

Т.В. Кукоба, А.В. Коцюруба, О.О. Мойбенко

## Вплив експресії та активності гемоксигенази-1 на функції серця при ішемії – реперфузії

*В експериментах на изолированных сердцах крыс, перфузируемых по методу Лангендорфа, изучали влияние экспрессии индуцибельной изоформы гем-оксигеназы (ГО-1) на функции миокарда при ишемии – реперфузии. Было показано, что 20-минутная глобальная ишемия и последующая 40-минутная реперфузия вызывают ослабление функций сердца (снижают давление, развиваемое левым желудочком, приводят к повышению конечно-диастолического давления, перфузионного давления в коронарных сосудах и их сопротивления). В ткани миокарда отмечается усиление экспрессии ГО-1, которое сопровождается незначительным угнетением ее активности. Предварительная индукция ГО-1 путем инъекции гемина (25 мг/кг внутрибрюшинно за 24 ч до эксперимента) вызывает усиление экспрессии белка-фермента ГО-1, приводит к повышению активности ГО в ткани миокарда, расширению коронарных сосудов и улучшает функциональные показатели работы сердца. Предварительная блокада ГО путем инъекции цинка протопорфинина – ZnPP IX (20 мг/кг внутрибрюшинно за 24 ч до эксперимента) приводит к полному торможению экспрессии ГО-1 в левом желудочке сердца. Ингибирование экспрессии ГО-1 в левом желудочке сердца сопровождается ухудшением функциональных показателей работы миокарда. Установлено различие уровней экспрессии ГО-1 в правом и левом желудочках миокарда как в норме, так и после ишемии – реперфузии.*

### ВСТУП

Показано, що посилення експресії міокардіальних стресових білків та антиоксидантних ферментів, до яких належать також білки теплового шоку (зокрема гемоксигеназа або HSP32), захищає міокард від постішемічних ушкоджень [3, 4, 10, 14]. Однак механізми, які лежать в основі кардіопротекторних ефектів посилення експресії та активності білків теплового шоку за умов ішемії, остаточно нез'ясовані. В останній час у літературі з'явилось чимало повідомлень стосовно участі гемоксигенази-1 (ГО-1), індукцибельної ізоформи ключового ферменту катаболізму гему, у захисті клітин від пошкоджень. Показано важливу захисну роль ГО-1 за допомогою стимулювання її експресії при розвитку стресових станів, а також при ішемічному прекодиціюванні міокарда

[15]. Доведено, що мікосомальний фермент ГО-1 може відігравати важливу роль у механізмах захисту клітин, зокрема від окисного стресу [1, 8]. Більшість дослідників при цьому передусім підкреслює цитопротективні ефекти, які супроводжують посилення індукції ГО-1 [2, 5]. У досліджах *in vitro* з використанням моделей окисного стресу, що супроводжуються стійкою експресією ГО-1 в епітеліальних клітинах легень, було продемонстровано підвищення резистентності клітин до гіпероксичних пошкоджень [8]. Подібний захисний ефект також був показаний при застосуванні геміну на культурі епітеліальних клітин трахеї людини [13]. Також виявлено, що помірні індукції ГО-1 є корисною для виживання клітин, а надмірна експресія (більше ніж у 10–15 разів) може посилювати пошкодження [12]. Мікросо-

© Т.В. Кукоба, А.В. Коцюруба, О.О. Мойбенко

мальний фермент ГО здійснює деградацію молекули гему з наступним утворенням білірубину, який є потужним антиоксидантом, монооксиду вуглецю, що має вазодилататорні властивості та бере участь у регуляції судинного тонуусу, й іонів вільного заліза. Активність та експресія ГО посилюються при наявності у організмі надлишку гему, якому притаманні прооксидантні властивості, та при патологічних станах і тому деякі дослідники розглядають систему деградації гему, а саме фермент ГО-1, як захисний антиоксидантний механізм.

Метою нашої роботи було вивчення впливу змін експресії білка ГО-1 та активності цього ферменту на функціонування міокарда за умов ішемії – реперфузії.

## МЕТОДИКА

Для експериментів використовували щурів самців масою 250–300 г, яких було розподілено на 6 груп (по 10 тварин у кожній). Тварин анестезували уретаном (1,9 г/кг), швидко вилучали серця та поміщали їх у охолоджений (0 °С) розчин Кребса – Хензелейта (ммоль/л): NaCl – 118,2, NaHCO<sub>3</sub> – 25, KCl – 4,8, MgSO<sub>4</sub> – 1,2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2, CaCl<sub>2</sub> – 2,4, глюкоза – 12. Розчин насичували карбогеном (95 % O<sub>2</sub> та 5 % CO<sub>2</sub>) та термостатували до 37°C, pH 7,4. Ізольовані серця перфузували з постійною швидкістю ретроградно за класичним методом Лангендорфа з 20-хвилинною тотальною ішемією та наступною 40-хвилинною реперфузією. До контрольної групи (I група) входили інтактні тварини; II групу складали тварини, серця яких піддавали впливу ішемії – реперфузії. У тварин III та IV груп викликали попередню індукцію ферменту ГО-1 за допомогою введення специфічного індуктора геміну („Sigma”, США) у дозі 25 мг/кг [7]. Блокаду активності та експресії ГО-1 викликали ін’єкцією цинку протопорфірину IX (ZnPP IX, „Sigma”, США) у дозі 20 мг/кг (V та VI групи) [2].

Гемін і ZnPP IX для ін’єкцій розчинювали у 0,1 моль/л NaOH, розводили фізіологічним розчином і встановлювали pH 7,4. Препарати вводили внутрішньоочеревинно за 1 добу до експерименту. Серця тварин IV і VI груп також піддавали впливу ішемії – реперфузії. Під час експериментів на ізольованих серцях реєстрували показники функціональної активності міокарда та коронарних судин, а саме: кінцево-діастолічний тиск (КДТ), тиск, що розвиває лівий шлуночок (ТРЛШ), який розраховували як різницю між систолічним тиском у лівому шлуночку та КДТ, перфузійний тиск у коронарних судинах. У мікросомальній фракції гомогенатів міокарда визначали активність ГО [9]. Для дослідження рівнів експресії білка ферменту ГО-1 (32 кДа) використовували метод Western blott-аналізу та специфічні антитіла до ГО-1 (Antibody Detection kit; Anti-Heme Oxygenase-1 from rabbit, „Sigma”). Аліквоту біологічного матеріалу з тканин лівого та правого шлуночків серця (20 мкг білка) піддавали електрофорезу у 12%-му поліакриламідному гелі, згідно зі стандартним методом. Білок переносили на PVDF-мембрану („Bio-Rad”, США) з використанням апарата Bio-Rad Mini-transblot („Bio-Rad”, США), швидко промивали у буферному розчині, потім інкубували у блокуючому буфері з желатиною при 25°C. Після блокування мембрани відмивали та інкубували у розчині зі специфічними первинними антитілами. Після повторного промивання мембрани інкубували при 37°C за наявності специфічних вторинних антитіл, мічених пероксидазою хрину. Отримані смужки візуалізували за допомогою специфічної кольорової реакції за допомогою методу комп’ютерної денситометрії (Molecular Analyst image-analysis software, „Bio-Rad”, США). Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням критерію t Стьюдента та комп’ютерної програми статистичної обробки даних „Origin 7.0” („Microcal Software, Inc.”, США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження показали, що у контролі експресія білка-фермента ГО-1 у лівому шлуночку незначна, а у правому спостерігаються лише його слідові кількості. Ішемія – реперфузія викликає посилення експресії ГО-1 у лівому та правому шлуночках серця щурів відповідно до контролю у 2 та 1,5 рази. Використання специфічного індуктора ГО-1 – геміну через 24 год після застосування призводить до значного, майже чотириразового, посилення експресії ГО-1 у лівому шлуночку та збільшує рівень експресії ГО-1 у правому шлуночку серця приблизно у 2–3 рази. Вплив ішемії – реперфузії на тлі попереднього застосування індуктора ГО-1 призводить до ще більш вираженої експресії ферменту ГО-1 у тканинах як лівого (приблизно у 5–6 разів), так і правого шлуночка серця щура (у 3–4 рази; рис. 1). Слід зазначити, що експресія ГО-1 у лівому шлуночку серця виражена значно більшою мірою та перевищує таку в правому шлуночку серця майже вдвічі. Окрім того, посилення експресії ГО-1 відмічається як у ранній (через 60 хв у II групі), так і у більш пізній термін (через 24 год при попередній ін'єкції

геміну у III та IV групах тварин). У наших дослідах підвищення рівня експресії ГО-1 після застосування геміну (III та IV групи) супроводжувалося значним посиленням активності ферменту ГО у тканині міокарда (рис. 2). Водночас попереднє застосування селективного блокатора ГО-1 ZnPP IX призводить до послаблення експресії ГО-1 у правому шлуночку серця та практично повністю інгібує її у лівому шлуночку у VI групі тварин порівняно з II та IV. Слід також зауважити, що вплив блокатора на експресію ГО-1 у правому шлуночку серця є меншим, і навіть за умов його попереднього введення у тканинах міокарда щурів V і VI груп реєструється приблизно двохразове порівняно з контролем посилення експресії ГО-1 (див. рис. 1).

Результати наших попередніх досліджень показали, що індукція ГО-1 *in vivo* може зменшувати пошкодження міокарда при наступній ішемії – реперфузії. Було встановлено, що посилення активності індукцибельної ізоформи ГО-1 при введенні тваринам за добу до ішемії геміну (25 мг/кг) поліпшувало функціонування міокарда, обмежувало розвиток окисного стресу внаслідок збільшення продукції кардіального білірубину та пригнічення утворення

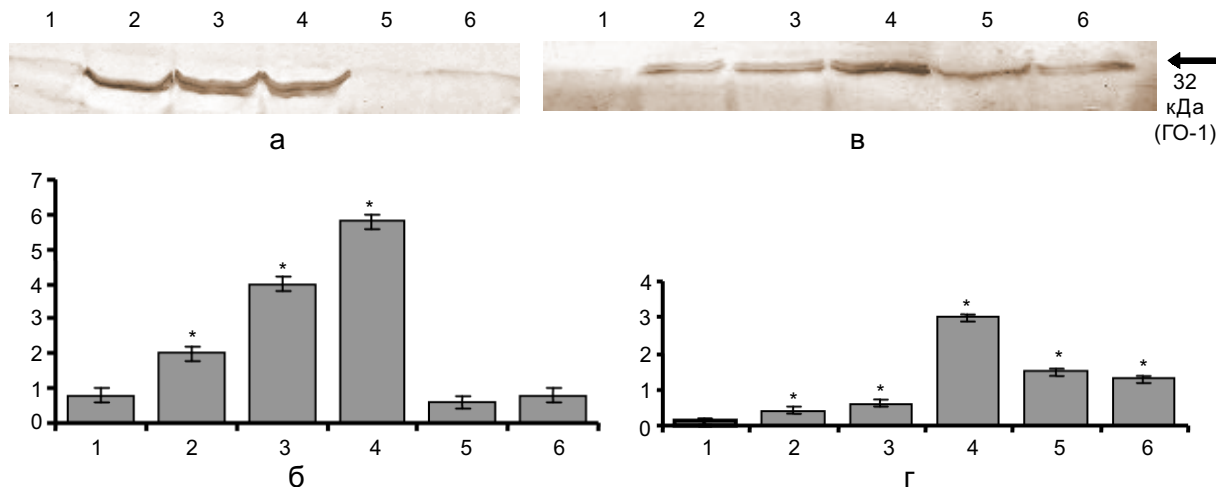


Рис. 1. Експресія гемоксигенази-1 (ГО-1; ум.од.) у лівому (а, б) і правому (в, г) шлуночках серця щурів: 1 – контроль (інтактні тварини), 2 – ішемія – реперфузія, 3 – попередня індукція ГО-1, 4 – попередня індукція ГО-1 та вплив ішемії – реперфузії, 5 – попередня блокада ГО-1, 6 – попередня блокада ГО-1 і вплив ішемії – реперфузії. \* вірогідно порівняно з контролем

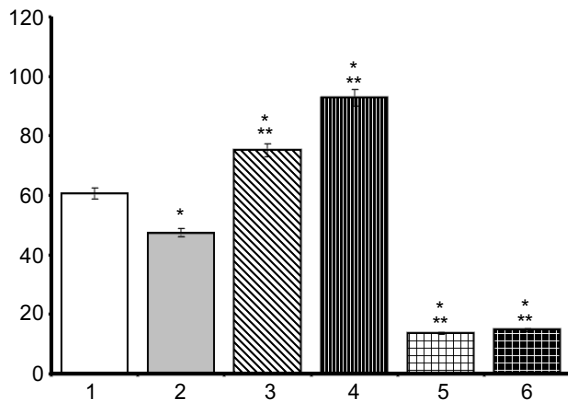


Рис. 2. Активність гемоксигенази (ГО) у тканині міокарда щурів: 1 – контроль (інтактні тварини), 2 – ішемія – реперфузія, 3 – попередня індукція ГО-1, 4 – попередня індукція ГО-1 та вплив ішемії – реперфузії, 5 – попередня блокада ГО-1, 6 – попередня блокада ГО-1 і вплив ішемії – реперфузії.

\* вірогідно порівняно з контролем; \*\* вірогідно порівняно з ішемією

активних форм кисню, а також зменшувало ступінь пошкодження кардіоміоцитів, про що свідчило зниження активності креатинкінази у розчині, що відтікав від серця у реперфузійний період [1]. Застосування геміну також призводило до подовження терміну зупинки серця під час ішемії ( $16,83 \pm 1,26$  порівняно з  $4,49 \text{ хв} \pm 1,32$  хв у контролі;  $P < 0,05$ ), окрім того, у 50 % випадків ізольовані серця тварин з попередньо індукованою ГО-1 взагалі не зупинялися протягом 20 хв ішемії. Також слід відмітити більш високий ТРЛШ і значне зменшення терміну відновлення повноцінних серцевих скорочень у реперфузійний період у тварин IV групи ( $1,07 \pm 0,39$  порівняно з  $3,43 \text{ хв} \pm 1,98$  хв у контролі; рис. 3,а). Попередня індукція та посилення активності ГО-1 запобігали підвищенню перфузійного тиску у коронарних судинах серця (рис. 3,б) і КДТ (рис. 3,в), а також попереджували розвиток фібриляції шлуночків, яка спостерігалася нами при блокаді ГО-1. Ми вважаємо, що попередження вазоконстрикції, яка, як правило спостерігається при відновленні перфузії після ішемії, є наслідком підви-

щення продукції ендogenous монооксиду вуглецю, який утворюється через посилення активності ГО одночасно з білірубінном та діє як вазодилататор. Подібні результати були отримані Clark та співавт. [5], Yoshida та співавт. [15], які також показали, що посилення активності ГО-1 при введенні геміну призводить до поліпшення серцевих функцій і до зменшення розміру інфаркту після ішемії – реперфузії ізольованих сердець щурів.

На відміну від цього, попереднє застосування ZnPP IX не лише призводило до повного пригнічення експресії ГО-1 у лівому та суттєвого її обмеження у правому шлуночку серця (див. рис. 1), а й значною мірою знижувало активність ГО-1 (див. рис. 2). Таке інгібування експресії та активності ГО-1 істотно погіршувало перебіг ішемії – реперфузії ізольованих сердець. З літературних джерел відомо, що ZnPP IX у дозі 20 мкмоль/кг повністю блокує експресію ГО-1 у тканині печінки [2]. У наших дослідженнях застосування цієї дози блокатора призводило до зниження активності ГО у тканині міокарда на 77,55 % порівняно з контролем (див. рис. 2) і значно погіршувало функціональні показники серця та судин (див. рис. 3,б,в), а у 85 % експериментів період реперфузії супроводжувався розвитком незворотної фібриляції шлуночків (рис. 4). Слід зазначити, що вихідні показники перфузійного тиску у коронарних судинах сердець тварин VI групи були вищими не тільки від контрольних, а й від показників тварин IV групи (див. рис. 3,а). Враховуючи те, що експерименти проводилися при постійній швидкості перфузії, тиск у коронарних судинах підтримували на рівні 70 мм рт.ст. (контроль). Базальне підвищення перфузійного тиску у коронарних судинах сердець тварин VI групи, вірогідно, було наслідком зменшення утворення монооксиду вуглецю через пригнічення активності ГО-1 під впливом ZnPP IX. Наступна ішемія – реперфузія призводила до

погіршення роботи серця (значне зниження ТРЛШ і збільшення КДТ, див. рис. 3,б,в) і посилення окисного стресу внаслідок збільшення утворення у тканині міокарда найбільш реактивного гідроксильного радикала у 1,7 раза порівняно з контролем та майже у 55 разів порівняно з його рівнем у міокарді тварин, які попередньо отримували гемін (IV група) [1]. Отримані нами результати узгоджуються з даними Csonka та

співавт. [6], які на моделі ішемії – реперфузії ізольованих сердець тварин з діабетом показали, що після реперфузії експресія ГО-1 відмічається лише у серцях без фібриляції шлуночків, а при наявності фібриляції експресія ГО-1 є суттєво зниженою. Застосування ZnPP IX у дозі 5 мкмоль/л у всіх випадках призводить до розвитку фібриляції [6]. Автори дійшли висновку, що причинами розвитку фібриляції шлуночків,

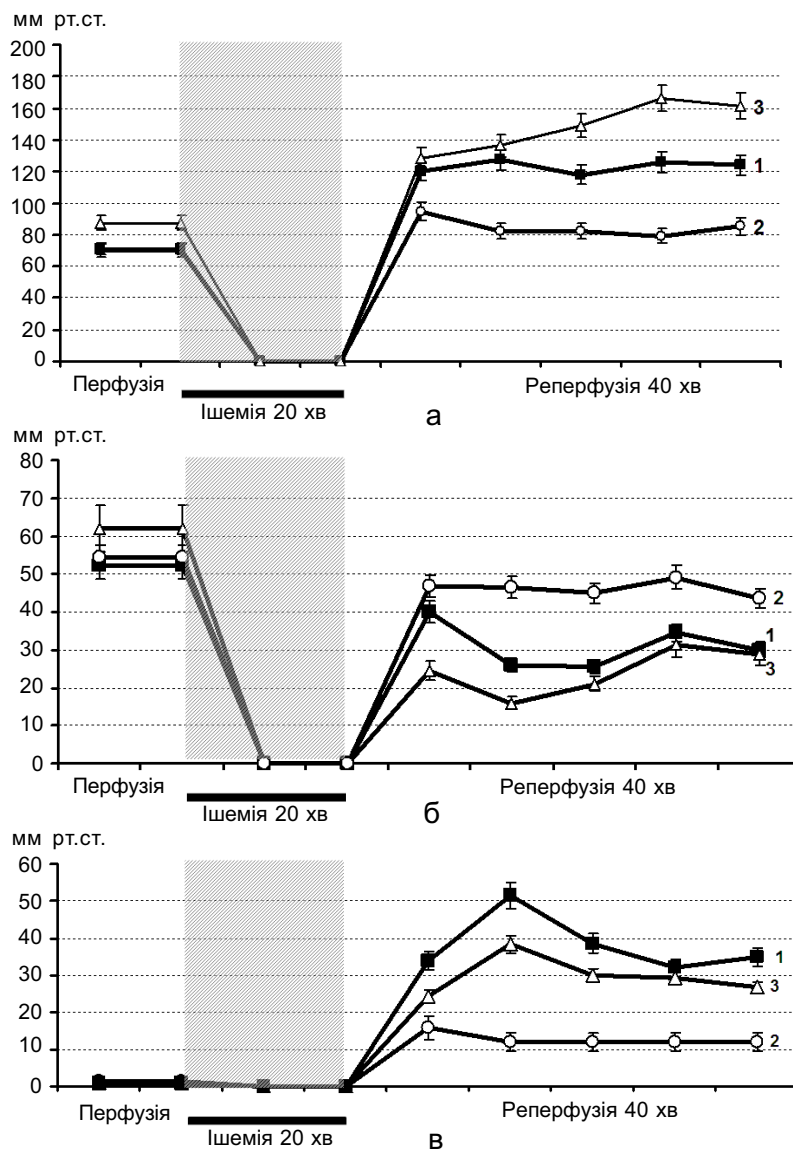


Рис. 3. Вплив індукції та блокади гемоксигенази (ГО) на перфузійний тиск у коронарних судинах (а), тиск, що розвиває лівий шлуночок (б) і кінцево-діастолічний тиск (в) при ішемії – реперфузії ізольованого серця щурів: 1 – контроль; 2 – попередня ідукція ГО-1 геміном; 3 – попередня блокада ГО-1 цинком проторфірином

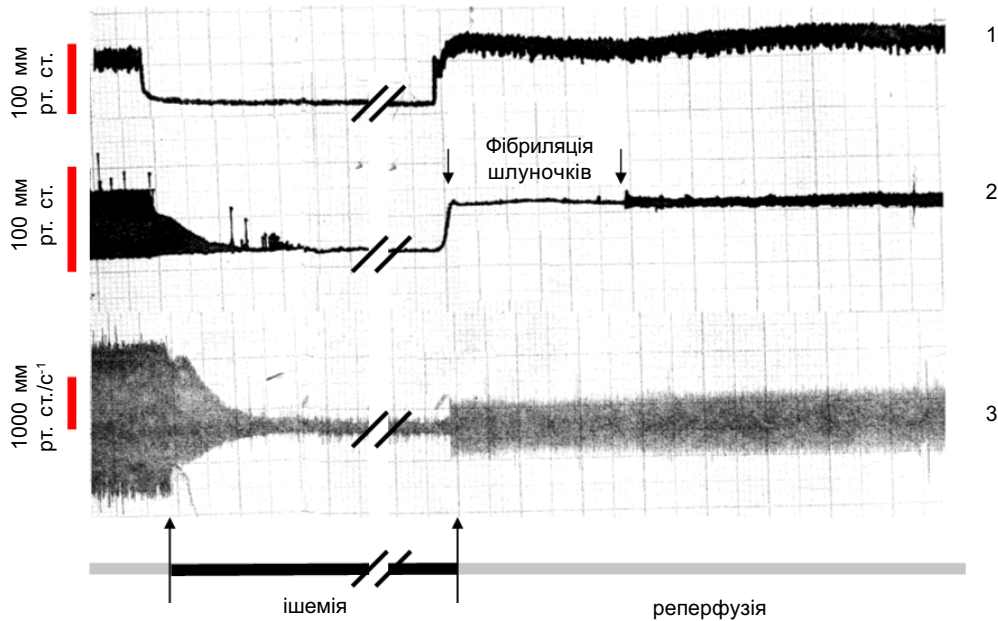


Рис. 4. Вплив блокатора гемоксигенази – ZnPP IX на функціонування ізолюваного серця щура: 1 – перфузійний тиск у коронарних судинах, 2 – тиск у лівому шлуночку серця, 3 – dP/dt (перша похідна)

індукованих ішемією – реперфузією, є послаблення регуляції та експресії мРНК ГО-1 і пригнічення її активності. Pataki та співавт. [11], використовуючи метод Northern blott-аналізу, показали, що після ішемії – реперфузії у серцях без фібриляції шлуночків спостерігаються майже чотирикратне посилення експресії мРНК ГО-1 порівняно з контролем, а за наявності фібриляції шлуночків у реперфузійний період посилення експресії мРНК ГО-1 не відбувалося. Автори висловили гіпотезу про існування взаємозв'язку розвитку фібриляції шлуночків, рівня експресії й активності ГО-1 і припустили, що втручання, яке здатне посилювати експресію мРНК ГО-1 та підвищувати активність ферменту, може запобігати розвитку фібриляції шлуночків серця у постішемичний період [11].

Нами також було показано, що рівень експресії ГО-1 у правому та лівому шлуночках серця різний, що, ймовірно, є наслідком їх структурно-функціональних особливостей. Відмінність рівнів експресії ферменту ГО-1 у різних відділах серця у

доступній нам літературі дотепер не описана. Існують дані, які показують, що при хронічній гіпоксії у трансгенних мишей, позбавлених гена ГО-1, розвиваються інфаркти виключно у правому шлуночку серця, а кардіоміоцити таких тварин більш чутливі до дії окисного стресу [14]. Крім того, за даними цих самих авторів, специфічне посилення експресії ГО-1 у міокарді таких мишей призводить до поліпшення відновлення серцевих функцій у реперфузійний період дозозалежно від рівня експресії ГО-1 [14]. Слід наголосити, що у даній роботі автори не досліджували особливості експресії ГО-1 у різних відділах серця, однак показали, що загалом посилення експресії ГО-1 призводить до суттєвого зниження розміру інфаркту відносно зони ризику лівого шлуночка серця (експерименти *in vivo*). Автори встановили також, що ГО-1 не тільки захищає кардіоміоцити від постішемичних пошкоджень при відсутності прозапальних клітин (дослідження на ізолюваному серці), а й від реперфузійних пошкоджень і запалення у дослідах *in vivo*

[14]. Враховуючи показану нами різницю рівнів експресії у лівому та правому шлуночках серця та літературні дані, можна стверджувати, що посилення експресії ГО-1 у кардіоміоцитах переважно лівого шлуночка серця захищає їх від ішемічних і реперфузійних пошкоджень та сприяє поліпшенню серцевих функцій, за допомогою обмеження продукції активних форм кисню та пригнічення окисного стресу переважно у лівому шлуночку серця. Позитивний вплив індукції ГО-1 на функціонування ізольованого серця щура опосередковується дією продуктів розпаду гему – СО і білірубину, а фермент ГО-1, ймовірно, бере участь у механізмах як раннього, так і пізнього прекодиціювання міокарда, оскільки посилення експресії ГО-1 відмічається як у ранній (60 хв), так і у більш пізній (24 год) термін.

*Автори висловлюють щире подяку Портниченко А.Г. та Василенко М.І. за допомогу у проведенні досліджень експресії ГО-1 за методом Western-blott-аналізу.*

**T.V. Kukoba, A.V. Kotsuruba, A.A. Moybenko**

#### **THE CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF HEME OXYGENASE-1 OVEREXPRESSION**

The purpose of this study was to determine the protective effects of heme oxygenase-1 (HO-1) expression against postischemic myocardial dysfunction. We also investigated HO-1 expression in cardiac tissue from the left and right ventricles of myocardium. Rat hearts were isolated and perfused according to Langendorff technique to evaluate the recovery of myocardial function after 20 min of global ischemia and 40 min of reperfusion. We found that HO-1 expression was more expressed in left ventricles of myocardium in basic conditions and after ischemia/reperfusion as well as after its previous induction by hemin. Upregulation of the inducible isoform of HO-1 and increase its activity after treatment of animals with hemin 24 h before ischemia ameliorated myocardial function (raised left ventricular developed pressure, decreased end-diastolic pressure, attenuated vasoconstriction) and reduced oxydative stress in cardiac tissue during reperfusion of isolated hearts. Zinc protoporphyrin IX, an inhibitor of heme oxygenase activity, completely abolished the HO-1 expression in left ventricles of myocardium and increased postischemic myocardial dysfunction. Likewise, cardiac tissue injury was exacerbated by treatment with zinc protoporphyrin IX through significant inhibition of HO activity and increasing of hydroxyl radical production on reperfusion. The treatment

of animals with hemin and following ischemia/reperfusion resulted in 5-6-times increase of HO-1 expression in the left ventricle of myocardium whereas in right ventricle only in 3-times. Our data provide strong evidence for a primary role of HO-1 in cardioprotection against reperfusion injury and show different HO-1 expression in left and right ventricles of myocardium.

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

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Кукоба Т.В., Мойбенко О.О., Коцюрба А.В. Кардіопротективна дія індукції гемоксигенази-1 за допомогою геміну при ішемії – реперфузії ізольованого серця щура // *Фізіол. журн.* – 2003. – **49**, № 6. – С. 14–21.
2. Amersi F., Buelow R., Kato H. et al. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury // *J. Clin. Invest.* – 1999. – **104**. – P. 1631–1639.
3. Benjamin I.J., McMillan D.R. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease // *Circulat. Res.* – 1998. – **27** (83), №2. – P. 117–132.
4. Black S.C., Lucchesi B.R. Heat shock proteins and the ischemic heart. An endogenous protective mechanism // *Circulation.* – 1993 – **87**, №3. – P. 1048–1051.
5. Clark J.E., Foresti R., Sarathchandra P. et al. Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction // *Amer. J. Physiol.* – 2000. – **278**, Issue 2. – P. H643–H651.
6. Csonka C., Varga E., Kovacs P. et al. Heme oxygenase and cardiac function in ischemic/reperfused rat hearts // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – **27**, №1–2. – P. – 119–126.
7. Hangaishi M., Ishizaka N., Aizawa T. et al. Induction of heme oxygenase-1 can act protectively against cardiac ischemia/reperfusion in vivo // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – **20**, (279), №2. – P. 582–588.
8. Lee P.J., Alam J., Sylvester S.L. et al. Regulation of heme oxygenase-1 expression in vivo and in vitro in hyperoxic lung injury // *Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 1996. – **14**, №6. – P. 556–568.
9. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases // *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1997. – № 37. – P. 517–554.
10. Marber M.S., Mestri R., Chi S.H. et al. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury // *J. Clin. Invest.* – 1995. – **95**, №4. – P. 1446–1456.
11. Pataki T., Bak I., Csonka C. et al. Regulation of ventricular fibrillation by heme oxygenase in ischemic/reperfused hearts // *Antioxid. Redox Signal.* – 2001. – **3**, №1. – P. 125–134.
12. Suttner D.M., Dennery P.A. Reversal of HO-1 related

- cytoprotection with increased expression is due to reactive iron // *FASEB J.* – 1999. – **13**, № 13. – P. 1800–1809.
13. Yamada N., Yamaya M., Okinaga S. et al. Protective Effects of Heme Oxygenase-1 against Oxidant-Induced Injury in the Cultured Human Tracheal Epithelium // *Amer. J. Respir. Cell. Mol. Boil.* – 1999. – **21**, № 3. – P. 428–435.
14. Yet S.F., Tian R., Layne M.D. et al. Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice // *Circulat. Res.* – 2001. – **20** (89), №2. – P. 168–173.
15. Yoshida T., Maulik N., Ho Y.S. et al. H (mox-1) constitutes an adaptive response to effect antioxidant cardioprotection: A study with transgenic mice heterozygous for targeted disruption of the Heme oxygenase-1 gene // *Circulation.* – 2001. – **27** (103), №12. – P. – 1695–1701.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,  
Київ*

*Матеріал надійшов до  
редакції 7.06.2005*