

Вплив куркуміну на мітохондріальну функцію кардіоміоцитів при доксорубіциніндукованому оксидативному стресі

О.О. Лінник¹, О.О. Гончар¹, В.І. Носар¹, Т.І. Древицька¹, О.М. Ковальов²,
І.М. Маньковська¹

¹Інститут фізіології О.О. Богомольця НАН України, Київ; ²Національний авіаційний університет, Київ; e-mail: newtulo@gmail.com

Досліджено вплив куркуміну на життєздатність кардіоміоцитів, процеси окисного фосфорилування в мітохондріях клітин, їх про- та антиоксидантний баланс при доксорубіциніндукованому оксидативному стресі. Виявлено, що введення доксорубіцину щуром призводило до підвищення в мітохондріях кардіоміоцитів вмісту активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) на 21% та перекису водню на 76%, зниження ферментативної активності мітохондріальної марганцевої супероксиддисмутази (Mn-SOD) на 14% і зростання активності каталази на 80% порівняно з контролем. При сумісному застосуванні доксорубіцину і куркуміну вміст ТБК-АП та H_2O_2 підвищувався лише на 14 та 26% відповідно, ферментативна активність каталази та Mn-SOD зростала на 52 і 9%. Після інкубації культури неонатальних кардіоміоцитів з доксорубіцином кількість живих клітин зменшилася на 30,4%, а некротично змінених зросла на 30,4% порівняно з контролем. Сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну призводило до підвищення життєздатності клітин на 8%, а кількість некротично змінених зменшувалася на 8% порівняно із застосуванням лише доксорубіцину. При оцінці показників дихання мітохондрій щурів, котрі отримували ін'єкції доксорубіцину рівень активного дихання (V_3) знизився на 43,8%, ступінь спряженості окиснення з фосфорилуванням (V_3/V_4^{ATP}) – на 47%, а коефіцієнт ефективності фосфорилування (АДФ/О) на 31,7% відповідно порівняно з контролем. Після сумісного застосування доксорубіцину і куркуміну показники мітохондріального дихання покращувалися відносно використання доксорубіцину: V_3 підвищився на 25%, V_3/V_4^{ATP} на 18%, а АДФ/О на 12%.

Ключові слова: мітохондрії; оксидативний стрес; доксорубіцин; куркумін.

ВСТУП

Розвиток оксидативного стресу є одним із провідних патогенетичних механізмів ушкодження серця антрацикліновими антибіотиками, які широко вживаються при поліхіміотерапії в онкологічній практиці. Їх токсичний вплив на серце зумовлений пригніченням синтезу нуклеїнових кислот і, як наслідок, — блокадою поділу клітин [1]. Ушкодження нуклеїнових кислот і одноланцюгові розриви ДНК можуть бути спричинені активними формами кисню (АФК), що утворюються під впливом антрациклінів [2]. Останніми роками інтенсивно вивчаються процеси ПОЛ як

найімовірніший механізм кардіотоксичної дії останніх. Показано, що новоутворені вільні радикали негативно впливають на функцію мембран кардіоміоцитів [3,4]. Підтверджено порушення структури мітохондрій кардіоміоцитів як складової частини ушкодження серця антрацикліновими антибіотиками. Під їх впливом пригнічується дихальний ланцюг мітохондрій клітин міокарда і знижується концентрація в них макроергічних фосфорних сполук [5]. Відзначено, що найбільш чутливою до ушкоджувальної дії цитостатиків є внутрішня мембрана мітохондрій, що, можливо, є наслідком їх спорідненості з

© О.О. Лінник, О.О. Гончар, В.І. Носар, Т.І. Древицька, О.М. Ковальов, І.М. Маньковська

кардіоліпіном. Її руйнування призводить до різкого збільшення проникності до відновленого нікотинамідаденіуклеотиду (НАДН) та Ca^{2+} , а також зростання поглинання кисню і подальшої генерації АФК. Це супроводжується інактивацією ключових ензимів дихального ланцюга і порушенням процесів окисного фосфорилування в мітохондріях кардіоміоцитів [6,7]. Таким чином, є природним, що в останні роки відбуваються інтенсивні пошуки речовин-протекторів мітохондрій від впливу антрациклінів. Серед таких сполук значне місце займає куркумін – поліфенольний антиоксидант рослинного походження. Це жовтий пігмент, отриманий з коренів рослини *Curcuma longa*, який використовується як біологічно активна добавка в терапії атеросклерозу, цукрового діабету, при алергічних захворюваннях. Він має протективний ефект при пошкодженнях міокарда [8], впливає на активність цитокінів, ензимів та транскрипційних факторів, пов'язаних із гіпоксією [9], а також зменшує токсичний вплив доксорубіцину на серце, печінку та нирки за рахунок його антиоксидантних властивостей [10–12]. Водночас комплексне вивчення протективного ефекту куркуміну на мітохондріальний апарат кардіоміоцитів при застосуванні антрациклінів досі не проводилося.

Метою нашого дослідження було вивчити вплив куркуміну на мітохондріальну функцію кардіоміоцитів при доксорубіциніндукованому оксидативному стресі *in vitro* (в культурі клітин) та *in vivo*.

МЕТОДИКА

В експериментах використовували 12 самиць щурів Fisher масою тіла 180–200 г та 5 дводенних щурів для отримання культури неонатальних кардіоміоцитів. Доксорубіцин (4 мг/кг) і куркумін (50 мг/кг) вводили внутрішньоочередово за схемою: премедикація куркуміном тричі на тиждень, а потім введення куркуміну і доксорубіцину разом

із паузою в 6–8 год за тією самою схемою. Через 24 год після останньої ін'єкції тварини були декапітовані відповідно до прийнятих біоетичних норм. Мітохондрії із міокарда виділяли загальноприйнятим методом диференційного центрифугування за умови зберігання нативності ізольованих органел при 4°C [13]. Процеси дихання та окисного фосфорилування досліджували полярографічним методом із використанням закритого електрода Кларка і приладу Оксиграф («Standard Oxygraph System» «Hansatech» Великобританія). Середовище виділення містило (ммоль/л): манітолу-D – 210, сахарози – 70, ЕДТА – 2, бичачого сироваткового альбуміну – 1 мг/кг, HEPES – 10 (pH 7,4). Функціональний стан мітохондрій досліджували методом Chance, Williams [14] в середовищі інкубації зі складом (ммоль/л): KCl–120, NaH_2PO_4 –5, HEPES–10; pH 7,4. Як субстрат окиснення використовували 5 ммоль/л сукцинату 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 мітохондрій. Використовуючи одержані хроно-амперографічні криві, обчислювали показники дихання мітохондрій (за Чансом): в стані активного дихання при додаванні АДФ (V_3), контрольованого дихання ($V_4^{\text{АДФ}}$), дихальний контроль ($V_3/V_4^{\text{АДФ}}$), коефіцієнт ефективності фосфорилування (АДФ/О) [15]. Концентрацію білка визначали методом Lowry [16]. Виділення і культивування неонатальних кардіоміоцитів здійснювали відповідно до модифікованої методики Surova [17]. За допомогою цервікальної дислокації щурів знерухомлювали, після чого через передній поздовжній розріз грудної клітки виймали серце та відокремлювали шлуночки з подальшим їх відмиванням (буферний розчин: 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 проводилось у

середовищі виділення, яке на основі вищезазначеного буфера містило колагеназу II типу (1,75 мг) та панкреатин (3 мг) на 5 мл розчину. Ресуспендували клітини у живильному середовищі культивування такого складу: середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище 199 (співвідношення DMEM/199 - 4:1), теляча сироватка - 8%, Na_2CO_3 - 4,2 ммоль/л, HEPES - 15 ммоль/л та антибіотики (стрептоміцин - 100 мкг/мл, гентаміцин - 0,05 мг/мл, пеніцилін - 100 ОД/мл). Виділені клітини підраховували з використанням світлової мікроскопії після фарбування 0,2%-м розчином трипанового синього. Культивування проводили протягом 1 доби у вищезазначеному живильному середовищі при 37°C з газовим складом 5% CO_2 та 95% атмосферного повітря. Після 24 год інкубації в культуру додавали 0,5 мкмоль доксорубіцину гідрохлориду («Sigma Aldrich», США) чи доксорубіцин у вказаній дозі разом з куркуміном («Sigma Aldrich», США) в дозі 20 мкмоль. Для підрахунку кількості живих, некротичних та апоптотичних клітин у культурі неонатальних кардіоміоцитів використовували методи забарвлення біс-бензimidом (Hoechst 33342) та пропідіум йодидом у концентрації 8,75 мкмоль/л та флуоресцентної

мікроскопії (NikonEclipse E200, фільтр D/PI, довжина хвилі збудження 330-380 та 510-560 нм для Hoechst та пропідіум йодиду відповідно). Ступінь оксидативного стресу кардіоміоцитів оцінювали біохімічними методами за вмістом у мітохондріях активних продуктів 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) [18] та перекису водню [19], антиоксидантний захист - за активністю мітохондріальної Mn-супероксиддисмутази (Mn-SOD) [20] та каталази [21].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ми оцінювали ступінь оксидативного стресу в клітинах міокарда щурів, котрі отримували ін'єкції доксорубіцину та куркуміну (сумісно) й доксорубіцину окремо (рис.1). Вплив доксорубіцину призвів до підвищення в мітохондріях кардіоміоцитів вмісту ТБК-АП на 21% та перекису водню на 76% порівняно з контролем ($P<0,05$), що свідчить про інтенсифікацію вільнорадикального окиснення. Ступінь деструктивно-метаболічних порушень у кардіоміоцитах за цих умов залежить від стану ферментних і неферментних антиоксидантних систем, узгоджена дія яких тримає під контролем як

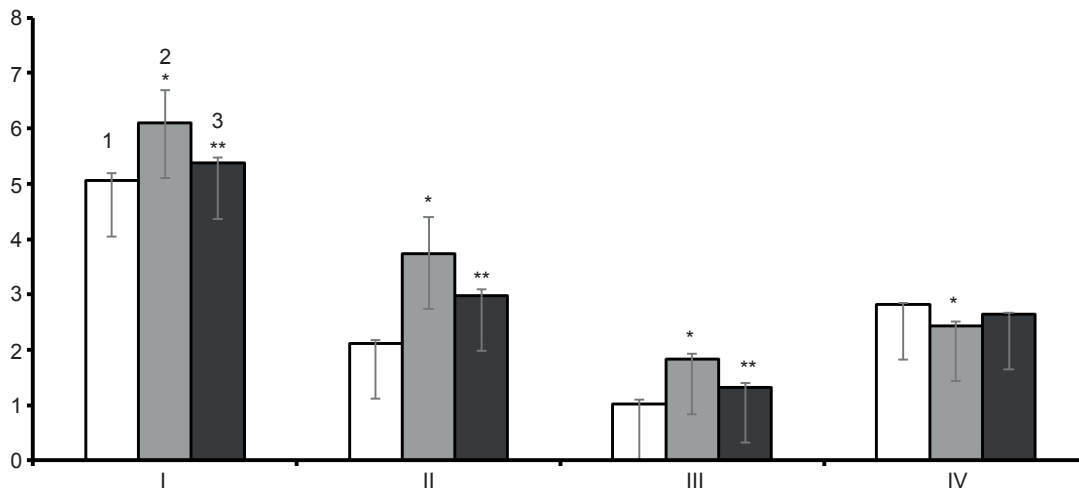


Рис. 1. Вплив куркуміну на про- та антиоксидантний баланс мітохондрій кардіоміоцитів при доксорубіциніндукованому оксидативному стресі; 1-контроль, 2-доксорубіцин, 3-доксорубіцин і куркумін; I-активні продукти тіобарбітурової кислоти, нмоль/мг; II- H_2O_2 , мкмоль/мг; III-каталаза, мкмоль·хв⁻¹·мг⁻¹; IV-марганцева супероксиддисмутаза, од/мг.

* $P<0,05$ порівняно з контролем, ** $P<0,05$ порівняно з введенням доксорубіцину

утворення, так і інактивацію АФК. Вважається, що мітохондріальна Мп-СОД відіграє найбільш суттєву роль в антирадикальному захисті, підтримуючи безпечний вміст супероксид-аніона, а активація експресії СОД захищає клітини від оксидативного стресу різного генезу [22]. У нашій роботі тривале введення доксорубіцину знижувало ферментативну активність Мп-СОД 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 субстратом для антиперекисних ферментів [23]. Сумісне застосування доксорубіцину та куркуміну призводило до значного зниження рівня вільнорадикальних процесів на відміну від окремого впливу доксорубіцину. Зменшення вмісту ТБК-АП та H_2O_2 (на 14 та 26% відповідно) при зниженні гіперактивації каталази (на 28%) та зростанні активності Мп-СОД (на 9%) свідчить про тенденцію до відновлення про- та антиоксидантної рівноваги в мітохондріях кардіоміоцитів. Таким чином, результати дослідження розвитку доксорубіциніндукованого оксидативного стресу в мітохондріях кардіоміоцитів свід-

чать про його гальмування при застосуванні куркуміну як у модельних експериментах [24], так і при введенні тваринам.

Надалі ми дослідили, як таке гальмування може відбиватися на життєздатності кардіоміоцитів та функціональній активності їх мітохондрій. За допомогою флуоресцентної мікроскопії було показано, що після інкубації культури неонатальних кардіоміоцитів з доксорубіцином у дозі 0,5 мкмоль кількість живих клітин зменшилася на 30,4%, а некротично змінених зросла на 30,4% порівняно з контролем (рис. 2). Після інкубації з куркуміном у дозі 20 мкмоль, кількість живих клітин зменшилася на 19,7%, а некротичні зросли на 19,7% відносно контролю, що може пояснюватися проапоптотичним впливом куркуміну на культуру неонатальних кардіоміоцитів при його безпосередньому застосуванні [21]. Сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну призводило до підвищення життєздатності клітин на 8%, а кількість некротично змінених зменшувалася на 8% порівняно із застосуванням лише доксорубіцину. Отримані результати свідчать про здатність куркуміну підвищувати життєздатність культури неонатальних кардіоміоцитів за умов оксидативного пошкодження.

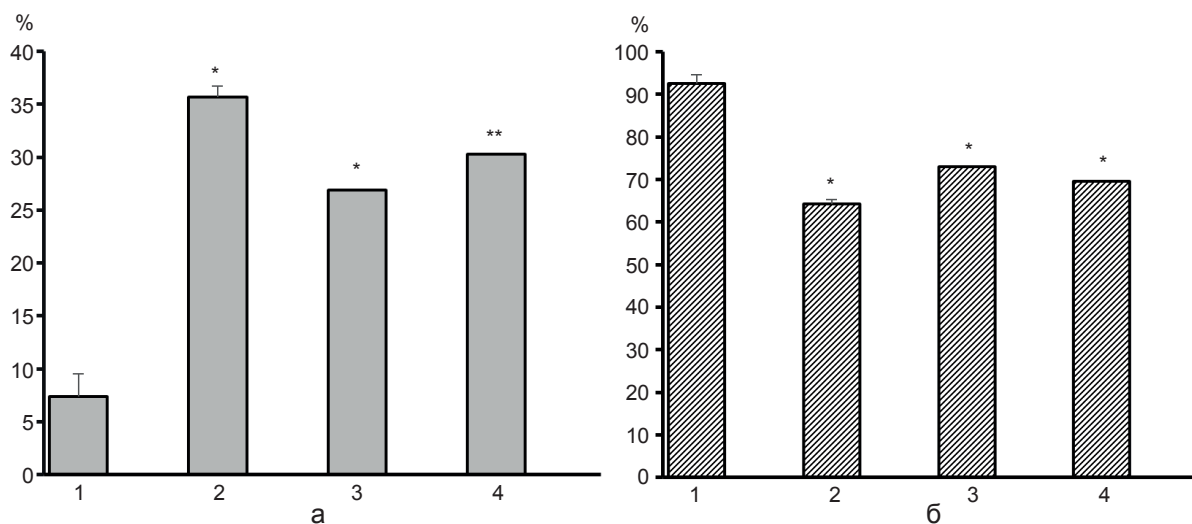


Рис.2. Частка некротичних (а) та живих (б) клітин при використанні флуоресцентної мікроскопії: 1- контроль, 2- доксорубіцин, 3- куркумін, 4- доксорубіцин і куркумін. * $P < 0,05$ порівняно з контролем, ** $P < 0,05$ порівняно з введенням доксорубіцину

Показники дихання мітохондрій міокарда щурів (M±m; n =12)

Показники	Контроль	Доксорубіцин	Доксорубіцин і куркумін
Рівень активного дихання (V_3) нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка	63,7±3,44	35,8±2,77*	44,7±2,13**, *
Рівень активності фосфорилування (V_4^{ATP}) нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка	22,1±2,23	23,5±2,11	24,9±2,18
Ступінь спряженості окиснення з фосфорилуванням (V_3/V_4^{ATP})	2,88±0,19	1,52±0,09*	1,8±0,11**, *
Коефіцієнт ефективності фосфори- лування (АДФ/О)	1,67±0,12	1,14±0,05*	1,29±0,04**, *

*P<0,05 порівняно з контролем, **P<0,05 порівняно з введенням доксорубіцину.

При оцінці параметрів дихання мітохондрій кардіоміоцитів щурів (за Чансом) виявлено: в мітохондріях щурів, котрі отримували ін'єкції доксорубіцину, V_3 знизився на 43,8%, V_3/V_4^{ATP} – на 47%, а коефіцієнт ефективності фосфорилування також зменшився на 31,7% порівняно з контролем. Ці результати 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. Водночас після сумісного застосування доксорубіцину та куркуміну показники мітохондріального дихання покращувалися порівняно із такими при використанні лише доксорубіцину: V_3 підвищився на 25%, V_3/V_4^{ATP} на 18%, а АДФ/О на 12% (таблиця). Отже, можна зробити висновок про здатність куркуміну покращувати електронно-транспортну функцію мітохондрій, посилювати спряженість й ефективність процесів дихання та фосфорилування для запобігання пошкодження клітин при оксидативному стресі.

Таким чином, результати досліджень свідчать про позитивний вплив куркуміну на життєздатність кардіоміоцитів, процеси окисного фосфорилування в мітохондріях кардіоміоцитів, їх про- та антиоксидантний баланс при доксорубіциніндукованому оксидативному стресі. Це дає можливість

із впевненістю говорити про доцільність застосування куркуміну для протекції мітохондріальної функції кардіоміоцитів від оксидативних пошкоджень при застосуванні антрациклінових антибіотиків та для реабілітації хворих після поліхіміотерапії.

ВИСНОВКИ

1. Вплив доксорубіцину призводив до розвитку оксидативного стресу, а саме до підвищення в мітохондріях кардіоміоцитів вмісту ТБК-АП на 21% та перекису водню на 76%, активність мітохондріальної Мп-СОД знижувалася на 14%, при цьому активність каталази зростала на 80% відносно контрольної групи. Сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну призводило до значного зниження ступеня оксидативних проявів процесів на відміну від окремого впливу доксорубіцину.

2. За допомогою флуоресцентної мікроскопії було показано, що після інкубації культури неонатальних кардіоміоцитів з доксорубіцином у дозі 0,5 мкмоль кількість живих клітин зменшилася на 30,4%, а некротично змінених зросла на 30,4% порівняно з контролем. При сумісному застосуванні доксорубіцину і куркуміну життєздатність клітин підвищилася порівняно із застосуванням лише доксорубіцину.

3. При оцінці показників дихання мітохондрій щурів, котрі отримували ін'єкції доксорубіцину, V_3 знизився на 43,8%, V_3/V_4^{ATP}

V_4^{ATP} на 47%, а АДФ/О на 31,7% відповідно порівняно з контролем. Після сумісного застосування доксорубіцину і куркуміну вони покращувалися порівняно із використанням лише доксорубіцину: V_3 підвищився на 25%, V_3/V_4^{ATP} на 18%, а АДФ/О на 12%.

О.А. Линник, О.А. Гончар, В.И. Носарь, Т.И. Древицкая, А.М. Ковалев, И.Н. Маньковская

ВЛИЯНИЕ КУРКУМИНА НА МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ДОКСОРУБИЦИНИНДУЦИРОВАННОМ ОКСИДАТИВНОМ СТРЕССЕ

Исследовано влияние куркумина на жизнеспособность кардиомиоцитов, процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях кардиомиоцитов, их про- и антиоксидантный баланс при доксорубицининдуцированном оксидативном стрессе. Обнаружено, что введение доксорубицина крысам приводило к повышению в митохондриях кардиомиоцитов содержания активных продуктов тиобарбитуровой кислоты (ТБК-АП) на 21% и перекиси водорода на 76%, снижение ферментативной активности митохондриальной марганцевой супероксиддисмутазы (Mn-SOD) на 14% и рост активности каталазы на 80% по сравнению с контролем. При совместном применении доксорубицина и куркумина содержание ТБК-АП и H_2O_2 повышалось только на 14 и 26% соответственно, ферментативная активность каталазы снижалась на 28%, а активность Mn-SOD на 9%. После инкубации культуры неонатальных кардиомиоцитов с доксорубицином количество живых клеток уменьшилось на 30,4%, а некротически измененных выросло на 30,4% по сравнению с контролем. Совместное применение доксорубицина и куркумина приводило к повышению жизнеспособности клеток на 8%, а количество некротически измененных уменьшалось на 8% по сравнению с применением только доксорубицина. При оценке показателей дыхания митохондрий крыс, получавших инъекции доксорубицина, уровень активного дыхания (V_3) снизился на 43,8%, показатель степени сопряженности окисления с фосфорилированием (V_3/V_4^{ATP}) на 47%, а коэффициент эффективности фосфорилирования (АДФ/О) на 31,7% соответственно по сравнению с контролем. После совместного применения доксорубицина и куркумина показатели митохондриального дыхания улучшались по сравнению с использованием только доксорубицина: V_3 повысился на 25%, V_3/V_4^{ATP} на 18%, а АДФ/О на 12% соответственно.

Ключевые слова: митохондрии; оксидативный стресс; доксорубицин; куркумин.

O. Linnik¹, O. Gonchar¹, V. Nosar¹, T. Drevytska¹, O. Kovalyov², I. Mankovska¹

EFFECT OF CURCUMIN ON MITOCHONDRIAL FUNCTION OF CARDIOMYOCYTES WITH DOXORUBICIN-INDUCED OXIDATIVE STRESS

We studied the effect of curcumin on the cardiomyocytes viability, processes of oxidative phosphorylation in the mitochondria of cardiomyocytes, their pro- and antioxidant balance in doxorubicin-induced oxidative stress. It has been revealed that administration of doxorubicin to rats led to a significant increase in the secondary products of lipid peroxidation (TBARS) in mitochondria by 21 and H_2O_2 by 76%, reduction of the enzymatic activity of mitochondrial Mn-SOD by 14% and intensified catalase activity by 80% compared with the control. After combined use of doxorubicin and curcumin the content of TBARS and H_2O_2 increased by 14 and 26%, respectively, the enzymatic activity of catalase decreased by 28%, and mitochondrial Mn-SOD activity intensified by 9%. During the incubation with doxorubicin, the number of live cells decreased by 30.4% and the number of necrotic cells increased by 30.4% relative to control. Coadministration of doxorubicin and curcumin led to augmented cell viability by 8%, while the number of necrotic cells reduced by 8% compared with the use of doxorubicin only. In assessing the parameters of mitochondrial respiration in rats that received injections of doxorubicin active breathing index (V_3) fell by 43.8%, the oxidation rate of the contingency of phosphorylation (V_3/V_4^{ATP}) decreased by 47% and phosphorylation efficiency index (ADP/O) also declined by 31.7% respectively compared with the control. The combined use of doxorubicin and curcumin improved the indicators of mitochondrial respiration compared to using only doxorubicin: V_3 raised by 25%, V_3/V_4^{ATP} by 18% and ADP/O by 12% respectively.

Key words: mitochondria; oxidative stress; doxorubicin; curcumin.

¹*O.O. Bogomolez Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv;*

²*National Aviation University, Kyiv.*

REFERENCES

1. Valvere V, Inhvatsabaya L, Nu Chau de G. Comparing score of anticancer antibiotics adriamycin and farmorubicin cardiotoxicity. *Cardiology*.1989; 29 (9): 64-6. [Russian]
2. Kovalenko V, Kalinkin N, Vatutin N. *Cytostatics heart injuri*. Donetsk: UkrNTEK. 2002; 350. [Russian]
3. Minnoti G, Mancuso C, Frustac A et al. Paradoxical inhibition of cardiac lipid peroxidation in cancer patients treated with doxorubicin Pharmacologic and molecular reappraisal of anthracycline cardiotoxicity. *J Clin invest*. 1996; 98:650-61.

4. Baraboi V, Sutkovoy D. The oxidation-antioxidant homeostasis in normal and pathological conditions. Ed. Acad. Ukrainian Academy of Medical Sciences Y Zozulya. K.: Chernobylinterinform. 1997; 420. [Russian]
5. Eidenschink AB, Schroter G, Muller Welhrich S et al. Myocardial high-energy phosphate metabolism is altered after treatment with anthracycline in children. *Cardiol. Young.* 2000; 10:610-17.
6. Gille L, Nohl H. Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23:775-82.
7. Eidenschink AB, Schroter G, Muller Welhrich S et al. Myocardial high-energy phosphate metabolism is altered after treatment with anthracycline in children. *Cardiol. Young.* 2000; 10:610-17.
8. Srivastav G and Mehta JL. Currying the heart: curcumin and cardioprotection. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009; 14:22-7.
9. Ströfer M, Jelkmann W, Depping R. Curcumin decreases survival of Hep3B liver and MCF-7 breast cancer cells: the role of HIF. *Strahlenther Onkol.* 2011 Jul; 187(7):393-400.
10. 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.
11. 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.
12. Perrone D, Ardito F, et al. Biological and therapeutic activities, and anticancer properties of curcumin. *ExpTherMed.* 2015 Nov; 10(5):1615-23.
13. Kondrashova MN, Fedotcheva NI, Saakyan IR et al. Preservation of native properties of mitochondria in rat liver homogenate. *Mitochondrion.* 2001 Oct; 1(3):249-67.
14. Chance B, Williams G. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *AdvEnzymol.* 1956; 17:65-134.
15. Estabrook RW. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:Oratios. *Methods Enzymol.* 1967; 10:41-7.
16. Lowry O, Rosebrough N, Fazz A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *JBiolChem.* 1951; 193(1):265-75.
17. Surova O, Nagibin V, Tumanovskaya L, Dosenko V, Moibenko A. Effect of a low dose of proteasome inhibitor on cell death and gene expression in neonatal rat cardiomyocyte cultures exposed to anoxia-reoxygenation. *ExpClinCardiol.* 2009; 14(2):57-61.
18. Stalnaya ID, Garishvili TG. Method of determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid. *Modern Methods in Biochem.* 1977; 66-8. [Russian].
19. Huwiler M, Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H₂O₂/iodide system. *EurJBiochem.* 1984; 141: 69-74.
20. Misra H, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of Epinephrine and a simple assay superoxide dismutase. *JBiolChem.* 1972; 247(10):3170-5.
21. Koroljuk M, Ivanov L, Mayorov I, Tokarev V. Method for determination of catalase activity. *LabBusiness.* 1988; 1:16-9. [Russian].
22. Wang J, Ma J, Giffard R. Overexpression of copper/zinc superoxidizedismutase decreases ischemia-like astrocyte injury. *Free Radic.Biol.Med.* 2005;38(8):1112-8.
23. Menshchikova E, Zenkov N. Antioxidants and inhibitors of radical oxidation processes. *Adv. Mod. Biol.* 1993; 113(4):442-53.
24. Linnik O, Drevytska T, Gonchar O, Chorny S, Kovalyov O, Mankovska I. Pro-antioxidant doxorubicin caused imbalance and its correction by curcumin in the neonatal rat cardiomyocytes culture. *Fiziol Zh.* 2015; 61(5):90-8. [Ukrainian].

*Матеріал надійшов
до редакції 05.09.2016*