

О.В. Сулова, В.Є. Досенко, В.С. Нагібін, Л.В. Тумановська, О.О Мойбенко

## Повторна аноксія–реоксигенація культивованих неонатальних кардіоміоцитів не спричинює апоптотичну клітинну смерть

*Исследована експрессия генов и механизмы клеточной смерти при моделировании двух эпизодов аноксии–реоксигенации на первичной культуре изолированных неонатальных кардиомиоцитов. Культуру клеток подвергали действию 30-минутной аноксии с последующей реоксигенацией в течение 24 ч (А–Р1) и повторной аноксии–реоксигенации продолжительностью 30–60 мин соответственно (А–Р2). Процент живых, некротических, апоптотических и аутофагических кардиомиоцитов определяли окрашиванием клеток флуоресцентными красителями бис-бензимидам, йодид пропицидумом и монодансилкадаверином соответственно, с помощью метода флуоресцентной микроскопии. Аноксия–реоксигенация существенно влияла на соотношение указанных клеток как при А–Р1, так и при А–Р2. Показано, что основным механизмом гибели клеток при моделировании А–Р1 и А–Р2 является некроз. Установлены изменения экспрессии генов белков теплового шока HSP70 и HSP90, антиапоптотического белка Bcl2 и ключевого регулятора аутофагии FRAP (от англ. FKBP-rapamycin associated protein). Полученные результаты позволяют предположить, что в культуре кардиомиоцитов через сутки после первой аноксии повышенная экспрессия белков теплового шока запускает каскад реакций, которые обуславливают некротическую гибель клеток и блокирование апоптотической программы при А–Р2.*

### ВСТУП

Припускається, що апоптоз, як генетично запрограмований вид клітинної смерті, має значення у патогенезі різноманітних захворювань серця, зокрема інфаркту міокарда, серцевої недостатності, кардіоміопатій тощо. Питання про вагомість цього виду загибелі клітин порівняно з іншими (некрозом, аутофагічною клітинною смертю) залишається недостатньо вивченим насамперед через те, що методи визначення апоптозу в умовах *in vivo* мають суттєві обмеження, а швидкоплинність апоптотичної програми та подальшої елімінації залишків клітин, що зазнали апоптозу, оточуючими клітинами не дають можливості визначити реальну кількість апоптотичних клітин. За даними різних дослідників, їх на кількість у серці при інфаркті міокарда та інших патологіях

може коливатися від 0,25 до 35 % [15, 19]. Частина вчених доводить надзвичайно велике значення апоптозу при інфаркті міокарда, а інші взагалі ставлять під сумнів будь-яке значення апоптотичної загибелі кардіоміоцитів, що не може бути порівняно із роллю некротичної загибелі клітин серця. Вивчення культивованих кардіоміоцитів дає змогу об'єктивно оцінити співвідношення живих, апоптотичних та аутофагічних клітин при моделюванні відповідної патології. Так, у наших попередніх дослідженнях показано, що аноксія–реоксигенація неонатальних кардіоміоцитів спричинює зменшення кількості живих клітин на 5–12 %, при цьому число некротичних клітин збільшується на 3–6 %, апоптотичних – на 4–7 %, аутофагічних – на 5–10 % [4–6]. У працях інших авторів отримано подібні дані при застосуванні аналогічної схеми експе-

© О.В. Сулова, В.Є. Досенко, В.С. Нагібін, Л.В. Тумановська, О.О Мойбенко

рименту, а при подовженні терміну аноксії та реоксигенації, звичайно, кількість загиблих клітин, насамперед апоптотичних, могла бути значно більшою [12, 21, 23]. Таким чином, апоптотична загибель кардіоміоцитів робить суттєвий внесок у зменшення клітинної популяції культивованих клітин, а попередження їх апоптозу є перспективним напрямком кардіопротекції [9, 14, 16].

Проте зрозуміло, що за реальних клінічних умов ішемічні напади із наступною реперфузією не поодинокі, а повторюються декілька разів навіть протягом однієї доби. Хоча аноксія–реоксигенація культивованих кардіоміоцитів лише частково відтворює ішемію–реперфузію серця, можна поставити питання: яким чином відреагують кардіоміоцити в культурі на повторні епізоди аноксії–реоксигенації. При цьому логічно передбачити, що перша аноксія–реоксигенація (А–Р1) призведе до змін в експресії певних генів, що регулюють процес запрограмованої клітинної смерті, забезпечують цитопротекцію, антиоксидантний захист тощо. Тобто повторної аноксії–реоксигенації (А–Р2) будуть зазнавати дещо інші кардіоміоцити зі зміненим спектром експресії генів та, можливо, із підвищеною стійкістю до вказаного виду uszkodження.

Мета нашого дослідження – визначити співвідношення апоптотичних, аутофагічних, некротичних і живих кардіоміоцитів при моделюванні двох послідовних впливів аноксії та реоксигенації та визначити експресію генів білків теплового шоку HSP70 і HSP90, антиапоптотичного білка Bcl2, а також ключового регулятора аутофагії FRAP у культивованих кардіоміоцитах.

## МЕТОДИКА

*Культивування ізольованих неонатальних кардіоміоцитів.* Культуру неонатальних кардіоміоцитів отримували за методикою,

викладеною у праці Reinecke та співавт. [16] з деякими модифікаціями. Використовували щурів лінії Вістар віком 2–3 доби. За допомогою цервікальної дислокації тварин знерухомлювали, після чого через передній поздовжній розріз виймали серце. Шлуночки відокремлювали від передсердь для чистоти культури від фібробластів та інших клітин сполучної тканини. Потім їх двічі відмивали у стерильному буферному сольовому розчині (рН 7,4) такого складу (ммоль/л): HEPES – 20, KCl – 5,4, NaCl – 116,4, глюкоза – 5,5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,4 та K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,4. Після цього їх механічно подрібнювали ножицями до отримання шматочків тканини розміром близько 1 мм<sup>3</sup>, котрі підлягали ферментативному розщепленню у розчині виділення, яке на основі зазначеного буфера містило колагеназу II типу (95 ОД/мл) і панкреатин (0,6 мг/мл). Розчин виділення попередньо оксигенували карбогеном. Перетравлення відбувалося у 5 циклів по 10 хв кожний. Починаючи з третього циклу, шматочки міокарда роз'єднували за допомогою піпетки, після чого розчин виділення збирали у пробірку. Клітини осаджували центрифугуванням при 400 g протягом 1 хв, далі ресуспендували у живильному розчині культивування (рН 7.4) такого складу: середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище 199 (співвідношення DMEM/199 – 4 : 1), теляча сироватка – 8 %, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 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 і некротичних клітин визначали за допомогою фарбування 0,2%-м розчином трипанового синього. Отримані клітини розміщували на скельця, покриті 2%-м розчином желатину, приготовленому на буфері, що входить до складу розчину виділення, із щільністю 120 000 на 1 см<sup>2</sup>. Культивування проводили протягом доби у живильному середовищі зазначеного складу при 37°C у газовому середовищі

(5 % CO<sub>2</sub> та 95 % атмосферного повітря). Через 24 год після культивування, коли більшість живих і нормально функціонуючих клітин прикріплюються до поверхні чашок Петрі, середовище замінювали.

*Відтворення аноксії–реоксигенації.* Аноксію моделювали аерацією клітин безкисневою газовою сумішшю, що включала 5 % CO<sub>2</sub> та 95 % Ar протягом 30 хв у ексикаторі з щільно притертою кришкою, куди зазначену газову суміш подавали через стерилізуючий фільтр (діаметр пор фільтра 0,22 мкм) і шар стерильної води, налітої на дно ексикатора. Для моделювання реоксигенації після аноксії проводили заміну живильного середовища та культивування клітин за вихідних умов протягом доби. А–Р1 тривала 30 хв та 24 год відповідно, після чого клітини зазнавали впливу А–Р2 – 30 хв та 1 год відповідно.

*Виділення РНК, зворотна транскрипція та полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) у реальному часі.* РНК виділяли з культури кардіоміоцитів після А–Р1, із використанням набору “Trizol RNA-prep» («Isogen», Росія). Зворотну транскрипцію проводили, використовуючи набір реагентів “First Strand cDNA Synthesis Kit» («Fermentas», Литва), 2–2,5 мкг загальної РНК і гексамерного праймера. Отриману внаслідок зворотної транскрипції компліментарну ДНК (кДНК) піддавали генспецифічній ПЛР-ампліфікації. Для кількісної оцінки експресії генів білка-регулятора апоптозу Bcl2 і ключового регулятора аутофагії FRAP використовували набір реагентів “TaqMan Gene Expression Assay 7500 Fast Real-time PCR System Custom № 443137” (“Applied Biosystem”, США), проби для відповідних генів розроблені на основі послідовності мРНК щура («Applied Biosystems», США). Експресія генів Bcl2 та FRAP була нормалізована відносно гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (ГАФДН) як ендogenous контролю, використовуючи набір реагентів “TaqMan Rodent GAPDH Control Reagent” (VIC™Pro-

be), (“Applied Biosystem”, США). ПЛР-ампліфікація складалася з 45 таких циклів: початкова денатурація при 95°C впродовж 20 с, з наступною обробкою при 95°C протягом 3 с, приєднання праймерів та елонгація – 60 °C, 30 с. Аналіз отриманих результатів проводили за допомогою програми “7500 Fast Real-time PCR Software”.

Для кількісної оцінки експресії генів білків теплового шоку HSP70 та HSP90 ми використовували праймери такої послідовності: HSP70-F 5'-ATG CGC TCG AGT CCT ACG CCT T-3', HSP70-R 5'-GCT GAT CTT GCC CTT GAG ACC CTC-3', HSP90-F 5'-TCC AAT AGG CTT GTG TCT TCC CCC-3', HSP90-R 5'-AAT CCG TTC CAT GTT GGC TGT CC-3'. Експресію гена білків теплового шоку стандартизували відносно експресії гена 18S (рибосомна субодинаця 18), як ендogenous контролю. Використані праймери були такої послідовності: 18S-F 5'-CTTAGAGGGACAAG TGGCG-3' та 18S-R 5'-GGACATCTAAGGG CATCACA-3'. ПЛР-ампліфікацію генів HSP70 та HSP90 проводили у 10 мкл SYBR Green PCR Master Mix, що містив 30 пмоль кожного праймера. Об'єм реакційної суміші доводили до 20 мкл деіонізованою водою. Програма ампліфікації починалася із попередньої активації “AmpliTaq Gold®” ДНК-полімерази протягом 10 хв при – 95 °C та складалася з 45 циклів: денатурація – 95 °C, 15 с, приєднання праймерів та елонгація – 59 °C, 1 хв. Для контролю за специфічністю флуоресценції продуктів реакції проводили стадію дисоціації – послідовне підвищення температури від 60 до 94°C із реєстрацією зменшення інтенсивності флуоресценції комплексів дволанцюгових ДНК з SYBR Green (“Applied Biosystem”, США). Для побудови стандартної кривої використовували ДНК ампліфікатів генів HSP70 та HSP90, вилучену з агарозного гелю та очищену за допомогою “DNA Extraction Kit” («Fermentas», Литва). Концентрацію ДНК

визначали із використанням спектрофотометра NanoDrop ND1000 («NanoDrop Technologies Inc», США) та перераховували в кількість молекул в 1 мкл. Після цього готували послідовні розведення очищеної ДНК генів білків теплового шоку та застосовували їх для ампліфікації за вищевказаною програмою.

*Визначення кількості живих, некротичних, апоптотичних та аутофагічних клітин.* Кількість живих, некротичних та апоптотичних клітин визначали за допомогою фарбування кардіоміоцитів біс-бензимідом (Hoechst 33342) та пропідіум йодидом у концентрації 8,75 мкмоль/л та оцінювали за допомогою методу флуоресцентної мікроскопії (Nikon Eclipse E200, фільтр D/PI, довжини хвиль збудження 330–380 та 510–560 нм для Hoechst та пропідіум йодиду відповідно). Біс-бензимід проникає через непошкоджену мембрану клітин і забарвлює синім кольором ядерний хроматин, візуалізуючи таким чином живі клітини (ядра їх мають рівний контур, округлу форму та рівномірне забарвлення) та апоптотичні клітини (останні мають фрагментовані та пікнотичні ядра). Пропідіум йодид не може проникати через плазматичну мембрану і забарвлює червоним лише ядра клітин з пошкодженою плазмолемою, тобто некротичних. Крім того, спостерігалися клітини із цілою плазмолемою (ядро синього кольору) та з ядром, що мало менші, порівняно зі звичайними, розміри та більшу інтенсивність забарвлення. Це свідчить про конденсацію хроматину в таких клітинах, що дає змогу говорити про початкову стадію апоптозу в них. Клітини із фрагментованим, проте червоним ядром, свідчать про початок розвитку програми апоптозу в клітинах і про настання некротичної їх загибелі в період реалізації цієї програми.

Для виявлення аутофагічних вакуолей застосовували специфічний барвник – монодансилкадаверин (фільтр UV-2A,

довжина хвилі збудження 330-380 нм) у концентрації 50 мкмоль/л (прижиттєве забарвлення клітин).

*Статистична обробка результатів.* Отримані результати обробляли статистично з використанням програми Excel 2000 та Origin 7,0. Вірогідність відмінностей середніх значень ( $P < 0,05$ ) визначали за критерієм *t* Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

*Клітинна смерть при моделюванні аноксії–реоксигенації у культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів.* Аноксія–реоксигенація значною мірою впливала на співвідношення живих, некротичних, апоптотичних та аутофагічних клітин у культурі кардіоміоцитів як при А–P1, так і при А–P2. При відтворенні А–P1 кількість некротичних та апоптотичних клітин збільшувалась удвічі ( $5,98 \pm 0,66 - 11,88 \% \pm 1,99 \%$ ) і втричі ( $2,59 \pm 0,61 - 7,85 \% \pm 1,97 \%$ ) відповідно у порівнянні з контролем ( $P < 0,05$ ). При цьому кількість живих клітин зменшувалася на 8,5 % ( $87,3 \pm 2,72 - 78,9 \% \pm 2,44 \%$ ) ( $P < 0,05$ ). А–P2 майже не впливала на кількість живих клітин ( $78,9 \pm 2,44 - 79,2 \% \pm 3,29 \%$ ), невірогідно збільшуючи їх відсоток у культурі ( $P > 0,05$ ), та у 1,7 раза збільшувала кількість некротичних ( $11,88 \pm 1,99 - 20,7 \% \pm 3,55 \%$ ) ( $P < 0,05$ ) клітин у порівнянні із А–P1 (рис. 1). А–P1 та А–P2 збільшували кількість аутофагічних клітин (див. 1,г) у 2,2 раза ( $6,45 \pm 1,47 - 13,99 \% \pm 2,03 \%$ ) та 4,2 раза ( $6,45 \pm 1,47 - 26,78 \% \pm 6,29 \%$ ) відповідно ( $P < 0,005$ ). Кількість аутофагічних клітин після А–P2 збільшувалася у порівнянні з А–P1 у 1,9 раза ( $13,99 \pm 2,03 - 26,78 \% \pm 6,20 \%$ ) ( $P_1 < 0,05$ ). Після А–P2 число клітин із ознаками апоптозу зменшувалася у 4,3 раза порівняно із А–P1 ( $7,85 \pm 1,97 - 1,84 \% \pm 0,38 \%$ ;  $P < 0,05$ ). Таким чином, А–P2 нівелювала індукцію апоптозу в культурі під впливом А–P1, доводячи кількість апопто-

тичних клітин майже до контрольного значення ( $2,59 \pm 0,61 - 1,84 \% \pm 0,38 \%$ ).

*Експресія генів білків теплового шоку HSP70, HSP90, білка-регулятора апоптозу Bcl2 та ключового регулятора аутофагії FRAP у культурі кардіоміоцитів при моделюванні аноксії-реоксигенації.* Встановлено, що при моделюванні А-Р1 відбуваються суттєві зміни в експресії мРНК генів HSP70, HSP90 (рис. 2). Так, вміст мРНК HSP70 збільшувався у 4,4 рази ( $1,32 \cdot 10^{-7} \pm 0,11 - 5,81 \cdot 10^{-7} \pm 0,47$ ) порівняно з контролем ( $P < 0,05$ ), а вміст мРНК HSP90 – у 38 разів ( $(5,12 \pm 0,005) \cdot 10^{-8} - (195 \pm 0,2) \cdot 10^{-8}$ ) ( $P < 0,05$ ). При цьому експресія генів Bcl2 та FRAP дещо зменшувалася, проте ці результати не були вірогідними (рис. 3).

Аналіз отриманих результатів показує, що стійкість кардіоміоцитів, котрі зазнали впливу А-Р1 до впливу А-Р2 не збільшується, а навпаки має тенденцію до

зменшення. Провідними механізмами загибелі клітин при цьому були некроз та аутофагічна клітинна смерть. Здатність до реалізації апоптотичної програми кардіоміоцити за вказаних умов втрачають. Отримані результати про збільшення експресії білків теплового шоку, що практично усіма дослідниками вважаються цито- та кардіопротективними, через 24 год після аноксії, на перший погляд, не можуть пояснити зменшення резистентності клітин до аноксії-реоксигенації. Однак експресія вказаних шаперонів має не лише протективне значення, а може і сприяти ушкодженню клітин. Відомо, що за умов стресу накопичуються HSP (від англ. heat shock protein) на мембранах клітин серця [11], внаслідок чого вони розпізнаються та елімінуються лімфоцитами. Накопичення HSP на мембрані є потужним прозапальним сигналом і корелює зі збільшенням кількості

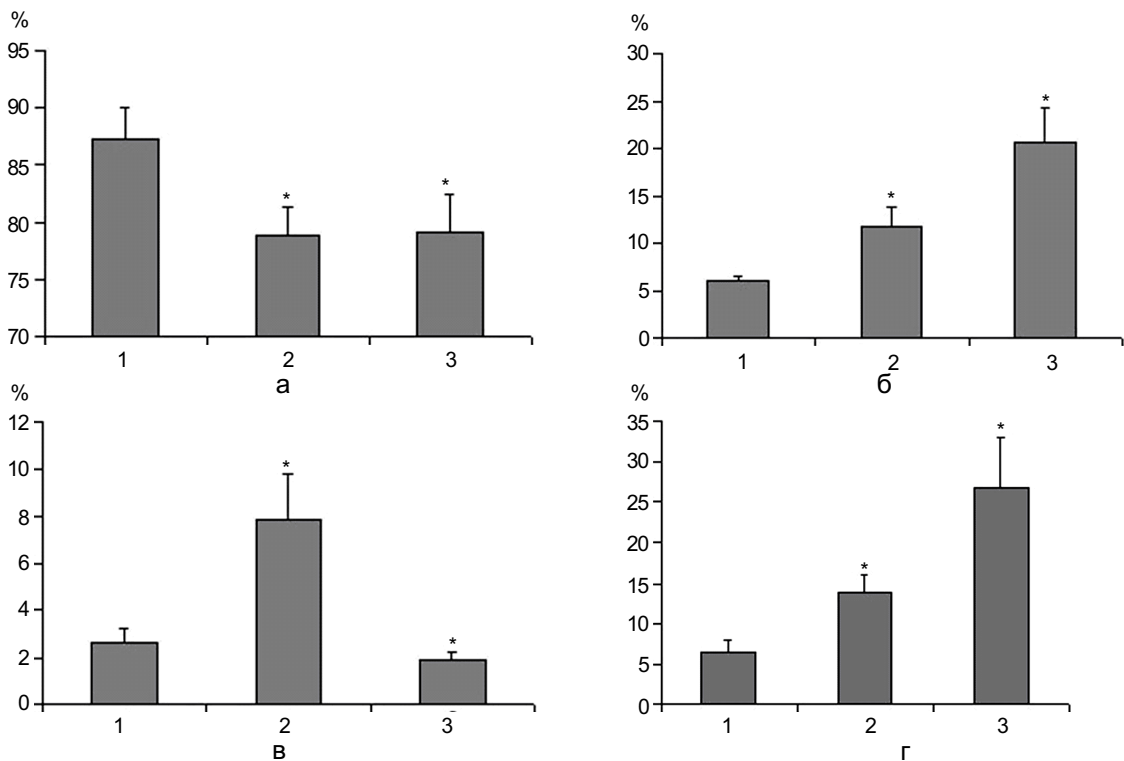


Рис. 1. Зміни кількості живих (а), некротичних (б), апоптотичних (в) і клітин з ознаками аутофагії (г) у первинній культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів при відтворенні аноксії-реоксигенації: 1 – контроль, 2 – вплив аноксії (30 хв) та реоксигенації (24 год), 3 – вплив аноксії (30 хв) і реоксигенації (24 год), аноксії (30 хв) та реоксигенації (1 год). \*  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем

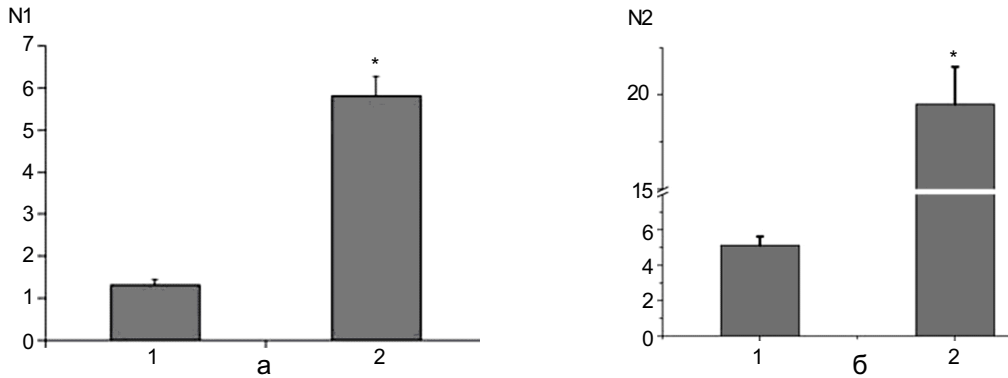


Рис. 2. Експресія генів HSP70 (а) та HSP90 (б) у культурі ізолюваних неонатальних кардіоміоцитів при відтворенні анексії–реоксигенації: N1 – кількість молекул мРНК HSP70 ( $10^7$ )/молекул мРНК 18S на 1 мкл, N2 – кількість молекул мРНК HSP90 ( $10^6$ )/молекул мРНК 18S на 1 мкл; 1 – контроль, 2 – анексія (30 хв), реоксигенація (24 год). \*  $P < 0,05$  у порівнянні з контролем

некротичних клітин. Слід зазначити, що за умов стресу білки теплового шоку також починають секретуватися кардіоміоцитами та можуть збуджувати так звані Toll-подібні рецептори, що вважаються основними компонентами первинної неспецифічної імунної відповіді. Експресія вказаних рецепторів характерна для клітин серця [18]. Таким чином, секретуючи у надмірній кількості HSP, клітини у культурі можуть впливати на власні Toll-подібні рецептори і стимулювати виділення прозапальних речовин, в тому числі фактора некрозу пухлин (ФНП), що індукуює як некроз, так і апоптоз. Встановлено, що ФНП в свою чергу індукуює експресію HSP, а останні опосередковано через ядерний фактор каппа

В (NF- $\kappa$ B), впливають на експресію ФНП, замикаючи таким чином хибне коло [19]. Також слід зазначити, що через білки, пов'язані з фактором, асоційованим із рецепторами ФНП (TRAF) (від. англ. TNE Receptor Associated Factor), пригнічується активність каспази 8 та як наслідок – каспази 3, із пригніченням розвитку апоптозу [24]. З інших джерел відомо, що за умов блокування апоптотичної програми, може відбуватися переключення механізмів загибелі з розвитком некрозом у відповідь на проапоптотичні фактори [7, 13]. Не виключено, що саме така ситуація складається в культурі кардіоміоцитів через добу після першої анексії – надмірна експресія білків теплового шоку запускає

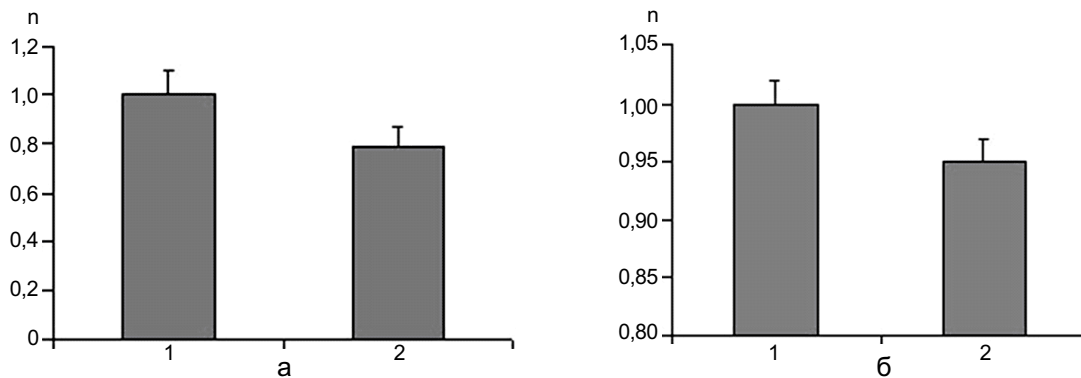


Рис. 3. Експресія генів Bcl2 (а) та FRAP (б) у культурі ізолюваних неонатальних кардіоміоцитів при відтворенні анексії–реоксигенації: n – відносний вміст мРНК гена/мРНК гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа; 1 – контроль, 2 – анексія (30 хв), реоксигенація (24 год)

каскад реакцій, що зумовлюють некротичну загибель клітин і блокування апоптотичної програми при повторній аноксії–реоксигенації.

Експресія Bcl2, що має як антиапоптотичні, так і антинекротичні властивості [3, 17] не зростала після відтворення – А–Р1, а, отже, не могла забезпечити збільшення стійкості клітин до повторної А–Р2. Експресія іншого цитопротективного протеїну FRAP, що запобігає аутофагічній клітинній смерті також мала тенденцію до зменшення, що, на нашу думку, пояснює значний приріст кількості кардіоміоцитів з ознаками аутофагії після А–Р2. Також раніше було показано, що в кардіоміоцитах за умов аноксії–реоксигенації розвивається стрес ендоплазматичного ретикулума [1, 22], що в свою чергу спричинює підвищення експресії GRP78/BiP – білка-шаперона, який є ключовим регулятором стрес-індукованої аутофагії [9].

Таким чином, отримані результати певною мірою пояснюють надзвичайно малу кількість апоптотичних кардіоміоцитів, що реєструється при інфаркті міокарда в клінічних умовах у людини [2, 8]. Не виключено, що в разі ішемічної хвороби серця, яка характеризується багаторазовими ішемічними епізодами, основним видом клітинної смерті є саме некроз, а роль апоптозу є вельми незначною.

Отже, за умов дії А–Р2 після першого її епізоду основним механізмом загибелі кардіоміоцитів у культурі є некроз та аутофагічна клітинна смерть. Не виключено, що індукована аноксією–реоксигенацією надмірна експресія білків теплового шоку 70 та 90 кДа робить вагомий внесок у блокування апоптотичної програми в культурі кардіоміоцитів, а, отже, пояснює надзвичайно малу кількість апоптотичних кардіоміоцитів, що реєструється при інфаркті у клініці, та наводить на думку про незначну роль апоптозу у загибелі клітин серця в умовах ішемії–реперфузії.

Показане підвищення експресії цитопротективного гена білка-регулятора аутофагії FRAP корелює зі зростанням популяції клітин, що мають ознаки аутофагії, в культурі кардіоміоцитів при відтворенні аноксії–реоксигенації.

**O.V. Surova, V.E. Dosenko, V.S. Nagibin,  
L.V. Tumanovskaya, A.A. Moybenko**

**SECOND ANOXIA-REOXYGENATION DOES NOT CAUSE THE APOPTOTIC CELL DEATH OF NEONATAL CARDIOMYOCYTES: POSSIBLE ROLE OF CHANGES OF mRNA EXPRESSION OF CYTOPROTECTIVE GENES**

The cells death and genes expression in neonatal cardiomyocytes culture at two anoxia-reoxygenation modeling were investigated. The primary culture of neonatal cardiomyocytes was undergone 30 min of anoxia followed by 24 h (A-R1) and the second anoxia-reoxygenation – 30 min and 60 min respectively (A-R2). The percentages of living, necrotic, apoptotic and autophagic cells were determined by staining with bis-benzimide, propidium iodide and monodansylcadaverine. Anoxia-reoxygenation significantly influenced the ratio of living, necrotic, apoptotic and autophagic cells both at its first A-R1 and second A-R2 episodes. It was shown that the main mechanism of cell death after the both periods of anoxia-reoxygenation is necrosis. The changes of mRNA levels of genes of heat shock proteins HSP70 and HSP90, antiapoptotic protein Bcl2 and key regulator of autophagy FRAP in cardiomyocytes culture were established. The data obtained allow to make suggestion that in 24 h after the first episode of anoxia-reoxygenation A-R1 the overexpression of heat shock proteins starts the cascade of reactions that causes the necrotic cell death prevalent and the blocking of apoptotic program at second anoxia-reoxygenation A-R2.

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

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Тумановська Л.В., Нагібін В.С., Досенко В.С., Мойбенко О.О. Ультраструктурні зміни в ізольованих кардіоміоцитах при моделюванні стресу ендоплазматичного ретикулуму // *Фізіол. журн.* – 2008. – **54**, № 3. – С. 10–21.
2. Bott-Fliegel L., Weig H.J., Uhlein H. et al. Quantitative analysis of apoptotic markers in human end-stage heart failure // *Eur. J. Heart Fail.* – 2008. – **10**(2) – P. 129–132.
3. Deng X., Gao F., May W.S.Jr. Bcl2 retards G1/S cell cycle transition by regulating intracellular ROS // *Blood.* – 2003. – **102**, № 9. – P. 3179–3185.
4. Dosenko V.E., Nagibin V.S., Tumanovskaya L.V. et al. Proteasomal proteolysis in anoxia-reoxygenation, pre-

- conditioning and postconditioning of isolated cardiomyocytes // Pathophysiology. – 2006. – **2**. – P. 119–125.
5. Dosenko V.E., Nagibin V.S., Tumanovskaya L.V. et al. Postconditioning prevents apoptotic, necrotic and autophagic cardiomyocyte cell death in culture // Фізіол. журн. – 2005. – **51**. – P. 12–17.
  6. Dosenko V.E., Nagibin V.S., Tumanovska L.V. et al. Protective effect of autophagy in anoxia-reoxygenation of isolated cardiomyocyte? // Autophagy. – 2006. – **2**(4). – P. 305–306.
  7. Hartmann A., Troadec J.-D., Hunot S. Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis // J. Neurosci. – 2001. – **21**, № 7. – P. 2247–2255.
  8. Khoynzhad A., Jalali Z., Tortolani A.J. A synopsis of research in cardiac apoptosis and its application to congestive heart failure // Heart Inst. J. – 2007. – **34**(3). – P. 352–359.
  9. Li J., Ni M., Lee B. et al. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells // Cell Death Differ. – 2008. – **15**(9) – P. 1460–1471.
  10. Li H.L., Karwatowska-Prokopczuk E., Mutomba M. et al. Pharmacology of caspase inhibitors in rabbit cardiomyocytes subjected to metabolic inhibition and recovery // Antioxid. Redox. Signal. – 2001. – **3**, № 1. – P. 113–123.
  11. Lin L., Kim S.C., Wang Y. et al. HSP60 in heart failure: abnormal distribution and role in cardiac myocyte apoptosis // Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol. – 2007. – **293**(4). – P. 2238–2247.
  12. Liu X.H., Zhang Z.Y., Sun S. et al. Ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia/reperfusion injury through attenuating endoplasmic reticulum stress // Shock. – 2008. – **30**(4). – P. 422–427.
  13. Los M., Mozoluk M., Ferrari D. et al. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling // Mol. Biol. Cell. – 2002. – **13**. – P.978–988.
  14. Naka Y., Sawa Y., Nishimura M. et al. Participation of caspase-3-like protease in necrotic cell death of myocardium during ischemia-reperfusion injury in rat hearts // Circulat. J. – 2003. – **67**, № 3. – P. 248–252.
  15. Pankuweit S., Jobmann M., Crombach M. et al., Cell death in inflammatory heart muscle diseases-apoptosis or necrosis? // Herz. – 1999. – **24**, № 3. – P. 211–218.
  16. Reinecke H., Zhang M., Bartosek T. et al. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts // Circulation. – 1999. – **100**. – P. 193–202.
  17. Sablina A.A., Budanov A.V., Ilyinskaya G.V. et al. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor // Nat. Med. – 2005. – **11**, № 12. – P. 1306–1313.
  18. Satoh M., Shimoda Y., Akatsu T. et al. Elevated circulating levels of heat shock protein 70 are related to systemic inflammatory reaction through monocyte Toll signal in patients with heart failure after acute myocardial infarction. // Eur. J. Heart Fail. – 2006. – **8**(8). – P. 810–815.
  19. Scarabelli T., Knight R., Anastasis Stephanou et al. Clinical Implications of Apoptosis in Ischemic Myocardium // Current Probl. Cardiol. – 2006. – 31. – P. 181–264.
  20. Sharma H.S., Stahl J., Weisensee D. et al. Cytoprotective mechanisms in cultured cardiomyocytes // Mol. Cell Biochem. – 1996. – **160** – P. 217–224.
  21. Song H., Zhang Z., Wang L. Small interference RNA against PTP-1B reduces hypoxia/reoxygenation induced apoptosis of rat cardiomyocytes // Apoptosis. – 2008. – **13**(3). – P. 383–393.
  22. Thuerauf D.J., Marcinko M., Gude N. et al. Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes // Circulat. Res. – 2006. – **99**(3). – P. 275–282.
  23. Tu I.H., Yen H.T., Cheng H.W. et al. Baicalein protects chicken embryonic cardiomyocyte against hypoxia-reoxygenation injury via mu- and delta- but not kappa-opioid receptor signaling // Eur. J. Pharmacol. – 2008. – **588**(2–3). – P. 251–258.
  24. Wajant H., Scheurich P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling // Intern. J. Biochem. and Cell Biol. – 2001. – **33**. – P. 19–32.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*  
*E-mail: olgasurovaya@mail.ru*

*Матеріал надійшов до редакції 11.09.2008*