

ГЕМІН, МОНООКСИД ВУГЛЕЦЮ ТА ЙОГО ДОНОР ВПЛИВАЮТЬ НА МЕТАБОЛІЗМ ІЗОЛЬОВАНОГО СЕРЦЯ В УМОВАХ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ

С. П. БЕСЧАСНИЙ, О. М. ГАСЮК

Кафедра біології людини та імунології
Херсонський державний університет,
вул. Університетська, 27, Херсон, 73013, Україна
e-mail: beschasnyis@gmail.com

Гемоксигенази виконують важливу роль у захисті клітин від стресорних впливів, забезпечують внутрішньоклітинний катаболізм гемвмісних білків. Активність гемоксигеназ обумовлює утворення ендogenous монооксиду вуглецю (CO). Як відомо, у невеликих кількостях CO активує розчинну гуанілатциклазу тим самим виконуючи цитопротекторну та антиапоптичну функції. На сьогодні перспективним для вивчення впливу на організм є сполуки-донори CO, які можна використовувати як протизапальні, антиапоптичні препарати. Особливої уваги заслуговує їхня дія на серцево-судинну систему. Метою дослідження було провести порівняльний вплив індуктору гемоксигенази-1, газоподібного CO та сполуки-донору CO на метаболізм ізольованого серця в умовах ішемії-реперфузії. На лабораторних мишах досліджували вплив ін'єкції індуктора гемоксигенази (геміну), донора CO (CORM-2) та розчиненого протягом 30 хв CO у перфузійному розчині Кребса-Хензелейта. Для виявлення впливу досліджуваних сполук на серце проводили ретроградну перфузію ізольованих сердець (із періодами перфузії-ішемії-реперфузії). Під час перфузії реєстрували електрограму серця, об'ємну швидкість коронарного потоку, у відтікаючому від серця розчині визначали вміст глюкози, кальцію, креатиніну та аспаратамінотрансферази (AsAt), з'ясовували ступінь ішемічного ушкодження. Стимуляція гемоксигенази-1 геміном не призводила до значних коливань у споживанні глюкози міокардом у період до ішемії та на початку реперфузії, рівень аспаратамінотрансферази не підвищувався у період перфузії та на початку реперфузії, був стабільним інтервал R-R під час перфузії та ішемії. Проте, наприкінці реперфузії відбувалося депонування кальцію міокардом, збільшувався рівень креатиніну. Перфузійний розчин із CO проявляв вазодилаторний ефект, із CORM-2 – вазоконстрикторний. CO також спричиняв депонування Ca^{2+} наприкінці реперфузії. CORM-2 навпаки – призводив до його вивільнення. CO знижував рівень креатиніну у перфузійному розчині, CORM-2 підвищував його рівень лише на початку реперфузії. CO та CORM-2 не посилювали вивільнення AsAt. CO на початку перфузії та під час ішемії знижував амплітуду зубця R, хоча у період реперфузії відбувалося його посилення, вкорочення інтервалу R-R. CORM-2 подовжував інтервал. CO та CORM-2 зменшували площу ішемічного ушкодження міокарду.

Ключові слова: аспаратамінотрансфераза, гемоксигеназа, глюкоза, електрокардіограма, ізольоване серце, кальцій, CORM-2.

Вступ. Гемоксигенази (або HO, HSP32) являють собою стресорні білки, які беруть участь у механізмах захисту від окисного пошкодження, спричиненого металами, ендотоксинами, гемом чи гемоглобіном та різноманітними цитокинами. Гемоксигеназа-1 (HO-1) є мікосомальним ферментом, який відіграє визначальну роль у першій стадії внутрішньоклітинного катаболізму Fe^{2+} -протопорфірину IX. Розпад гема у клітині супроводжується утворенням інших біологічно активних сполук: монооксиду вуглецю (CO), білівердину та Fe^{2+} . Вивільнений CO, який є активатором розчинної гуанілатциклази, запускає її сигнальний шлях, що є ефекторним механізмом цитопротекторного та антиапоптичного захисту (Ryter et al., 2002; Beschasny et al., 2021). Білівердин, та його відновлена форма (білірубін), є антиоксидантами (Frei et al., 1988). Вивільнене двовалентне залізо може брати участь у реакції

Фентона, що спричиняє утворення реактивних форм кисню (Abraham et al., 1995). Індуцибельна форма гемоксигенази HO-1 є загальноновизнаним регулятором запалення. Так, у нокаутованих за HO-1 мишей спостерігаються хронічні запальні процеси із ураженнями судин (Poss et al., 1997). Після впливу стафілококового ліпополісахариду у HO-1-дефіцитних мишей спостерігалися значні ушкодження органів та зниження виживаємості (Wiesel et al., 2000). Уведення гемоглобіну або білівердину (Sarady-Andrews et al., 2005) цим тваринам знижувало ступінь запалення легень, зменшувало експресію прозапальних цитокинів та, внаслідок індукції HO-1, покращувало виживання після впливу стафілококових ліпополісахаридів (Otterbein et al., 1995; Otterbein et al., 1997). Цікавим є те, що CO також володіє протизапальними властивостями, подібними до HO-1. CO інгібує активацію NF- κ B та секрецію гранулоци-

тарного макрофаг-стимулюючого фактору (Sarady et al., 2002). Було також показано, що CO призводить до зниження експресії TNF- α , IL-1 β при одночасному посиленні експресії протизапального цитокіну IL-10 (Otterbein et al., 2000). NO-1 під час активації макрофагів стимулює їхнє перетворення у протизапальний фенотип M2 (Sarady et al., 2002; Weis et al., 2009).

Вважається, що антиапоптична та протизапальна дія NO-1 пов'язана із вивільненням CO внаслідок її активності. Проте, залишається не зрозумілим чи однаковими є ефекти, що спостерігаються при впливі індукторів гемоксигенази або окремо CO.

Особливої уваги заслуговують т.зв. сполуки-донори CO (CO-Releasing Molecule, CORM), які є перспективними протизапальними, антиапоптичними сполуками. CORM після потрапляння до організму поступово розпадається з вивільненням CO. Ці сполуки дозволяють точно дозувати CO, є безпечними для організму та не спричиняють отруєння CO, оскільки інгаляції цього газу дуже складно контролювати.

Метою нашого дослідження було проведення порівняльного аналізу впливу індуктору гемоксигенази-1, газоподібного CO та сполуки-донору CO на метаболізм ізолюваного серця в умовах ішемії-реперфузії.

Матеріали й методи. Експеримент проводили на мишах-самцях, що були розділені на 4 групи по 7 тварин у кожній. Перша група за добу до перфузії серця отримала внутрішньоочеревинну ін'єкцію індуктора NO-1 (гемін) у концентрації 25 мг/кг («Sigma-Aldrich» (США)). Друга група отримала донор CO (CORM-2) у концентрації 25 мг/кг («Sigma-Aldrich» (США)). Через ізолювані серця тварин третьої групи під час перфузії пропускали перфузійний розчин, який протягом 30 хв насичували CO. Після наркотизування уретаном здійснювали ретроградну перфузію коронарних судин ізолюваного серця мишей в умовах постійного тиску (70 ± 2 мм рт. ст.) теплим ($+37^\circ\text{C}$) перфузійним розчином Кребса-Хензелейта для теплокровних (рН 7,2–7,4), який постійно насичували вуглецем (95% O_2 і 5% CO_2). Періоди перфузії, ішемії та реперфузії тривали по 30 хв.

Вимірювання показників виконували після стабілізації роботи серця протягом 30 хв. Під час перфузії знімали електрограму серця електрокардіографом «МІДАС 6/12MINI» у II відведенні. Визначали об'ємну швидкість (ОШ) коронарного потоку (у мл за 1 хв) (Neely et al., 1973). У відтікаючому від серця розчині визначали вміст глюкози, кальцію, креатиніну та аспартатамінонотрансферази (реагенти НВП «Філісіт-Діагностика»

(Україна). Для визначення ступеню ішемічного ушкодження, серця після реперфузії заморожували та нарізали кільцями товщиною 1,5–2 мм і фарбували 2,3,5-трифенілтетразолієм хлористим. Площу некротичних ділянок вимірювали за допомогою програми ImageJ та виражали у відсотках до загальної площі зрізу.

Статистичний аналіз результатів проводили із використанням програми Statistica 10, показники виражали у вигляді медіани. Достовірність відмінностей визначали за критерієм Мана–Уїтні та Вілкоксона. Зміни вважалися статистично значущими при $P < 0,05$. Дослідження проводили із дотриманням Директиви 2010/63/EU Європейського парламенту про захист тварин, що використовуються для наукових цілей та Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Результати та їх обговорення. Як видно з рисунку 1, у контрольній групі ОШ достовірно збільшилася перед початком ішемії, наприкінці реперфузії – збільшення (рис. 1-А).

При пропусканні перфузійного розчину із CO, на початку перфузії ОШ достовірно збільшилася, проте на початку реперфузії достовірних змін не зафіксовано, наприкінці реперфузії відбулося збільшення ОШ (див. рис. 1-Б). У групі, де вводили CORM-2, на початку перфузії ОШ знизилася на чверть, на початку реперфузії не змінювалася, наприкінці реперфузії відбулося зниження цього показника (див. рис. 1-В). У групі зі стимульованою NO-1 ОШ була стабільною, за винятком її зниження у період кінця реперфузії (див. рис. 1-Г).

Дослідження вмісту глюкози у перфузійному розчині показало посилення її споживання міокардом в контролі у період перфузії та на початку реперфузії, проте наприкінці реперфузії споживання глюкози достовірно знизилося (рис. 2-А). У групі де вводили гемін відбулося зниження споживання глюкози лише наприкінці реперфузії (рис. 2-Б). Використання перфузійного розчину із CO показало, що на початку перфузії споживання глюкози посилювалося, відразу після ішемії відбувалося зниження споживання майже наполовину, наприкінці реперфузії споживання знову посилювалося. Цікавим є те, що у групі із CORM - 2 показники споживання глюкози залишалися незмінними.

Динаміка споживання Ca^{2+} відрізнялася по групам: у контрольній групі перед ішемією кальцій вивільнявся у перфузійний розчин, на початку реперфузії спостерігалася його депонування у міокарді, проте, наприкінці реперфузії, знову відбувалося вивільнення Ca^{2+} до перфузійного розчину (рис. 2-А).

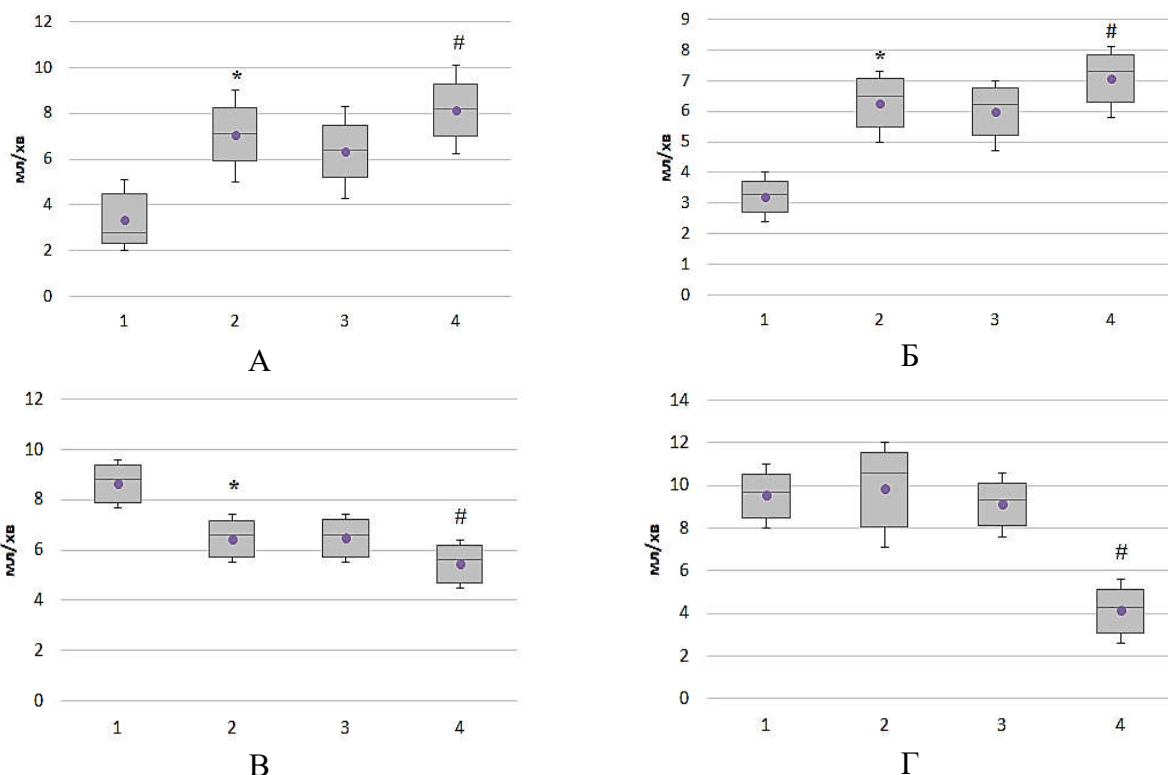


Рис. 1. Динаміка об'ємної швидкості кровотоку ізольованого серця: А- контроль; Б –перфузійний розчин із СО; В – введення CORM-2; Г – введення геміну

Примітки: 1- початок перфузії; 2 – кінець перфузії; 3 – початок реперфузії; 4 – кінець реперфузії; * $P < 0,05$ порівняно зі значеннями на початку перфузії; ** $P < 0,05$ порівняно зі значеннями перед ішемією; # $P < 0,05$ порівняно зі значеннями на початку реперфузії; формат представлення даних: ● – медіана, □ – 25-75%, I – мінімальне та максимальне значення

Notes: 1 - beginning of perfusion; 2 - end of perfusion; 3 - beginning of reperfusion; 4 - end of reperfusion; * $P < 0.05$ versus values at the beginning of perfusion; ** $P < 0.05$ versus values before ischemia; # $P < 0.05$ versus values at the beginning of reperfusion; data presentation format: ● - median, □ - 25-75%, I - minimum and maximum values

У групі, де застосовували гемін, в період перфузії перед ішемією відбувалося депонування Ca^{2+} , на початку реперфузії спостерігалось вивільнення депонованого кальцію (рис. 2-Б), наприкінці реперфузії знову відбувалося його депонування. У групі, в якій використовували перфузійний розчин із СО, відбувалося вивільнення Ca^{2+} у період до ішемії та відразу на початку реперфузії. Наприкінці реперфузії у цій групі спостерігалось депонування кальцію міокардом (рис. 2-В). Використання CORM-2 спричиняло вивільнення Ca^{2+} перед ішемією, на початку реперфузії вивільнення посилювалося у 3,3 рази. Наприкінці реперфузії відбувалося депонування кальцію (рис. 2-Г).

Вміст креатиніну, який є маркером пошкодження кардіоміоцитів, також відрізнявся по групам. У контролі перед ішемією його рівень знижувався, наприкінці реперфузії спостерігалось його вивільнення. У групі, де використовували гемін, вивільнення креатиніну було наприкінці реперфузії. Цікавим є те, що використання розчину із СО знижувало вивільнення креатиніну у період перед ішемією

Fig. 1. Dynamics of volumetric blood flow velocity in the isolated hearts: A- control; B - perfusion solution with CO; C - CORM-2; D – injection of hemin

Notes: 1 - beginning of perfusion; 2 - end of perfusion; 3 - beginning of reperfusion; 4 - end of reperfusion; * $P < 0.05$ versus values at the beginning of perfusion; ** $P < 0.05$ versus values before ischemia; # $P < 0.05$ versus values at the beginning of reperfusion; data presentation format: ● - median, □ - 25-75%, I - minimum and maximum values

та наприкінці реперфузії. CORM-2 спричиняв вивільнення креатиніну лише на початку реперфузії.

Стосовно АсАт, то у контролі спостерігалось вивільнення цього ферменту перед ішемією та на початку реперфузії. У групі, де вводили гемін, підвищення концентрації було на початку реперфузії. Використання СО напакі – знижувало вивільнення АсАт до перфузійного розчину. Попереднє введення CORM-2 спричиняло зниження процесу вивільнення АсАт із міокарду у період перфузії та на початку реперфузії.

Цікавими виявилися результати дослідження електрокардіографічних показників (табл. 1). У контрольній групі амплітуда зубця R перед ішемією збільшувалася у 4.4 рази. На початку реперфузії відбувалося зменшення амплітуди, а наприкінці реперфузії – посилення. У групі, яка отримувала гемін, під час перфузії та ішемії відбувалося зниження амплітуди, проте на початку та наприкінці реперфузії спостерігалось її посилення. Пропускання перфузійного розчину із СО показало

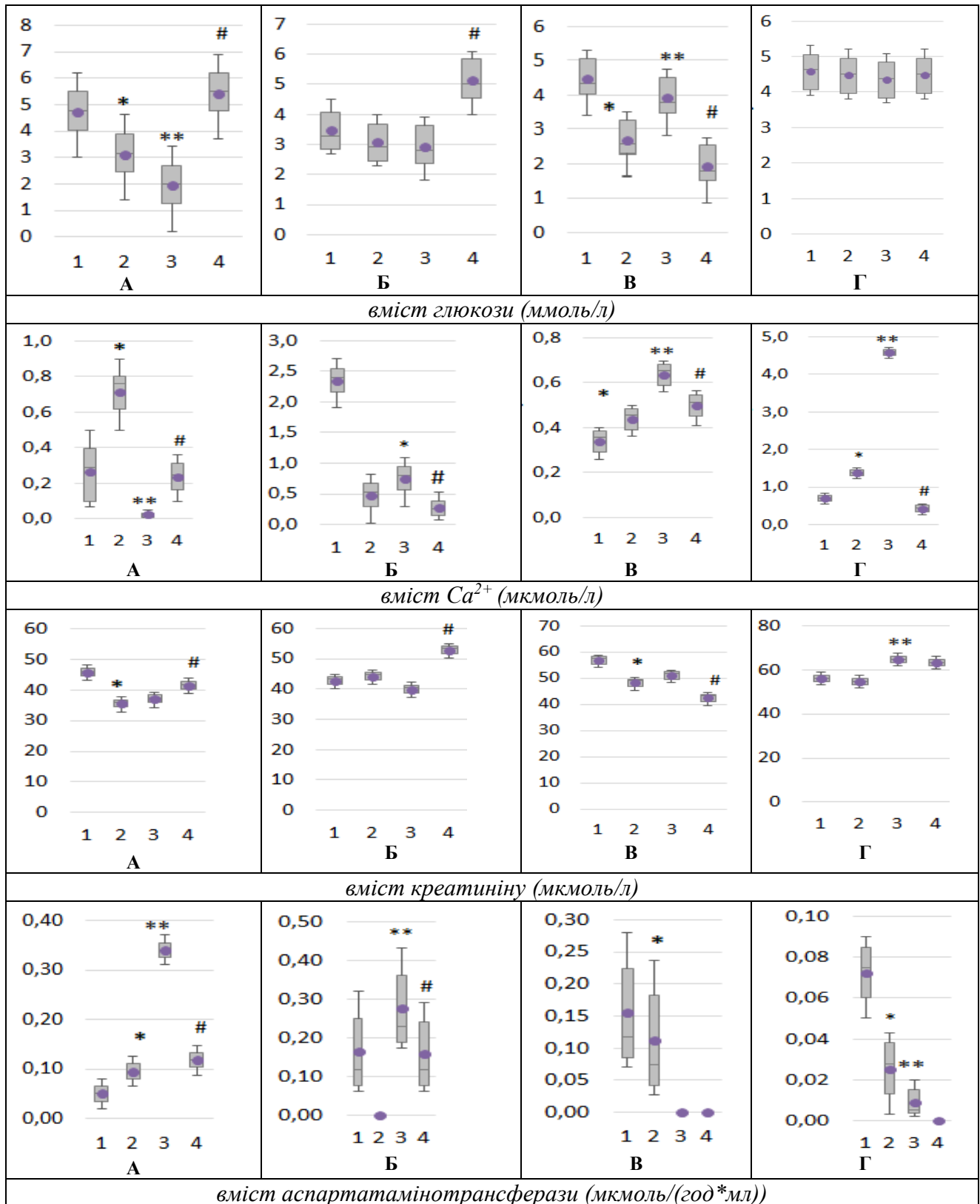


Рис. 2. Біохімічні показники у перфузійного розчину (A – контроль; Б – гемін; В – CO; Г – CORM-2) Fig. 2. Biochemical indicators in perfusion fluid (A - control; B - hemin; C - CO; D - CORM-2)

Примітки: 1- початок перфузії; 2 – кінець перфузії; 3 – початок реперфузії; 4 – кінець реперфузії; *P < 0,05 порівняно зі значеннями на початку перфузії; **P < 0,05 перед ішемією; #P < 0,05 на початку реперфузії; формат представлення даних: ● – медіана, □ – 25-75%, I – мінімальне та максимальне значення
 Notes: 1 - beginning of perfusion; 2 - end of perfusion; 3 - beginning of reperfusion; 4 - end of reperfusion; *P < 0.05 versus values at the beginning of perfusion; **P < 0.05 before ischemia; #P < 0.05 at the beginning of reperfusion; data presentation format: ● - median, □ - 25-75%, I - minimum and maximum values

Таблиця 1.

Показники амплітуди зубця R (мВ) та інтервалу R-R (мс) (Md)

Table 1.

<i>R-wave amplitude (mV) and R-R interval (ms) (Md)</i>					
Група	1 хв	30 хв	Ішемія	61 хв	90 хв
<i>Амплітуда зубця R (мВ)</i>					
Контроль	0,16 [0,14;0,17]	0,71* [0,65;0,75]	0,75 [0,69;0,79]	0,39*** [0,36;0,41]	0,66# [0,61;0,69]
Гемін	1,49 [1,43;1,54]	0,51* [0,49;0,53]	1,12 [1,07;1,16]	0,09*** [0,07;0,094]	1,53 [1,47;1,58]
СО	1,16 [0,1;1,22]	0,41* [0,39;0,42]	0,29** [0,2;0,3]	0,83*** [0,8;0,86]	2,96# [2,8;3,1]
CORM-2	0,11 [0,1;0,12]	0,51* [0,48;0,54]	0,06** [0,03;0,09]	1,48*** [1,41;1,55]	0,53# [0,49;0,56]
<i>інтервал R-R (мс)</i>					
Контроль	2,17 [2,08;2,27]	5,77* [5,5;6,04]	6,25** [5,94;6,56]	0,76*** [0,74;0,78]	7,15# [6,81;7,49]
Гемін	0,87 [0,84;0,9]	0,84 [0,81;0,87]	1,22 [1,18;1,26]	0,87*** [0,84;0,9]	1,46# [1,4;1,52]
СО	1,24 [1,19;1,29]	1,23 [1,18;1,28]	5,5** [5,24;5,76]	1,32*** [1,27;1,37]	1,00# [0,97;1,03]
CORM-2	1,48 [1,44;1,52]	5,69* [5,53;5,85]	7,62** [7,4;7,84]	1,07*** [1,05;1,09]	4,73# [4,6;4,86]

Примітки: *P < 0,05 порівняно зі значеннями на початку перфузії; **P < 0,05 порівняно зі значеннями перед ішемією; *** P < 0,05 порівняно зі значеннями під час ішемії; # P < 0,05 порівняно зі значеннями на початку реперфузії; дані подано у вигляді медіани та кватилей, Me [25%; 75%]

результати, подібні до результатів попередньої групи. Донор СО під час ішемії значно знижував амплітуду зубця R. На початку реперфузії відбувалося посилення, проте наприкінці реперфузії було її падіння.

Інтервал R-R у контрольній групі в період перед ішемією подовжувався, на початку реперфузії відбулося його вкорочення і вже наприкінці – подовження в 9 разів. Гемін спричиняв стабільні показники інтервалу R-R у період до та після ішемії. Проте, на початку та наприкінці реперфузії спостерігалось його подовження. Використання перфузійного розчину із СО показало, що у період ішемії відбувалося подовження інтервалу у 4 разв, під час реперфузії – вкорочення інтервалу. У групі із CORM-2 спостерігали результати, подібні до контролю (подовження інтервалу R-R на початку перфузії та під час ішемії, вкорочення на початку реперфузії та подовження наприкінці реперфузії).

Вплив досліджуваних сполук на площу ішемічного ураження міокарду був неоднаковий (рис. 3). При порівнянні з контролем, у групі з попереднім введенням геміну спостерігалось достовірне збільшення площі ушкодження. У групі, в якій використовували перфузійний розчин із роз-

чинним СО, спостерігалось достовірне зменшення площі ушкодженого міокарду в порівнянні з контролем. Найменший ступінь ушкодження було встановлено в групі, яка попередньо отримувала CORM-2. Порівнюючи ефект СО та CORM-2 виявилось, що донор СО достовірно зменшує площу ішемічного ураження міокарду в умовах ішемії-реперфузії у порівнянні з розчинним СО у перфузійному розчині.

Отримані результати вказують на неоднозначну роль стимуляції НО-1 у функціонуванні ізолюваного серця в умовах ішемії. Заслугове уваги те, що у випадку стимуляції НО-1 не спостерігалось значних коливань у споживанні глюкози міокардом у період до ішемії та на початку реперфузії. Депонування Ca²⁺ спостерігалось перед ішемією, проте на початку реперфузії відбувався вихід кальцію з міокарду. Наприкінці реперфузії знову спостерігалось його депонування. Стосовно креатиніну, то його рівень у відтікаючому перфузійному розчині збільшився наприкінці реперфузії подібно до контролю, проте у декілька разів з більшими значеннями. Позитивним є те, що рівень АсАт не підвищувався у період перфузії та на початку реперфузії (на тлі підвищених його рівнів у контрольній групі).

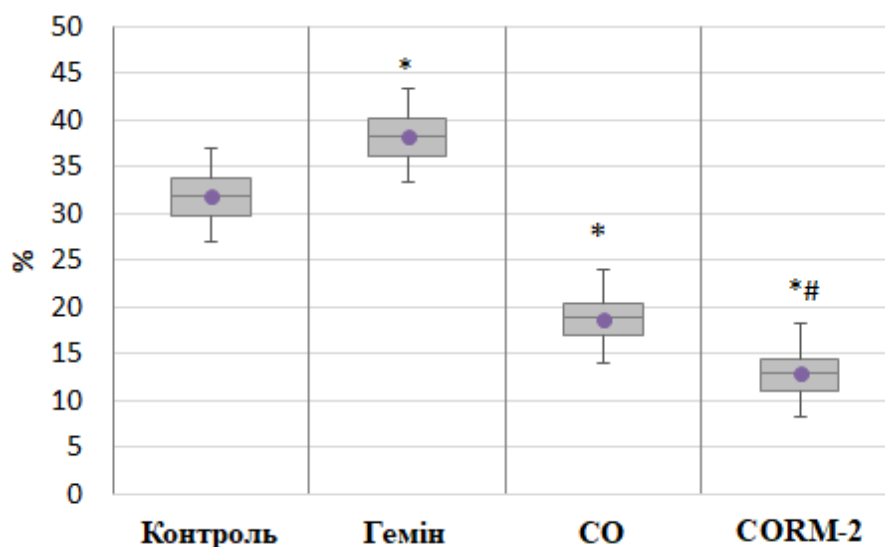


Рис 3. Вплив геміну, CO та його донора на ступінь розвитку некрозу після ішемії-реперфузії ізольованого серця миші

Примітки: * $P < 0,05$ порівняно з контролем; # $P < 0,05$ порівняно з CO; формат представлення даних: ● – медіана, □ – 25-75%, I – мінімальне та максимальне значення

Fig. 3. Influence of hemin, CO and its donor on the degree of necrosis development after ischemia-reperfusion of isolated myocardial heart

Note: * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs CO; data presentation format: ● - median, □ – 25-75%, I - minimum and maximum values

Стимуляція HO-1 геміном обумовлювала зниження амплітуди зубця R на початку перфузії на відміну від контролю, у якого спостерігалось її посилення. Стосовно впливу на тривалість інтервалу R-R, то в групі яка отримувала гемін, інтервал був стабільним на початку перфузії та під час ішемії. У контролі навпаки – спостерігалось його подовження. Під час реперфузії у групі із стимульованою HO-1 відбувалося подовження інтервалу R-R. Ступінь ушкодження міокарду незначно відрізнявся від контролю.

Ефекти CO та CORM-2 були дещо відмінними від ефектів стимуляції HO-1 геміном. Зокрема, розчин, насичений CO мав вазодилаторний вплив на судини серця, особливо під час перфузії та реперфузії. CORM-2 проявив вазоконстрикторний ефект. Споживання глюкози у групі із CORM-2 було стабільним під час перфузії та реперфузії. Дія CO у перфузійний період посилювала поглинання глюкози, на початку реперфузії – знижувала, наприкінці реперфузії – знову посилювала.

CO спричиняв вивільнення кальцію до перфузійного розчину та його депонування наприкінці реперфузії. CORM-2, навпаки, призводив до вивільнення кальцію у перфузійний розчин перед ішемією та на початку реперфузії. Рівень креатиніну у перфузійному розчині з CO знижувався перед ішемією та наприкінці реперфузії. CORM-2 підвищував рівень креатиніну лише на початку реперфузії. CO та CORM-2 не посилювали вивільнення АсАт до перфузійного розчину.

CO на початку перфузії та під час ішемії знижував амплітуду зубця R, а під час реперфузії – посилював. Під час реперфузії помітно вкорочувався інтервал R-R. Дія CORM-2 не стабілізувала вольтаж зубця R, проте подовжувала інтервал перед- та під час ішемії і наприкінці реперфузії. Разом з тим, попередній вплив CO та CORM-2 призводили до зменшення площі ішемічного ушкодження міокарду.

Дійсно, стимуляція HO-1 може посилювати захист клітин від стресорного пошкодження (Wen et al., 2015). За літературними даними, HO-1 володіє вазодилаторними ефектами (Ndisang et al., 2002), що узгоджується із отриманими даними. Автори вказують, що ішемія-реперфузія призводить до зниження активності HO-1 у міокарді, проте стимуляція геміном обумовлює посилення гемоксигеназної активності та захист міокарду від окисного стресу. У нашому випадку спостерігалася зворотна тенденція під час реперфузії.

Гемін якомога краще стимулює HO-1 (Ndisang et al., 2002). Отримані вазодилаторні ефекти під час ішемії-реперфузії при використанні перфузійного розчину із CO пояснюються тим, що низькі концентрації CO індуюють вивільнення оксиду азоту (Omura et al., 2005). Разом з тим відомо, що одночасне підвищення експресії білівердинредуктази та гемоксигенази-2 сприяє виживанню кардіоміоцитів (Ding et al., 2011). Джерелом геміну, окрім деградації геміну гемоглобіну, можуть бути й інші клітинні гемопротеїни, зок-

рема цитохром р450 та інші цитохроми, які також мають протизапальний ефект (Otterbein et al., 1995; Morita et al., 1995). Це узгоджується з відомостями, що гемоксигенази захищають мітохондрії від токсичного uszkodження, викликаного впливом геміну. Білірубін у високих концентраціях здатен інгібувати клітинний метаболізм та проліферацію шляхом впливу на активність ендоплазматичного ретикулуму (Müllebner et al., 2015).

Проведене дослідження показало, що стимуляція НО-1 обумовлювала зниження ОШ (можливий слабкий вазоконстрикторний ефект), знижувала споживання глюкози міокардом, відтерміновувала депонування кальцію кардіоміоцитами (наприкінці реперфузії), зменшує вивільнення креатиніну. Про позитивний вплив на стан міокарду вказує стабілізація інтервалу R-R, відсутність АсАт у перфузійному розчині у групи тварин із стимульованою НО-1.

Висновки. Отже, проведені дослідження показали, що попереднє уведення геміну позитивно впливає на метаболізм міокарду, має антиаритмічний ефект в умовах ішемії-реперфузії. Проте, одноразового його уведення недостатньо для захисту серця у період реперфузії. Використання перфузійного розчину із СО має вазодилаторний ефект, попереднє уведення CORM-2 – вазоконстрикторний, що пов'язано з їхнім впливом на кальцієві канали кардіоміоцитів. СО та CORM-2 сприятливо впливають на метаболізм міокарду, зменшують площу ішемічного uszkodження. Проте їхній вплив на кальцієві канали призводить до виникнення аритмії. Перспективним є дослідження CORM-2 як блокатора кальцієвих каналів у серцево-судинній системі.

Список літератури:

1. Abraham N.G., Lavrovsky Y., Schwartzman M.L., Stoltz R.A., Levere R.D., Gerritsen M.E., Shibahara S., Kappas A. Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. No 92(15). P. 6798-6802. doi: 10.1073/pnas.92.15.6798
2. Beschasnyi S.P., Hasiuk O.M. The effect of carbon monoxide's donor CORM-2 on erythrocyte aquaporins. *World of Medicine and Biology*. 2021. No 17(76). P. 167-173.
3. Ding B. et al. The coordinated increased expression of biliverdin reductase and heme oxygenase-2 promotes cardiomyocyte survival: a reductase-based peptide counters β -adrenergic receptor ligand-mediated cardiac dysfunction. *FASEB J*. 2011. No 25(1). P. 301-313. doi: 10.1096/fj.10-166454
4. Frei B., Stocker R., Ames B.N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988. No 85(24). P. 9748-9752. doi: 10.1073/pnas.85.24.9748
5. Morita T. et al. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. No 92(5). P. 1475-1479. doi: 10.1073/pnas.92.5.1475
6. Müllebner A. et al. Heme degradation by heme oxygenase protects mitochondria but induces ER stress via formed bilirubin. *Biomolecules*. 2015. No5(2). P. 679-701. doi: 10.3390/biom5020679
7. Ndisang J.F., Zhao W., Wang R. Selective regulation of blood pressure by heme oxygenase-1 in hypertension. *Hypertension*. 2002. No 40(3). P. 315-321. doi: 10.1161/01.hyp.0000028488.71068.16
8. Neely J.R. et al. Effects of ischemia on function and metabolism of the isolated working rat heart. *Am J Physiol*. 1973. No 225(3). P. 651-658. doi: 10.1152/ajplegacy.1973.225.3.651
9. Omura S. et al. Effects of genetic ablation of *bach1* upon smooth muscle cell proliferation and atherosclerosis after cuff injury. *Genes Cells*. 2005. No 10(3). P. 277-285. doi: 10.1111/j.1365-2443.2005.00832.x
10. Otterbein L. et al. Mechanism of hemoglobin-induced protection against endotoxemia in rats: a ferritin-independent pathway. *Am J Physiol*. 1997. No 272(2 Pt 1). P. L268-L275. doi: 10.1152/ajplung.1997.272.2.L268
11. Otterbein L., Sylvester S.L., Choi A.M. Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995. No 13(5):595-601. doi: 10.1165/ajrcmb.13.5.7576696
12. Otterbein L.E. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med*. 2000. No 6(4). P. 422-428. doi: 10.1038/74680
13. Poss K.D., Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997. No 94(20). P. 10919-10924. doi: 10.1073/pnas.94.20.10919
14. Ryter S.W., Otterbein L.E., Morse D., Choi A.M. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem*. 2002. No 1-2. P. 249-263. doi: 10.1023/A:1015957026924
15. Sarady J.K. et al. Carbon monoxide modulates endotoxin-induced production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002. No 27(6). P. 739-745. doi: 10.1165/rcmb.4816
16. Sarady-Andrews J.K. et al. Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005. No 289(6). P. L1131-L1137. doi: 10.1152/ajplung.00458.2004
17. Weis N. et al. Heme oxygenase-1 contributes to an alternative macrophage activation profile induced by apoptotic cell supernatants. *Mol Biol Cell*. 2009. No 20(5):1280-1288. doi: 10.1091/mbc.e08-10-1005
18. Wen Y.T. et al. Heatstroke effect on brain heme oxygenase-1 in rats. *Int J Med Sci*. 2015. No 12(9). P. 737-741. doi: 10.7150/ijms.12517
19. Wiesel P. et al. Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficient

mice. *Circulation*. 2000. No 102(24). P. 3015-3022. doi: 10.1161/01.cir.102.24.3015

References:

1. Abraham N.G., Lavrovsky Y., Schwartzman M.L., Stoltz R.A., Levere R.D., Gerritsen M.E., Shibahara S., Kappas A. Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. No 92(15). P. 6798-6802. doi: 10.1073/pnas.92.15.6798
2. Beschasnyi S.P., Hasiuk O.M. The effect of carbon monoxide's donor CORM-2 on erythrocyte aquaporins. *World of Medicine and Biology*. 2021. No 17(76). P. 167-173.
3. Ding B. et al. The coordinated increased expression of biliverdin reductase and heme oxygenase-2 promotes cardiomyocyte survival: a reductase-based peptide counters β -adrenergic receptor ligand-mediated cardiac dysfunction. *FASEB J*. 2011. No 25(1). P. 301-313. doi: 10.1096/fj.10-166454
4. Frei B., Stocker R., Ames B.N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988. No 85(24). P. 9748-9752. doi: 10.1073/pnas.85.24.9748
5. Morita T. et al. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. No 92(5). P. 1475-1479. doi: 10.1073/pnas.92.5.1475
6. Müllebner A. et al. Heme degradation by heme oxygenase protects mitochondria but induces ER stress via formed bilirubin. *Biomolecules*. 2015. No5(2). P. 679-701. doi: 10.3390/biom5020679
7. Ndisang J.F., Zhao W., Wang R. Selective regulation of blood pressure by heme oxygenase-1 in hypertension. *Hypertension*. 2002. No 40(3). P. 315-321. doi: 10.1161/01.hyp.0000028488.71068.16
8. Neely J.R. et al. Effects of ischemia on function and metabolism of the isolated working rat heart. *Am J Physiol*. 1973. No 225(3). P. 651-658. doi: 10.1152/ajplegacy.1973.225.3.651
9. Omura S. et al. Effects of genetic ablation of *bach1* upon smooth muscle cell proliferation and atherosclerosis after cuff injury. *Genes Cells*. 2005. No 10(3). P. 277-285. doi: 10.1111/j.1365-2443.2005.00832.x
10. Otterbein L. et al. Mechanism of hemoglobin-induced protection against endotoxemia in rats: a ferritin-independent pathway. *Am J Physiol*. 1997. No 272(2 Pt 1). P. L268-L275. doi: 10.1152/ajplung.1997.272.2.L268
11. Otterbein L., Sylvester S.L., Choi A.M. Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995. No 13(5):595-601. doi: 10.1165/ajrcmb.13.5.7576696
12. Otterbein L.E. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med*. 2000. No 6(4). P. 422-428. doi: 10.1038/74680
13. Poss K.D., Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997. No 94(20). P. 10919-10924. doi: 10.1073/pnas.94.20.10919
14. Ryter S.W., Otterbein L.E., Morse D., Choi A.M. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem*. 2002. No 1-2. P. 249-263. doi: 10.1023/A:1015957026924
15. Sarady J.K. et al. Carbon monoxide modulates endotoxin-induced production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002. No 27(6). P. 739-745. doi: 10.1165/rcmb.4816
16. Sarady-Andrews J.K. et al. Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005. No 289(6). P. L1131-L1137. doi: 10.1152/ajplung.00458.2004
17. Weis N. et al. Heme oxygenase-1 contributes to an alternative macrophage activation profile induced by apoptotic cell supernatants. *Mol Biol Cell*. 2009. No 20(5):1280-1288. doi: 10.1091/mbc.e08-10-1005
18. Wen Y.T. et al. Heatstroke effect on brain heme oxygenase-1 in rats. *Int J Med Sci*. 2015. No 12(9). P. 737-741. doi: 10.7150/ijms.12517
19. Wiesel P. et al. Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circulation*. 2000. No 102(24). P. 3015-3022. doi: 10.1161/01.cir.102.24.3015

HEMIN, CARBON MONOXIDE AND ITS DONOR AFFECT THE METABOLISM OF AN ISOLATED HEART UNDER CONDITIONS OF ISCHEMIA-REPERFUSION

S. P. Beschasnyi, O. M. Hasiuk

Hemoxygenases play an important role in protecting cells from stressors and provide intracellular catabolism of heme-containing proteins. The activity of hemoxygenase is responsible for the formation of endogenous carbon monoxide (CO). In small amounts, CO is known to activate soluble guanylate cyclase, thus performing cytoprotective and anti-apoptotic functions. To date, CO donor compounds, which can be used as anti-inflammatory, anti-apoptotic drugs, are promising for studying their effects on the body. Their effects on the cardiovascular system deserve special attention. The aim of the study was to compare the effects of hemoxygenase inducer-1, gaseous CO and CO donor compound on the metabolism of the isolated heart under ischemia-reperfusion conditions. The effects of hemoxygenase inducer hemin, CO donor (CORM-2) and dissolved for 30 min with Krebs-Henseleit perfusion solution was investigated in laboratory mice. Retrograde perfusion of isolated hearts (with perfusion-reperfusion periods) was performed to reveal the effect of the studied compounds on the heart. During perfusion we recorded cardiac electrogram, coronary volumetric velocity, determined the content of

glucose, calcium, creatinine and aspartate aminotransferase (AST) in the solution drained from the heart, and determined the degree of ischemic damage. Stimulation of hemoxygenase with hemin did not result in significant fluctuations in myocardial glucose intake during perfusion and early reperfusion, aspartate aminotransferase levels were not elevated during perfusion and early reperfusion, and the R-R interval was stable during perfusion and ischemia. However, at the end of reperfusion, there was myocardial calcium deposition and creatinine level increased. The degree of ischemic damage after reperfusion did not differ from control. Perfusion solution from CO showed vasodilator effect, CORM-2 – vasoconstrictor effect. CO also resulted in Ca^{2+} deposition at the end of reperfusion. On the contrary, CORM-2 led to its release. CO decreased creatinine level in perfusion solution, while CORM-2 increased its level only at the beginning of reperfusion. CO and CORM-2 did not increase AST release. CO at the beginning of perfusion and during ischemia decreased the amplitude of the R waveform, although it increased and shortened the R-R interval during reperfusion. CORM-2 lengthened the interval. CO and CORM-2 decreased the area of ischemic myocardial damage.

Keywords: aspartate aminotransferase, heme oxygenase, glucose, an electrocardiogram, isolated heart, calcium, CORM-2.

Отримано редколегією 30.10.2021