

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

Ультроструктурні зміни в ізольованих кардіоміоцитах при моделюванні “стресу ендоплазматичного ретикулума”

Моделируя «стресс эндоплазматического ретикулума» (ЭР) с помощью его классического индуктора тапсигаргина были установлены специфические ультроструктурные признаки, сопоставление которых с изменениями при аноксии–реоксигенации и одновременном подавлении протеасомного протеолиза, аутофагии и апоптоза, позволяет сделать вывод о том, что они имеют общие, характерные для стресса ЭР, черты. Под влиянием тапсигаргина в части кардиомиоцитов наблюдалось скопление в околоядерной зоне митохондрий большого размера (так называемых гигантских митохондрий), внутренние мембраны которых в основном сохраняли свою структуру, однако в некоторых органеллах матрикс разрушен или повышенно конденсирован. Структура ЭР была близкой к норме, и только в отдельных локусах клеток отмечалось незначительное расширение его цистерн, что, с нашей точки зрения, является первым признаком стресса ЭР. В другой группе клеток тапсигаргин приводил к дегидратации и осмиофилии цитоплазмы, существенному уменьшению размеров и количества митохондрий, значительному расширению цистерн ЭР, частичной или полной дегрануляции этих органелл, которые часто образовывали вакуоли, наполненные электронно-плотным материалом. Кроме того, в этих клетках отмечалось накопление липофуцина и разрушение миофиламентов при сохранении целостности цитоплазматической мембраны. Одновременное подавление протеасомального протеолиза, аутофагии и апоптоза приводило к аналогичным ультроструктурным изменениям в кардиомиоцитах, но как показали исследования с применением флуоресцентных красителей для выявления апоптоза и некроза, целостность сарколеммы в этих опытах в большинстве клеток не сохранялась, что неизбежно приводит к некрозу. Проведенные исследования указывают на значение стресса ЭР в процессах гибели кардиомиоцитов при аноксии–реоксигенации, а также в условиях подавления протеасомального протеолиза, аутофагии и апоптоза.

ВСТУП

Ендоплазматичний ретикулум (ЕР) забезпечує у клітинах процеси синтезу, пост-трансляційної модифікації, фолдингу та транспорту мембранних і цитоплазматичних протеїнів [4, 10, 19]. За нормальних умов білки з порушенням третинної структури (протеїни з порушенням фолдингу, від англ. unfolded protein, UP) зазнають протеасомної деградації безпосередньо на поверхні ЕР, а вільні амінокислоти, що утворюються надалі, включаються до

біосинтезу нових протеїнів [6, 7, 17]. Таким чином, ЕР можна розглядати як органелу, в якій поєднано процеси контролю за якістю білків, що утворюються та інтенсивністю їх деградації. Порушення функціонування ЕР, що супроводжується накопиченням в його просвіті UP, спричинюється факторами різної природи (харчова депривація, гіпоксія, ішемія–реперфузія, вільнорадикальне окиснення, гліколізування, порушення мобілізації кальцію тощо). Неспецифічний характер ушкодження та відповіді на нього зумовили появу терміна “стрес

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

ЕР”, що об’єднує комплекс характерних біохімічних і генетичних змін, котрі відбуваються у клітинах, які зазнали впливу відповідних чинників [2, 6, 9–11, 15, 20]. При цьому морфологічні ознаки стресу ЕР практично невивчено. Молекулярний каскад, що забезпечує зв’язок між ЕР і геномом клітини, отримав назву – відповідь на накопичення протеїнів з порушенням фолдингу (від англ. *unfolded protein response*, UPR) [5]. Фосфорилування деяких протеїніназ (PERK, Ire 1, ATF6), утворення активної форми ядерного фактора каппаВ (від англ. NF- κ B), активація протеасомного та лізосомного (з утворенням аутофагосом) протеолізу (так званої системи ERAD – деградація, асоційована з ЕР) вресі-решт призводить до активації транскрипції генів молекулярних шаперонів (GRP78 та GRP94) і гена CHOP, а також до прискорення деградації змінених протеїнів і пригнічення синтезу нових білків [2–4, 6, 8, 10, 11, 19]. Цей процес має захисний, пристосувальний характер, даючи змогу клітинам нівелювати порушення, пов’язані зі стресом ЕР. Проте, якщо процеси синтезу, фолдингу, транспорту та деградації білків не нормалізуються, в клітині розвивається апоптоз через пряму активацію протеаз (специфічної для ЕР каспази 12), низки протеїніназ (Ask1, JNK, p38 MAPK) і транскрипційних факторів (GADD153, ATF4, ATF6, XBP-1) [4, 5, 8, 9, 11, 13–15, 20].

У літературі активно обговорюється питання про роль протеасомного протеолізу (першої системи ERAD) у розвитку стресу ЕР. З одного боку, показано, що останній спричинює активацію системи ERAD за участі протеасоми, а з іншого, доведено, що інгібітори протеасоми є його індукторами [5, 6]. У наших попередніх працях показано, що аноксія–реоксигенація кардіоміоцитів призводить до змін активності протеасоми (зменшення під час аноксії та часткове відновлення за подальшої реоксигенації) [22, 23]. Також нами вперше встановлено факт активації аутофагії (другої

системи ERAD) при моделюванні аноксії–реоксигенації кардіоміоцитів [1, 21, 23]. Отже, питання про взаємодію цих протеолітичних систем так само як і ультраструктурні зміни при розвитку стресу ЕР різного генезу є досить цікавими і практично невивченими. Крім того, в наших попередніх дослідженнях було показано, що блокада запрограмованих видів клітинної смерті (апоптозу та аутофагії) спричинює підвищення некротичної загибелі клітин під дією різних ушкоджуючих факторів [21]. Зважаючи на універсальне значення стресу ЕР, ми висунули гіпотезу про зв’язок між розвитком вказаного вище нетипового некрозу та процесами, що його супроводжують. У зв’язку з цим мета нашого дослідження – визначити ультраструктурні особливості стресу ЕР за умов впливу тапсигаргіну, який вважається класичним його індуктором [9, 10], а також дослідити наявність стресу ЕР при аноксії–реоксигенації культивованих кардіоміоцитів та одночасного пригнічення систем, які мають значення при UPR, а саме протеасомного протеолізу, аутофагії та апоптозу.

МЕТОДИКА

Досліди було проведено на первинній культурі неонатальних кардіоміоцитів, отриманих з міокарда шлуночків дводобових щурів ферментативним гідролізом [25]. Кількість живих і загиблих клітин (85–95 та 5–15 % відповідно) визначали за допомогою 0,2%-го розчину трипанового синього, що проникає тільки крізь ушкоджену мембрану некротичних клітин і забарвлює їх. Клітини розміщували на скельця зі щільністю 120 000 на 1 см². Культивування проводили при 37°C у газовому середовищі – 5 % CO₂ та 95 % атмосферного повітря протягом 1–2 діб [21, 22]. Стрес ЕР відтворювали інкубацією культури клітин із тапсигаргіном (3 мкмоль/л) протягом 3 год [6]. Указаний препарат вважається класичним індуктором стресу

EP і реалізує свою дію передусім внаслідок пригнічення активності кальцієвої АТФази в мембранах EP, а також може впливати на транспорт деяких іонних каналів (HERG) на поверхню клітини. Тапсигаргін, за деякими даними, є інгібітором транспорту протеїнів, так само як monensin, brefeldin A, tunicamycin [2, 9, 26]. Аноксію–реоксигенацію моделювали за допомогою аерації клітин безкисневою газовою сумішшю такого складу: 5 % CO₂ та 95 % Ar протягом 30 хв із наступною заміною живильного середовища та культивуванням клітин за вихідних умов протягом 60 хв. В інших експериментах в культуру кардіоміоцитів вносили інгібітор протеасоми кластолактацистин β-лактон (10 мкмоль/л), інгібітор аутофагії N-3-метиладенин (100 ммоль/л) та інгібітор каспаз N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al (DEVD) (100 мкмоль/л). Кожна експериментальна група складалася з 9 окремих дослідів. Кількість живих, некротичних та апоптотичних клітин оцінювали цитологічно за допомогою забарвлення кардіоміоцитів біс-бензimidом (Hoechst 33342) і пропідіум йодидом в однаковій концентрації 8,75 мкмоль/л. Перший з них проникає через непошкоджену мембрану клітин і забарвлює ядерний хроматин, візуалізуючи таким чином живі й апоптотичні клітини (останні мають фрагментовані та пікнотичні ядра). Пропідіум йодид не може проникати через плазматичну мембрану та забарвлює лише ядра клітин з пошкодженою плазмалею, тобто некротичних. Для виявлення аутофагічних вакуолей застосовували специфічний барвник – монодансилкадаверин у концентрації 50 мкмоль/л (прижиттєве забарвлення клітин) [27]. Для електронно-мікроскопічних досліджень використовували рутинний метод заливки культивованих кардіоміоцитів у епоксидні смоли з фіксацією зразків в 2,5%-му глютаральдегіді на какодилатному буфері та постфіксацією 1%-ю осміевою кислотою. Ультратонкі зрізи контрастувалися в уранілацетаті та цитраті свинцю.

Матеріал вивчали на електронному мікроскопі Jem – 100 CX (Японія).

Результати експериментів обробляли методом варіаційної статистики з використанням критерію t Стьюдента та критерію χ^2 за допомогою статистичних програм Origin 7.0 та Excel 2000. Статистично вірогідними вважалися результати, для яких $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ультроструктурні зміни в ізольованих неонатальних кардіоміоцитах при індукції стресу EP тапсигаргіном. Тапсигаргін уже через 3 год інкубації призводить до суттєвих ультроструктурних змін у кардіоміоцитах. При електронно-мікроскопічних дослідженнях виявлялися клітини, які знаходилися на різних стадіях пошкодження. Це дало змогу виділити три групи клітин із певним комплексом ультроструктурних відхилень від норми. В кардіоміоцитах першої групи (рис. 1) спостерігалось підвищення осміофільності та часткова дегідратація цитоплазми, порушення просторового співвідношення ядро/цитоплазма: об'єм цитоплазми зменшувався відносно такого ядра. Скорочувальний апарат в основному зберігався, частина мітохондрій знаходилася вздовж міофіламентів, проте в більшості клітин цієї групи в окремих локусах цитоплазми, найчастіше в навколоядерній зоні, спостерігалось скупчення мітохондрій великих розмірів, що супроводжувалося накопиченням ліпофусцину. Внутрішні мембрани мітохондрій здебільшого зберігали свою структуру, проте в деяких органелах матрикс був зруйнованим або підвищено конденсованим. Ядра містили дифузно розташований хроматин та мали чітко окреслену ядерну мембрану. Структура EP в основному була близькою до норми, зберігалася гранульованість і лише в окремих ділянках клітин відмічалось незначне розширення його цистерн, що, на нашу думку, є першими проявами стресу EP.

Друга група кардіоміоцитів при впливі

тапсигаргіну (рис. 2) характеризувалася частковим руйнуванням міофіламентів, котрі зберігалися здебільшого на периферії клітин і часто втрачали смугастість і помітним розширенням цистерн ЕР, який в окремих ділянках втрачав гранульованість. Кількість кардіоміоцитів, які містили гігантські мітохондрії, була меншою, ніж у першій групі, проте спостерігалися дрібні, дуже витягнуті, дезорієнтовані в цитоплазмі мітохондрії, з ознаками деградації внутрішніх мембран в окремих з них (в тому числі з утворенням мієліноподібних структур). Ядра в цій групі клітин часто втрачали форму та чіткі контури ядерної мембрани,

однак хроматин мав дифузне розташування.

Третя група кардіоміоцитів при впливі тапсигаргіну (рис. 3) відображала поглиблення патологічного процесу, що проявлялося в значному зменшенні об'єму клітин, дегідратації та осміофілії цитоплазми, повній відсутності міофіламентів, зменшенні кількості мітохондрій (переважно поодинокі дрібні та витягнутої форми) та наявності вакуолей, що утворилися частково або повністю дегранульованим ЕР, деякі з яких містили електронно-щільні включення. Також відмічалася незначна конденсація хроматину.

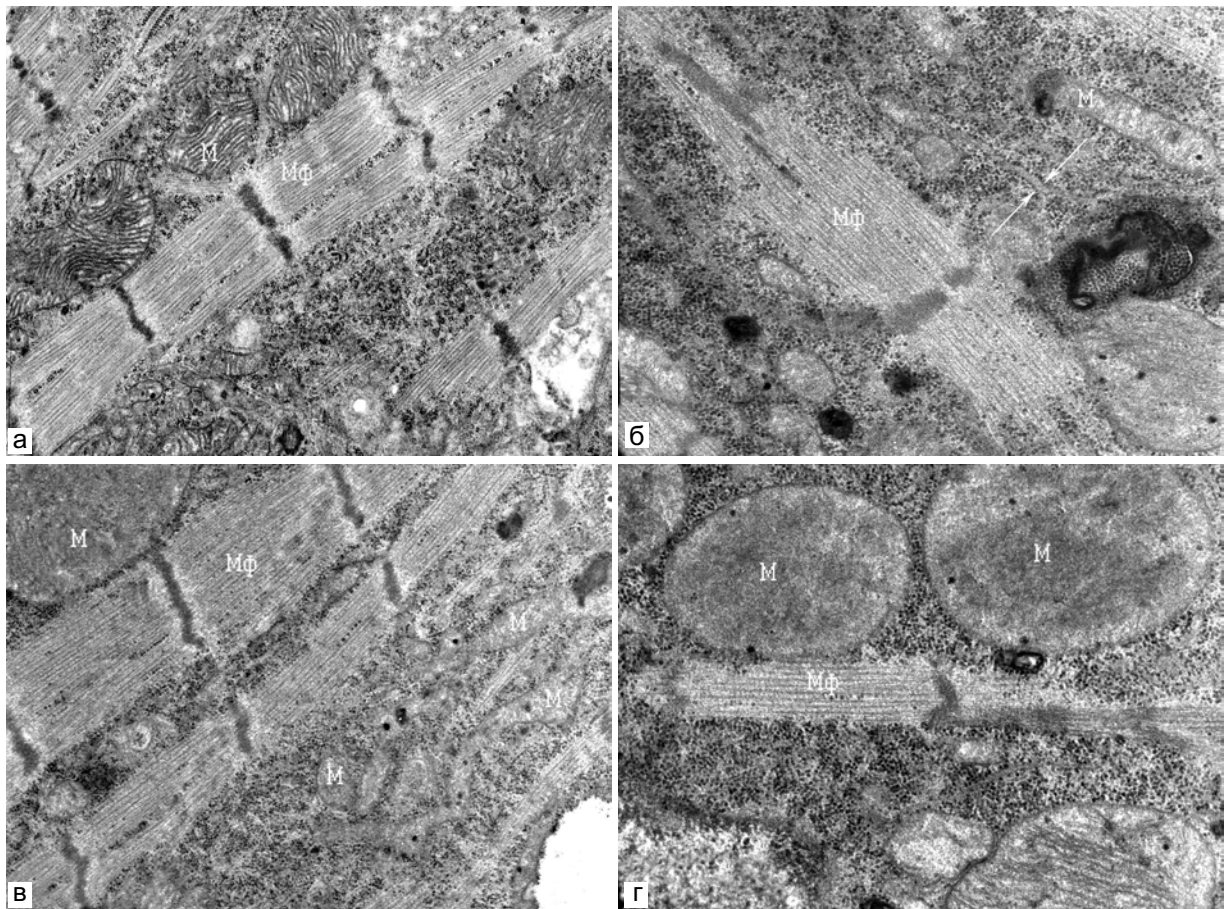


Рис. 1. Ультраструктурні зміни в кардіоміоцитах, першої групи клітин при впливі тапсигаргіну: а – контроль. Архітектоніка клітини збережена, вздовж міофіламентів розташовані мітохондрії нормальних розмірів; б, в, г – вплив тапсигаргіну. Наявні міофіламенти (МФ), мітохондрії із зменшенням розмірів і кількості (М), розширення ендоплазматичного ретикулула в окремих локусах клітин (†) (в). Г – ділянка кардіоміоцита, яка містить гігантські мітохондрії. Зб. X14 000

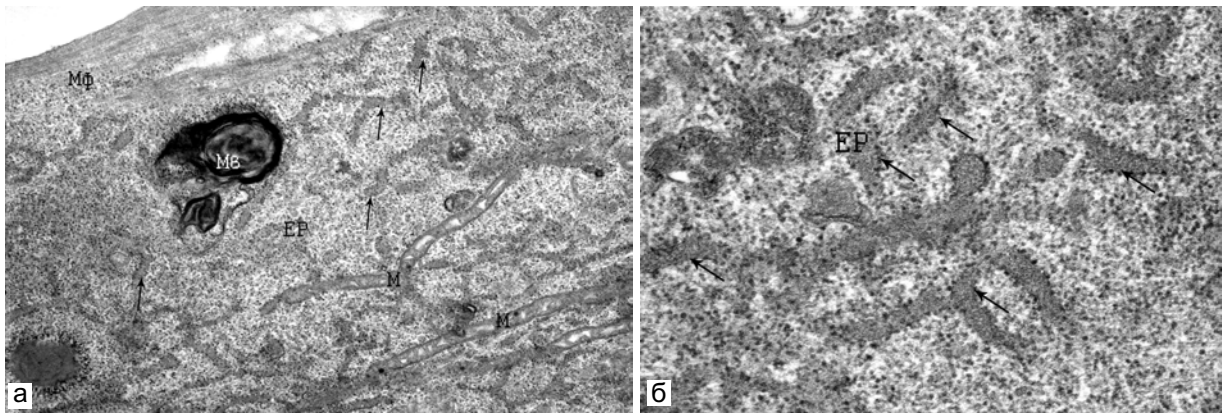


Рис. 2. Ультраструктурні зміни в кардіоміоцитах, які показують поглиблення патологічного процесу (друга група клітин) при впливі тапсигаргіну: а – ділянка ізолюваного кардіоміоцита, яка містить зменшені, характерно витягнуті мітохондрії (М) з ознаками деградації крист, розширені цистерни частково дегранульованого ендоплазматичного ретикулума (ЕР ↑), заповнені електронно-щільним гомогенним матеріалом, мієліноподібні вклучення (МВ), наявність яких свідчить про дегенеративні процеси внутрішньоклітинних мембран, а також залишки зруйнованих міофіламентів (МФ) на периферії клітини. Зб. X10000; б – фрагмент цитоплазми кардіоміоцита з розширеним ЕР (↑). Зб. X27000

Таким чином, на всіх стадіях розвитку патологічного процесу, в усіх групах клітин при впливі тапсигаргіну характерним була наявність змін в ультраструктурі мітохондрій, проте перша та друга групи характеризувалися скупченням гігантських мітохондрій, тоді як у третій групі кардіоміоцитів спостерігалися поодинокі, значною мірою зменшені в об'ємі, витягнуті мітохондрії з пошкодженням матриксу. Ці зміни супро-

воджувалися накопиченням ліпофусцину в усіх трьох групах клітин.

У тих кардіоміоцитах, де зберігалися міофіламенти, розширення цистерн ЕР було менше вираженим. Клітини другої та особливо третьої групи містили значну кількість різних за розмірами вакуолей, частина з яких була утворена в результаті розширення цистерн ЕР, проте відсутність у більшості вакуолей характерного для

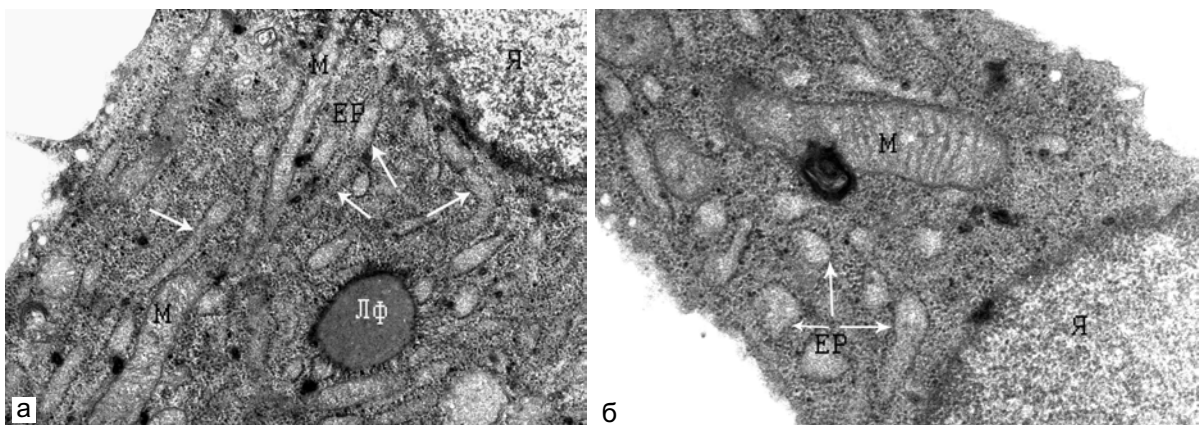


Рис. 3. Кардіоміоцити з ознаками значних ультраструктурних змін – виражена осміофілія та дегідратованість цитоплазми, повна відсутність міофіламентів, значне зменшення кількості мітохондрій (М), заповнені гомогенним матеріалом вакуолі, утворені дегранульованим ендоплазматичним ретикулумом (ЕР ↑), ЛФ – ліпофусцин, Я – ядро: а – Зб. X14000; б – Зб. X20000

аутофагії вмісту (частини цитоплазми, окремих органел), не дає змоги однозначно визначити їх призначення. Водночас більша частина клітин з ознаками осміофілії, дегідратованості (перша та друга групи кардіоміоцитів) містила конденсовані мітохондрії (незважаючи на те, що структура більшості органел, зокрема ядра, а в першій групі і міофіламентів, зберігалася), що вказує на можливість розвитку початкових стадій апоптозу. Це припущення підтверджується і тим, що, незважаючи на суттєві ультраструктурні зміни, в переважній більшості кардіоміоцитів збері-

галася цілісність сарколеми (відсутність видимих дефектів цитоплазматичної мембрани та відсутність ознак, характерних для пошкодження сарколеми, а саме – набряку мітохондрій, цитоплазми тощо).

Ультраструктурні ознаки стресу ЕР в ізольованих неонатальних кардіоміоцитах при аноксії–реоксигенації. В експериментах з відтворенням аноксії–реоксигенації ізольованих неонатальних кардіоміоцитів у частині клітин виявлялися зміни, що відмічалися вже на етапі аноксії (рис. 4,а,б), які можуть вказувати на розвиток стресу ЕР. Зокрема, зміни кількості та якості

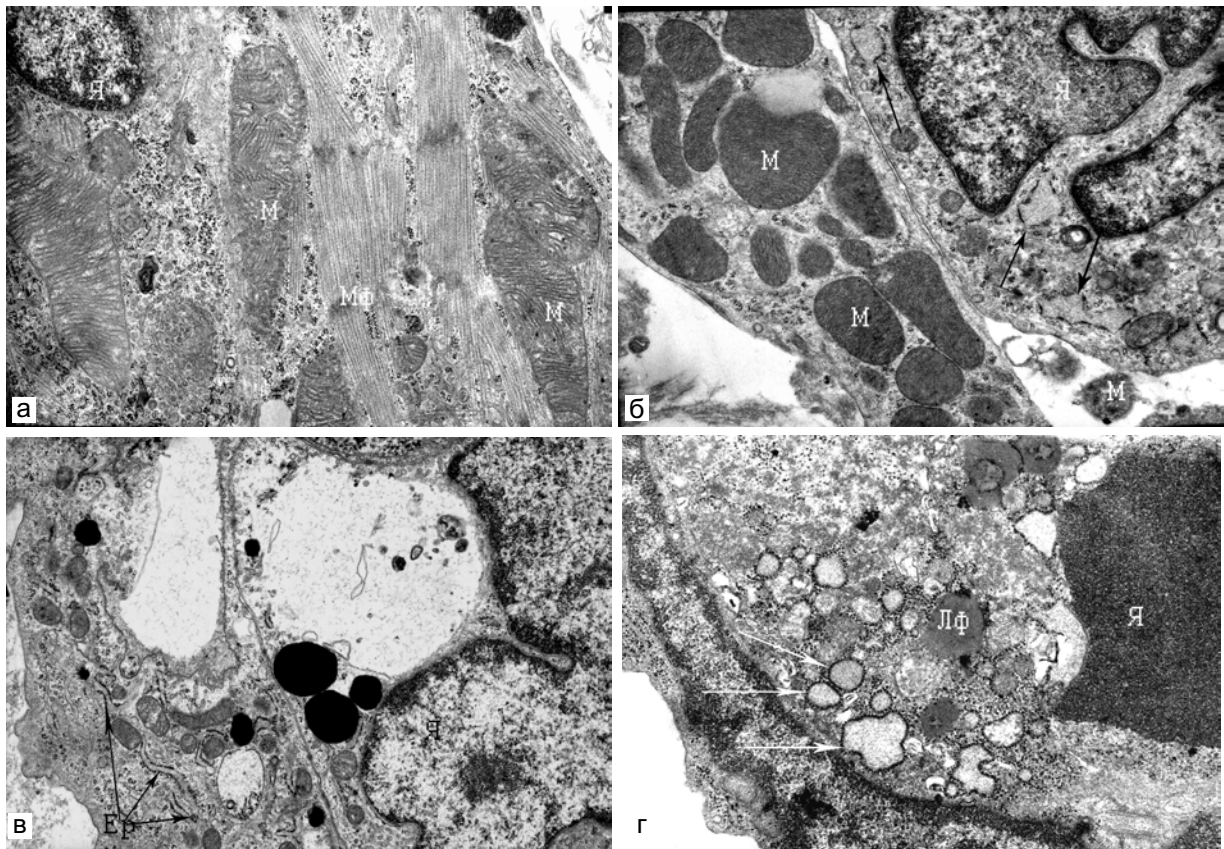


Рис. 4. Кардіоміоцити за умов аноксії–реоксигенації. Різною мірою ушкоджені клітини містять ознаки стресу ендоплазматичного ретикулула (ЕР) в динаміці його розвитку (спостерігається відповідність із змінами в описаних групах клітин за умов впливу тапсигаргіну): а та б – аноксія протягом 0,5 год. Характерне збільшення розмірів мітохондрій (М), розширення ЕР в окремих ділянках кардіоміоцитів. Зб. X10000 та X8000 відповідно; в та г – відображають поглиблення процесу за умов аноксії–реоксигенації, а саме зникнення міофіламентів (МФ), зменшення кількості мітохондрій і значне зменшення їх розмірів, виражене розширення ЕР аж до утворення вакуолей, наповнених гомогенним матеріалом, накопичення ліпофусцину (ЛФ), Я – ядро. Зб. X8000 та X14000 відповідно

мітохондрій – накопичення в окремих локусах гігантських мітохондрій, загальне зменшення кількості та розмірів цих органел в деяких кардіоміоцитах. Також ми спостерігали характерне розширення цистерн ЕР, наповнених гомогенним матеріалом, а в окремих клітинах – утворення вакуолей гранульованим або частково дегранульованим ЕР (див. рис. 4,в,г). Описані зміни часто асоціювалися з мієліноподібними фігурами та ліпофусцином, а також великою кількістю аутофагічних вакуолей з характерним вмістом (див. рис. 4,в). Таким чином, є підстави вважати, що аноксія та реоксигенація ізольованих неонатальних кардіоміоцитів також супроводжується розвитком стресу ЕР, що, можливо, на ранніх етапах патологічного процесу сприяє запуску механізмів, спрямованих на виживання клітин, зокрема активації протеасомного й аутофагічного шляхів деградації білків та ушкоджених компонентів клітин. Проте, з огляду на те, що як аноксія, так і реоксигенація призводять до змін гомеостазу багатьох систем клітини, що унеможлиблює відновлення нормального функціонування ЕР через запуск механізмів UPR, його стрес може стати одним із тригерів запуску запрограмованих типів клітинної смерті при цій патології.

Ультраструктурні характеристики стресу ЕР в ізольованих неонатальних кардіоміоцитах за умов одночасного пригнічення протеасомного протеолізу, аутофагії та апоптозу. Дуже цікавим, на нашу думку, виявився той факт, що при коінкубації ізольованих неонатальних кардіоміоцитів з інгібіторами протеасоми (класто-лактацистин β -лактон), аутофагії (N-3-метиладеніном) та каспази 3 (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al, DEVD) ультраструктура кардіоміоцитів значною мірою нагадувала зміни, які ми спостерігали при індукції стресу ЕР тапсигаргіном. Особливо це стосується кардіоміоцитів, які можна віднести до першої та третьої груп. Так само, як і у разі

застосування тапсигаргіну, клітини знаходилися на різних стадіях пошкодження. Як видно з рис. 5, частина кардіоміоцитів містила збережені міофіламенти, достатню кількість мітохондрій, проте деякі з них мали ознаки набряку або деструкції внутрішніх мембран і/або значно більші розміри, ніж у нормі (див. рис. 5,а,б). ЕР переважно зберігав свою структуру, його цистерни в цій групі клітин були розширеними тільки в окремих локусах цитоплазми (див. рис. 5,в,г). Чітко контуровані ядра здебільшого містили дифузно розташований хроматин без ознак конденсації і лише в окремих клітинах виявлялася примембранна конденсація хроматину. Спостерігалися значний набряк апарату Гольджі та наявність активного везикулярного транспорту безпосередньо біля цих органел (див. рис. 5,б), а також окремі плями ліпофусцину та мієліноподібні структури (зміни, характерні для першої групи клітин у дослідах з тапсигаргіном).

Кардіоміоцити, що зазнали впливу інгібіторів протеолізу та апоптозу, зі зменшеним об'ємом цитоплазми, значними накопиченнями ліпофусцину, зменшенням кількості мітохондрій, дуже витягнутих, дезорієнтованих у просторі, з ознаками деградації внутрішніх мембран значною мірою нагадували клітини третьої групи кардіоміоцитів у дослідах з моделюванням стресу ЕР за допомогою тапсигаргіну (рис. 6,а). Міофіламенти практично були відсутніми. Більша частина об'єму клітин була заповнена розширеними цистернами ЕР з частковою або повною втратою гранулярності (див. рис. 6,а,б). Ядра в основному зберігали свою структуру без змін. Характерною відмінністю від попередньої серії експериментів на цій стадії патологічного процесу були ознаки деградації не тільки внутрішніх мембранних структур клітини, але й плазматичної мембрани (див. рис. 6,г).

Слід відмітити, що такі зміни в структурі кардіоміоцитів спостерігалися як при одно-

часному застосуванні двох, так і трьох інгібіторів, проте інгібітор каспаз в комбінації з пригніченням аутофагії та протеасомного протеолізу призводить до значного збільшення кількості кардіоміоцитів з вираженим ушкодженням.

Зіставляючи ультраструктурні зміни, викликані тапсигаргіном або одночасним застосуванням інгібіторів протеолізу та апоптозу, можна дійти висновку, що вони мають специфічні риси, характерні саме для стресу ЕР. Отже, за умов пригнічення протеасомного та лізосомного (аутофагічного) шляхів деградації протеїнів спосте-

рігаються ті самі зміни, як і при застосуванні класичного індуктора стресу ЕР тапсигаргіну. Ще більш вираженими ці патологічні зміни стають при додатковому впливі інгібітора апоптозу. Проте є і деякі відмінності, зокрема інгібування протеасомного протеолізу з одночасним пригніченням аутофагії та/або пригніченням каспаз не призводить до дегідратації цитоплазми та осміофілії у переважній більшості клітин (що яскраво виражено в третій групі кардіоміоцитів у серії дослідів індукції стресу ЕР тапсигаргіном). Також відсутні мітохондрії з конденсованим матриксом,

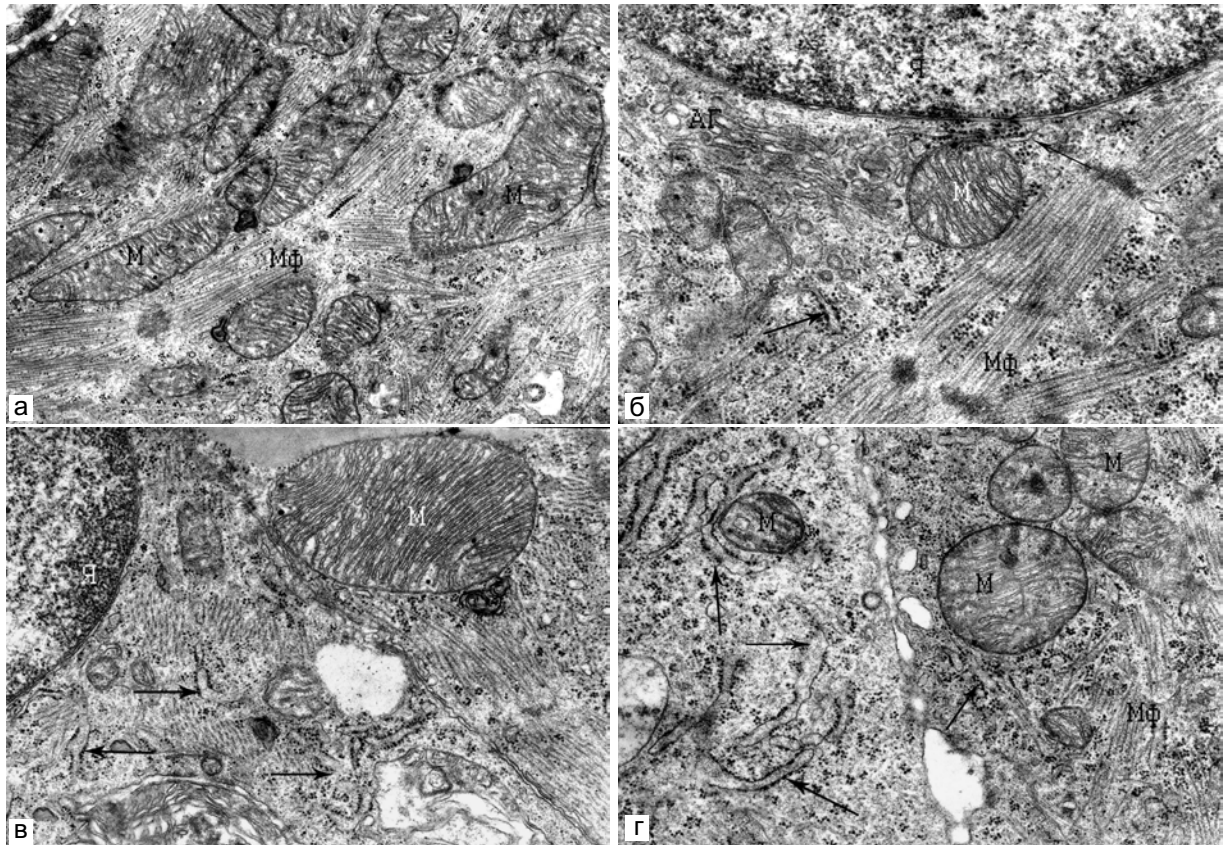


Рис. 5. Кардіоміоцити після коінкубації з інгібітором протеасоми (класто-лактацистин β-лактон), інгібітором аутофагії та інгібітором каспази 3, ультраструктурні зміни в яких можна зіставити з умовно виділеною першою групою клітин при впливі тапсигаргіну: а – ділянка кардіоміоцита, яка містить міофіламенти (МФ), характерну для контрольних показників кількість мітохондрій (М) частково з ознаками набряку. Зб. X14 000; б – перинуклеарна зона кардіоміоцита з гіпертрофованим апаратом Гольджі (АГ), ендоплазматичний ретикулум (ЕР) в окремих ділянках розширений (↑), але в основному зберігає свою структуру. Зб. X20000; в та г – ділянки, що містять розширені цистерни ЕР. Зб. X10000 та X14000 відповідно

тобто практично не виявляються ознаки початкових стадій апоптозу. Натомість спостерігаються виражені ознаки порушення цілісності сарколеми, що неодмінно призводить до некротичної загибелі клітин. Ці результати повністю підтверджуються вивченням досліджуваного матеріалу за допомогою люмінесцентної мікроскопії з застосуванням фарбників для виявлення некрозу, апоптозу та аутофагії. Інгібітор аутофагії N-3-метиладенін (100 ммоляр) викликає збільшення кількості некротичних клітин у 1,9 раза у порівнянні з аноксією-реоксигенацією ($P < 0,001$), а кількість

живих клітин при цьому знижується на 5,5 % ($P = 0,03$) [20]. Застосування інгібітора каспаз DEVD (100 мкмоль/л) під час аноксії-реоксигенації також призводило до збільшення кількості некротичних клітин у 2,8 раза, відносно аноксії-реоксигенації ($P < 0,001$). Попередження як аутофагії, так і апоптозу за допомогою одночасного застосування N-3-метиладеніну та інгібітора каспаз призводило при аноксії-реоксигенації до значного підвищення числа клітин, що загинули через некроз (в 4,5 раза, $P < 0,001$). Попередження аутофагічної клітинної смерті у разі застосування інгі-

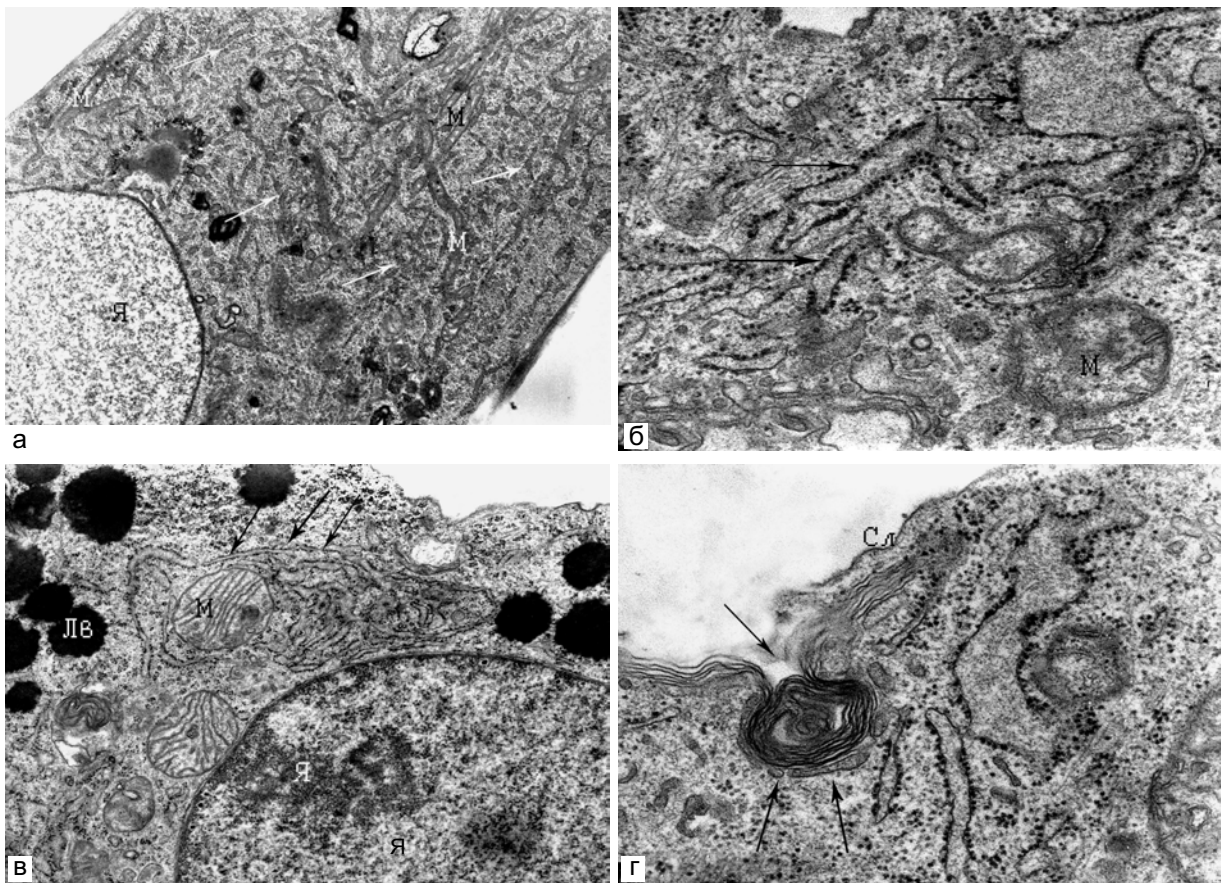


Рис. 6. Кардіоміоцити після коінкубації з інгібітором протеасоми (класто-лактацистин β -лактон), інгібітором аутофагії та інгібітором каспази 3: а – дегідратований, осміофільний кардіоміоцит, який містить зменшену кількість мітохондрій (М) витягнутої форми значно зменшених у розмірах, міофіламенти повністю відсутні. Зб. X6700; б – розширені цистерни ендоплазматичного ретикулула (ЕР) в ділянці кардіоміоцита (фрагмента) при зб. X27000; в – накопичення ліпофусцину (Лф) на тлі значного розширення ЕР, який утворює ланцюги з окремих цистерн. Зб. X14000; г – ділянка цитоплазматичної мембрани з ознаками її деградації, що свідчить про порушення цілісності цитоплазматичної мембрани (↑). Зб. X27000

бітора протеасоми призводило до двократного збільшення числа некротичних клітин. Попередження апоптотичної загибелі клітин в умовах застосування кластолактацистін β -лактону спричинювало збільшення кількості некротичних клітин до 41,2 %. Одночасне застосування N-3-метиладеніну і DEVD у цьому разі збільшувало кількість клітин, що загинули через некроз в 13,4 раза ($P < 0,001$) [1, 21].

Аналізуючи отримані нами результати та літературні дані відносно стресу ER, слід вказати на суттєві відмінності у патофізіологічному трактуванні значення цього процесу при ішемічній патології. З одного боку, він є тригером UPR із залученням експресії генів та активації деяких захисних систем, може вважатися протективним механізмом, який дає змогу клітинам адаптуватися до дії ушкоджуючих факторів різної природи, зокрема при ішемічно-реперфузійному синдромі. Проте ефективність цієї протекції значною мірою залежить від вихідного стану клітин та інтенсивності впливу патогена. Інший погляд на цю проблему передбачає розвиток дегенеративних процесів (апоптоз, аутофагія), попередження яких, на думку деяких дослідників, може сприяти виживанню клітин. Зокрема Nickson та співавт. [15] доводять, що пригнічення одного із шляхів апоптотичної загибелі (p53-залежний модулятор апоптозу, PUMA) характерного для стресу ER, дозволяє зменшити кількість апоптотичних кардіоміоцитів [15]. Lee та співавт. [11] отримали докази того, що нокдаун генів CHOP та каспази-12 (одних з ключових факторів реалізації апоптозу при стресі ER) запобігає апоптотичній загибелі клітин за впливу тапсигаргіну та тунікаміцину [11]. Проте автори не зважають на можливість розвитку некротичної загибелі кардіоміоцитів і не проводять відповідних досліджень. У цьому і своїх попередніх дослідженнях ми отримали переконливі дані про те, що пригнічення запрограмованої клі-

тинної смерті (апоптозу та/або одночасно аутофагії) спричинює різке збільшення кількості некротичних клітин і зменшення – живих [21]. При цьому незаперечною є теза про те, що некроз є найбільш несприятливим видом клітинної смерті, який активує запалення з явищами вторинної альтерації, що спричинює поширення зони ушкодження, зокрема при інфаркті міокарда. До того ж потрібно зважати на те, що аутофагія є компонентом UPR, а за умов її пригнічення метиладеніном збільшується число некротичних клітин, що підтверджує думку про те, що стрес ER є одним з можливих механізмів ендогенної цитопротекції, зокрема і при аноксії–реоксигенації кардіоміоцитів.

Не менш цікавою, на наш погляд, є проблема про значення протеасомного протеолізу в індукції та реалізації стресу ER. Доведено здатність інгібіторів протеасоми викликати цей внутрішньоклітинний процес або внаслідок накопичення убіквітинізованих білків, або опосередковано через ядерний фактор NF-карра B, еукаріотичний фактор ініціації 2α (IF2 α) та інші регуляторні протеїни [5, 8, 14]. З іншого боку, як було зазначено вище, протеасомний протеоліз є необхідним компонентом реалізації стресу ER за рахунок UPR, спрямований на протеасомну утилізацію білків, що накопичуються на мембранах стресованого ER [6]. Наші дослідження повністю узгоджуються з наведеними даними, бо за впливу специфічного інгібітора протеасоми ми спостерігали характерні морфологічні ознаки стресу ER, а при додатковому впливі інгібітора аутофагії (зазначимо, що аутофагія є другою складовою UPR поряд з протеасомним протеолізом) патоморфологічні ознаки стають більш вираженими, незворотними, що може вказувати на поглиблення дегенеративного процесу. При цьому з літературних джерел відомо, що нездатність клітинних систем реалізувати програму UPR призводить до реалізації апоптозу

[8, 9, 11, 13]. А в наших дослідженнях було показано, що застосування інгібітора каспаз в умовах індукції стресу ЕР спричинює як важкі внутрішньоклітинні порушення, так і порушення цілісності цитоплазматичної мембрани із розвитком некротичної загибелі клітин. Таким чином, проведені дослідження вказують на значення стресу ЕР в процесах загибелі кардіоміоцитів при анексії-реоксигенації та пригніченні протеасоми, а також є передумовою для пошуку засобів кардіопротекції, що реалізують свою дію через ендогенні механізми розвитку відповіді на стрес.

Tumanovska L.V., Nagibin V.S., Dosenko V.E., Moibenko A.A.

ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN ISOLATED CARDIOMYOCYTES IN MODELING OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS

At modeling of endoplasmic reticulum (ER) stress by its classic inducer thapsigargin, anoxia-reoxygenation and simultaneous inhibition of proteasomal proteolysis, autophagy and apoptosis a diversity of ultrastructural peculiarities was shown. Their comparison allows to make a conclusion that changes in these groups of experiments are similar and typical for ER stress. Thapsigargin application was shown to result in accumulation of giant mitochondria in perinuclear zone of cardiomyocytes. Some of these mitochondria had destroyed and high condensed matrix. The structure of ER was normal but in some regions of cells the dilation of ER cisterns occurred that, to our opinion, is an essential sign of ER stress. In another group of cells thapsigargin caused dehydration and osmiophilia of cytoplasm, significant dilation of ER cisterns, partial or complete degranulation of these organelles that often formed vacuoles with high electron density material. Also, the significant decrease of the number and size of mitochondria that had partially destroyed and condensed matrix was observed in these cells. The accumulation of lipofuscin and myofilament destruction at preservation of sarcoplasmic membrane integrity was detected. However, in conditions of simultaneous inhibition of proteasomal proteolysis, autophagy and apoptosis the loss of membrane integrity was shown, and we propose that it unconditionally should cause necrotic cell death. That was confirmed by use of fluorogenic dyes to detect necrosis and apoptosis. Our data indicate the important role of ER stress in processes of cardiomyocytes death at anoxia-reoxygenation and inhibition of proteasomal and autophagic proteolysis.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Тумановська Л.В., Досенко В.С., Нагібін В.С. та ін. Апоптотична, аутофагічна та онкотична загибель кардіоміоцитів при анексії-реоксигенації // *Фізіол. журн.* – 2004. – **50**, №5. – С.11–18.
2. Baumeister P., Luo S., Skarnes W.C. et al. Endoplasmic reticulum stress induction of the grp78/bip promoter: activating mechanisms mediated by YY1 and its interactive chromatin modifiers // *Mol. and Cell. Biol.* – 2005. – **25**, №11. – P. 4529–4540.
3. Bausero M.A., Gastpar R., Multhoff G., Asea A. Alternative mechanism by which IFN- γ enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72 // *J. Immunol.* – 2005. – **175**, №5. – P. 2900–2912.
4. Boelens J., Lust S., Offner F. et al. The endoplasmic reticulum: a target for new anticancer drugs // *In Vivo.* – 2007. – **21**, №2. – P.215–226.
5. Fribley A., Zeng Q., Wang C. Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in head and neck squamous cell carcinoma cells // *Mol. and Cell. Biol.* – 2004. – **24**, №22. – P.9695–9704.
6. Fujita I E., Kourokui Y., Isoai A. et al. Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II) // *Human Mol. Genetics.* – 2007. – **16**, №6. – P.618–629.
7. Glickman M.H., Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction // *Physiol. Rev.* – 2002. – **82**. – P.373–428.
8. Jiang H., Wek R.C. Phosphorylation of the γ -subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2 γ) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**, №14. – P. 14189–14202.
9. Kim R., Emi M., Tanabe K., Murakami S. Role of the unfolded protein response in cell death // *Apoptosis.* – 2006. – **11**, №1. – P.5–13.
10. Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response // *Physiology (Bethesda).* – 2007. – **22**, № 3. – P.193–201.
11. Lee G.H., Kim H.K., Chae S.W. et al. Bax inhibitor-1 regulates endoplasmic reticulum stress-associated reactive oxygen species and heme oxygenase-I expression // *J. Biol. Chem.* – 2007. – **282**, №30. – P.21618–21628.
12. Marciniak S.J., Yun C.Y., Oyadomari S. et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum // *Genes Dev.* – 2004. – **18**, №24. – P.3066–3077.
13. Morishima N., Nakanishi K., Takenouchi H. et al. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12 // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, №37. – P.34287–34294.

14. Mulugeta S., Nguyen V., Russo S.J. et al. A surfactant protein C precursor protein BRICHOS domain mutation causes endoplasmic reticulum stress, proteasome dysfunction, and caspase 3 activation // *Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2005. – **32**, № 6. – P.521–530.
15. Nickson P., Toth A., Erhardt P. PUMA is critical for neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress // *Cardiovascular. Res.* – 2007. – **73**, № 1. – P.48–56.
16. Obeng E.A., Boise L.H. Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**, №33. – P.29578–29587.
17. Oyadomari S., Yun C., Fisher E.A. Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload // *Cell.* – 2006. – **126**, №4. – P.727–739.
18. Rao R.V., Hermel E., Castro-Obregon S. et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program mechanism of caspase activation // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, № 36. – P.33869–33874.
19. Rutishauser J., Spiess M. Endoplasmic reticulum storage diseases // *Swiss. Med. Wkly.* – 2002. – 132, №17 – **18**. – P.211–222.
20. Szegezdia E., Duffyc A., Martin E. et al. ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2006. – **349**, №4. – P.1406–1411.
21. Dosenko V.E., Nagibin V.S., Tumanovska L.V., Moibenko A.A. Protective effect of autophagy in anoxia-reoxygenation of isolated cardiomyocyte? // *Autophagy.* – 2006. – **2**, №4. – P.305–306.
22. Dosenko V.E., Nagibin V.S., Tumanovskaya L.V. et al. Proteasomal proteolysis in anoxia-reoxygenation, preconditioning and postconditioning of isolated cardiomyocytes // *Pathophysiology.* – 2006. – **13**, №2. – P.119–125.
23. Nagibin V.S., Dosenko V.E., Moibenko A.A. Proteasomal activity in isolated neonatal cardiomyocytes in anoxia-reoxygenation // *Abstracts of Joint 59th Harden EMBO Conf. “The ubiquitin proteasome system in health and disease”* (Cirencester, 6–10 Sept., 2004). – Cirencester, 2004. – P.13.
24. Nagibin V.S., Dosenko V.E., Tumanovskaya L.V., Moibenko O.O. Apoptotic and autophagic death of cardiomyocytes in anoxia-reoxygenation and at inhibition of proteasome activity // *Abstracts of 12th Euroconference on apoptosis* (Chania, 17–20 Sept. 2004). – Chania, 2004. – P.117.
25. Reinecke H., Zhang M., Bartosek T., Charles E.M. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts // *Circulation.* – 1999. – **100**. – P.193–202.
26. Delisle B.P., Anderson C.L., Balijepalli R.C. et al. Thapsigargin selectively rescues the trafficking defective LQT2 channels G601S and F805C // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, №37. – P.35749–35754.
27. Munafo D.B., Colombo M.I. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation // *J. Cell Science.* – 2001. – **114**. – P.3619–3629.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
tumanovskaya1@mail.ru*

*Матеріал надійшов до
редакції 20.10.2007*