

А.Г. Портниченко, М.И. Василенко, А.А. Мойбенко

Гипоксическое preconditionирование предупреждает индукцию и активацию 5-липоксигеназы при ишемии и реперфузии сердца крыс

У крыс-самцов Вистар проводили гипоксическое preconditionирование (10% O₂ в азоте в течение 3 ч), через 24 ч сердце изолировали и подвергали 30-минутной ишемии и 40-минутной реперфузии по методу Лангендорфа. Исследовали изменения экспрессии белка 5-липоксигеназы (5-ЛО) в желудочках сердца и субклеточных фракциях миокарда после preconditionирования и в динамике ишемии и реперфузии. Установлено, что гипоксическое preconditionирование редуцировало некротическое повреждение кардиомиоцитов при постишемической реперфузии, уменьшая высвобождение лактатдегидрогеназы в перфузат на 27,6%. Экспрессия 5-ЛО в результате ишемии и реперфузии возрастала в 10,5 раза в левом желудочке и в 14,3 раза – в правом. При ишемии и постишемической реперфузии происходила постепенная транслокация белка 5-ЛО в ядерный субклеточный компартмент, более выраженная в левом желудочке. Гипоксическое preconditionирование не приводило к достоверному увеличению экспрессии 5-ЛО, а также полностью предупреждало ее рост при последующей ишемии–реперфузии, частично редуцировало транслокацию белка при реперфузии в левом желудочке. Таким образом, гипоксическое preconditionирование ограничивает провоспалительное действие ишемии и реперфузии миокарда, предупреждая увеличение экспрессии 5-ЛО и уменьшая альтерацию кардиомиоцитов.

Ключевые слова: миокард, гипоксическое preconditionирование, ишемия и реперфузия, 5-липоксигеназа.

ВВЕДЕНИЕ

Гипоксическое и ишемическое воздействия на сердечную мышцу имеют значительное сходство, поскольку одним из основных компонентов ишемического воздействия на сердечную мышцу является недостаток кислорода. Однако многолетние исследования указывают на существенные отличия воздействия различных видов и режимов гипоксии на ткани и целостный организм. В отличие от тяжелой гипоксии/ишемии, preconditionирование миокарда гипоксией умеренной интенсивности оказывает кардиопротекторные эффекты, механизмы которых исследованы лишь частично [1–3, 20]. До сих пор не исследовалось влияние позднего preconditionирования, в том числе гипокси-

ческого, на экспрессию провоспалительных белков, среди которых одно из ключевых мест занимает 5-липоксигеназа (5-ЛО).

Общепринято мнение, что 5-ЛО преимущественно экспрессируется в лейкоцитах, вовлеченных в реакции неспецифической резистентности, иммунный ответ и воспаление. Среди них нейтрофилы, В-лимфоциты, моноциты и макрофаги, тучные клетки, дендрциты, а также и пенные клетки в атеросклеротических бляшках [16]. Однако в недавних исследованиях установлено, что 5-ЛО экспрессируется в кардиомиоцитах крыс [12, 21].

Современные сведения о 5-ЛО, ее функциях и механизмах участия в патологических процессах значительно дополнены. Основными ее продуктами являются липидные

© А.Г. Портниченко, М.И. Василенко, А.А. Мойбенко

медиаторы – лейкотриены, известные своим местным провоспалительным действием, а также липоксины, обладающие противовоспалительным эффектом.

Механизм биосинтеза лейкотриенов включает несколько белков – ферментов и их коактиваторов. Это 5-ЛО, 5-ЛО-активирующий протеин (FLAP), цитозольная фосфолипаза A_2 (PLA $_2$), LTA4-гидролаза, LTC4-синтаза. Активация сигнальных путей приводит к кальцийзависимой транслокации 5-ЛО и PLA $_2$ к перинуклеарной мембране, где синтезируются лейкотриены. Активированная PLA $_2$ высвобождает арахидоновую кислоту из мембранных фосфолипидов. 5-ЛО взаимодействует со скаффолдподобным белком FLAP, что облегчает трансфер к ней арахидоновой кислоты и инкорпорацию молекулярного O $_2$ в молекулу арахидоновой кислоты. В дальнейшей двухшаговой реакции с помощью растворимой LTA4-гидролазы синтезируется наиболее мощный лейкотриен LTB $_4$, а после ассоциации 5-ЛО и FLAP с мембраносвязанной LTC4-синтазой – цистеинил-лейкотриены LTC $_4$, LTD $_4$ и LTE $_4$. LTA4 может подвергаться переносу в соседние клетки, где таким же образом включается в метаболические реакции [13, 16, 21].

Фосфорилирование 5-ЛО на Ser 523 протеинкиназой A предотвращает трансфер 5-ЛО в ядерный компартмент, ее связывание с PLA $_2$ и синтез лейкотриенов. Вместо этого, фосфорилированная цитозольная 5-ЛО связывается с циклооксигеназой 2 (COX-2) и продуцирует 15-эпилипоксин-A4 (15-epi-LXA4), обладающий противовоспалительным действием. Эти эффекты подтверждены при действии таких препаратов, как аторвастатин и пиоглитазон [21]. Таким образом, активация протеинкиназы A (PKA) и индукция COX-2 могут являться звеньями кардиопротекции, ассоциированными с активацией 5-ЛО-опосредованных механизмов.

Экспериментальные и клинические исследования указывают на связь 5-ЛО и FLAP с развитием воспалительных процессов при

сердечно-сосудистой патологии [3, 16]. Фермент 5-ЛО вовлечен в механизмы воспаления, зависящего от гиперлипидемии, в сосудистой стенке и патогенезе аневризмы аорты [16, 22]. Патогенез острых осложнений при росте активности FLAP может опосредоваться через LTB $_4$, повышенное содержание которого наблюдают у больных инфарктом миокарда [8]. Клинические исследования продемонстрировали, что ингибирование FLAP и образования лейкотриенов приводит к супрессии уровня биомаркеров, ассоциированных с риском инфаркта миокарда, в том числе LTB $_4$, миелопероксидазы, С-реактивного белка и др. [3, 8, 16]. Применение ингибиторов 5-ЛО, в частности корвитина и других препаратов кверцетина, подтверждает возможную ключевую роль механизмов, опосредованных 5-ЛО, в развитии повреждения миокарда при инфаркте [3, 8, 15].

Заглушение гена, кодирующего 5-ЛО (*ALOX5*), в культуре кардиомиоцитов улучшало их выживаемость при аноксии-реоксигенации путем предупреждения некротического повреждения клеток. В исследованиях *in vivo* обнаружено уменьшение размера экспериментального инфаркта миокарда у крыс в 3,8 раза [12].

Исследования полиморфизма генов, вовлеченных в механизмы образования лейкотриенов показали, что гаплотип В (HapB) гена, кодирующего FLAP (*ALOX5AP*), ассоциирован с риском развития ишемической болезни сердца (ИБС) и инфаркта миокарда у европеоидов США [10, 19]. Укороченные аллели «3» и «4» промотора *ALOX5* повышают риск ИБС у негроидов, а HapK LTA4H – у европеоидов. Однонуклеотидные полиморфизмы LTA4H (rs2540477) повышали риск ИБС у европеоидов, в то время как однонуклеотидный полиморфизм PLA2G4A (rs12746200) – снижал риск ИБС, инфаркта миокарда, инсульта и смертности от этих заболеваний в течение 3 лет. Моноциты, содержащие варианты HapK или rs2540477, продуцировали на 50 и 33% больше LTB $_4$, чем в норме, соответственно

[9]. По результатам мета-анализа мировых публикаций, *NarB* и *rs1722842* полиморфизмы гена *APOA5* ассоциированы с ИБС, из них *NarB* рассматривается как предиктор этой патологии, а *NarA* связан с риском инфаркта миокарда [10]. Полиморфизм *LTC4*-гидролазы также может быть ассоциирован с ростом или уменьшением риска развития ИБС [5]. Полученные данные подтверждают патогенетическую роль 5-ЛО и ее липоксигеназных продуктов в ишемическом повреждении миокарда и необходимость поиска путей регуляции этих метаболических процессов.

Показано, что гипоксия может индуцировать ген *FLAP* посредством факторов транскрипции *NF-κB* и *HIF-1α* [7]. Последний редуцирует экспрессию микроРНК *miR-135a* и *miR-199a-5p*, которые негативно регулируют *FLAP*. Это может приводить к значительному росту экспрессии мРНК и белка *FLAP* [7] и быть компонентом провоспалительных механизмов. По недавним сведениям, гиперэкспрессия микроРНК *miR-219* приводит к редукции экспрессии белка 5-ЛО и продукции лейкотриенов [17], однако регуляция этого механизма при гипоксии требует изучения.

Таким образом, гипоксическое прекодиционирование может влиять на экспрессию 5-ЛО, ее кофакторов и регуляторных молекул, но эти механизмы и их возможное участие в предупреждении риска и тяжести ишемического повреждения миокарда до сих пор не исследовались. Цель нашей работы – установление участия 5-ЛО в механизмах позднего гипоксического прекодиционирования путем изменения ее экспрессии в миокарде после гипоксического воздействия и ишемии–реперфузии изолированного сердца, а также влияния прекодиционирования на некротическое повреждение миокарда.

МЕТОДИКА

Исследования проводили на крысах-самцах линии Вистар в возрасте 6 мес, массой 280–350 г. Животных разделяли на такие

экспериментальные группы: 1-я (контроль) – интактные крысы, 2-я – гипоксическое прекодиционирование по разработанной нами ранее модели [1, 2] – крысы, которых подвергали воздействию острой нормобарической гипоксии (дыхание газовой смесью с 10%-м содержанием кислорода в азоте) в течение 3 ч; 3-я (сравнение) – крысы, которым вводили стабилизатор *HIF-1α* CoCl_2 (внутрибрюшинно, 30 мг/кг).

Сердца извлекали у животных под уретановым наркозом (1,5 г/кг) при введении гепарина (250 МЕ/кг). Сердца крыс 1-й и 2-й групп (через 24 ч после прекодиционирования) подвергали 30-минутной тотальной ишемии и 40-минутной реперфузии по методу Лангендорфа. Для изоволюмической перфузии использовали модифицированный раствор Кребса, содержащий (ммоль/л): NaCl – 120, KCl – 5,8, CaCl_2 – 2,8, MgSO_4 – 1,1, KH_2PO_4 – 1,2, NaHCO_3 – 21,4, глюкозы – 10 (рН 7,4), при насыщении карбогеном и 37 °С. В динамике перфузии и реперфузии в пробах оттекающего перфузата определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) с помощью набора реактивов *LDH 500* («Sigma», США).

Для определения экспрессии белков отбирали образцы миокарда правого и левого (с перегородкой) желудочков в динамике эксперимента (до воздействия, сразу и через 24 ч после воздействия гипоксии, после ишемии и после постишемической реперфузии, а также через 24 ч после введения CoCl_2). Ткани механически измельчали в жидком азоте, подвергали ультразвуковой гомогенизации и лизису, центрифугировали 20 мин (10000 g, 4 °С) и отбирали супернатанты для определения экспрессии белка методом иммуноблоттинга (Western blotting).

Для получения субклеточных белковых фракций использовали модификацию методов для замороженных образцов миокарда [6, 11]. После механической гомогенизации в жидком азоте пробы подвергали ультразвуковой гомогенизации и лизису в лизис-буфере (50 ммоль/л tris-HCl , 5 ммоль/л EDTA , 10

ммоль/л EGTA, 50 мкг/мл PMSF, 0,2 ммоль/л ортованадата натрия, коктейль ингибиторов протеаз («Sigma», США)). Центрифугировали при 1000 g 15 мин, получали растворимую мембранно-цитозольную фракцию. Осадок растворяли в RIPA-буфере и центрифугировали при 7800 g 10 мин, получая растворимую ядерную фракцию. В супернатантах определяли содержание белка бицинхониновым методом с помощью набора реактивов BCA-1 («Sigma», США). Супернатанты денатурировали и использовали для определения экспрессии белка.

Иммуноблоттинг проводили с помощью оборудования и протоколов BioRad Labs (США) с использованием антител и реактивов фирмы «Sigma». Супернатант (по 100 мкг белка) разделяли на 7,5% SDS-PAGE ($n = 3$ в каждой пробе) и переносили на PVDF-мембраны. Мембраны блокировали Western blocking solution («Sigma», США). Для определения экспрессии белка использовали моноклональные антитела к липоксигеназному домену 5-ЛО («BD Biosciences», США). В качестве вторичных антител использовали видоспецифический иммуноглобулин G (IgG), меченный пероксидазой («Sigma», США), детекцию осуществляли в реакции с TMB с помощью ProteoQuest Western blotting kit («Sigma», США) и соответствующих протоколов. Интенсивность окраски определяли с помощью компьютерной денситометрии и представляли в условных единицах.

Результаты обрабатывали с применением методик вариационной статистики, достоверность различия показателей оценивали по критериям *t* Стьюдента и Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что в интактном миокарде крыс экспрессия 5-ЛО имеет низкий уровень, различий между левым и правым желудочками не обнаружено, после ишемии и постишемической реперфузии она достоверно возрастала: в 10,5 раза в левом желудочке и в 14,3 раза

– в правом (рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют о значительной стимуляции экспрессии 5-ЛО в миокарде при его ишемическом и реперфузионном повреждении, что способствует вовлечению этого фермента в развитие воспалительного процесса.

Через 24 ч после гипоксического preconditionирования наблюдали тенденцию к незначительному росту экспрессии 5-ЛО в желудочках сердца по сравнению с контролем (см. рис. 1). Однако после ишемии и реперфузии preconditionированного сердца показатели экспрессии фермента редуцировались до уровня значений у интактных животных и были существенно меньшими, чем после ишемии–реперфузии в контрольной группе: в 15,8 раза в левом желудочке и в 28,5 раза – в правом (см. рис. 1).

Некротическое повреждение клеток оценивали по высвобождению ЛДГ в оттекающий перфузат. Альтерация миокарда при ишемии–реперфузии preconditionированного сердца значительно уменьшалась, высвобождение ЛДГ из разрушенных клеток редуцировалось на 27,6% (рис. 2), размер инфаркта – на 34,1% [3].

Таким образом, позднее preconditionирование миокарда, индуцированное гипоксией, не только в значительно меньшей мере стимулировало воспалительный ответ, опосредованный активацией 5-ЛО, нежели ишемическое повреждение, но и редуцировало стимуляторное влияние последующей ишемии–реперфузии на экспрессию 5-ЛО в миокарде. Это сопровождалось уменьшением некротической альтерации кардиомиоцитов, что, в свою очередь, редуцирует активацию воспаления в ишемизированном миокарде. Полученные результаты указывают на участие мощных противовоспалительных механизмов в кардиопротекторных эффектах позднего preconditionирования. С учетом сведений, что некоторые гипоксические воздействия усиливают экспрессию FLAP [7], можно предположить синергическое влияние этого белка и 5-ЛО и последующий рост

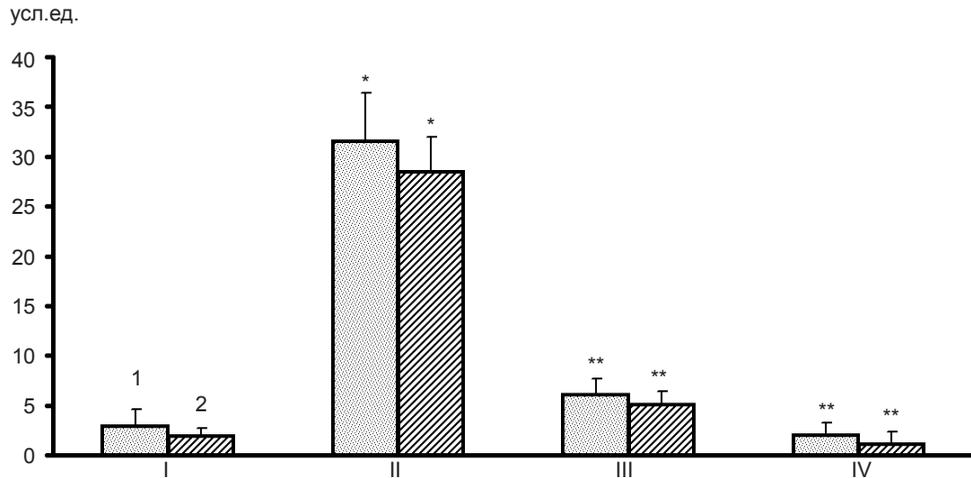


Рис. 1. Экспрессия 5-липоксигеназы в миокарде до и после ишемии–реперфузии изолированного сердца крыс, интактных (контроль) и при гипоксическом preconditionировании: 1 – левый желудочек, 2 – правый желудочек; I – контроль, II – ишемия–реперфузия, III – гипоксическое preconditionирование, IV – гипоксическое preconditionирование и ишемия–реперфузия. *P<0,05 по сравнению с контролем, ** P<0,05 по сравнению с влиянием ишемии–реперфузии

синтеза его провоспалительных продуктов, особенно при ишемически-реперфузионном повреждении миокарда. В то же время использование гипоксического режима, который разработан нами для позднего preconditionирования миокарда, не приводит к значительной стимуляции экспрессии белка 5-ЛО, что предотвращает усиление воспалительного ответа, несмотря на возможный рост экспрессии FLAP.

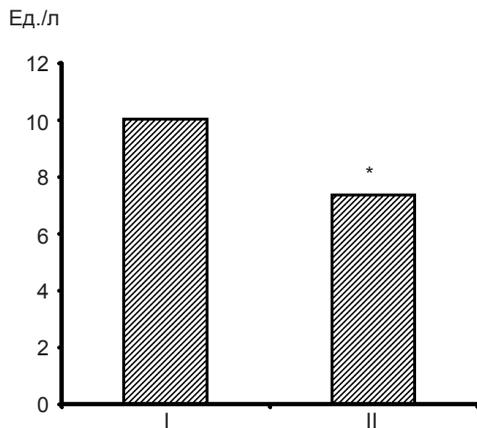


Рис. 2. Высвобождение лактатдегидрогеназы при постишемической реперфузии из изолированного сердца крыс, интактных (I) и после гипоксического preconditionирования (II). *P<0,05 по сравнению с контролем

При исследовании экспрессии 5-ЛО в субклеточных фракциях миокарда обнаружена отчетливая транслокация белка при ишемически-реперфузионном повреждении, более выраженная в левом желудочке (рис. 3). В интактных кардиомиоцитах максимальное количество белка содержалось в мембранно-цитозольном пуле (см. рис. 3,а). При ишемии происходила его частичная транслокация, а после постишемической реперфузии наблюдали максимальную транслокацию белка в ядерный субклеточный компартмент (см. рис. 3,б), особенно выраженную в левом желудочке. Полученные результаты могут свидетельствовать о выраженном стимуляторном влиянии ишемии и особенно постишемической реперфузии на активность 5-ЛО в миокарде, поскольку ее транслокация необходима для активного участия фермента в синтезе лейкотриенов [13, 16, 21].

Гипоксическое preconditionирование в раннем периоде (немедленно после воздействия) не вызывало транслокации белка в ядерный компартмент (см. рис. 3,б). Однако через 24 ч после действия гипоксии наблюдали достоверное уменьшение количества белка в мембранно-цитозольной фракции левого

желудочка и рост – в ядерной фракции обоих желудочков сердца ($P < 0,05$). Таким образом, в поздней фазе preconditionирования приводило к частичной транслокации фермента, что указывает на вовлечение липоксигеназы в механизмы «готовности» кардиомиоцитов к возможному ишемическому поражению, которые реализовались в позднем периоде preconditionирования.

При ишемии preconditionированного сердца не наблюдали дальнейшего усиления транслокации фермента, что является благоприятным признаком. Только при реперфузии транслокация белка в ядерный компартмент существенно усиливалась в левом желудочке (см. рис. 3,б). В правом желудочке исходный

уровень экспрессии белка в ядерной фракции был выше, чем в левом ($P < 0,05$), и не изменялся достоверно вследствие ишемии и реперфузии.

Таким образом, позднее гипоксическое preconditionирование способствовало ограничению транслокации липоксигеназы в перинуклеарную мембрану и ее активации при последующем ишемическом поражении, что может быть составной протекторного влияния preconditionирования. Однако этот механизм проявлял только частичный эффект при постишемической реперфузии в левом желудочке.

При сравнении влияния гипоксии с действием $CoCl_2$, который стабилизирует HIF-1

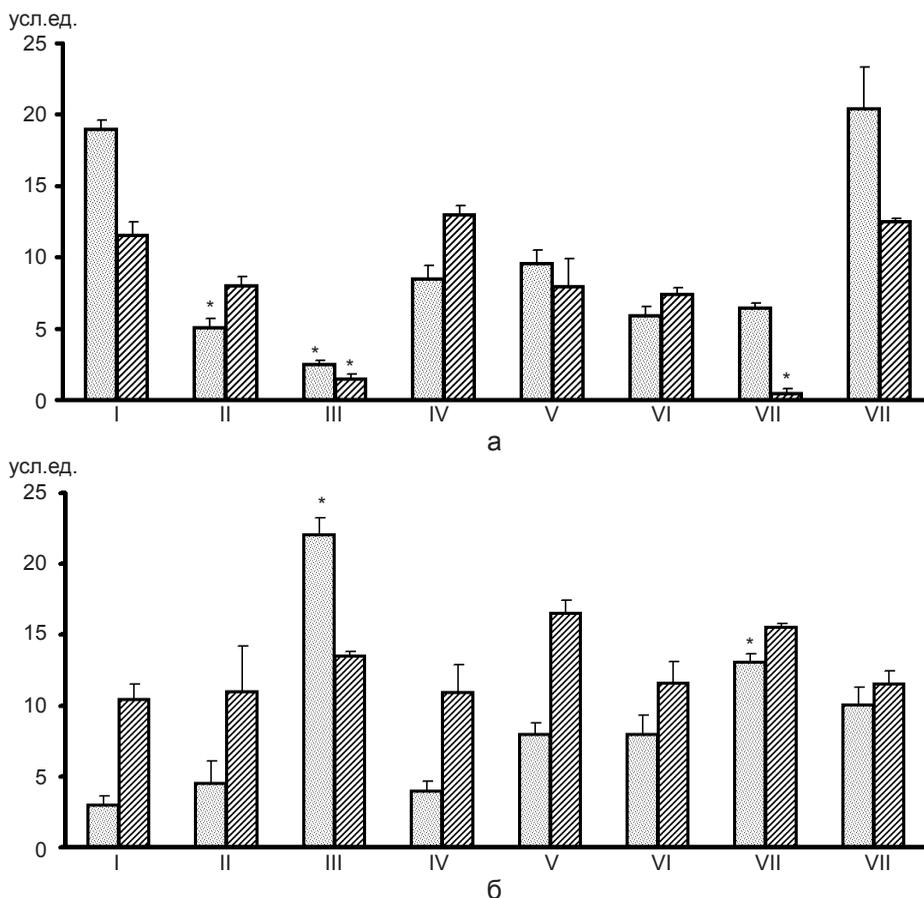


Рис. 3. Экспрессия 5-липоксигеназы в субклеточных фракциях миокарда изолированного сердца крыс: а – мембранно-цитозольная фракция, б – ядерная фракция; I – контроль, II – ишемия, III – ишемия–реперфузия, IV – гипоксия, V – через 24 ч после гипоксии, VI – гипоксия и ишемия, VII – гипоксия и ишемия–реперфузия, VIII – через 24 ч после введения $CoCl_2$; 1 – левый желудочек, 2 – правый желудочек. * $P < 0,05$ по сравнению с уровнем до ишемии

независимо от доступности кислорода, выявлены различия этих воздействий на субклеточное распределение белка. Сравнивали действие гипоксии без последующей нормоксии, с последующей нормоксией в течение 24 ч и эффект CoCl_2 через 24 ч после введения. Выявлено, что при действии CoCl_2 соотношение экспрессии 5-ЛО в субклеточных фракциях соответствовало показателям, полученным сразу после гипоксического воздействия, при этом существенной транслокации белка не наблюдалось. Таким образом, стабилизация HIF-1 любого геноза не стимулировала транслокации белка. Частичная транслокация белка, которую наблюдали через 24 ч после воздействия гипоксии, очевидно, усиливалась благодаря последующему нормоксическому пребыванию животных, когда белок HIF-1 дестабилизировался. Этот вывод подтверждается результатами об усилении транслокации белка в ядерный компартмент при постишемической реперфузии, когда происходит возврат миокарда к нормоксическим условиям.

Таким образом, выявлено участие механизмов, зависящих от постишемической реоксигенации миокарда, в стимуляции перераспределения белков между клеточными компартментами миокардиоцитов. В частности, значительная транслокация 5-ЛО в перинуклеарную мембрану при реоксигенации может приводить к мощному росту синтеза провоспалительных лейкотриенов и усилению повреждения миокарда [16]. В то же время недостаток кислорода при ишемическом или гипоксическом воздействии ограничивает транслокацию этого белка. Позднее гипоксическое прекондиционирование предупреждало постишемическую транслокацию 5-ЛО, но лишь частично ограничивало реперфузионную редистрибуцию белка.

Поскольку синтез лейкотриенов из арахидоновой кислоты является кислородзависимым процессом [16], гипоксия также уменьшает скорость их продукции, а совокупность ограничения транслокации и каталитической

активности 5-ЛО в липоксигеназных реакциях может закономерно усиливать синтез липоксинов этим ферментом [21], что интенсифицирует противовоспалительное действие прекондиционирования. Индукция COX-2 при позднем прекондиционировании [18] также поддерживает предположение о возможном изменении метаболической активности 5-ЛО в сторону синтеза липоксинов.

Помимо этого, изменение экспрессии 5-ЛО при гипоксическом прекондиционировании может влиять на регуляцию экспрессии генов посредством микроРНК. Мультидоменная рибонуклеаза III дайсер, участвующая в биогенезе микроРНК, содержит связывающий домен для 5-ЛО, который повышает ее активность. В свою очередь 5-ЛО модифицирует процессинг прекурсоров микроРНК дайсером [4]. Вместе с тем повышение экспрессии микроРНК miR-219 приводит к редукции экспрессии белка 5-ЛО и продукции лейкотриенов [17]. Эти механизмы, которые только начали изучаться, могут принимать участие в обнаруженном нами феномене быстрого ограничения функции индуцибельных ферментов при позднем прекондиционировании, что предупреждает токсическое действие их продуктов, как это установлено ранее относительно индуцибельной NO-синтазы [14], так и в отношении 5-ЛО.

Данные исследований в сопоставлении с полученными нами результатами свидетельствуют о множественной регуляции липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты при гипоксии. С одной стороны, HIF-1 α -зависимый механизм приводит к росту экспрессии FLAP [7]. С другой стороны, согласно нашим результатам, при умеренном гипоксическом воздействии не стимулируется рост экспрессии и транслокации белка 5-ЛО, для последнего вообще представляется важным реоксигенация клетки и дестабилизация HIF-1 α . Можно высказать предположение, что гипоксическое прекондиционирование влияет на липоксигеназный путь метаболизма арахидоновой кислоты, приводя

его в состояние «готовности» к возможной ишемической атаке посредством синтеза ко-факторов (FLAP) и частичной транслокации 5-ЛО в течение лаг-фазы прекодиціонування. В то же время создаются условия для преимущественного участия фермента в синтезе липоксинов, что можно рассматривать как протекторный эффект. В отличие от прекодиціонування, при воздействии тяжелой гипоксии/ишемии с последующей реоксигенацией происходит быстрая стимуляция липоксигеназного метаболизма с ростом экспрессии 5-ЛО и выраженной транслокацией фермента.

Таким образом, полученные результаты характеризуют новые эффекты и механизмы позднего гипоксического прекодиціонування миокарда, а также позволяют выделить новые звенья патогенетических механизмов ишемически-реперфузионного повреждения миокарда и подходы к их коррекции. В частности, выявлены рост экспрессии белка 5-ЛО в левом и правом желудочках при ишемии-реперфузии миокарда и усиление транслокации липоксигеназы в ядерный компартмент клетки, зависящее от реоксигенации миокарда. Эти провоспалительные эффекты, а также некротическое повреждение кардиомиоцитов частично предотвращаются гипоксическим прекодиціонуванням миокарда, особенно в левом желудочке сердца.

**А.Г. Портниченко, М.І. Василенко,
О.О.Мойбенко**

ГІПОКСИЧНЕ ПРЕКОДИЦІОНУВАННЯ ПОПЕРЕДЖУЄ ІНДУКЦІЮ ТА АКТИВАЦІЮ 5-ЛІПОКСИГЕНАЗИ ПРИ ІШЕМІЇ ТА РЕПЕРФУЗІЇ СЕРЦЯ ЩУРІВ

Щурів-самців Вістар піддавали гіпоксичному прекодиціонуванню (10% O₂ в азоті протягом 3 год), через 24 год серце ізолювали і піддавали 30-хвилинній ішемії і 40-хвилинній реперфузії за методом Лангендорфа. Досліджували зміни експресії білка 5-ліпоксигенази (5-ЛО) у шлуночках серця щурів та субклітинних фракціях міокарда внаслідок прекодиціонування та в динаміці ішемії та реперфузії. Встановлено, що гіпоксичне прекодиціонування редукувало некротичне пошкодження кардіоміоцитів

при постішемичній реперфузії, зменшуючи вивільнення лактатдегідрогенази у перфузат на 27,6%. Експресія 5-ЛО внаслідок ішемії та реперфузії зростала в 10,5 раз у лівому шлуночку і в 14,3 раз – у правому. При ішемії і постішемичній реперфузії відбувалася поступова транслокація білка 5-ЛО в ядерний субклітинний компартмент, більш виразна у лівому шлуночку. Гіпоксичне прекодиціонування не стимулювало експресію 5-ЛО, а також повністю попереджувало її зростання при наступній ішемії–реперфузії, частково редукувало транслокацію білка при реперфузії у лівому шлуночку. Отже, гіпоксичне прекодиціонування обмежує прозапальну дію ішемії та реперфузії міокарда, попереджуючи підвищення експресії 5-ЛО та зменшуючи альтерацію кардіоміоцитів.

Ключові слова: міокард, гіпоксичне прекодиціонування, ішемія та реперфузія, 5-ліпоксигеназа.

**A.G. Portnychenko, M.I. Vasylenko,
O.O.Moybenko**

HYPOXIC PRECONDITIONING PREVENTS THE INDUCTION AND ACTIVATION OF 5-LIPOXYGENASE DURING ISCHEMIA AND REPERFUSION OF RAT HEART

Male Wistar rats were subjected to hypoxic preconditioning (10% O₂ in nitrogen for 3 h). In 24 h heart were isolated and subjected to 30 min ischemia and 40 min reperfusion. Changes in expression of 5-lipoxygenase (5-LO) protein in rat heart ventricles, and in myocardial subcellular fractions were evaluated by Western blotting. It was found that hypoxic preconditioning attenuated reperfusion damage of cardiomyocytes with reducing the release of LDH by 27.6%. After ischemia and reperfusion, expression of 5-LO was 10.5-fold elevated in the left ventricle and 14.3-fold – in the right one. During ischemia and reperfusion occurred gradual translocation of 5-LO protein in nuclear subcellular compartment, more expressive in the left ventricle. Hypoxic preconditioning did not significant increase in 5-LO expression, but fully prevented its growth in the following ischemia-reperfusion, and partly reduced protein translocation at reperfusion in the left ventricle. Thus, hypoxic preconditioning limits proinflammatory effects of ischemia and reperfusion in myocardium, preventing the increase in expression of 5-LO, and reducing the alteration of cardiomyocytes. Key words: myocardium, hypoxic preconditioning, ischemia and reperfusion, 5-lipoxygenase.

*O.O.Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine,
International Centre for Astronomical and Medico-
Ecological Research, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Портниченко А.Г., Василенко М.І., Мойбенко О.О. Вплив гострої гіпоксичної ішемії на індукцію синтезу оксиду азоту у щурів // Фізіол. журн. – 2003.- **49**, №3. – С.47–49.

2. Портниченко А.Г., Василенко М.И., Портниченко В.И., Мойбенко А.А. Острая гипоксическая гипоксия как индуктор отсроченной кардиопротекции у крыс // Гипоксия, автоматизированный анализ гипоксических состояний / Сб. трудов под ред. А.З.Колчинской. – М.-Нальчик, 2005. – Т.1. – С.185–190.
3. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца / Под ред. А.А. Мойбенко, В.Е. Досенко, А.Н. Пархоменко. – К.: НВП «Видавництво «Наукова думка» НАН України», 2008. – 518 с.
4. Dincbas-Renqvist V., Pepin G., Rakonjac M., Plante I., Ouellet D.L., Hermansson A., Goulet I., Doucet J., Samuelsson B., Rådmark O., Provost P. Human dicer C-terminus functions as a 5-lipoxygenase binding domain // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – **1789**. – P. 99–108.
5. Freiberg J.J., Tybjaerg-Hansen A., Sillesen H., Jensen G.B., Nordestgaard B.G. Promotor polymorphisms in leukotriene C4 synthase and risk of ischemic cerebrovascular disease // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2008. – **28**, № 5. – P. 990–996.
6. Fryer R.M., Patel H.H., Hsu A.K., Gross G.J. Stress-activated protein kinase phosphorylation during cardioprotection in the ischemic myocardium // Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2001. – **281**, – 3. – P. H1184–H1192.
7. Gonsalves C.S., Kalra V.K. Hypoxia-mediated expression of 5-lipoxygenase-activating protein involves HIF-1alpha and NF-kappaB and microRNAs 135a and 199a-5p // J. Immunol. – 2010. – **184**, № 7. – P. 3878–3888.
8. Hakonarson H. Role of FLAP and PDE4D in myocardial infarction and stroke: target discovery and future treatment options // Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med. – 2006. – **8**, №3. – P. 183–192.
9. Hartiala J., Li D., Conti D.V., Vikman S., Patel Y., Tang W.H., Brennan M.L., Newman J.W., Stephensen C.B., Armstrong P., Hazen S.L., Allayee H. Genetic contribution of the leukotriene pathway to coronary artery disease // Hum. Genet. – 2011. – **129**, № 6. – P.617–627.
10. Huang H., Zeng Z., Li J., Zhang L., Chen Y. Variants of arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein (*ALOX5AP*) gene and risk of coronary heart disease: A meta-analysis // Arch. Med. Res. – 2010. – **41**, № 8. – P. 634–641.
11. Kido M., Otani H., Kyoji S., Sumida T., Fujiwara H., Okada T., Imamura H. Ischemic preconditioning-mediated restoration of membrane dystrophin during reperfusion correlates with protection against contraction-induced myocardial injury // Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2004. – **287**, № 1. – P. H81–H90.
12. Lisovyy O.O., Dosenko V.E., Nagibin V.S., Tumanovska L.V., Korol M.O., Surova O.V., Moibenko O.O. Cardio-protective effect of 5-lipoxygenase gene (*ALOX5*) silencing in ischemia-reperfusion // Acta Biochim. Pol. – 2009. – **56**, № 4. – P.687–694.
13. Poeckel D., Funk C.D. The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in preclinical models of cardiovascular disease // Cardiovasc. Res. – 2010. – **86**, № 2. – P.243–253.
14. Portnychenko A.G., Harmatina O.Yu., Kotsuruba A.V., Moybenko O.O. The role of nitric oxide in endotoxin-induced cardiodepression // Exp. Clin. Cardiol. – 2005. – **10**, №4. – P. 223–228.
15. Prasad N.S., Raghavendra R., Lokesh B.R., Naidu K.A. Spice phenolics inhibit human PMNL 5-lipoxygenase // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. – 2004. – **70**, №6. – P. 521–528.
16. Rådmark O., Samuelsson B. Regulation of the activity of 5-lipoxygenase, a key enzyme in leukotriene biosynthesis // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2010. – 396, №1. – P. 105–110.
17. Recchiuti A., Krishnamoorthy S., Fredman G., Chiang N., Serhan C.N. MicroRNAs in resolution of acute inflammation: identification of novel resolvin D1-miRNA circuits // FASEB J. – 2011. – **25**. – P. 544–560.
18. Shinmura K., Tang X.L., Wang Y., Xuan Y.T., Liu S.Q., Takano H., Bhatnagar A., Bolli R. Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – **97**, № 18. – P.10197–10202.
19. Tsai A.K., Li N., Hanson N.Q., Tsai M.Y., Tang W. Associations of genetic polymorphisms of arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein with risk of coronary artery disease in a European-American population // Atherosclerosis. – 2009. – **207**, № 2. – P.487–491.
20. Xi L., Tekin D., Gursoy E., Salloum F., Levasseur J.E., Kukreja R.C. Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia // Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2002. – **283**, № 1. – P. H5–H12.
21. Ye Y., Lin Y., Perez-Polo J.R., Uretsky B.F., Ye Z., Tieu B.C., Birnbaum Y. Phosphorylation of 5-lipoxygenase at ser523 by protein kinase A determines whether pioglitazone and atorvastatin induce proinflammatory leukotriene B4 or anti-inflammatory 15-epi-lipoxin A4 production // J. Immunol. – 2008. – **181**, № 5. – P.3515–3523.
22. Zhao L., Moos M.P., Gräbner R., Pédrone F., Fan J., Kaiser B., John N., Schmidt S., Spanbroek R., Lötzer K., Huang L., Cui J., Rader D.J., Evans J.F., Habenicht A.J., Funk C.D. The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm // Nat. Med. – 2004. – **10**, № 9. – P. 966–973.

*Ин-т физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев;
Междунар. центр астроном. и медико-экол. исследований НАН
Украины, Киев; E-mail: port@biph.kiev.ua*