

Р.Б. Струтинський, В.С. Нагібін, Н.А. Струтинська, О.Р. Янчій, О.О. Мойбенко

Вплив флокаліну на розвиток апоптозу та некрозу при аноксії–реоксигенації ізольованих неонатальних кардіоміоцитів

У досліджах на культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів вивчали вплив нового кардіопротектора флокаліну на виживання клітин при аноксії–реоксигенації, розвиток некрозу та апоптозу, а також внесок у вищезазначені процеси активації АТФ-чутливих калієвих (K_{ATP}) та блокування високопорогових кальцієвих каналів. Флокалін додавали в середовище інкубації в дозі 5 та 20 мкмоль/л за 2 хв до початку аноксії (30 хв) та наступної реоксигенації (60 хв). Вони є близькими до напівмаксимального: перша – відкриття K_{ATP} -каналів, друга – блокування високопорогових кальцієвих каналів та потужної активації перших. Виявлено, що у дозі 5 мкмоль/л флокалін спричиняв зсув співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин у бік живих, відсоток яких практично не відрізнявся від контрольних значень. Відкриття K_{ATP} -каналів пригнічувало некроз одвічі та повністю запобігало розвитку апоптозу, що був індукований аноксією–реоксигенацією неонатальних кардіоміоцитів. Флокалін пригнічував апоптоз неонатальних кардіоміоцитів настільки, що він був на 36 % меншим, ніж у контрольних експериментах. При додаванні в середовище інкубації дози 20 мкмоль/л ознак кардіопротекції не виявлено. Останнє може бути наслідком як досить сильної активації калієвих каналів, так і наслідком обох факторів – інгібування високопорогових кальцієвих каналів і, відповідно, суттєвого зменшення вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} та порушення метаболічних процесів ще до аноксії–реоксигенації. Таким чином, помірне відкриття K_{ATP} -каналів флокаліном значно зменшує некроз і повністю запобігає апоптозу, що були індуковані аноксією–реоксигенацією неонатальних кардіоміоцитів.

Ключові слова: аденозинтрифосфатчутливі калієві канали, апоптоз, некроз, аноксія–реоксигенація, неонатальні кардіоміоцити, флокалін.

ВСТУП

Флокалін є новим вітчизняним оригінальним кардіопротектором і міотропним спазмолітиком, основною специфічною дією якого є відкриття K_{ATP} -каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран клітини [7,24]. Відомо, що одним із механізмів кардіопротекції сполук такого типу є зменшення входу в цитоплазму клітини іонів кальцію через L-тип кальцієвих каналів, до інгібування яких призводить гіперполяризація плазматичної мембрани внаслідок відкриття K_{ATP} -каналів [15]. Однак нещодавно було встановлено, що при збільшенні дози флокаліну він може безпосередньо інгібувати високопорогові каль-

цієві та потенціалзалежні натрієві канали в культурі неонатальних кардіоміоцитів [23]. Зокрема, для напівмаксимального блокування цих каналів дози флокаліну становлять $IC_{50}=23,1$ та $IC_{50}=17,1$ мкмоль/л відповідно.

В експериментах *in vitro* на ізольованому та перфузованому за Лангендорфом серці морських свинок і шурів та *in vivo* на анестезованих собаках було показано потужні антишемічні ефекти флокаліну та зменшення розміру інфаркту міокарда на 40 % [5, 8]. Його кардіопротекторний вплив проявляється в широкому діапазоні застосованих доз від 0,1 при внутрішньовенному до 3,3 мг/кг при пероральному введенні відповідно. Було

© Р.Б. Струтинський, В.С. Нагібін, Н.А. Струтинська, О.Р.Янчій, О.О. Мойбенко

виявлено, що оптимальними дозами для виникнення антиішемічного ефекту є такі, що викликають помірне відкривання $K_{ATФ}$ -каналів [1, 5, 8].

Незважаючи на масштабне дослідження захисних механізмів дії флокаліну, досі залишається невивченим його вплив на розвиток різних типів клітинної загибелі при ішемії–реперфузії міокарда та інших тканин. Зокрема, внесок у вищезазначені процеси активації $K_{ATФ}$ -каналів та блокування високопорогових кальцієвих каналів.

Метою нашої роботи було дослідження впливу флокаліну на виживання клітин при аноксії–реоксигенації культури ізольованих неонатальних кардіоміоцитів, процеси некрозу та апоптозу.

МЕТОДИКА

Первинну культуру неонатальних кардіоміоцитів отримували з міокарда шлуночків дводобових щурів за допомогою ферментного гідролізу [22]. Шлуночки щурів відокремлювали від перикарда та передсердь, механічно подрібнювали ножицями до отримання шматочків тканини розміром 1–2 мм³. Ці шматочки ферментативно розщеплювали у середовищі виділення яке попередньо оксигенували карбогеном, колагеназа II типу (95 ОД/мл) та панкреатин (0,6 мг/мл), розведені в буфері такого складу (ммоль/л): НЕРЕС – 20,0; КСL – 5,4; NaCL – 116,4; глюкоза – 5,5; Na₂НРО₄ – 0,4; K₂НРО₄ – 0,4 та перемішувався. Перетравлення відбувалося у три цикли (по 10 хв кожний). Після кожного з циклів шматочкам міокарда давали осісти, надосадове середовище видаляли, а до міокарда додавали свіже середовище виділення. Після третього циклу кардіоміоцити відмивали центрифугуванням у буфері при 3000 g. Кількість живих і загиблих клітин визначали за допомогою 0,2%-го розчину трипанового синього. Принцип зазначеного методу полягає в тому, що останній не здатен проникати крізь непошкоджену мембрану клітин і відповідно

зафарбовує останні лише із зруйнованою мембраною, тобто загиблі.

Для культивування клітини розміщували на скельця, покриті 2%-м розчином желатину, зі щільністю 180000 на 1 см². Культивування проводили протягом однієї доби у живильному середовищі такого складу: середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище 199 (співвідношення DMEM/199 – 4 : 1), теляча сироватка – 15 %, Na₂CO₃ – 4,2 ммоль/л, НЕРЕС – 15 ммоль/л та антибіотики (стрептоміцин – 100 мкг/мл, гентаміцин – 0,05 мг/мл, пеніцилін – 100 ОД/мл) при 37°C у газовому середовищі – 5% CO₂ та 95 % атмосферного повітря.

Аноксію моделювали аерацією клітин безкисневою газовою сумішшю (5 % CO₂ та 95 % Ar) упродовж 30 хв з наступною зміною живильного середовища та культивуванням клітин за вихідних умов протягом 60 хв – реоксигенація.

Кількість живих, некротичних та апоптотичних клітин оцінювали цитологічно за допомогою забарвлення кардіоміоцитів біс-бензимідом (Hoechst 33342) і йодидом пропідіуму в однаковій концентрації – 8,75 мкмоль/л. Перший з них проникає через непошкоджену мембрану клітини та забарвлює ядерний хроматин, що дає змогу відокремити живі та апоптотичні клітини. При цьому останні мають фрагментовані та пікнотичні ядра. Йодид пропідіуму не проникає через непошкоджену плазматичну мембрану та забарвлює ядра клітин з пошкодженою плазмалею, тобто некротичні.

Флокалін розчиняли в диметилацетаміді (5 мг : 0,1 мл) та додавали в середовище інкубації в дозі 5 та 20 мкмоль/л за 2 хв до початку аноксії. Як контроль на дію розчинника в окремій серії експериментів в середовище інкубації додавали диметилацетамід у дозах, що відповідали введеним разом з флокаліном. Після цього проводили звичайне цитологічне дослідження за допомогою барвників біс-бензимідину (Hoechst 33342) і йодиду пропідіуму.

Отримані результати обробляли математично методом варіаційної статистики за

допомогою комп'ютерної програми Origin 7.0. Достовірність результатів визначали за критерієм t Стьюдента. Значення $P < 0,05$ розглядали як статистично достовірні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При відтворенні експериментальної аноксії–реоксигенації в культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів відбуваються патологічні процеси, які спричиняють активацію некрозу та апоптозу. Відповідно до цього зменшується співвідношення живих клітин до некротичних та апоптотичних (таблиця, рисунок). Так, кількість живих кардіоміоцитів порівняно з контролем зменшувалася на $15,88 \pm 1,83$ % ($n=9$, $P < 0,05$), а некротичних та апоптотичних збільшувалась у 2,83 раза ($n=9$, $P < 0,05$) та на $55,56 \pm 4,85$ % ($n=9$, $P < 0,05$) відповідно.

Вивчаючи антиішемічні ефекти нового вітчизняного фторвмісного кардіопротектора флокаліну ми досліджували дію двох доз: 5 та 20 мкмоль/л, які є близькими до середньо-ефективних доз: перша – активації K_{ATP} -каналів та, друга – напівмаксимального блокування високопорогових кальцієвих каналів і сильної активації K_{ATP} -каналів [23, 24].

Виявлено, що додавання в середовище інкубації флокаліну в меншій дозі призводило до зсуву співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин у бік живих, відсоток яких практично не відрізнявся від контрольних значень (див. таблицю) та був вищим на $19,0 \pm 1,82$ % ($n=9$, $P < 0,05$) щодо експериментів з відтворенням аноксії–реоксигенації

без введення флокаліну. Таким чином, використання дози флокаліну, що є середньо-ефективною для активації K_{ATP} -каналів та практично не має безпосереднього впливу на високопорогові кальцієві та потенціалзалежні натрієві канали неонатальних кардіоміоцитів [23, 24], запобігає збільшенню загальної смертності клітин під час аноксії–реоксигенації. Водночас спостерігається деяка зміна у механізмах загибелі клітин.

Додавання флокаліну в дозі 5 мкмоль/л за 2 хв до аноксії–реоксигенації зменшувало некроз та апоптоз у 2,06 та 2,43 раза ($n=9$, $P < 0,05$) відповідно. Проте, якщо при активуванні K_{ATP} -каналів створення аноксії–реоксигенації все ж таки посилювало процеси некрозу порівняно з контролем (у 1,37 раза), то апоптоз флокалін пригнічував настільки, що кількість апоптотичних кардіоміоцитів була на $36,07 \pm 4,02$ % ($n=9$, $P < 0,05$) нижчою, ніж у контрольних експериментах. Тобто він повністю запобігав розвитку апоптозу, що був індукований аноксією–реоксигенацією неонатальних кардіоміоцитів (див. рисунок).

Ці результати збігаються з ефектами іншого фторвмісного активатора K_{ATP} -каналів – діазоФм в аналогічних експериментах [2, 9], який зменшував кількість некротичних та апоптотичних клітин на 44,8 % та у 2,61 раза відповідно. При цьому число живих клітин збільшувалося на 16 %. Слід зауважити, що активація K_{ATP} -каналів за допомогою діазоФм та діазоксиду перед ішемією–реоксигенацією неонатальних кардіоміоцитів, як і в нашому випадку з флокаліном, практично

Вплив активації K_{ATP} -каналів флокаліном на співвідношення (%) живих, некротичних та апоптотичних клітин в культурі неонатальних кардіоміоцитів під час аноксії–реоксигенації

Умови експерименту	Живі клітини	Некротичні клітини	Апоптотичні клітини
Контроль ($n=8$)	$88,04 \pm 0,96$	$5,75 \pm 0,81$	$6,21 \pm 0,48$
Аноксія–реоксигенація ($n=9$)	$74,06 \pm 1,97$ *	$16,27 \pm 1,43$ *	$9,66 \pm 1,35$ *
Аноксія–реоксигенація і введення флокаліну в дозі			
5 мкмоль/л ($n=9$)	$88,13 \pm 0,99$ **	$7,90 \pm 0,81$ **	$3,97 \pm 0,43$ ***
20 мкмоль/л ($n=5$)	$75,26 \pm 3,58$ *	$17,06 \pm 3,34$ *	$7,68 \pm 2,28$

* $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно з аноксією–реоксигенацією.

повністю запобігала розвитку апоптозу, що був нею індукований [2,9].

Відомо, що механізмами, які призводять до пригнічення апоптотичних процесів при активації $K_{ATФ}$ -каналів є зменшення перевантаження матриксу мітохондрій іонами кальцію та пригнічення утворення вільних радикалів, попередження відкриття мітохондріальної пори та інгібування звільнення цитохрому с, активація білка BCL₂ та інгібування білка Вах, що індукує апоптоз [3, 6, 9, 10, 18]. Цілком вірогідно, що у випадку з флокаліном можуть існувати ще і інші механізми, що пригнічують загибель клітин:

- зниження деградації пуринових нуклеотидів – АТФ, ГТФ і вмісту неорганічного фосфату (зменшення апоптозу та некрозу) [3, 4, 11, 16, 19];

- підвищення конститутивного та пригнічення індукційного синтезу оксиду азоту (зменшення апоптозу та некрозу) [1, 3, 9, 14, 20, 21];

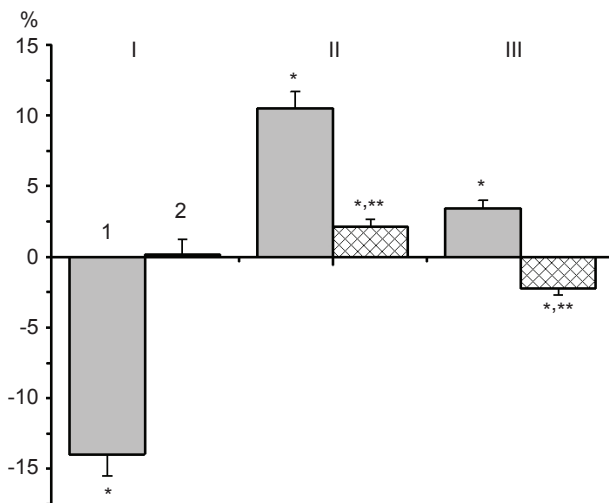
- обмеження генерації вільних радикалів кисню та азоту (зменшення апоптозу та некрозу) [3, 6, 9, 17];

- зменшення активності фосфоліпази А₂, запобігання руйнування клітинної мембрани та збереження структури внутрішньоклітинних органел (зменшення некрозу) [3, 7, 9, 25];

- зменшення активності ліпоксигенази (зменшення некрозу) та ксантинооксидази (зменшення апоптозу та некрозу) [3, 9, 17];

- збільшення активності гемоксигенази та утворення СО, дія якого на апоптоз подібна до впливу оксиду азоту (зменшення апоптозу) [3, 9, 12, 13].

При використанні флокаліну у більшій дозі – 20 мкмоль/л, що призводить не лише до активації $K_{ATФ}$ -каналів, але і до напівмаксимального блокування високопорогових кальцієвих каналів, захисту кардіоміоцитів від аноксії–реоксигенації не відбувалося (див. таблицю). Кількість живих клітин практично не відрізнялася від експериментів з аноксією–реоксигенацією без флокаліну та була зменшеною порівняно з контролем на $14,52 \pm 2,06$ % (n=5, P<0,05); при аноксії–реоксигенації без флокаліну – 15,88 %. Відсоток некротичних клітин порівняно з контролем зростав у 2,97 рази (n=5, P<0,05), що достовірно не відрізнялося від експериментів з аноксією без флокаліну. Водночас навіть без ознак кардіопротекції (за співвідношенням живих клітин), у разі дози флокаліну 20 мкмоль/л також спостерігається певна тенденція до зменшення апоптотичних процесів за аноксії–реоксигенації в культурі



Залежність змін кількості живих (I), некротичних (II) та апоптотичних (III) клітин у культурі неонатальних кардіоміоцитів під час аноксії–реоксигенації від дії флокаліну (5 мкмоль/л): 1 – аноксія–реоксигенація, 2 – введення флокаліну та наступна аноксія–реоксигенація. *P<0,05 порівняно з контролем; **P<0,05 порівняно з аноксією–реоксигенацією

неонатальних кардіоміоцитів. Незважаючи на те, що відсоток апоптотичних клітин порівняно з контролем зростав на $23,67 \pm 12,06$ %, проте він був менший, ніж в експериментах з аноксією–реоксигенацією без флокаліну на $20,50 \pm 3,97$ % ($n=5$, $P<0,05$). Виходячи зі співвідношення живі–некротичні–апоптотичні клітини, можна зробити висновок, що це відбувається внаслідок деякого збільшення живих і некротичних клітин (див. таблицю). Відсутність кардіопротекторних ефектів флокаліну в дозі 20 мкмоль/л підтверджує наші попередні висновки, отримані *in vitro* та *in vivo* про обережний підхід до дозування активаторів K_{ATP} -каналів при використанні в терапевтичних цілях. Останнє може бути наслідком як досить сильної активації калієвих каналів, та відповідно, пригнічення збудливості кардіоміоцитів і метаболічних процесів, так і відкривання перших та інгібування високопорогових кальцієвих каналів і, відповідно, суттєвого зменшення вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} та порушення метаболізму ще до аноксії–реоксигенації.

Розчинник флокаліну диметилацетамід у використаних в експериментах дозах не мав впливу на культуру неонатальних кардіоміоцитів.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що в дозі 5 мкмоль/л флокалін змінював співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин в бік перших, відсоток яких практично не відрізнявся від контрольних значень.

2. Активування K_{ATP} -каналів зменшувало процеси некрозу у два рази та повністю запобігало розвитку апоптозу, що був індукований аноксією–реоксигенацією неонатальних кардіоміоцитів.

3. У дозі 20 мкмоль/л, яка призводить не лише до активації K_{ATP} -каналів, але і до напівмаксимального блокування високопорогових кальцієвих каналів, ознак кардіопротекції при аноксії–реоксигенації кардіоміоцитів не виявило.

**Р.Б. Струтинский, В.С. Нагибин,
Н.А. Струтинская, О.Р. Янчий, А.А. Мойбенко**

ВЛИЯНИЕ ФЛОКАЛИНА НА РАЗВИТИЕ АПОПТОЗА И НЕКРОЗА ПРИ АНОКСИИ–РЕОКСИГЕНАЦИИ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ

В опытах на культуре изолированных неонатальных кардиомиоцитов исследовали влияние нового кардиопротектора флокалина на выживание клеток при аноксии–реоксигенации, развитие некроза и апоптоза, а также участие в вышеупомянутых процессах активации ATP -зависимых калієвих (K_{ATP}) и ингибирования высокопороговых кальциевых каналов. Флокалин вводили в среду инкубации в дозе 5 и 20 мкмоль/л за 2 мин до аноксии (30 мин) и следующей реоксигенации (60 мин). Эти дозы являются близкими к полумаксимальным: первая – активации K_{ATP} -каналов, вторая – полумаксимального блокирования высокопороговых кальциевых каналов и сильной активации первых. Показано, что в дозе 5 мкмоль/л он вызывает смещение соотношения живых, некротических и апоптотических клеток в сторону живых, процент которых практически не отличался от контрольных экспериментов без аноксии–реоксигенации. Активация K_{ATP} -каналов уменьшала процессы некроза в два раза и полностью предотвращала развитие апоптоза, индуцируемого аноксией–реоксигенацией неонатальных кардиомиоцитов. Флокалин подавлял апоптоз неонатальных кардиомиоцитов настолько, что он был на 36 % меньше, чем в контроле. При добавлении в среду инкубации флокалина в дозе 20 мкмоль/л эффекта кардиопротекции не обнаружено. Последнее может быть следствием как достаточно сильной активации калієвих, так и следствием обоих факторов – активации калієвих и ингибирования высокопороговых кальциевых каналов. И, соответственно, существенного уменьшения содержания внутриклеточного Ca^{2+} и нарушения метаболіческих процессов еще до моделирования аноксии–реоксигенации. Таким образом, умеренная активация K_{ATP} -каналов флокалином значительно уменьшает процессы некроза и полностью предотвращает апоптоз у неонатальных кардиомиоцитов, индуцируемых аноксией–реоксигенацией. Ключевые слова: K_{ATP} -каналы, апоптоз, некроз, аноксия–реоксигенация, неонатальные кардиомиоциты, флокалин

**R.B. Strutyński, V.S. Nagibin, N.A. Strutyńska,
O.R. Ianchii, A.A. Moibenko**

INFLUENCE OF FLOCALIN ON DEVELOPMENT OF APOPTOSIS AND NECROSIS AT ANOXIA-REOXYGENATION OF CULTURE RATS NEONATAL CARDIOMYOCYTES

The influence of the new cardioprotector floccalin was investigated on the culture of rat's neonatal cardiomyocytes

during anoxia-reoxygenation modelling. The mechanisms of apoptosis and necrosis were investigated under influence of ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels activation and in conditions of blocking of the L-type calcium (VGCCs) channels. Flocalin was added in the culture medium in the dose 5 and 20 μM at 2 minutes before anoxia (30 minutes) and following reoxygenation (60 minutes). These doses are near to: the first dose means the opening of K_{ATP} channels and the second one means the IC_{50} block of VGCCs. It is discovered that in dose 5 μM of flocalin drew the change of correlation of living, necrotizing and apoptizing cells drew side-shifting living. The number of live cells was almost the same like in control (experiments without anoxia-reoxygenation modelling). The opening of K_{ATP} channels decreases necrosis in two times and fully prevented development of apoptosis which was induced anoxia-reoxygenation modelling. Flocalin depressed the apoptosis of neonatal cardiomyocytes so that he was on to 36% less than in control group (without anoxia-reoxygenation). But in the high dose (20 μM) that provokes not only K_{ATP} channels opening but also IC_{50} block of VGCCs cardioprotection was not detected after modelling of anoxia-reoxygenation. The last can be investigation both enough strong activating of the potassium channels and by investigation of both factors are opening of potassium and inhibition of VGCCs channels and, accordingly, substantial diminishing of level of intracellular Ca^{2+} and violation of metabolic processes yet to anoxia-reoxygenation. Thus, small doses of flocalin, that induce moderate opening of K_{ATP} channels significantly decrease the number of necrotic and apoptotic cells in culture of rat neonatal cardiomyocytes induced by anoxia-reoxygenation.

Key words: ATP-sensitive potassium channels, apoptosis, necrosis, anoxia-reoxygenation, rat neonatal cardiomyocytes, flocalin.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мохорт М.А., Шаламай А.С. Організація заводського виготовлення препарату Флокалін - нового вітчизняного міотропного спазмолітика і кардіопротектора // Наука та інновації. – 2009. – 5, №1. – С.80–84.
2. Нагібін В.С., Досенко В.Є., Пивовар С.М., Мойбенко О.О., Ягупольський Л.М. Фторований аналог діазоксиду попереджає апоптоз неонатальних кардіоміоцитів під час аноксії-реоксигенації // Фізіол. журн. – 2004. – 50, №3. – С.3–8.
3. Струтинський Р.Б., Коцюрuba А.В., Нешерет О.П., Ровенець Р.А., Мойбенко О.О. Зміни метаболізму в міокарді при ішемії-реперфузії та активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів // Там само. – 2012. – 58, №1. – С.13–26.
4. Струтинський Р.Б., Коцюрuba А.В., Нешерет О.П., Шиш А.М., Ровенець Р.А., Мойбенко О.О. Кардіопротекторні ефекти активації аденозинтрифосфатзалеж-

них калієвих каналів в експериментах *in vivo*: вплив на біохімічні параметри крові за умов ішемії-реперфузії міокарда // Там само. – 2009. – 55, №6. – С.12–19.

5. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Чебанов В. А., Горобець М. Ю. Моделювання промислового процесу виробництва препарату “Флокалін” та визначення його оптимально-ефективної дози для лікування захворювань серця // Наука та інновації. – 2013. – 9, №1. – С.55–63.
6. Струтинський Р., Мохорт М., Ягупольський Л., Мойбенко О. Флокалін - новий вітчизняний кардіопротектор // Вісн. фармакології та фармацевції. – 2010. – №3. – С.44–56.
7. Струтинський Р.Б., Пивовар С.М., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Кардіопротекторні ефекти флокаліну: відносна роль активації сарколемальних та мітохондріальних аденозинтрифосфатзалежних калієвих каналів // Фізіол. журн. – 2008. – 54, №6. – С.15–23.
8. Струтинський Р.Б., Французова С.Б., Ровенець Р.А., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Флокалін - новий вітчизняний кардіопротектор // Патологія. – 2008. – 5, №3. – С.22.
9. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца // Под редакцией Мойбенко А.А. – К.: Наук. думка, 2008. – 518 с.
10. Alizadeh A.M., Faghihi M., Khori V., Sohanaki H., Pourkhalili K., Mohammadghasemi F., Mohsenikia M. Oxytocin protects cardiomyocytes from apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rat heart: role of mitochondrial ATP-dependent potassium channel and permeability transition pore // Peptides. – 2012. – 36, №1. – P.71–77.
11. Bourguin A., Beck L., Khoshniat S., Wauquier F., Oliver L., Hue E., Alliot-Licht B., Weiss P., Guicheux J., Wittrant Y. Inorganic phosphate stimulates apoptosis in murine MO6-G3 odontoblast-like cells // Arch Oral Biol. – 2011. – 56, №10. – P.977–983.
12. Brouard S., Berberat P.O., Tobiasch E., Seldon M.P., Bach F.H., Soares M.P. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis // J. Biol. Chem. – 2002. – 277, № 20. – P.17950–17961.
13. Coito A.J., Buelow R., Shen X.D., Amersi F., Moore C., Volk H.D., Busuttill R.W., Kupiec-Weglinski J.W. Heme oxygenase-1 gene transfer inhibits inducible nitric oxide synthase expression and protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia-reperfusion injury // Transplantation. – 2002. – 74, №1. – P.96–102.
14. Das A., Xi L., Kukreja R.C. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling // J. Biol. Chem. – 2005. – 280, №13. – P.12944–12955.
15. Flagg T.P., Nichols C.G. Sarcolemmal K_{ATP} channels: what do we really know? // J. Mol. and Cell Cardiol. – 2005. – 39. – P.61–70.
16. Halestrap A.P., Clarke S.J., Javadov S.A. Mitochondrial

- permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection // *Cardiovascular Res.* – 2004. – **61**, №3. – P.372–385.
17. Li P.F., Dietz R., von Harsdorf R. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells // *Circulation.* – 1997. – **96**, №10. – P.3602–3609.
 18. Liu D., Lu C., Wan R., Auyeung W.W., Mattson M.P. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* – 2002. – **22**, № 4. – P.431–443.
 19. Mansfield K., Pucci B., Adams C.S., Shapiro I.M. Induction of apoptosis in skeletal tissues: phosphate-mediated chick chondrocyte apoptosis is calcium dependent // *Calcif Tissue Int.* – 2003. – **73**, №2. – P.161–172.
 20. Patten R.D., Denofrio D., El-Zaru M., Kakkar R., Saunders J., Celestin F., Warner K., Rastegar H., Khabbaz K.R., Udelson J.E., Konstam M.A., Karas R.H. Ventricular assist device therapy normalizes inducible nitric oxide synthase expression and reduces cardiomyocyte apoptosis in the failing human heart // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2005. – **45**, № 9. – P.1419–1424.
 21. Ramasamy R., Hwang Y.C., Liu Y., Son N.H., Ma N., Parkinson J., Sciacca R., Albala A., Edwards N., Szabolcs M.J., Cannon P.J. Metabolic and functional protection by selective inhibition of nitric oxide synthase 2 during ischemia-reperfusion in isolated perfused hearts // *Circulation.* – 2004. – **109**, № 13. – P.1668–1673.
 22. Reinecke H., Zhang M., Bartosek., Charles E.M. Survival, integration and differentiation of cardiomyocyte grafts // *Circulation.* – 1999. – **100**, №2. – P.193–202.
 23. Voitychuk O.I., Strutynskyi R.B., Moibenko O.O., Shuba Y.M. Effects of fluorine-containing opener of ATP-sensitive potassium channels, pinacidil-derivative flocalin, on cardiac voltage-gated sodium and calcium channels // *NSAP.* – 2012. – **385**, №11. – P.1095–1102.
 24. Voitychuk O.I., Strutynskyi R.B., Yagupolskii L.M., Tinker A., Moibenko O.O., Shuba Y.M. Sarcolemmal cardiac KATP channels as a target for the cardioprotective effects of the fluorine-containing pinacidil analogue flocalin // *Brit. J. Pharmacol.* – 2011. – **162**, №3. – P.701–711.
 25. Yagami T., Yamamoto Y., Kohma H., Nakamura T., Takasu N., Okamura N. L-type voltage-dependent calcium channel is involved in the snake venom group IA secretory phospholipase A2-induced neuronal apoptosis // *Neurotoxicology.* – 2013. – **35**. – P.146–153.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: ruslans@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до редакції 18.03.2013