовании доксорубицина в дозе 0,5 мкмоль/мл составлял 2,9 ± 0,8 усл.ед., то есть он уменьшался на 20% относительно контроля 3,6 ± 0,7 усл.ед. ($P<0,05$). Уровень экспрессии гена-мишени HIF пируватдегидрогеназы киназы (PDK-1) также достоверно уменьшался в 4 раза. При инкубации культуры неонатальных кардиомиоцитов с доксорубицином количество живых клеток по отношению к контролю уменьшилось на 50,4%, а совместно с куркумином – процент погибших клеток уменьшился на 7,7 по сравнению с использованием только доксорубицина. Добавление доксорубицина приводило к значительному повышению в кардиомиоцитах уровня активных форм тиобарбитуровой кислоты (ТБК-АП) в 3,6 раза и перекиси водорода на 64%. Применение доксорубицина снижало также ферментативную активность Mn-СОД на 32%, при этом активность каталазы возрастала на 72% по сравнению с контролем. Добавление куркумина в клеточную культуру кардиомиоцитов способствовало повышению активности Mn-СОД на 14%, каталазы - на 23%. При этом уровень ТБК-АП вырос в 1,4 раза по сравнению с контролем, а уровень H_2O_2 повысился на 20%. Совместное применение доксорубицина и куркумина приводило к значительному

снижению уровня свободнорадикальных процессов в отличие от доксорубициновой интоксикации, а именно, вызывало снижение содержания ТБК-АП и H_2O_2 (на 56,7 и 18,4% соответственно), при уменьшении гиперактивации каталазы (на 19%) и росте активности Mn-СОД (на 35%).
Ключевые слова: окислительный стресс; кардиомиоциты; фактор индуцированный гипоксией (HIF-1α); доксорубицин; куркумин.

O. Linnik, T. Drevytska, O. Gonchar, S. Chornyy, O. Kovalyov, I. Mankovska

DOXORUBICIN-INDUCED ALTERATIONS IN PRO–AND ANTIOXIDANT BALANCE AND THEIR CORRECTION BY CURCUMIN IN THE NEONATAL RAT CARDIOMYOCYTES CULTURE

It was studied the effect of doxorubicin on the HIF system and the pro–antioxidant balance of neonatal cardiomyocytes as well as the possibility of the oxidative stress correcting using curcumin. It has been revealed that the expression of mRNA HIF-1α using doxorubicin at a dose of 0,5 μM was 2.9 ± 0.8 cu, so it decreased by 20% compared to control - 3.6 ± 0.7 cu ($P<0.05$). The level of expression of the HIF target gene PDK-1 also significantly decreased (4 times). During the incubation with doxorubicin, the number of live cells decreased by 50,4% relative to control. And after using doxorubicin and curcumin together, the percentage of dead cells decreased by 7,7 compared to doxorubicin only. Doxorubicin intoxication led to a significant increase in the secondary products of lipid peroxidation (TBARS) in cardiomyocytes by 3.6 times and hydrogen peroxide by 64%. Prolonged incubation with doxorubicin reduced the enzymatic activity of Mn-SOD by 32%, while catalase activity increased by 72% compared to control. Adding of curcumin to the cardiomyocyte cell culture contributed to increasing of the Mn-SOD activity by 14%, catalase – by 23%. The level of TBARS increased by 1,4 times compared with the control, and the level of H_2O_2 increased by 20%. The joint use of doxorubicin and curcumin resulted in a significant reduction of free radical oxidation unlike effect of doxorubicin per se. Specifically, there was lessening of TBARS and H_2O_2 (at 56.7 and 18.4% respectively), while decreasing of the catalase hyperactivation (19%) and rising of the Mn-SOD activity (35%).
Key words: oxidative stress, cardiomyocytes, HIF-1α, doxorubicin, curcumin.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Cadenas E, Davis KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and ageing. Free Rad. Biol. Med. 2000; 29: 222–30.
2. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals and apoptosis. Semin. Med. Genet. 2001; 106:62-70.
3. Goda N, Kanai M. Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism. Int J Hematol. 2012; 95:457–63.
4. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1a. Review Cell Death and Differ. 2008; 15: 621–27
5. Lee K, Qian D, Rey S, Wei H, Liu J, Semenza G. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2009; 106(7):2353-8.
6. Chen TH, Yang YC, Wang JC, Wang JJ. Curcumin treatment protects against renal ischemia and reperfusion injury-induced cardiac dysfunction and myocardial injury. Transplant Proc. 2013; 45(10):3546-9.
7. Aggarwal S, Ichikawa H, Takada Y, Sandur SK, Shishodia S, Aggarwal B. Curcumin (diferuloymethane) down regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I kappa B alpha kinase and Akt activation . Mol. Pharmacol. 2006; 69(1):195-206.
8. Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Vergara P, Moreno MG, Muriel P. Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF-kB proinflammatory cytokines production and oxidative stress. Biochem. Biophys. Acta. 2007; 1770:989-96.
9. Swamy AV, Gulliaya S, Thippeswamy A, et al. Cardioprotective effect of curcumin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in albino rats. Indian J Pharmacol. 2012; 44: 73–7.
10. Mohamad RH, El-Bastawesy AM, Zekry ZK, et al. The role of Curcuma longa against doxorubicin (adriamycin) - induced toxicity in rats. J Med Food 2009; 12: 394–402.
11. Stalnaya ID, Garishvili TG. Method of determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid. Modern methods in biochemistry. 1977; 66-8. [Russian].
12. Huwiler M, Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H_2O_2/iodide system. Eur. J. Biochem. 1984; 141: 69-74.
13. Misra H, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of Epinephrine and a simple assay superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 1972; 247(10): 3170-5.
14. Koroljuk M, Ivanov L, Mayorov I, Tokarev V.Method for determination of catalase activity. Lab. Business. 1988; 1:16-9 [Russian].
15. Linnik O, Drevytska T, Chornii S, Dosenko V, Mankovska I. Effect of doxorubicin on the culture of isolated neonatal rats cardiomyocytes. Bulletin VNMU. 2014; 2(18):383-7. [Ukrainian].
16. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. Cell Metab. 2006; 3:177–85.
17. Rapisarda A, Melillo G. Overcoming disappointing results with antiangiogenic therapy by targeting hypoxia. Nature. Reviews. Clinical Oncology. 2012; 9:378-90.
18. Tanaka T, Yamaguchi J, Shoji K, Nangaku M. Anthracy-

cline Inhibits Recruitment of Hypoxia-inducible Transcription Factors and Suppresses Tumor Cell Migration and Cardiac Angiogenic Response in the Host. J. Biol. Chem. 2012; 287(42):34866-82.
19. Hyunsung Choi, Yang-Sook Chun, Seung-Won Kim, Myung-Suk Kim, and Jong-Wan Park. Curcumin inhibits hypoxia-inducible factor-1 by degrading aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: a mechanism of tumor growth inhibition. Mol Pharmacol. 2006; 70:1664–71.
20. Menshchikova E, Zenkov N. Antioxidants and inhibitors of radical oxidation processes. Adv. Mod. Biol. 1993; 113 (4):442-53. [Russian].
21. Sazontova T, Anchishkin N, Zhukov A. Role of reactive oxygen spcies and redox signaling in adapting to change of the oxygen content. Fiziol. Zh. 2008; 54 (2):18-32. [Russian].
22. Wang J, Ma J, Giffard R. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase decreases ischemia-like astrocyte injury. Free Radic.Biol.Med. 2005; 38(8):1112-8.
23. Srivastav G and Mehta JL. Currying the heart: curcumin and cardioprotection. J Cardiovasc Pharmacol 2009; 14: 22–7.
24. Grisham M, McCord J. Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In: Taylor A, Matalon S, Ward P, editors. Physiology of oxygen radicals. Bethesda: Am Physiol Soc; 1986. pp. 1–18.
25. Appiah R, Commandeur JN, Vermeulen NP. Inhibition of human recombinant cytochrome P_{450}s by curcumin and curcumin decomposition products. Toxicology. 2007; 235:83–91.
26. Sandur SK, Ichikawa H, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Sethi G, et al. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). Free Radic Biol Med. 2007; 43:568–80.
27. Miriyala S, Panchatcharam M, Rengarajulu P. Cardioprotective effects of curcumin. Adv Exp Med Biol. 2007; 595:359–77.
28. Cremers NA, Lundvig DM, vanDalen SC, Schelbergen RF, vanLent PL, Szarek WA, Regan RF, Carels CE, Wagener FA. Curcumin-induced heme oxygenase-1 expression prevents H2O2-induced cell death in wild type and heme oxygenase-2 knockout adipose-derived mesenchymal stem cells. Int J MolSci. 2014; 8;15(10):17974-99.

Матеріал надійшов до редакції 03.02.2015