

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

## Заглушення експресії гена ALOX5 із застосуванням малих інтерферуючих РНК запобігає некротичній загибелі неонатальних кардіоміоцитів при аноксії–реоксигенації

*В експериментах на первинній культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура встановлено, що у них експресується ген ALOX5, який кодує фермент 5-ліпоксигеназу. Моделювання аноксії–реоксигенації не впливало суттєво на експресію мРНК 5-ліпоксигенази. Введення у кардіоміоцити специфічних до мРНК 5-ліпоксигенази інтерферуючих РНК (siRNA) пригнічувало експресію гена ALOX5 через 24 год культивування у 4,7 раза ( $P < 0,05$  порівняно з введенням індиферентних РНК). При моделюванні аноксії–реоксигенації зниження рівня мРНК 5-ліпоксигенази супроводжувалося збільшенням кількості живих клітин (на 13,3 %,  $P < 0,001$ ) внаслідок зменшення кількості клітин, що загинули шляхом некрозу (на 14,6 %,  $P < 0,001$ ). Число апоптотичних клітин при цьому не змінювалося. Отримані результати дають змогу стверджувати, що специфічне пригнічення експресії гена, що кодує фермент 5-ліпоксигеназу, за допомогою інтерферуючих РНК здійснює цитопротективний ефект при аноксії–реоксигенації кардіоміоцитів.*

*Ключові слова:* ALOX5; РНК інтерференція; кардіоміоцити; аноксія–реоксигенація.

### ВСТУП

Ліпоксигенази належать до родини мономерних негемових, не сірко-, а залізовмісних діоксигеназ, що каталізують перетворення поліненасичених жирних кислот у кон'юговані гідропероксиди [5]. Ген ALOX5 кодує фермент 5-ліпоксигеназу, яка каталізує перетворення арахідонової кислоти у лейкотриєн A<sub>4</sub> – попередник низки біологічно активних ейкозаноїдів [21]. Утворення лейкотриєнів супроводжується генерацією низки сполук з прооксидантними властивостями, таких, як гідроперекиси ліпідів [5, 21]. Комбінована дія ейкозаноїдів і прооксидантів зумовлює негативний вплив 5-ліпоксигенази на клітини серця при ішемії–реперфузії, а хімічні інгібітори цього ферменту проявляють виражені кардіопротекторні властивості [2, 3, 11]. Патологічне значення активації 5-ліпоксигенази при ішемії серця

добре вивчено на рівні цілісного організму або органа [2, 3, 11], однак практично немає даних щодо визначення ролі цього ферменту в культурі ізольованих кардіоміоцитів при відтворенні ішемічно–реперфузійного ушкодження, яке за таких умов проявляється загибеллю клітин некротичним, апоптотичним та аутофагічним шляхом [4]. Більше того, сам факт експресії гена ALOX5 у кардіоміоцитах донині не було встановлено. Наведені дані безумовно є підставою для розробки нових методів впливу на активність вказаного ферменту або експресію гена ALOX5. Для цього, наприклад, може бути використана технологія РНК-інтерференції – один з найсучасніших високоспецифічних методів цільової генотерапії, який вже досить широко використовують дослідники різних галузей біології та медицини [6, 10, 13, 19, 20]. Дволанцюгові РНК при потраплянні в клітину активують низку

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

молекулярних систем (Dicer, RISC тощо), що забезпечують селективну деградацію мРНК певного гена [6]. У зв'язку з цим, метою нашої роботи було дослідити, як вплине специфічне заглушення гена ALOX5 за допомогою інтерферуючих РНК на резистентність кардіоміоцитів до аноксії–реоксигенації.

## МЕТОДИКА

Отримання культури ізольованих неонатальних кардіоміоцитів та моделювання аноксії–реоксигенації проводили за описаною [7] методикою.

*РНК-інтерференція in vitro.* РНК для специфічного заглушення гена ALOX5, а також індиферентні РНК, що не впливають на експресію жодного гена, були синтезовані на замовлення фірмою “Metabion” (Німеччина) і мали наступну послідовність нуклеотидів: ALOX5-Sense-5'-GUACAGGAAGGGAACAUUUUU-3', ALOX5-Antisense-5'-AAAUGUCCCUUCCUGUACUU-3', Scrambled-Sense-5'-UGUUCAGCGAAAUUAACCUU-3', Scrambled-Antisense-5'-GGUUAUAUUUCGCUGAACAUU-3'. Дволанцюгові РНК отримували перед дослідом таким чином: розчини відповідних сенсових і антисенсових олігонуклеотидів розводили за допомогою буфера для анелінга, який включав у себе (ммоль/л): HEPES-KOH – 30, (рН 7,4), KCl – 100, MgCl<sub>2</sub> – 2, NH<sub>4</sub>Ac – 50. В окрему пробірку вносили рівні об'єми кожного з розчинів і додавали вдвічі менший об'єм буфера. Отриману суміш інкубували 1 хв при 90 °С і протягом 45 хв, охолоджували до кімнатної температури у термоциклері “GeneAmp System 2700”. Введення у кардіоміоцити специфічних до мРНК 5-ліпоксигенази чи індиферентних дволанцюгових РНК здійснювали електропорацією за допомогою набору для трансфекції кардіоміоцитів щура та приладу Nucleofector (“Amaxa”, США). Кардіоміоцити у живильному сере-

довищі переносили у пробірки та осаджували центрифугуванням протягом 60 с при 2300 хв<sup>-1</sup>. До клітинного осаду додавали 104 мкл буфера, що містив 85 мкл розчину для трансфекції кардіоміоцитів щура та 19 мкмоль/л додаткового розчину (за рекомендаціями виробника) а також 7,5 мкл розчину контрольних (індиферентних) чи 5-LO-специфічних дволанцюгових РНК (20 ммоль/л). Вміст пробірок обережно перемішували і переносили в кювети для трансфекції. Кювети поміщали у нуклеофектор і запускали програму, розроблену спеціально для введення генетичних конструкцій у кардіоміоцити. Вміст кювет переносили у “свіже” середовище і культивували за наведеною вище схемою протягом доби. Всі операції проводилися при 37 °С.

*Виділення РНК, зворотна транскрипція та полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі.* РНК виділяли із використанням набору Trizol RNA-prep (“Isogen”, Росія) з культур кардіоміоцитів, що зазнали дії аноксії–реоксигенації, контрольних культур, а також з кардіоміоцитів, що зазнавали аноксії–реоксигенації на тлі введення специфічних до мРНК 5-ліпоксигенази чи індиферентних дволанцюгових РНК за допомогою електропорації. Концентрацію виділеної РНК визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 1000 (“Thermo Scientific”, США). Зворотну транскрипцію проводили із використанням набору для синтезу стандартних комплементарних кДНК (кДНК), (“Fermentas», Литва), застосовуючи 1,2–1,5 мкг загальної РНК і гексамерний праймер. Отримана внаслідок зворотної транскрипції кДНК зазнавала генспецифічної ампліфікації за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Для кількісної оцінки експресії мРНК 5-ліпоксигенази ми використовували праймери такої послідовності: прямий ALOX5-F 5'-ATG CGC TCG AGT CCT ACG CCT T-3', зворотний ALOX5-R 5'-GCT GAT CTT GCC CTT GAG ACC CTC-3'. Експресія гена

ALOX була стандартизована відносно експресії гена 18S рибосомальної субодиниці як ендогенного контролю. Були використані праймери такої послідовності: прямий 18S-F 5'-CTTAGAGGGACAAGTGGCG-3' та зворотний 18S-R 5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'. ПЛР-ампліфікацію гена ALOX5 проводили у 10 мкл суміші для ПЛР, що містила 30 пмоль/л кожного праймера. Об'єм доводили до 20 мкл деіонізованою водою. Ампліфікацію здійснювали за допомогою термоциклера "7500 Fast Real-Time PCR System". Програма ампліфікації починалася із попередньої активації AmpliTaq Gold® ДНК-полімерази протягом 10 хв при 95 °С та складалася з 50 циклів: денатурація – 95 °С, 15 с, приєднання праймерів та елонгація – 64 °С, 1 хв. Для контролю специфічності проводили стадію дисоціації – послідовне підвищення температури від 64 до 99 °С із реєстрацією зниження інтенсивності флуоресценції комплексів дволанцюгових ДНК з флуоресцентним барвником SYBR Green. Для побудови стандартної кривої використовували ампліфіковані фрагменти гена ALOX5, які вилучали з агарозного гелю та очищували за допомогою набору для виділення ДНК ("Fermentas", Литва). Концентрацію ДНК визначали із використанням спектрофотометра NanoDrop 1000 ("Thermo Scientific", США) та перераховували на кількість молекул у 1 мкл. Після цього готували послідовні розведення очищеної ДНК гена 5-ліпоксигенази та застосовували їх для ампліфікації за вищевказаною програмою. Аналіз отриманих результатів проводили за допомогою програмного забезпечення 7500 Fast Real-time PCR.

Кількість живих, некротичних та апоптотичних клітин визначали за допомогою фарбування кардіоміоцитів біс-бензimidом (Hoechst 33342) і йодидом пропідіуму [1] у концентрації 8,75 мкмоль/л та оцінювали за допомогою методу флуоресцентної мікроскопії (Nikon Eclipse E200, фільтр D/PI

довжина хвилі збудження 330–380 та 510–560 нм для Hoechst і йодиду пропідіуму відповідно).

*Статистична обробка результатів.* Отримані результати обробляли статистично з використанням програми Excel 2000 та Origin 7.0. Вірогідність відмінностей середніх значень ( $P < 0,05$ ) визначали за критерієм t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Насамперед нами було визначено рівень експресії мРНК 5-ліпоксигенази у культивованих кардіоміоцитах шура, який становив  $7,5 \cdot 10^{-5}$  ум. од.  $\pm 7,5 \cdot 10^{-6}$  ум. од. за нормальних умов та практично не змінювався після аноксії–реоксигенації (рис. 1,а). Отже, кардіоміоцити здатні експресувати цей ген, та бути джерелом відповідних продуктів перетворення арахідонової кислоти за допомогою 5-ліпоксигенази.

Введення в культуру кардіоміоцитів малих інтерферуючих РНК, специфічних до мРНК 5-ліпоксигенази, призводило до зменшення рівня експресії мРНК вищезгаданого гена в 4,7 раза ( $P < 0,05$ ) через 24 год після трансфекції, що було визначено нами за допомогою ПЛР у реальному часі (рис. 1,б).

Відтворення аноксії–реоксигенації на культурах кардіоміоцитів виявило суттєвий вплив заглушення гена ALOX5 на співвідношення живих, некротичних та апоптотичних кардіоміоцитів (рис. 2). Через добу після введення у кардіоміоцити дволанцюгових РНК, що не впливають на експресію жодного гена, співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин становило  $83,34 \pm 2,89$ ,  $11,2 \pm 2,61$  та  $5,5 \% \pm 1,55 \%$  відповідно. У культурах, в які вводилися дволанцюгові РНК, що заглушували ген 5-ліпоксигенази, це співвідношення було  $76 \pm 3,65$ ,  $15 \pm 1,43$  та  $8,9 \% \pm 2,54 \%$  відповідно. Після аноксії протягом 30 хв з наступною реоксигенацією впродовж 60 хв

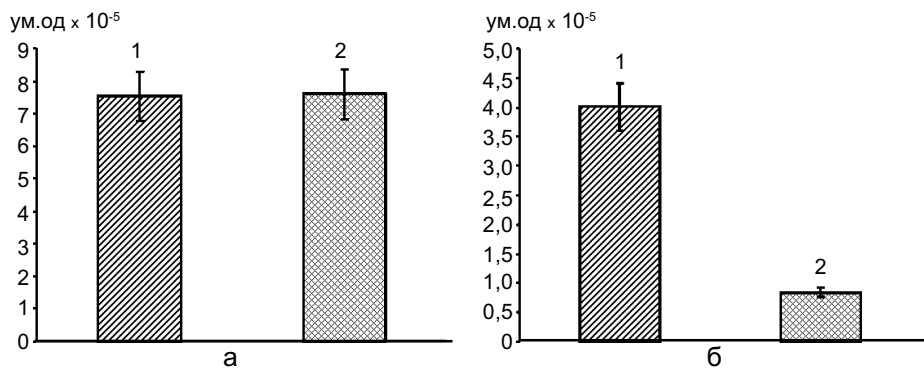


Рис. 1. Експресія мРНК 5-ліпоксигенази в культурі кардіоміоцитів при аноксії–реоксигенації (а): 1 – контроль, 2 – аноксія–реоксигенація та за умов специфічного заглушення цього гена за допомогою інтерферуючих РНК (б) 1 – індиферентні РНК, 2 – інтерферуючі РНК; n = 6. \* P<0,05 у порівнянні з контролем

кількість живих клітин у контрольних культурах зменшувалася до  $62,7 \% \pm 1,85 \%$  ( $P < 0,001$ ), некротичних збільшилося до  $29,5 \% \pm 2,61 \%$  ( $P < 0,001$ ), а кількість апоптотичних клітин, вірогідно не змінювалася. Моделювання аноксії–реоксигенації на культурах із заглушенням експресії гена 5-ліпоксигенази не призводило до вірогідних змін кількості живих, некротичних та апоптотичних клітин порівняно з контролем ( $P > 0,05$ ). При цьому у культурах, що зазнавали аноксії–реоксигенації на тлі введення індиферентних дволанцюгових РНК, збільшувалася кількість живих клітин до  $76 \% \pm 1,27 \%$  ( $P < 0,001$ ), а некротичних зменшувалася до  $14,9 \% \pm 1,32 \%$  ( $P < 0,001$ ). Кількість апоптотичних клітин при цьому вірогідно не змінювалася ( $P > 0,05$ ).

Таким чином, отримані нами результати свідчать про те, що заглушення гена ALOX дає змогу збільшити кількість живих клітин після аноксії–реоксигенації за рахунок зменшення клітин, що загинули некротичним шляхом. Зважаючи на те, що за каталітичної дії 5-ліпоксигенази утворюються прооксидантні речовини (гідроперекиси ліпідів), зрозуміло, що за участі цього ферменту відбувається порушення цілісності плазмолем та мембран органел, що є основною причиною розвитку некрозу [8, 9, 15, 27]. А отже, за умов зменшення експресії гена ALOX5 та можливості утворення

його білкового продукту, ймовірність розвитку подій за описаним сценарієм знижується. Деякі дані свідчать і про залучення ліпоксигеназ до запуску апоптотичної програми, зокрема спричиненої впливом фактора некрозу пухлин  $\alpha$  [18, 27]. Проте за нашими результатами, заглушення гена ALOX5 не запобігало апоптотичній загибелі кардіоміоцитів. Це опосередковано свідчить про те, що запуск апоптозу кардіоміоцитів при аноксії–реоксигенації не потребує залучення ліпоксигеназ чи їх продуктів. Іншим механізмом впливу ліпоксигеназ на функціонування кардіоміоцитів та їх резистентність до ішемії є активація рецепторів лейкотриєнів (CysLT1 та CysLT2) [16]. Останнім часом із застосуванням різних методів, включаючи гібридизацію *in situ*, Northern-blotting, та ПЛР у реальному часі, було показано наявність транскриптів згаданих рецепторів у тканинах серця [12, 14, 17, 23]. Таким чином, лейкотриєни можуть аутокринно впливати на кардіоміоцити, взаємодіючи із специфічними рецепторами. Liu та співавт. [16] встановили, що мобілізація кальцію, індукована впливом ангіотензину II у кардіоміоцитах, опосередковується активацією рецепторів лейкотриєнів, а інгібітор 5-ліпоксигенази AA-861 і селективний антагоніст рецептора CysLT1 (МК-571) запобігали збільшенню концентрації внутрішньоклітинного кальцію за умов

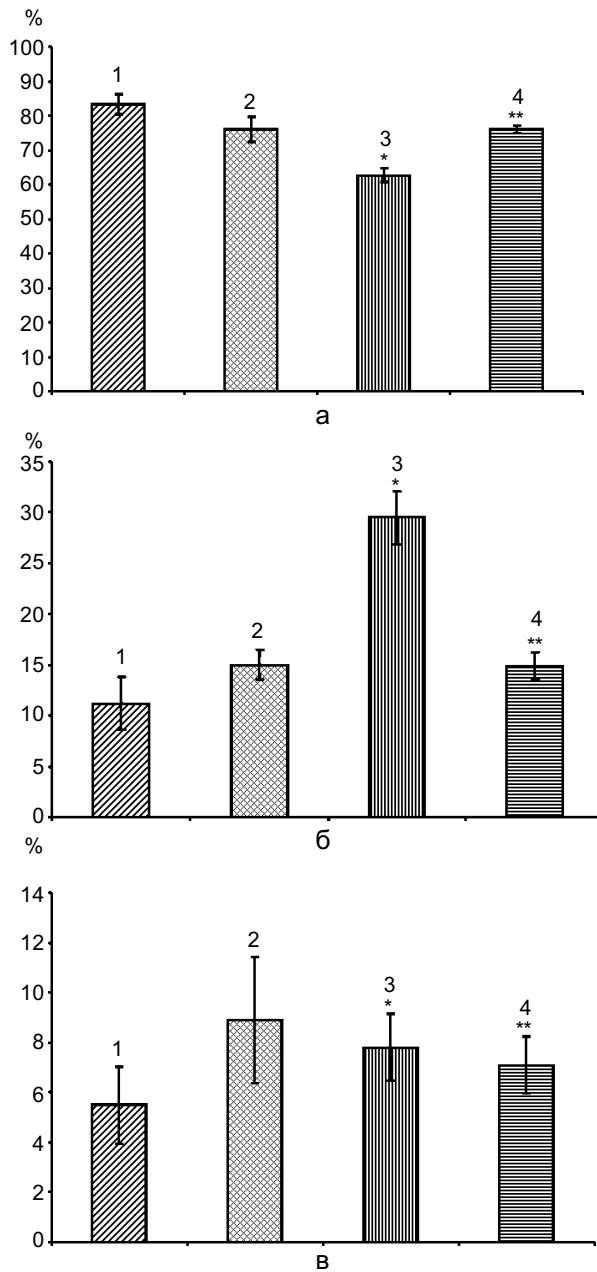


Рис. 2. Зміни кількості живих (а), некротичних (б) та апоптотичних (в) клітин у первинній культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів при відтворенні аноксії–реоксигенації на тлі пригнічення експресії гена 5-ліпоксигенази: 1 – контрольні культури, у які було введено індиферентні РНК; 2 – культури, у які було введено специфічні до мРНК 5-ліпоксигенази інтерферуючі РНК; 3 – аноксія–реоксигенація на тлі введення індиферентних РНК; 4 – аноксія–реоксигенація на тлі введення інтерферуючих РНК; n = 14. \*P<0,001 порівняно з контрольними культурами, у які було введено індиферентні РНК; \*\*P<0,001 порівняно з культурами, що зазнавали аноксії–реоксигенації на тлі введення індиферентних РНК

впливу ангіотензину II. Ці дані, дають змогу припустити, що протекторний ефект заглушення гена ALOX5 пов'язаний із зменшенням перевантаження кальцієм кардіоміоцитів, що значною мірою проявляється при гіпоксії. Про значення кальційзалежного ушкодження кардіоміоцитів, зокрема при індукції некрозу, відомо досить давно [22, 28].

Технологія специфічного заглушення генів із застосуванням інтерферуючих РНК, яка була використана для запобігання ушкодження кардіоміоцитів при аноксії–реоксигенації, на нашу думку, відкриває великі перспективи для специфічної генотерапії інфаркту міокарда та ішемічного ушкодження інших органів. Тимчасовий характер заглушення гена зумовлює перевагу цього методу порівняно з нокаутом генів, що не може знайти практичного застосування за клінічних умов, бо всі гени, що експресуються в організмі, необхідні для підтримання нормальної життєдіяльності. Проте за умов патології, коли активність певних генів та їх білкових продуктів може бути небажаною та спричинює додаткове ушкодження, заглушення цих генів на певний час (наприклад, на період гострого інфаркту міокарда) є вельми доцільним. Звісно, коло генів, що можуть бути мішенями антиішемічної терапії не обмежується ліпоксигеназами, а може бути значно розширене. Так, у Song та співавт. [13] продемонстрували можливість запобігання апоптозу, що індукувався гіпоксією та реоксигенацією кардіоміоцитів, із використанням інтерферуючих РНК до однієї із тирозинових фосфатаз – РТР-1В. З огляду на ці дані, зрозуміло, що технологія РНК-інтерференції має великі переваги, бо дає

можливість здійснювати заглушення одночасно багатьох генів, наприклад тих, що беруть участь у розвитку некрозу чи апоптозу. Подальші роботи в цьому напрямку дозволять окреслити перелік відповідних генів та довести ефективність їх заглушення за умов ішемії міокарда.

## ВИСНОВКИ

1. Неонатальні кардіоміоцити щура здатні експресувати ген ALOX5, що кодує фермент 5-ліпоксигеназу.

2. Аноксія–реоксигенація неонатальних кардіоміоцитів щура протягом 30 та 60 хв відповідно не призводить до вірогідних змін рівня експресії мРНК 5-ліпоксигенази.

3. Зниження рівня експресії мРНК 5-ліпоксигенази за допомогою специфічних дволанцюгових РНК запобігає некротичній загибелі кардіоміоцитів при аноксії–реоксигенації.

**А.О. Лисовой, В.С. Нагибин, О.В. Суrowая,  
Л.В. Тумановская, В.Е. Досенко, А.А. Мойбенко**

### **ЗАГЛУШЕНИЕ ГЕНА ALOX5 ПРИ ПОМОЩИ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК ПРЕДОТВРАЩАЕТ НЕКРОТИЧЕСКУЮ ГИБЕЛЬ НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ АНОКСИИ–РЕОКСИГЕНАЦИИ**

В экспериментах на первичной культуре изолированных неонатальных кардиомиоцитов крысы установлено, что в них экспрессируется ген, кодирующий фермент 5-липоксигеназу. Моделирование аноксии–реоксигенации существенно не влияло на экспрессию гена ALOX5. Введение в кардиомиоциты специфических к мРНК 5-липоксигеназы интерферирующих РНК подавляло экспрессию гена ALOX5 через 24 ч культивирования в 4,7 раза ( $P < 0,05$  по сравнению с введением индифферентных РНК). При моделировании аноксии–реоксигенации снижение уровня мРНК 5-липоксигеназы сопровождалось увеличением количества живых клеток (на 13,3 %,  $P < 0,001$ ) за счет уменьшения количества клеток, погибших путем некроза (на 14,6 %,  $P < 0,001$ ). Число апоптотических клеток при этом не изменялось. Полученные результаты позволяют утверждать, что специфическое угнетение экспрессии гена ALOX5 при помощи интерферирующих РНК оказывает цитопротективный эффект при аноксии–реоксигенации кардиомиоцитов.

Ключевые слова: ALOX5; РНК интерференция; кардиомиоциты; аноксия–реоксигенация.

**O.O. Lisovyy, V.S. Nagibin, O.V. Surova,  
L.V. Tumanovska., V.E. Dosenko, A.A. Moibenko**

### **SIRNA-MEDIATED SILENCING OF 5-LIPOXYGENASE GENE (ALOX5) REDUCES NECROSIS OF CARDIOMYOCYTES IN ANOXIA-REOXYGENATION**

In experiments on the primary culture of isolated neonatal rat cardiomyocytes it was determined that cardiomyocytes express ALOX5 gene encoding enzyme 5-lipoxygenase. Anoxia-reoxygenation does not affect significantly the expression of 5-lipoxygenase mRNA in cardiomyocytes. Transfection of 5-lipoxygenase-specific small interfering RNA's (siRNA) into cardiomyocytes lead to a significant reduction of 5-lipoxygenase mRNA expression in cardiomyocytes 24 hours after transfection. ALOX5 gene silencing resulted in improved viability of cell population (by 13,3 %  $P < 0,001$ ) due to decreased number of necrotic (by 14,6 %,  $P < 0,001$ ), but not apoptotic, cells during anoxia-reoxygenation. Our results indicate that siRNA against ALOX5 effectively protects cardiomyocytes against anoxia-reoxygenation injury.

Key words: ALOX5; RNA interference; cardiomyocytes; anoxia-reoxygenation.

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

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Досенко В.С., Нагібін В.С., Тумановська Л.В. та ін. Посткондиціонування запобігає апоптотичній, некротичній та аутофагічній смерті кардіоміоцитів у культурі // *Фізіол. журн.* – 2005. – **51**. – Р. 12–17.
2. Колчин Ю.Н., Попович Л.Ф., Грабовський Л.А. и др. Влияние ингибитора 5-липоксигеназы кверцетина на морфофункциональные проявления повреждения миокарда при ишемии-реперфузии сердца // *Кардиология.* – 1990. – **30**, № 3. – С. 72–75.
3. Пархоменко А.Н., Мойбенко А.А., Кожухов С.Н. и др. Первый опыт применения внутривенной формы ингибитора 5-липоксигеназы у больных с острым инфарктом миокарда: клинико-гемодинамические параллели, влияние препарата на размеры некроза // *Укр. кардіол. журн.* – 2000. – № 1-2. – С. 5–9.
4. Тумановська Л.В., Досенко В.С., Нагібін В.С. та ін. Апоптотична, аутофагічна та онкотична смерть кардіоміоцитів при аноксії–реоксигенації // *Фізіол. журн.* – 2004. – **50**, № 5. – Р.11–18.
5. Brash A. R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate // *J. Biol. Chem.* – 1999. – **274**. – Р. 23679–23682.
6. Carol A. Sledz, Bryan R. G. Williams. RNA interference in biology and disease // *Blood.* – 2005. – **106**. – Р. 787–794.
7. Dosenko V.E., Nagibin V.S., Tumanovskaya L.V. et al. Proteasomal proteolysis in anoxia-reoxygenation, preconditioning and postconditioning of isolated cardio-

- myocytes // Pathophysiology. – 2006. – **2**. – P. 119–125.
8. Duvoisin R.M., K. van Leyen, Engelhardt H., Wiedmann M. A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation // Nature. – 1998. – **395**. – P. 392–395.
  9. Festjens N., Vanden Berghe T., Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signaling cascades, important mediators and concomitant immune response // Biochim. and Biophys. Acta. – 2006. – **1757**. – P. 1371–1387.
  10. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // Nature. – 1998. – **391**. – P.806 – 811.
  11. Hashimoto H., Miyazawa K., Hagiwara M. et al. Beneficial effects of a new 5-lipoxygenase inhibitor on occlusion- and occlusion-reperfusion-induced myocardial injury // Arzneimittelforschung. – 1990. – **40**, № 2, Pt 1. – P. 126-9.
  12. Heise C.E., O'Dowd B.F., Figueroa D.J. et al Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**. – P. 30531–30536.
  13. Huiwen Song., Zhiyong Zhong., Lin Wong. Small interference RNA against PTP-1B reduces hypoxia/reoxygenation induced apoptosis of rat cardiomyocytes // Apoptosis. – 2008. – **13**. – P. 383–393.
  14. Kamohara M., Takasaki J., Matsumoto M. et al. CysLT2 receptors on human coronary artery smooth muscle cells // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 2001. – **287**. – P. 1088–1092.
  15. Kuhn H., Belkner J., Wiesner R., Brash A.R. Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase // J. Biol. Chem. – 1990. – **265**. – P. 18351–18361.
  16. Liu P., Misurski D.A., Gopalakrishnan V. Cysteinyl leukotriene-dependent  $[Ca^{2+}]$  responses to angiotensin II in cardiomyocytes // Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol. – 2003. – **284**. – P. 1269–1276.
  17. Lynch K.R., O'Neill G.P., Liu Q. et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor // Nature. – 1999. – **399**. – P. 789–793.
  18. Maccarrone M., Melino G., Finazzi-Agro A. Lipoxygenases and their involvement in programmed cell death // Cell Death Differ. – 2001. – **8**. – P. 776–784.
  19. Margaret A. Nordlie, Loren E. et al. Molecular aspects of ischemic heart disease: ischemia/reperfusion-induced genetic changes and potential applications of gene and RNA interference therapy // J. Cardiovasc. Pharmacol. Therap. – 2006. – **11**, № 1. – P. 17–30.
  20. Masahiro S., Keiko T., Tomoji H., Naoki M. RNA interference targeting SHP-1 attenuates myocardial infarction in rats // FASEB J. – 2005. – **19**, № 14. – P. 2054–2056.
  21. Murphy R. C., Gij'on M. A. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes // Biochem. J. – 2007. – 405. – P. 379–395.
  22. Nakayama H., Chen X., Baines C.P.  $Ca^{2+}$  and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure // J. Clin. Invest. – 2007. – **117**, № 9. – P. 2431–2444.
  23. Ogasawara H., Ishii S., Yokomizo T. et al. Characterization of mouse cysteinyl leukotriene receptors mCysLT1 and mCysLT2: differential pharmacological properties and tissue distribution // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**. – P. 18763–18768.
  24. Redmark O. Arachidonate 5-lipoxygenase // Prostaglandins & other Lipid Mediators. – 2002. – **68**–69. – P. 211–234.
  25. Reinecke H., Zhang M., Bartosek T., Charles E.M. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts // Circulation. – 1999. – **100**. – P. 193–202.
  26. Riccioni G., Capra V., D'Orazio N. et al. Leukotriene modifiers in the treatment of cardiovascular diseases // J. Leukoc. Biol. – 2008. – Sep. 15.
  27. Spittler G. Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases? // Med. Hypotheses. – 2003. – **60**, № 1. – P. 69–83.
  28. Zimmermann K.C., Bonzon C., Green D.R. The machinery of programmed cell death // Pharmac. Therapeutics. – 2001. – **92**. – P. 57–70.

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

*Матеріал надійшов до*  
*редакції 04.02.2009*