

Ритікова Наталія Володимирівна - к. мед. н., доцент кафедри гістології та ембріології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця; +38 066 788-85-38

Маринський Георгій Сергійович - д. тех. н., провідний науковий співробітник Інституту електрозварювання імені Є.О. Патона НАН України

Чернець Олександр Владиславович - к. тех. н., зав. лабораторії зварювання біологічних тканин Інституту електрозварювання імені Є.О. Патона НАН України; +38 050 502-72-47

Лопаткіна Катерина Гордіївна - провідний інженер-технолог Інституту електрозварювання імені Є.О. Патона НАН України; +38 095 143-68-81

Васильченко Валерій Андрійович - провідний інженер-технолог Інституту електрозварювання імені Є.О. Патона НАН України; +38 067 797-51-24

Сидоренко Дмитро Федорович - провідний інженер-технолог Інституту електрозварювання імені Є.О. Патона НАН України

Буряк Юрій Захарович - провідний інженер-технолог Інституту електрозварювання імені Є.О. Патона НАН України

Сердюк Віктор Костянтинович - провідний інженер-технолог Інституту електрозварювання імені Є.О. Патона НАН України

© Лінник О.О., Древицька Т.І., Чорний С.А., Досенко В.Є., Маньковська І.М.

УДК: 576.311.347+591.04

Лінник О.О.¹, Древицька Т.І.¹, Чорний С.А.², Досенко В.Є.¹, Маньковська І.М.¹

¹ Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України (вул. Богомольця, 4, м. Київ, Україна, 01024), ² Інститут молекулярної біології та генетики НАН України (вул. Заболотного, 146, м. Київ, Україна, 03680)

ВПЛИВ ДОКСОРУБІЦИНУ НА КУЛЬТУРУ ІЗОЛЬОВАНИХ НЕОНАТАЛЬНИХ КАРДІОМІОЦИТІВ ЩУРІВ

Резюме. В статті представлені дослідження впливу антрациклінового антибіотика доксорубіцину на клітинні та молекулярно-генетичні зміни в культурі неонатальних кардіоміоцитів щурів. Вибір цієї речовини пов'язаний з появою нових даних, щодо можливості антрациклінових антибіотиків пригнічувати зв'язок транскрипційного фактору HIF з регуляторними послідовностями в геномі, таким чином, пригнічувати експресію генів-мішеней HIF. Крім того, показано, що речовини цього класу використовують для моделювання оксидативного стресу та кардіоміопатії *in vivo*. У роботі продемонстровано дозу залежність рівня клітинної загибелі та концентрації доксорубіцину, а також вплив змодельованого оксидативного стресу на рівень експресії генів, що кодують 1 α -субодиницю транскрипційного фактору HIF, а також його генів-мішеней TERT та PDK-1.

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

Вступ

Загальновідомою є здатність протипухлинних препаратів пошкоджувати майже всі органи і тканини організму. Найчастіше при лікуванні онкологічних захворювань використовуються антрациклінові антибіотики, зокрема, доксорубіцин, який є особливо кардіотоксичним та має здатність до потенціювання і кумуляції [Zhang et al, 1996]. Це стало причиною використання доксорубіцинової моделі для відтворення оксидативного стресу *in vitro* та кардіоміопатії *in vivo* та дало можливість дослідження глибоких генетично-молекулярних механізмів впливу антрациклінових антибіотиків на мітохондріальний апарат клітин серця. Відомо, що інтеркалюючи між парами нуклеотидів, ці цитостатики порушують процеси реплікації і транскрипції нуклеїнових кислот, впливають на експресію генів та фосфорилування білків [Filyak&Stoika, 2005]. Ушкодження нуклеїнових кислот можуть спричинити також вільні радикали, що утворюються під впливом антрациклінів [Коваленко та ін., 2002]. Останніми роками інтенсивно вивчаються реакції інтенсифікації 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 [Minnoti et al, 1996]. Особливу увагу викликають окиснювальні пошкодження мітохондрій при розвитку антрациклінових кардіоміо-

патій, що підтверджуються в багатьох дослідженнях [Montaigne et al., 2013]. Інкубація культури клітин кардіоміоцитів з доксорубіцином призводила до швидкого селективного зниження експресії кардіальних м'язово-специфічних генів, яке визначали методом Нозерн-блоттингу, що передує іншим змінам, характерним для антрациклінової кардіоміопатії [Ito et al., 1990].

Крім того, нещодавно стало відомо про можливість антрациклінових антибіотиків блокувати роботу транскрипційного фактору HIF і пригнічувати експресію HIF-залежних генів. Транскрипційний комплекс HIF (hypoxia inducible factor) - 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 у мітохондріях [Semenza, 2011; Mankovskaya et al., 2006]. Також, нещодавно було показано, що HIF-1 грає критичну роль в регуляції продукції ROS у мітохондріях завдяки різним механізмам: прямим - регуляція біогенезу та аутофагії мітохондрій [Morten et al., 2013], перебудова патерну експресії субодиниць цитохром С оксидази [Fukuda et al., 2007], а також опосередкованим - регуляція експресії PDK-1 (кіназа піруватдегідрогенази), яка фосфорилує та інактивує піруватдегідрогеназу [Kirito et al., 2009]. Зокрема, при гіпоксично-індукованій аутофагії саме HIF-1

регулює експресію протеїна Vpn3, потенціального індуктора мітофагії [Gustafsson, 2011]. При дослідженні регуляції мітохондріального метаболізму за допомогою HIF-1 показано, що при гіпоксії та, відповідно, при збільшенні утворення ROS мітохондріями, підвищується експресія HIF-1 α та його генів-мішеней. Так, Lee із співавт. [2009] вважають, що доксорубіцин має здатність інгібувати HIF-1 опосередковані відповіді через блокування його зв'язку з ДНК шляхом пригнічення здатності гетеродимера зв'язуватись з чутливим до гіпоксії консенсусним -RCGTG-елементом регуляторних ділянок [Rapisarda & Melillo, 2012; Tanaka et al., 2012]. Отже, з одного боку, HIF-1 спричиняє розвиток клітинної адаптації до гіпоксії шляхом активного зниження споживання кисню в мітохондріях через дію 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 PO₂ 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) [Cataldi, 2009]. Так, Mattiussi зі співавторами [2011] 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- β -катеніновому шляху. Але, незважаючи на велику кількість досліджень, треба підкреслити, що при експериментальному відтворенні оксидативного стресу за допомогою доксорубіцину, молекулярно-генетичні механізми змін у мітохондріях залишаються мало дослідженими. Залишається також необхідність пошуку шляхів впливу на рівень експресії HIF та його можливих генів-мішеней для знаходження ефективних методів протекції міокарду на молекулярно-генетичному рівні при використанні антрациклінів.

Метою нашої роботи було дослідити клітинні і генетично-молекулярні ефекти дії доксорубіцину на ізолюовані неонатальні кардіоміоцити.

Матеріали та методи

Дослідження було проведено на ізолюованих кардіоміоцитах дводенних неонатальних щурах лінії Вістар. Виділення і культивування неонатальних кардіоміоцитів здійснювалось відповідно до модифікованої методики [Surova et al., 2009]. цервікальної дислокації щури знерухомлювалися, після чого через передній поздовжній розріз грудної клітини виймалося серце та відокремлювалися шлуночки з подальшим їх відмиванням (бу-

ферний розчин: HEPES - 20, KCl - 5,4, NaCl - 116,4, глюкоза - 5,5, Na₂HPO₄ - 0,4 та K₂HPO₄ - 0,4 ммоль/л) та подрібненням. Ферментативне розщеплення проводилось у середовищі виділення, яке на основі вищезазначеного буферу містило колагеназу II типу (1,75 мг) та панкреатин (3 мг) на 5 мл розчину. Ресуспендувались клітини у живильному середовищі культивування такого складу: середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище 199 (співвідношення DMEM/199 - 4 : 1), теляча сироватка - 8%, Na₂CO₃ - 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% розчином трипанового синього. Культивування проводили протягом 1 доби у живильному середовищі вищезазначеного складу при 37°C у газовому середовищі, яке містило 5% CO₂ та 95% атмосферного повітря. Після 24 годин інкубації в культуру додавали відповідну дозу доксорубіцину гідрохлориду (SigmaAldrich). 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)-,5 дифенілтетразолійбромід (МТТ) в блакитні кристали формаза (МТТ-ф), нерозчинні у воді. Кількість утвореного формаза визначається колориметричним методом після його розчинення в органічних розчинниках. Клітини саджали на 96-лункові планшети (20 тисяч клітин на лунку) та інкубували з доксорубіцином гідрохлоридом (SigmaAldrich) в різних дозах для визначення рівня токсичності - 0,1; 0,5 та 1 мкМ в середовищі DMEM+199 24 години. Через добу в кожен лунку додавали по 20 мкл стокового розчину МТТ (5 мг МТТ (SigmaAldrich) на 1 мл PBS) та інкубували 4 години. Результат оцінювали шляхом вимірювання на спектрофотометрі оптичної щільності лізату в лунках, отриманого за допомогою додавання в кожен лунку по 200 мкл DMSO, на довжині хвилі 570 нм. Крім того, для підрахунку кількості живих, некротичних та апоптотичних клітин використовували методи забарвлення біс-бензімідом (Hoechst 33342) та пропідіум йодидом в концентрації 8,75 мкмоль/л та флюоресцентної мікроскопії (NikonEclipse E200, фільтр D/PI, довжина хвилі збудження 330-380 та 510-560 нм для Hoechst та пропідіум йодиду відповідно).

Клітини з чашок знімали за допомогою 0,2% розчину натрієвої солі етилендіамінотетрауксусної кислоти (pH=8.1), який містив 0,15% трипсину протягом 15 хвилин. Виділення тотальної РНК з культури неонатальних кардіоміоцитів проводили з використанням набору "Trizol RNA Prep 100" ("Isogen", Росія), який містить Trizol reagent (містить денатуруючий агент гуанідинтіоціонат і фенол) та ExtraGene E (суспензія суміші іонообмінників). Оцінку експресії мРНК генів проводили з використан-

ням напівкількісної зворотної транскрипції, 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 "RandomHexamer" (0,5 мкг/мкл), 20 од інгібітора рибонуклеаз, 20 мМ 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 генів TERT та PDK-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'. 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. Для визначення змін експресії гена HIF-1 α використовували систему TaqMan Gene Expression Assay. Експресію стандартизували відносно експресії гена GAPDH (набір TaqMan®Assay Reagents Rat GAPDH). Початкова денатурація при 95°C протягом 20 с, ампліфікація складалася з 65 наступних циклів: денатурація при 95°C 3 с, приєднання праймерів та елонгація - 60°C 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 величин ($p < 0,05$) визначали за t критерієм Стьюдента.

Результати. Обговорення

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 (Sigma) та життєздатність кардіоміоцитів. При інкубації з доксорубіцином в дозах 0,1; 0,5 та 1,0 мкМ кількість живих клітин відносно до контролю зменшилась на $10,9 \pm 9,99\%$; $23,6 \pm 8,76\%$ та $31,5 \pm 9,86\%$ відповідно (рис. 1). Це підтвердило літературні дані щодо кардіотоксичності антрациклінів та дало можливість вибрати дозу доксорубіцину 0,5 мкМ як оптимальну для подальших досліджень.

У подальшому використовували методи флуоресцентного забарвлення та мікроскопії для визначення,

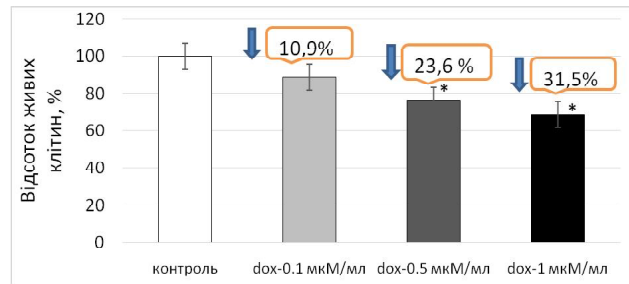


Рис. 1. Відсоток живих клітин при використанні різних доз доксорубіцину за даними МТТ-тесту.

Примітка. * - достовірні відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

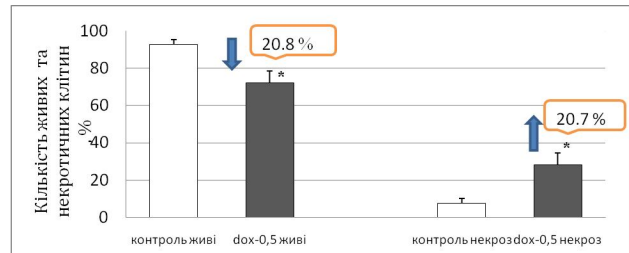


Рис. 2. Кількість живих та некротичних клітин при використанні 0,5 мкМ доксорубіцину за даними флуоресцентної мікроскопії.

Примітка. * - достовірні відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

оцінки стану та підрахунку кількості живих, некротичних та апоптотичних клітин при використанні доксорубіцину в дозі 0,5 мкМ. Після інкубації з доксорубіцином кількість живих клітин знизилась на $20,8 \pm 4,3\%$ порівняно з контролем, відповідно кількість кардіоміоцитів, що загинули шляхом некрозу, збільшилась на $20,7 \pm 4,2\%$ (рис. 2). При цьому зустрічалися лише поодинокі апоптотичні клітини, відсоток яких на графіках не відображений.

Для оцінки змін експресії ряду генів використовували метод ПЛР у реальному часі. Встановлено, що при використанні доксорубіцину в дозі 0,5 мкМ відбуваються суттєві зміни експресії мРНК TERT та PDK-1.

Так, рівень експресії мРНК HIF-1 α становив $3,6 \pm 0,7$ у.о. у контролі і $2,9 \pm 0,8$ ум.од. при використанні доксорубіцину в зазначеній концентрації, таким чином він дещо зменшувався, проте ці дані не мали вірогідного характеру (рис. 3А). В той же час, рівні експресії генів-мішеней HIF TERT та PDK-1 достовірно ($p < 0,05$) зменшувалися у 4,9 та 4 рази відповідно порівняно з контролем (рис. 3Б, В).

Таким чином, дані МТТ-тесту відображають дозозалежне збільшення рівня некротичної загибелі кардіоміоцитів. Коефіцієнт кореляції між кількістю живих клітин та дозою доксорубіцину, що додавалася в культуру, дорівнює - 0,95. Для подальших досліджень ми використовували середню дозу - 0,5 мкМ, вона вже викликала зміни, характерні для оксидативного пошкодження, але ще не призводила до суттєвої загибелі кардіоміоцитів.

Отримані нами дані дозволяють припустити, що по-

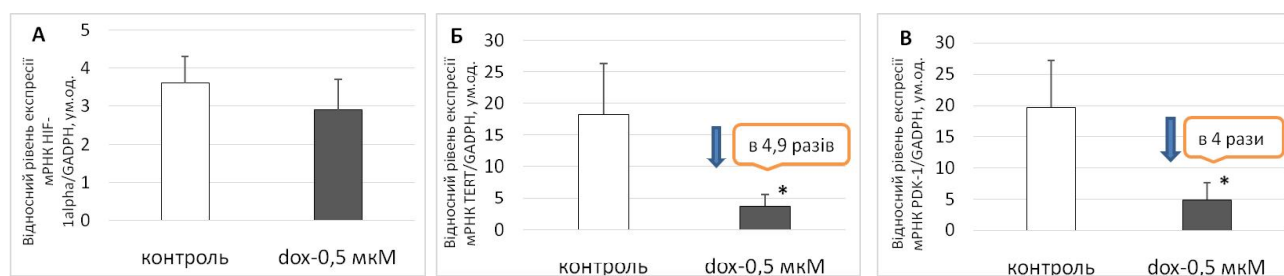


Рис. 3. Зміни експресії мРНК HIF-1 α (А), TERT (Б) та PDK-1 (В) при використанні 0,5 мкМ доксорубіцину за даними ПЛР у реальному часі.

Примітка. * - достовірні відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).

гіршення 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 нашій лабораторії раніше було показано, що теломераза експресується в культурі неонатальних кардіоміоцитів і що рівень її експресії при оксидативному стресі та моделюванні аноксії-реоксигенації змінювався [Кедлян, 2013]. У свою чергу, Li зі співавт. [2013] отримали дані про те, що теломераза має нейропротекторну дію за умов кисневої та глюкозної депривації, механізми якої наразі залишаються невідомими. Однак припускають, що це пов'язано зі зниженням співвідношення Bcl-2/Bax, підсиленням продукції ROS та зниженням мітохондріального потенціалу (Ψ_m).

PDK-1 є одним із генів-мішеней HIF, який призводить до зменшення надходження пірувату в мітохондрії, тим самим протидіє зниженню ефективності електронного транспорту за гіпоксичних умов, що в іншому випадку могло б підвищити продукцію ROS [Kirito, 2009]. Так, в своїх дослідженнях Hur [2013] припускає, що PDK-1 може бути мішенню для протипухлинної терапії, оскільки вона збільшує виживання пухлинних клітин в умовах кисневої депривації, завдяки активації гліколізу.

Таким чином, наші дані певною мірою пояснюють механізми збільшення некротичної загибелі клітин при інкубації з доксорубіцином у культурі неонатальних кардіоміоцитів.

Список літератури

- Коваленко В. Н. Повреждение сердца цитостатиками / Коваленко В. Н., Калинин Н. В., Ватутин Н. Т. - Донецк : Изд-во УкрНТЭК, 2002. - 350 с.
- Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells / K. Lee, D. Qian, S. Rey [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. - 2009. - Vol. 106, №7. - P. 2353 - 8.
- 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 [et al.] // J. Biol. Chem. - 2012. - Vol. 287, № 42. - P. 34866 - 34882.
- Doxorubicin induced apoptosis is in spontaneously hypertensive rats, differential effects in heart, kidney and intestine and inhibition by ICR 1'187 / J. Zhang, J. R. Clark, E. H. Herman [et al.] // J. Mol. Cell Cardiol. - 1996. - Vol. 28. - P. 1931 - 1943.
- Doxorubicin selectively inhibition muscle gene expression in cardiac muscle cells in vivo and in vitro / H. Ito, S. C. Miller, M. E. Billingham [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1990. - Vol. 87. - P. 4275 - 4279.
- Effect of a low dose of proteasome inhibitor on cell death and gene expression in neonatal rat cardiomyocyte cultures exposed to anoxia-reoxygenation / O. Surova, V. Nagibin, L. Tumanovskaya [et al.] // Exp. Clin. Cardiol. - 2009. - Vol. 14, № 2. - P. 57 - 61.
- Expression of pyruvate dehydrogenase kinase-1 in gastric cancer as a potential therapeutic target / H. Hur, Y. Xuan, Y. Kim [et al.] // Int. J. Oncol. - 2013 - Vol. 42, № 1 - P. 44 - 54.
- Expression of TERT mRNA and TERC changes during anoxia-reoxygenation and myocardial infarction / В. П. Кедлян, Т. І. Древицька, В. Л. Гур'янова [та ін.] // Physiology: from molecules to the body. - 2013. - P. 24 - 25.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. При проведенні МТТ-тесту після інкубації з доксорубіцином в дозах 0,1; 0,5 та 1,0 мкМ кількість живих клітин відносно до контролю зменшилась на $10,9 \pm 9,99\%$; $23,6 \pm 8,76\%$ та $31,5 \pm 9,86\%$ відповідно. Коефіцієнт кореляції між кількістю живих клітин та дозою доксорубіцину, що додавалась в культуру дорівнював $-0,95$.

2. За даними флуоресцентної мікроскопії після інкубації з доксорубіцином кількість живих клітин знизилась на $20,8 \pm 4,3\%$ порівняно з контролем, а кількість кардіоміоцитів, що загинули шляхом некрозу, збільшилась на $20,7 \pm 4,2\%$.

3. Показано, що рівень експресії мРНК HIF-1 α не змінився під дією доксорубіцину, становив $3,6 \pm 0,7$ ум.од. у контролі і $2,9 \pm 0,8$ ум.од. при використанні доксорубіцину, а рівень експресії генів TERT та PDK-1 достовірно зменшувалися у 4,9 та 4 рази відповідно ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

Отже, можна зробити висновок, що використання даної моделі відкриває перспективи для подальшого вивчення функціональних, морфологічних, динамічних та біохімічних характеристик мітохондрій при розвитку оксидативного стресу як на культурі клітин, так і у досліді in vivo. Залишається також необхідність пошуку шляхів впливу на рівень експресії HIF та його можливих генів-мішеней для знаходження ефективних методів протекції міокарду на молекулярно-генетичному рівні при використанні антрациклінів.

- Expression of transcriptional factor HIF subunits in rat tissues under acute and intermittent hypoxia / I. Mankovskaya, T. Drevitskaya, V. Dosenko [et al.] // Hypoxia Med. J. Proceedings of the sixth international conference "Hypoxia in Medicine". - 2006. - Milan, Italy. 1-2: 35.
- Filyak O. S. Comparative study of ps3 expression in human carcinoma cell lines A549 and MCP7 under anticancer drug treatment / O. S. Filyak, R. S. Stoika // Укр. біох. журн. - 2005. - Т. 77, № 2. - P. 136 - 140.
- Gustafsson A. B. Bnip3 as a dual regulator of mitochondrial turnover and cell death in the myocardium / A. B. Gustafsson // *Pediatr. Cardiol.* - 2011. - Vol. 32, № 3. - P. 267 - 74.
- HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells / R. Fukuda, H. Zhang, J. W. Kim [et al.] // *Cell.* - 2007. - Vol. 129. - P. 111 - 122.
- Human telomerase represses ROS-dependent cellular responses to Tumor Necrosis Factor- α without affecting NF- κ B activation / M. Mattiussi, G. Tilman, S. Lenglez [et al.] // *Cell. Signal.* - 2012. - Vol. 24, № 3 - P. 708 - 717.
- 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, № 17. - P. 2844 - 9.
- Mitochondrial Dysfunction as an Arrhythmogenic Substrate A Translational Proof-of-Concept Study in Patients With Metabolic Syndrome in Whom Post-Operative Atrial Fibrillation Develops / D. Montaigne, X. Marechal, P. Lefebvre [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* - 2013. - Vol. 62(16). - P. 1466 - 1473.
- Morten K. J. Differential regulation of HIF-mediated pathways increases mitochondrial metabolism and ATP production in hypoxic osteoclasts / K. J. Morten, L. Badder, H. J. Knowles // *J. Pathol.* - 2013. - Vol. 229, № 5. - P. 755 - 764.
- Paradoxical inhibition of cardiac lipid peroxidation in cancer patients treated with doxorubicin Pharmacologic and molecular reappraisal of anthracycline cardiotoxicity / G. Minnoti, C. Mancuso, A. Frustac [et al.] // *J. Clin. Invest.* - 1996. - Vol. 98. - P. 650 - 661.
- 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.
- Semenza G. Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning / G. Semenza // *Vascular Program.* - 2011. - Vol. 1813, № 7. - P. 1263-8.
- The neuroprotective role and mechanisms of TERT in neurons with oxygen-glucose deprivation / J. Li, Y. Qu, D. Chen [et al.] // *Neuroscience.* - 2013 - Vol. 252 - P. 346 - 58.
- p53 and telomerase control rat myocardial

Линник О.А., Древицька Т.И., Черный С.А., Досенко В.Е., Маньковская И.Н.

ВЛИЯНИЕ ДОКСОРУБИЦИНА НА КУЛЬТУРУ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС

Резюме. В статье представлены исследования влияния антрациклинового антибиотика доксорубин на клеточные и молекулярно-генетические изменения в культуре неонатальных кардиомиоцитов крыс. Выбор этого вещества связан с появлением новых данных о возможности антрациклиновых антибиотиков подавлять связь транскрипционного фактора HIF с регуляторными последовательностями в геноме и, таким образом, подавлять экспрессию генов-мишеней HIF. Кроме того, показано, что вещества этого класса используют для моделирования оксидативного стресса и кардиомиопатии *in vivo*. В работе продемонстрирована дозо зависимость уровня клеточной гибели и концентрации доксорубин, а также влияние моделированного оксидативного стресса на уровень экспрессии генов, кодирующих 1 α -субъединицу транскрипционного фактора HIF и его генов-мишеней TERT и PDK-1.

Ключевые слова: кардиомиоциты, митохондрии, доксорубин, оксидативный стресс, HIF.

Linnik O.A., Drevytska T.I., Chorny S.A., Dosenko V.Y., Mankovska I.N.

THE DOXORUBICIN EFFECT ON CULTURE OF THE ISOLATED NEONATAL CARDIAC HYSTIOCYTES RAT

Summary. This paper presents research on the impact of the anthracycline antibiotic doxorubicin on cellular, molecular and genetic changes in the culture of neonatal cardiac hystiocytes rats. The choice of this substance is associated with the emergence of new data on the possibility of anthracycline antibiotics inhibit transcription factor HIF connection with regulatory sequences in the genome and thus inhibit the expression of HIF target genes. Furthermore, we showed that this class of substances is used for the simulation of oxidative stress and cardiomyopathy *in vivo*. The paper demonstrates dose dependency between cell death and doxorubicin concentration and impact of modeled oxidative stress on the expression of genes encoding transcription factor HIF-1 α -subunit, as well as its target genes TERT and PDK-1.

Key words: cardiac hystiocytes, mitochondria, doxorubicin, oxidative stress, HIF-1.

Стаття надійшла до редакції 22.04.2014 р.

Лінник Оксана Олександрівна - аспірант Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України; +38 093 815-50-98; newmulo@gmail.com

Древицька Тетяна Ігорівна - к. біол. н., Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, ст. наук. співроб.; drevt@ukr.net

Чорний Сергій Анатолійович - к. біол. н., наук. спів роб. Інституту молекулярної біології та генетики НАН України

Досенко Віктор Євгенович - д. мед. н., професор, провідний наук. співроб. Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України

Маньковська Ірина Микитівна - д. мед. н., професор, зав. відділом Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України; +38 044 256-24-91; mankovsk@biph.kiev.ua