

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ імені О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Шаріпов Роман Рінатович**

УДК 616.831:616.12:612:176:616-035.86

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**Порушення кардіогемодинаміки при фокальній ішемії-реперфузії  
головного мозку та їх корекція**

Спеціальність 14.03.04 – патологічна фізіологія

Дисертація подається на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, текстів і  
результатів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Науковий керівник

**Сагач Вадим Федорович,**

доктор медичних наук, професор  
член-кор. НАН України

Київ-2019

## АНОТАЦІЯ

**Шаріпов Р.Р. Порухення кардіогемодинаміки при фокальній ішемії-реперфузії головного мозку та їх корекція – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

*Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – «патологічна фізіологія».*

*Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2019.*

Дисертація присвячена вивченню порушень кардіогемодинаміки при фокальній ішемії-реперфузії головного мозку та можливості їх корекції у щурів. В клінічній практиці кардіальна дисфункція розвивається при ішемічному інсульті і має назву – цереброкардіальний синдром. Тому вивчення цих функціональних змін в роботі серця та можливість їх корекції або попередження дуже актуальне. В роботі була використана модель фокальної церебральної ішемії-реперфузії басейна середньої мозкової артерії – МСАО (middle cerebral artery occlusion), за допомогою монофіламентного оклюдера 4/0 (Doccolcorp., USA). Ішемія тривала 60 хвилин, після чого починалась реперфузія. Була виявлена систолічна, та діастолічна дисфункція серця, як під час ішемії, так і під час реперфузії. Фокальна ішемія головного мозку супроводжувалась зменшенням ударного об'єму серця та хвилинного об'єму крові. Порушувалися процеси релаксації лівого шлуночка – підвищувались показники кінцево-діастолічної жорсткості міокарда та кінцево-діастолічний тиск, виявлено суттєве збільшення константи активного розслаблення. Під час раннього періоду реперфузії також спостерігалось порушення насосної функції та скоротливої активності міокарда – зменшення максимальної швидкості наростання тиску. Реперфузія головного мозку супроводжувалась порушенням релаксації міокарда – кінцево-діастолічна жорсткість міокарда залишалася на високому рівні, константа активного розслаблення була подовжена. У мітохондріях та гомогенаті тканин серця в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку показано розвиток оксидативного стресу та індукцію нітрозативного стресу. Після попереднього введення тваринам комбінації DL-пропаргілгліцину та L-цистеїну

у серці суттєво зменшувалися прояви оксидативного та нітрозативного стресів. Попереднє введення вище вказаних сполук, в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку, сприяло збереженню показників насосної функції серця; попереджувало порушення діастолічної функції серця, поліпшувалися процеси релаксації лівого шлуночка. Введення комбінації DL-пропаргілгліцину та L-цистеїну при ішемії-реперфузії головного мозку збільшувало виживання тварин через 24 год на 25%. У тварин, які отримували екдистерон до моделювання фокальної ішемії-реперфузії головного мозку, прояви оксидативного та нітрозативного стресів у мітохондріях серця значно зменшувалися. Отримані результати можуть бути використані для попередження та корекції порушень кардіогемодинаміки, які виникають у пацієнтів при ішемічному інсульті та реперфузійному пошкодженні головного мозку під час тромболітичної терапії.

**Ключові слова:** цереброкардіальний синдром, фокальна ішемія-реперфузія, кардіогемодинаміка, оксидативний та нітрозативний стрес, пропаргілгліцин, L-цистеїн, екдистерон.

## ABSTRACT

**Sharipov R.R. Alterations of cardiohemodynamics under focal cerebral ischemia-reperfusion and their correction. – Qualifying scientific work as a manuscript.**

*Thesis for a candidate of medical science degree (PhD) by speciality 04.03.04 "Pathological physiology". – Bohomoletz Institute of Physiology NA S of Ukraine, Kyiv, 2019.*

The dissertation is devoted to the study of disorders of cardiohemodynamics during focal cerebral ischemia-reperfusion and possibilities for their correction in rats. In clinical practice, cardiac dysfunction develops during ischemic stroke and called «cerebrocardial syndrome». Therefore, it is very relevant to study these functional changes in cardiac function and possibilities for their correction or prevention. In the dissertation, the model of focal cerebral ischemia and reperfusion of the middle

cerebral artery territory – MCAO (middle cerebral artery occlusion), was used, with the monofilament occluder 4/0 (Doccolcorp., USA). Ischemia lasted for 60 minutes than reperfusion had been started. Systolic and diastolic cardiac dysfunction was detected, both during ischemia and reperfusion. Focal cerebral ischemia was accompanied by a decrease in stroke output and minute volume of blood circulation. Secondary to derangement of processes of left ventricular relaxation, end-diastolic myocardial stiffness and end-diastolic pressure parameters rose, a substantial increase of active relaxation constant was detected. During the early period of reperfusion, it also detected impairment of heart pump function and contractile activity of the myocardium (deceleration of the maximum speed of pressure rise). Cerebral reperfusion was accompanied by myocardial relaxation impairment, end-diastolic myocardial stiffness remained high, and active relaxation constant was elongated. Oxidative stress progression and nitrosative stress induction were demonstrated in conditions of focal cerebral ischemia and reperfusion in mitochondria and cardiac tissue homogenate. After preliminary co-administration of DL-propargylglycine and L-cysteine to the animals, oxidative and nitrosative stress manifestations significantly decreased in the heart. In conditions of focal cerebral ischemia and reperfusion, preliminary administration of the above compounds promoted the preservation of heart pump-function parameters; prevented cardiac diastolic function impairment, improved left ventricular relaxation processes. In cerebral ischemia and reperfusion, co-administration of DL-propargylglycine and L-cysteine increased the survival rate by 25% after 24 hours. Oxidative and nitrosative stress manifestations significantly decrease in cardiac mitochondria in animals treated with ecdysterone before the modeling of cerebral ischemia and reperfusion. The obtained results can be used to prevent and correct the cardiohemodynamic disorders that occur in patients during ischemic stroke and cerebral reperfusion injury during thrombolytic therapy.

**Keywords:** cerebrocardial syndrome, focal ischemia-reperfusion, cardiohemodynamics, oxidative and nitrosative stress, propargylglycine, L-cysteine, ecdysterone.

## СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті:

1. Шаріпов Р.Р., Коцюруба А.В., Коп'як Б.С., Сагач В.Ф. Індукція нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів за експериментальної ішемії-реперфузії головного мозку та його корекція екдистероном. // Фізіол. журн. – 2014 – Т.60, № 5. – С.3-13.
2. Коцюруба А.В., Шаріпов Р.Р., Коп'як Б.С., Сагач В.Ф. Фокальна ішемія-реперфузія головного мозку викликає зниження стійкості до кислотного гемолізу еритроцитів венозної крові, яке запобігається дією екдистерону.// Фізіол. журн. –2014 – Т. 61, № 5. – С.3-10.
3. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kopyak BS, Sagach VF. Induction of Oxidative Stress in Heart Mitochondria under Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion and Protective Effect of Ecdysterone. *Inte J Physiol and Pathophysiol.* 2015; 6 (2):,157-164.
4. Sharipov RR, Dorofeyeva NA, Sagach VF. Cardiohemodynamic Changes in Focal Cerebral Ischemia. *Inte J Physiol and Pathophysiol.* 2018; 9(4): 335-340.
5. Шаріпов Р. Р, Дорофєєва Н. О, Сагач В. Ф. Вплив реперфузії ішемізованої ділянки головного мозку на функціональний стан серця.// Фізіол. журн. – 2018– Т. 64, № 2. – С.90-95.

## НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

### Тези:

1. Вплив фокальної ішемії головного мозку на кардіогемодинаміку.  
**Р.Р. Шаріпов, Н.О. Дорофєєва, В.Ф. Сагач**  
VII Пленум Укр. Наук. Тов.-ве. патофізіологів. та наук.-прокт. конф. за участю іноземних спеціалістів «Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики» (Полтава, 2018 ).

2. Inhibition of cystathionine gamma-lyase can prevent cardiac dysfunction after focal cerebral ischemia NA Dorofeyeva, **RR Sharipov**, VF Sagach EUR. J. HEART FAILURE 21, 577-578.

3. Endothelial monocyte-activating polypeptide-II improved heart function in focal cerebral ischemia-reperfusion N Dorofeyeva, **R Sharipov**, V Sagach EUR. J. CLIN. INVEST. 49, 73-74.

4. Попереднє введення пропаргілгліцину та L-цистеїну попереджує порушення кардіогемодинаміки при фокальній ішемії головного мозку. Н.О. Дорофєєва, **Р.Р. Шаріпов**, В.Ф. Сагач/ Фізіол. журн., 2019, Т. 65, № 3 (Додаток) - с.84-85.

5. Зміни кардіогемодинаміки щурів за умов фокальної ішемії головного мозку. **Р.Р. Шаріпов**, Н.О. Дорофєєва, В.Ф. Сагач / Фізіол. журн., 2019, Т. 65, № 3 (Додаток) - с.85-86.

6. Зміни функціонального стану серця за умов реперфузії після фокальної ішемії головного мозку. **Р.Р. Шаріпов**, Н.О. Дорофєєва, В.Ф. Сагач/ Фізіол. журн., 2019, Т. 65, № 3 (Додаток) - с.86.

Патент на корисну модель:

Н.О. Дорофєєва, Р.Р. Шаріпов, В.Ф. Сагач Спосіб попередження порушень функціонального стану серця при фокальній ішемії-реперфузії головного мозку // Патент № 134865 A61K45 / 00. 10.06.2019. Бюл. № 11.

## ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ЗМІСТ.....	7
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	10
ВСТУП.....	12
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУР.....	19
1.1.Сучасні уявлення про патогенез ішемічного інсульту.....	19
1.1.1. Гостра фокальна церебральна ішемія.....	19
1.1.2. Патофізіологічні механізми ішемічного пошкодження головного мозку..	23
1.2. Реперфузійне пошкодження головного мозку та серця.....	25
1.3. порушення кардіогемодинаміки в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку.....	31
1.3.1. Патофізіологічні механізми порушення кардіогемодинаміки в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку.....	31
1.3.2. Біохімічні аспекти пошкодження міокарда в умовах фокальної ішемії- реперфузії головного мозку.....	33
1.3.2.1. Оксидативний стрес.....	34
1.3.2.2. Нітрозативний стрес.....	36
1.4. Роль сірководню в порушенні функцій серця.....	39
РОЗДІЛ 2. МОДЕЛЬ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	43
2.1. Модель фокальної церебральної ішемії-реперфузії.....	43
2.2 Дослідження показників кардіодинаміки щурів з фокальною церебральною ішемією-реперфузією.....	46
2.3. Метод виділення фракції мітохондрій із серця щурів.....	48
2.4. Методика досліджень біохімічних змін в міокарді.....	48
2.4.1. Методики дослідження оксидативного стресу.....	48
2.4.2. Методики дослідження нітрозативного стресу.....	50
2.5. Дослідження впливу L-цистеїну та пропаргілгліцину на кардіогемодинаміку при фокальній ішемії-реперфузії ГМ.....	52

2.6. Методика дослідження маркерів ПОЛ в венозній крові відтікаючий від ГМ та вплив на їх зміни екдистерона.....	53
РОЗДІЛ 3. ЗМІНИ В ФУНКЦІОНАЛЬНОМУ СТАНІ СЕРЦЯ ЩУРІВ ПРИ ФОКАЛЬНІЙ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ.....	54
3.1. Показники насосної та скоротливої функції серця при фокальній ішемії-реперфузії головного мозку.....	54
3.2. Показники діастолічної функції серця при фокальній ішемії-реперфузії головного мозку.....	61
РОЗДІЛ 4. ДАНІ ДОСЛІДЖЕНЬ РОЗВИТКУ ОКСИДАТИВНОГО ТА НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСІВ В СЕРЦІ ЩУРІВ ПРИ ФОКАЛЬНІЙ ЦЕРЕБРАЛЬНІЙ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ.....	66
4.1. Зміни показників та маркерів оксидативного стресу.....	66
4.2. Зміни показників та маркерів нітрозативного стресу.....	68
РОЗДІЛ 5. КОРЕКЦІЯ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ПОРУШЕНЬ КАРДИОГЕМОДИНАМІКИ КОМБІНАЦІЄЙ L-ЦИСТЕЇНА ТА ПРОПАРГІЛГЛІЦИНА.....	73
РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ ЕКДИСТЕРОНА НА ОСКИДАТИВНИЙ ТА НІТРОЗАТИВНИЙ СТРЕСИ В СЕРЦІ ТА ПОКАЗНИКИ МАРКЕРІВ ПОЛ В ВЕНОЗНІЙ КРОВІ ВІДТІКАЮЧИЙ ВІД ГОЛОВНОГО МОЗКУ ПРИ ФОКАЛЬНІЙ ЦЕРЕБРАЛЬНІЙ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ.....	82
6.1. Протекторна дія екдистерона при оксидативному стресі в мітохондріях серця в умовах фокальної церебральної ішемії-реперфузії.....	83
6.2. Корекція екдистероном індукції нітрозативного стресу в мітохондріях серця при фокальній церебральній ішемії-реперфузії.....	86
6.3. Зміни показників маркерів ПОЛ в венозній крові відтікаючий від головного мозку при фокальній церебральній ішемії-реперфузії під впливом екдистерону.....	92
6.3.1. Показники маркерів ПОЛ в венозній крові відтікаючий від головного мозку при фокальній церебральній ішемії-реперфузії.....	92



6.3.2. Вплив екдистерону на зміни показників маркерів ПОЛ в венозній крові відтікаючий від головного мозку при фокальній церебральній ішемії- реперфузії.....	94
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	97
ВИСНОВКИ.....	107
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	109

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню  
АФА – активні форми азота  
АРІЛ – антагоніст рецептора інтерлейкіну 1  
ВМНТ – високомолекулярні нітрузо тіоли  
ВСА – внутрішня сонна артерія  
ГМ – головний мозок  
ГПМК – гостре порушення мозкового кровообігу  
ДК – дієнові кон'югати  
ЖМкс – кінцево-сistolічна жорсткість міокарду  
ЖМмакс – максимальна жорсткість міокарду  
ЗСА – загальна сонна артерія  
ЗоСА – зовнішня сонна артерія  
ІІ – ішемічний інсульт  
ІІ-1 – інтерлейкін 1  
ЛШ – лівий шлуночок  
КДО – кінцево-діастолічний об'єм  
КДТ – кінцево-діастолічний тиск  
КСО – кінцево-сistolічний об'єм  
КСТ – кінцево-сistolічний тиск  
МП – мітохондріальна пора  
МК – мозковий кровоток  
МДА – малоновий діальдегід  
НМНТ – низькомолекулярні нітрозотіоли  
СМА – середня мозкова артерія  
УО – ударний об'єм  
ФВ – фракція викиду  
ФНП – фактор некрозу пухлин  
ФЦ – фокальна церебральна ішемія

ХОК – хвилинний об'єм крові

ЧСС – частота серцевих скорочень

ЦКС – цереброкардіальний синдром

$dP/dt_{\max}$  – максимальна швидкість підвищення тиску

$dP/dt_{\min}$  – максимальна швидкість зниження тиску

eNOS – ендотеліальна синтаза оксиду азоту

iNOS – індукцйбельна синтаза оксиду азоту

LTC<sub>4</sub> – лейкотрієн C<sub>4</sub>

MCAO – middle cerebral artery occlusion

NO – оксид азоту

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – нітрит-аніон

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – нітрат-аніон

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – супероксидний радикал

OH – гідроксильний радикал

ONOO<sup>-</sup> – пероксинітрит

Таи – константа активного розслаблення

TxB<sub>2</sub> – тромбоксан B<sub>2</sub>

## ВСТУП

### Актуальність теми

Ішемічний інсульт (ІІ) належить до найбільш тяжких форм цереброваскулярних захворювань. Це зумовлено високими показниками захворюваності, інвалідизації та смертності. У світі ця проблема є актуальною, а дослідження спрямовані на її вирішення є пріоритетними [1,2]. Ішемічний інсульт – це «глобальна епідемія». Згідно з даними ВООЗ, з 2005 до 2030 років прогнозується збільшення частоти ІІ на 43,8%. Ця патологія посідає друге місце у структурі причин смертності та перше місце – у структурі причин інвалідизації дорослого населення більшості країн [3]. Щорічно у світі в середньому фіксують 16,8 млн. випадків ІІ, це на 68 % більше, ніж в 1990 році [4]. За прогнозами експертів ВООЗ, якщо ситуація не зміниться, то у 2030 р. цей показник становитиме 23 млн., а 7,8 млн. пацієнтів з ІІ можуть померти. Приблизно 77 млн. осіб, які перенесуть ІІ, будуть інвалідами, що спричинить великі соціально-економічні витрати у суспільстві [5]. Це пов'язано з «постарінням» населення планети та розповсюдженням серед людства факторів ризику цереброваскулярних захворювань, та безпосередньо ІІ: артеріальної гіпертензії, дисліпідемії, цукрового діабету, гіподинамії, тютюнопаління та зловживання алкоголем [6].

Для України проблема ІІ є дуже актуальною. У 2015 р. в Україні зареєстровано 96 319 випадків ІІ, або 274,0 випадки на 100 тис. населення, з них 33 % працездатного віку, що перевищує показники в європейських країнах (200,0 випадків на 100 тис. населення). В цілому, в Україні за останні десять років захворюваність на ІІ становить у середньому 260-300 випадків на 100 тис. населення. Збільшення захворюваності на ІІ обумовлено демографічною ситуацією в Україні, зокрема постарінням населення (12 млн пенсіонерів, 27,9 % популяції), та зростаючою розповсюдженістю вище вказаних факторів ризику [7]. Дванадцять млн. українців (28,3 % населення) хворіють на артеріальну гіпертензію, 18,1 % населення – на ІХС та 1,5 млн (3 % населення) – на

цукровий діабет [8]. Також має значення урбанізація населення, а як наслідок – гіподинамія, зловживання алкоголем та тютюнопаління, які широко розповсюджені серед населення України. Ці фактори, а також їх поєднання, відзначаються практично в усіх пацієнтів із цереброваскулярними захворюваннями [9,10]. В кожного п'ятого пацієнта, який переніс ІІ, протягом наступних 5 років є дуже висока ймовірність розвитку повторного інсульту, що становить частоту рецидиву приблизно 5 % на рік [11].

Однією з найважливіших проблем сучасної неврології є терапія ускладненого перебігу ІІ. У першу чергу, це стосується функціональних змін серцево-судинної системи в гострому періоді інсульту. Сучасний рівень розуміння цієї патології дозволяє розглядати інсульт не тільки як неврологічну, але і як мультидисциплінарну проблему, в якій серце і головний мозок мають два взаємопов'язаних аспекти: з одного боку – це інсульт, що розвивається в результаті захворювань серця, з іншого – кардіальна дисфункція при гострому інсульті, яка сприяє ранній смертності хворих [12]. У перший місяць ІІ причиною 51 % випадків летальності є ускладнення безпосереднього враження головного мозку, 22 % випадків – респіраторні інфекції, 12 % випадків – ускладнення зі сторони серцево-судинної системи, які за рік збільшуються до 28 % [13]. У цілому, у пацієнтів з ішемічним пошкодженням головного мозку смертність від кардіальних причин превалює над такою безпосередньо від інсульту [14,15]. Раптова смерть може наступити внаслідок низки причин, деякі з яких встановлюються при аутопсії (розрив аневризми, емболія легеневої артерії, інфаркт міокарда), інші залишаються невідомими. Більшість дослідників вважають, що це, вірогідно, розвиток фатальних серцевих аритмій [16]. Кардіальна дисфункція при ІІ, описана близько 60 років тому, і може проявлятися у вигляді різних варіантів порушення серцевого ритму, змін на електрокардіограмі, до розвитку гострого інфаркту міокарда, що отримало також назву цереброкардіального синдрому (ЦКС) [17,18], що свідчить про нерозривний зв'язок і взаємозалежність мозкової і системної гемодинаміки [19]. Тому з'ясування механізмів порушень серцевої діяльності при тромбозі

мозкових судин є актуальним. З іншого боку, останнім часом, важливим для лікування таких хворих є застосування раннього тромболілізу, тобто реперфузії ішемізованих тканин мозку. А реперфузія всіх тканин, у тому числі, і ішемізованих, супроводжується їх пошкодженням внаслідок розвитку оксидативного стресу і, ймовірно, також і порушенням функції серця. Попередження цих порушень, безумовно, дуже важливе для досягнення позитивних результатів у лікуванні таких хворих. Тому важливо з'ясувати наявність порушень серцевої діяльності при реперфузії тканин мозку та знати шляхи їх попередження.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Роботу виконано в рамках наукової тематики відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Вивчення ролі мітохондрій в реакціях серцево-судинної системи при різних функціональних станах організму» (2010-2013рр.), № державної реєстрації 0107U005336; «Дослідження ролі сигнальних сполук сірки в реакціях серцево-судинної системи щурів при різних станах організму» (2014-2018 рр.), № державної реєстрації 0109U005359.

### **Мета і завдання дослідження**

**Метою** роботи було вивчення порушень кардіогемодинаміки, дослідження патофізіологічних механізмів розвитку кардіальної дисфункції в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку та їх корекція.

### **Завдання:**

1. Дослідити вплив фокальної ішемії ГМ, модельовану оклюзією середньої мозкової артерії, та наступної реперфузії на насосну, скоротливу та діастолічну функції серця у щурів.
2. Дослідити вплив фокальної ішемії-реперфузії ГМ на розвиток оксидативного стресу в міокарді щурів.

3. Дослідити вплив фокальної ішемії-реперфузії ГМ на розвиток нітрозативного стресу в міокарді щурів.
4. Вивчити вплив DL-пропаргілгліцину та L-цистеїну на кардіогемодинаміку щурів в умовах фокальної ішемії-реперфузії ГМ.
5. Дослідити дію екдистерону на розвиток оксидативного та нітрозативного стресів у мітохондріях серця щурів в умовах фокальної ішемії-реперфузії ГМ.

**Об'єкт дослідження:** фокальна ішемія-реперфузія головного мозку у щурів лінії Вістар, оксидативний стрес, нітрозативний стрес, кардіальна дисфункція.

**Предмет дослідження:** параметри кардіогемодинаміки, показники окисного метаболізму, активність ферментів, корекція порушень кардіогемодинаміки.

**Методи дослідження.** Фізіологічні, біохімічні та статистичні.

Отримані результати обробляли статистично з використанням програми Microsoft Excel 2007 та Origin 7,5. При цьому вірогідність різниці середніх величин ( $P < 0,05$ ) визначали за критерієм  $t$  Стюдента. Значення  $P < 0,05$  вважали достовірними.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Отримані результати щодо змін насосної, скоротливої та діастолічної функції серця у щурів в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку. Виявлено зміни маркерів оксидативного стресу, підвищення пулів дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА), що свідчить про інтенсифікацію ПОЛ у мітохондріях серця щурів з фокальною ішемією-реперфузією головного мозку. Вперше виявлена активація індукбельного *de novo* синтезу NO, зростання пулів нітрозотіолів, збільшення активності аргінази, підвищення пулів нітрат-аніонів, що

підтверджує індукцію нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів з фокальною ішемією-реперфузією ГМ. Вперше показано, що введення комбінації DL-пропаргілгліцину та L-цистеїну попереджало порушення кардіогемодинаміки в умовах фокальної ішемії-реперфузії ГМ. При цьому знижувалося кінцево-діастолічна жорсткість міокарда внаслідок поліпшення процесу релаксації лівого шлуночка. Вперше показано, що екдистерон – природний аналог кальцитріолу, суттєво зменшував прояви оксидативного та попереджував індукцію нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів з фокальною ішемією-реперфузією ГМ. Таким чином, було продемонстровано, що головним патофізіологічним механізмом/наслідком цереброкардіального синдрому (ЦКС) є розвиток оксидативно-нітрозативного стресу, який можна попередити стимуляцією антиоксидантних властивостей організму, зокрема, запропонованою нами комбінацією сполук DL-пропаргілгліцин – L-цистеїн або за допомогою сполуки рослинного походження – екдистерону.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані результати, мають насамперед вагоме теоретичне значення, оскільки дають змогу сформулювати уявлення про патофізіологічні механізми розвитку цереброкардіального синдрому, тобто порушення функції серця при фокальній ішемії-реперфузії ГМ. Виявлено, що ішемія-реперфузія ГМ супроводжується не лише порушеннями насосної, скоротливої та діастолічної функції серця, а й розвитком оксидативного стресу, пригніченням конститутивного синтезу оксиду азоту в міокарді та мітохондріях серця зокрема. Практичне значення результатів полягає у демонстрації корекції порушень кардіогемодинаміки, відновлення синтезу оксиду азоту, антиоксидантній та кардіопротекторній дії комбінації сполук DL-пропаргілгліцин – L-цистеїн та екдистерону. Отримані результати надалі можуть бути використані в клінічній практиці для профілактики, попередження та лікування пошкодження міокарда під час ішемічного інсульту та реперфузійного пошкодження ГМ, як ускладнення тромболітичної терапії пацієнтів неврологічних відділень.



**Особистий внесок здобувача.** Автором проведено пошук та обґрунтування тематики наукового дослідження, проаналізовано літературні джерела з обраного напрямку. Проведено функціональні, біохімічні дослідження, проаналізовано та узагальнено отримані результати та їх статистична обробка. Планування теми наукового дослідження, експерименту, інтерпретація одержаних результатів та формулювання висновків проведено спільно з науковим керівником член-кор. НАН України д.м.н., проф. В.Ф. Сагачем. Експериментальні дослідження виконано спільно зі співробітниками відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, які є співавторами опублікованих праць. Дослідження показників кардіогемодинаміки були проведені спільно з н.с. відділу фізіології кровообігу Н.О. Дорофєєвою, біохімічні дослідження – спільно із с.н.с. А.В. Коцюрбою та н.с. Ю.П. Коркач. За участю співавторів публікацій проведено інтерпретацію отриманих результатів.

### **Апробація результатів дисертації**

Результати дослідження та основні теоретичні положення були представлені та обговорені на наступних з'їздах та конференціях:

1. VII Пленум Українського наукового товариства патофізіологів та науково-практична конференція за участю іноземних спеціалістів «Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики» (Полтава, 2018 р.).

2. ESC Heart & Stroke Conference, Berlin, Germany (25-26 січня 2019 р.) – постерна доповідь.

3. 53rd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation (ESCI) Coimbra, Portugal (22-24 травня 2019 р.) – усна доповідь.

4. Heart Failure 2019 & World Congress on Acute Heart Failure, Athens, Greece (25-28 травня 2019 р.) – постерна доповідь.

5. 20-й з'їзд Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, Київ (27-30 травня 2019 р.) – усна доповідь.

### **Публікації**

За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових робіт, у тому числі 5 статей у рекомендованих ВАК України фахових журналах та 6 тез доповідей на конгресах, з'їздах, конференціях.

### **Структура та обсяг дисертації.**

Дисертаційна робота викладена на 105 сторінках машинописного тексту. Текст роботи включає вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, чотири розділи власних результатів досліджень, розділ аналізу та узагальнення результатів, висновки, список літератури. Робота містить 6 таблиць, 39 рисунків, 3 фотографії. Бібліографічний перелік використаних джерел включає 231 наукову працю.

## РОЗДІЛ 1.

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ПАТОГЕНЕЗ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

##### 1.1.1. Гостра фокальна церебральна ішемія

У другій половині ХХ ст, неврологами було запропоновано визначення мозгового інсульту: це гостре порушення мозкового кровообігу, яке супроводжується структурно-морфологічними змінами в тканині мозку і стійким неврологічним дефіцитом, що утримується 24 год. і більше після появи перших симптомів події. Більш точнішим є формулювання: інсульт – це цереброваскулярна катастрофа, синдром швидкого розвитку симптомів та ознак фокальної чи глобальної втрати мозкових функцій з неврологічними симптомами, що тривають 24 год. і більше або призводять до смерті без іншої видимої причини її виникнення [20]. У літературі використовуються наступні, певною мірою, різні поняття: гостра фокальна церебральна ішемія, ішемічний інсульт, інфаркт мозку. Гостра фокальна церебральна ішемія – патофізіологічне поняття, що характеризується метаболічними і патохімічними процесами у відповідь на локальний дефіцит мозкової перфузії та супроводжується вогнищевими неврологічними розладами. Якщо порушення неврологічних функцій минають протягом перших 24 год після їх виникнення, діагностують транзиторну ішемічну атаку. Коли стійка неврологічна симптоматика залишається понад 24 години, стан визначається як ішемічний інсульт.

Інфаркт мозку – морфологічний термін, формується якщо мозковий кровотік у певній ділянці мозку падає нижче нижнього ішемічного порогу (10 мл/100 г речовини мозку за 1 хв) та характеризується загибеллю нейронів і клітин нейроглії. Цей термін запропонував учень Вірхова J. Cohnheim у 1879 р. [21]. Сучасні методи досліджень дали можливість вивчити церебральну ішемію та її патогенез на молекулярному рівні та сприяли розробці концепцій патогенезу ішемічного інсульту. Одна з провідних, це – концепція порогового ішемічного

кровотоку. Поріг визначається критично низьким рівнем мозкового кровотоку (МК) і недостатнім надходженням кисню до нейронів та нейроглії. У фізіологічних умовах кровотік сірої речовини головного мозку – 80 мл/100 г за 1 хв, у білій – 20 мл/100 г за 1 хв. Це необхідно для надходження кисню, глюкози та збереження енергетичного субстрату мозку, нормального функціонування нейронів, підтримання їх інтегративних функцій [22].

За умов гострої фокальної ішемії мозку, в залежності від рівня МК, має місце каскад метаболічних порушень: первинна реакція виникає у разі зменшення МК нижче 55 мл/100 г речовини мозку за 1 хв і проявляється порушенням синтезу білка; зменшення МК нижче 35 мл/100 г речовини мозку за 1 хв стимулює анаеробний гліколіз; за умов що МК нижче 20 мл/100 г речовини мозку за 1 хв. виникає надлишкове вивільнення збуджувальних нейротрансмітерів і порушення енергетичного обміну; зменшення МК нижче 10 мл/100 г речовини мозку за 1 хв. викликає аноксичну деполяризацію мембран, цитотоксичний набряк мозку, незворотні ушкодження нейронів і клітин нейроглії – некроз і апоптоз [22]. Виділяють поріг утрати електричної функції нейронів або верхній ішемічний поріг – кровоток менше 20 мл/100 г речовини мозку за 1 хв. За цих умов припиняється електрична активність у клітинах кори, зменшується амплітуда викликаних потенціалів з ділянки фокальної ішемії, порушується синаптична передача, порушується церебральний метаболізм кисню (знижується до 2,0-2,5 мл/100 г за 1 хв.) та глюкози (знижується до 2,0 мл/100 г за 1 хв.). Це призводить до розвитку ішемії тканини мозку, стійкого, але зворотного неврологічного дефіциту. Якщо мозкова перфузія продовжує знижуватись нижче порога електричного ураження нейронів (нижче 10 мл/100 г речовини мозку за 1 хв.), то посилена екстракція тканиною кисню, до 40-50 %, з артеріальної крові, частково компенсує дефіцит – мізерна перфузія [23]. Перші 1-6 год. це допомагає підтримувати метаболічний рівень кисню та глюкози, запобігаючи розвитку інфаркту мозку. У разі відновлення перфузії в перші 6 год ділянка ішемії може зазнати зворотного розвитку – ішемічна пенумбра, або ж формується інфаркт мозку. Визначення

верхнього і нижнього ішемічних порогів дало можливість сформулювати концепцію ішемічної напівтіні (ischemic penumbra), межевої ділянки з кровотоком менше 20-18 мл/100 г за 1 хв. [24]. Ішемічна напівтінь – це ділянка ішемізованої, але життєздатної тканини мозку, яка оточує зону інфарктного ядра, це тканина у стані функціональних порушень, кровотік якої з відповідає «мізерній» перфузії. Зниження МК менше 10 мл/100 г за 1 хв. вважають критичним порогом для незворотного пошкодження нейронів ішемічної напівтіні [21]. На цій стадії пригнічується метаболізм у мітохондріях і стимулюється малоефективний анаеробний шлях розщеплення глюкози, як наслідок – підвищення рівня лактату та розвиток поза- і внутрішньоклітинного ацидозу. Значно збільшується утворення вільних радикалів та збуджувальних ексайтотоксинів, порушується функція іонних насосів і клітинних мембран.

Існують різні підходи до класифікації ішемічних гострих порушень мозкового кровообігу (ГПМК) [21]:

- залежно від темпу формування і тривалості неврологічного дефіциту;
- з урахуванням етіологічних чинників;
- патогенетична класифікація інфаркту мозку;
- клінічна класифікація з урахуванням критерію J.Bamford та співавторів (1991);
- з урахуванням ступеня тяжкості хворих на ішемічний інсульт.

Залежно від темпу формування і тривалості неврологічного дефіциту Комітет експертів ВООЗ із судинної патології мозку рекомендує виділяти такі клінічні форми ішемічних ГПМК: транзиторні ішемічні атаки; пролонговані ішемічні атаки зі зворотним розвитком (Prolonged reversible Ischemic Attacks), або малий інсульт (minor stroke); прогресуючий ішемічний інсульт (stroke-in-evolution); завершений (тотальний) ішемічний інсульт (major stroke).

Сучасні досягнення ангіоневрології свідчать про етіологічну гетерогенність ішемічного інсульту. За критеріями TOAST (Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment – дослідження низькомолекулярного гепариніду Org

10172 в терапії гострого інсульту) виділяють такі етіологічні чинники ішемічного інсульту [25]:

- близько 20,9 % інфарктів пов'язані з макроангіопатіями (великі артерії), з яких понад 50 % являють собою стенози та оклюзії екстра- або інтракраніальних судин;
- причиною 25,6 % інсультів є кардіогенні емболії;
- 5 % випадків усіх ішемічних інсультів зумовлені мікроан-гіопатіями (малі судини), що спричиняють розвиток лакунарних інфарктів з формуванням дрібних осередків некрозу вглибоких відділах головного мозку;
- у 3,5 % випадків виявляється інша етіологія інсульту;
- у 6,9 % обстежених причини ішемічного інсульту конкурентні;
- часто (22,7 %) причини розвитку інсульту не вдається точно з'ясувати.

Патогенетична класифікація характеризує механізми розвитку ішемічних ГПМК, локалізацію осередку ураження, його розмір [26]:

- територіальний інфаркт, зумовлений тромботичною або тромбоемболічною закупоркою великого артеріального русла; неврологічна симптоматика відповідає ураженню основних судинних басейнів;
- інфаркт у кінцевих гілках великих артерій мозку або в «межових зонах», васкуляризованих дистальними артеріями малого калібру із сусідніх судинних басейнів; причиною виникнення цього варіанта інфаркту здебільшого є зниження перфузійного тиску, тобто гемодинамічний чинник;
- лакунарні інфаркти у ділянці таламуса, внутрішньої капсули, стовбура мозку або в білій речовині півкуль великого мозку; зумовлені локальними порушеннями кровотоку в ділянці мікроангіопатій у разі артеріальної гіпертонії, цукрового діабету.

### 1.1.2. Патофізіологічні механізми ішемічного пошкодження головного мозку

Патофізіологічні зміни, що відбуваються при ішемії, називаються ішемічним каскадом. Патобіохімічна сутність ішемічного каскаду полягає: у зниженні доставки  $O_2$  та глюкози, зменшенні напруги  $CO_2$ ; негайному розщепленні АТФ для забезпечення клітин в енергії (триває 2-4 хвилини після повної ішемії); використанні фосфокреатиніну, рівень якого в мозку в 3 рази більший, ніж АТФ; зниження внутрішньоклітинного рН і переході на анаеробний гліколіз, що призводить до підвищення вмісту молочної кислоти; перетворенні тривалентного заліза у двовалентне (за допомогою лактату), що сприяє утворенню вільних радикалів та окисленню ліпідів клітинних мембран; підвищенні рівня збуджуючих амінокислот-нейротрансмітерів -глутамату та аспартату [27]. Глутамат зв'язується з іонотропними рецепторами N-метил-D-аспартату (NMDA) і  $\alpha$ -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонової кислоти (AMPA) (iGluRs), що значно підвищує вхід кальцію в клітину. Кальцій активує фосфоліпази та протеази, які розщеплюють внутрішньоклітинні та мембранні білки [28]. Також глутамат сприяє входженню в клітину Na, Cl,  $H_2O$ . Аспартат впливає тільки на NMDA-рецептори. Високий вміст кальцію, натрію та АДФ в клітинах стимулює надмірне утворення вільних радикалів та деградацію гіпоксантину. Реактивні форми кисню безпосередньо пошкоджують ліпіди, білки, нуклеїнову кислоту та вуглеводи [29]. Вони особливо токсичні для клітин, оскільки антиоксидантні ферменти – супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатіон та механізми викачування ( $\alpha$ -токоферол, вітамін С), занадто повільні для компенсації виробництва реактивних форм кисню. Внаслідок надмірного утворення вільних радикалів відбувається індукована активація мітохондріальної пори [30], активація каскаду ліпоксигенази [31], активації поліADP-рибозної полімерази [32] та посилення іонного дисбалансу через вторину активацію кальцієвих каналів (TRPM) [33]. Крім того, реактивні форми кисню та азоту також мають потенціал модифікації ендогенних функцій білків, які можуть бути нейропротективними [34]. У період від 24 до 72 годин після

ішемії формується відстрочена нейротоксичність. Тривала активація NMDA-рецепторів підтримує входженню в клітину іонів кальцію, внаслідок чого продовжують активуватися фосфоліпази, протеази. Збільшується утворення арахідонової кислоти та вільних радикалів, що призводить до окислення ліпідів. Оскільки запаси АТФ виснажені: пошкоджена функція натрій-калієвої АТФзалежного насоса, внаслідок чого іони натрію й хлору входять у клітину, а іони калію виходять з неї. Підвищення рівня внутрішньоклітинного кальцію активує фосфоліпази  $A_1$ ,  $A_2$  і C, що призводить до гідролізу мембранних фосфоліпідів і вивільнення вільних жирних кислот. Арахідонова кислота метаболізується до простагландинів та тромбоксану  $A_2$  (через шлях циклооксигенази), лейкотрієнів (через шлях ліпоксигенази), які посилюють церебральну ішемію. Тромбоксан  $A_2$  і простагландини, що утворилися з арахідонової кислоти, мають потужні судинозвужувальні властивості та сприяють агрегації тромбоцитів, викликають ішемію й залучаються до механізму реперфузійного пошкодження. Супероксидні, пероксидні й гідроксильні радикали призводять до пероксисного окислення ліпідів в середині мембрани нервової клітини. Це пошкоджує функції мембрани й вивільнює токсичні побічні продукти (альдегіди), що призводять до набряку клітин, порушують проникність гематоенцефалічного бар'єра, спричиняють запалення. Супероксидні радикали самі по собі можуть формувати запальну відповідь з утворенням судинних тромбів [27]. Зрештою, ці мультимодальні каскади призведуть до складної суміші нейрональної смерті, що включає некроз, апоптоз та аутофагію [35].

Незважаючи на те, що відновленням перфузії можна «врятувати» життєздатні клітини ішемічної напівтіні головного мозку, реперфузія може викликати реперфузійне пошкодження клітин. Іноді вона призводить до більшої тканинної альтерації, ніж її відсутність [36].



## 1.2. РЕПЕРФУЗІЙНЕ ПОШКОДЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ТА СЕРЦЯ

Відновленням перфузії можна «врятувати» життєздатні, але функціонально неповноцінні клітини ішемічної напівтіні. Незважаючи на це, реперфузія може супроводжуватися й згубною дією — викликати реперфузійне ушкодження тканини мозку. На моделях інсульту на тваринах було показано, що іноді реперфузія призводить до більшого тканинного пошкодження, ніж її відсутність [36].

Точний механізм розвитку реперфузійного ушкодження тканини мозку поки що остаточно не з'ясований. Це може бути пов'язане з надлишком осмотично активних речовин, води, вільнорадикальним окисненням, виділенням токсичних для ендотеліальних клітин речовин [37].

Ураження ендотелію судин призводить до набряку оточуючих тканин або розвитку геморагії, порушення гематоенцефалітичного бар'єра. Поверхня ендотелію змінює свої антикоагулянтні властивості на прокоагулянтні. Посилюється адгезія лейкоцитів, тромбоцитів, прогресують мікроциркуляторні порушення. Це призводить до розвитку феномену невідновного кровотоку (*no-reflow phenomenon*).

Участь клітин запалення внаслідок експресії рецепторів адгезії, активація пула запальних поліморфноядерних лейкоцитів, потрапляння їх та імунореактивних клітин із внутрішньосудинного русла в ділянку інфарктного ядра, це дуже важливі патологічні процеси, які можуть посилювати реакцію асептичного локального запалення, активацію апоптозу. Активація клітин запалення може призвести до додаткового тканинного пошкодження через виділення реактивних форм кисню, які посилюють оксидантний стрес клітин [36]. Реперфузія зумовлює підвищення парціального тиску кисню, збільшує концентрацію токсичних вільних радикалів — продуктів пероксидного окиснення. Оксидативний стрес та ендотеліальна дисфункція є основними механізмами реперфузійного пошкодження головного мозку після ішемії. [38].

Вільні радикали, зокрема супероксидний аніон, взаємодіє з оксидом азоту, що призводить до утворення токсичного радикалу пероксинітрату, який посилює пошкодження клітинних структур [39].

Окисний стрес спостерігається при ішемії, однак більшою мірою він є наслідком подальшої реперфузії, коли відбувається виснаження антиоксидантів. Вважається, що внаслідок цього розвиваються порушення функції мембранних структур, які призводять до тривалої неврологічної дисфункції, незважаючи на відносну збереженість ДНК ядер нейронів [40].

В розвитку ішемічно-реперфузійних ушкоджень головного мозку оксид азоту (NO) займає важливе місце, це довели дослідження останніх десятиліть [41].

Ефекти NO в організмі реалізуються шляхом метаболізму в трьох основних реакціях: 1) із супероксидним радикалом і ліпідним перекисом; 2) з білками, що містять гемове і негемове залізо; 3) з тіолами і вторинними амінами. Синтезований у клітині NO дуже швидко зв'язується зі своїми клітинними мішенями, якими є залізовмісні ферменти і білки: гуанілатциклаза, власне NO-синтаза, гемоглобін, мітохондріальні ферменти циклу Кребса, ферменти синтезу білка і ДНК [42, 43].

Оксид азоту, синтезований різними типами NOS, виконує різні функції. Активація ендотеліальної NOS спостерігається при підвищенні швидкості кровотоку (напруга зсуву) під час гострого фізичного навантаження [44]. Ендотеліальна продукція NO захищає організм від гіпертензії, тромбозів, спазмів судин, вільнорадикального ушкодження. Експресія iNOS призводить до гіперпродукування NO і його токсичних форм. У такому випадку NO продукує мікроглія і лейкоцити. [45].

Нейрональна NOS відіграє першочергову роль при ішемії головного мозку. nNOS у мозку зосереджена в глутаматергічних гранулярних клітинах і ГАМК-ергічних корзинчастих клітинах мозочка, у нейронах кори мозку. Вважається, що NOS-вмісні нейрони мозку проявляють підвищену резистентність до шкідливих впливів, оскільки володіють НАДФН-діафорозною активністю.

НАДФН-діафораза - необхідний компонент ланцюга утворення NO в нейронах, глії, клітинах судин мозку, вона відіграє значну роль у механізмах відповіді при ішемії-реперфузії головного мозку [46]. Ферментативний синтез NO знижується, якщо напруга кисню падає нижче 30 мм рт. ст. [47]. Починає активуватись – нітритредуктазний шлях утворення NO в організмі. Продуктування NO в процесі нітритредуктазної реакції в 1000 разів вище інтенсивності NO-синтазної реакції [48]. Дефіцит кисню – чинник, який забезпечує активну роботу нітритредуктазних систем з гемвмісними білками – гемоглобіном, міоглобіном, цитохромоксидазою і цитохромом P-450. Кисень інгібує нітритредуктазну активність гемвмісних білків, а ішемія і функціональне навантаження активують цикл оксиду азоту. Однак відновлювати іони NO<sub>2</sub> - в NO можуть лише відновлені форми гемвмісних білків. Тому найважливішим компонентом нітритредуктазних систем є електроннодонорні системи, що здійснюють відновлення гемоглобіну, міоглобіну, цитохромоксидази і цитохрому P-450.

Активація нітритредуктазного компонента за умов ішемії може бути однією зі складових ушкодження нейронів у період реперфузії. Однак за фізіологічних умов сила «слабкого» NO-синтазного компонента полягає в тому, що саме він лімітує надходження субстрату NO<sub>2</sub> - для «сильного» нітритредуктазного компонента. Тут прослідковується аналогія з принципом доповненості, який добре відомий фізикам: сила «слабкого» компонента в слабкості «сильного» [49].

Окисний стрес – основний патогенетичний шлях руйнування нейронів, і NO відіграє тут значну роль. NO впливає на сигнальні шляхи активних форм кисню, взаємодіє з системами, які в процесі метаболізму арахідонової кислоти продукують простагландини. Їх утворення залежить від наявності зазначеної кислоти і перекису, рівень яких може регулюватися NO. Похідні NO взаємодіють із багатьма ферментами, що метаболізують арахідонову кислоту (пероксинітрит інгібує простагліцинсинтазу) [50]. Індуцибельна дія NO на процес апоптозу спостерігається при генеруванні високих концентрацій NO в клітинах і тканинах, наприклад, при функціонуванні iNOS. Це може бути

зумовлено тим, що при інтенсивній генерації NO різко підвищується ймовірність його перетворення в пероксинітрит, який запускає процес апоптозу. Крім того (і для цього не обов'язково ініціювати синтез NO у високих концентраціях), цей агент, взаємодіючи з мітохондріями, може спричиняти вихід із них цитохрому C – потужного активатора апоптозу. NO здатний ініціювати посилений синтез проапоптичного білка p53 [51].

Нейротоксичність NO зумовлена його перетворенням у більш агресивні сполуки – пероксинітрит. Реакція окиснення L-аргініну, яка каталізується NOS, призводить до утворення двох продуктів вільнорадикальної природи – NO і супероксидного аніон-радикала. Продуктом взаємодії NO і супероксиду є високореактивна сполука – пероксинітрит. Гіперпродукція ONOO- вказує на індукцію нітрозативного стресу, що, на думку дослідників, є однією з важливих ланок окисного стресу [52].

Участь NO-синтази в механізмах ушкоджувального впливу NO підтверджується тим, що трансгенні миші, в яких відсутній ген, що кодує нейрональну NO-синтазу, виявляють стійкість до ішемії мозку [53]. До того ж, NO нейронального походження відіграє провідну роль у патогенезі реперфузійного ушкодження клітин мозку. У мишей із дефіцитом експресії nNOS розміри ушкодження і набряку мозку при його реперфузії виражені меншою мірою [45]. Ці дані дозволяють вважати, що саме нейрональна ізоформа ферменту вносить найбільш суттєвий вклад у посилення генерування NO, що спостерігається при ішемії-реперфузії мозку [54]. Отже, підвищення продукування NO в клітинах мозку призводить до ушкодження і загибелі. У той же час, зниження продукування NO в ендотелії судин мозку спричиняє вазоконстрикцію, що ще сильніше перекриває доступ кисню [55,46].

На початкових стадіях ішемії, а також у пізніх періодах ішемії-реперфузії спостерігається позитивні ефекти впливу NO. Під час ішемічного ушкодження відбувається розвиток потужного оксидативного стресу. NO-синтазного шлях генерації NO пригнічується, а індукований нітритредуктазним шлях оксиду азоту, завдяки своїй радикальній природі, лише сприяє руйнації. Посилюється

вона і в період реперфузії. Тільки тоді, коли зона пенумбри звільнена від продуктів ПОЛ через відновлення кровотоку, можна спостерігати позитивні ефекти NO [41].

Подібні ішемічно-реперфузійні процеси та пошкодження відбуваються і в серці. Під час ішемії міокарду, коли є невідповідність постачання кисню міокарду і його потребі, виникає цілий комплекс функціональних, метаболічних та структурних пошкоджень. Тривала і глибока ішемія міокарду закінчується загибеллю кардіоміоцитів [56]. Раннє відновлення коронарного кровотоку при гострому інфаркті міокарду сприяє зменшенню зони некрозу міокарду. Повне або часткове відновлення кровотоку в ішемізованій зоні міокарду може відбуватися спонтанно, внаслідок лізису або реканалізації тромбу, припинення спазму вінцевої артерії, посилення колатерального кровотоку в ділянці ішемії. Внутрішньовенне введення тромболітичних препаратів, хірургічні методи штучно відновлюють кровоток.

У дослідженнях доведено, що при відновленні кровотоку в коронарній артерії виникають патологічні процеси — реперфузійне пошкодження міокарду [57, 58, 59]. Клінічно реперфузійне пошкодження міокарду виявляється у вигляді: шлуночкової екстрасистолії, патологічного ідіовентрикулярного ритму, шлуночкової тахікардії, фібриляції шлуночків [60]. Це отримало назву феномена — оглушення міокарду (*stunning myocardium*), його оберненої післяішемічної дисфункції [56]. При цьому відбувається пошкодження судин мікроциркуляторного русла за відсутності відновлення коронарного кровотоку на тканинному рівні (феномен — *no reflow*) [57], прискорений некроз кардіоміоцитів, які були функціонально пошкоджені під час ішемії [57].

Одразу після реоклюзії коронарної артерії виникають реперфузійні аритмії, як наслідок гострих метаболічних і локальних електрофізіологічних змін в міокарді [61], але далеко не повністю вивчені механізми їхнього виникнення. В патогенезі реперфузійного синдрому задіяні наступні взаємопов'язані фактори, які доповнюють один одного [57]: утворенням вільних радикалів кисню, як несприятливий ефект реоксигенації ішемізованої тканини—

«кисневий парадокс»; - надлишкове надходження йонів кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ) з екстрацелюлярного простору в кардіоміоцити; порушенням функції мітохондрій, зменшенням продукції АТФ; формування контрактури кардіоміоцитів та їх некроз або апатоз — «кальцієвий парадокс» [57, 62].

Дослідження останніх років [63] доводять, що реперфузійне пошкодження може бути пов'язане з дисфункцією мітохондрій, а саме з активацією мітохондріальної пори (МП) [64, 65]. Зміни проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани може призводити до набряку мітохондрії та в подальшому до ушкодження зовнішньої мембрани мітохондрії з утворенням пор. За умов різних патологічних станів, так і при ішемії-реперфузії, пов'язаних з надлишком внутріклітинного кальцію, відкриття пор призводить до зниження мембранного потенціалу, гальмуванню синтезу АТФ в наслідок розмежування окисного фосфорилювання [66, 67, 68].

МП це неселективний канал, що відкривається і може пропускати молекули масою менше ніж 1500 Да [69]. Активаторами МП можуть бути іони кальція [70], неорганічний фосфат та зменшення концентрації АТФ [71], вільні радикали [64]. При ішемії-реперфузії відкриття МП призводить до виходу з мітохондрій таких речовин як - цитохром С, фактор індукції апоптозу, вільні радикали [71]. Доведено, що більшість реперфузійних пошкоджень міокарда пов'язані з утворенням та відкриттям МП і в подальшому дією тих речовин і вільних радикалів які виходять в цитозоль [72]. При дослідженнях на серці морської свинки під час реперфузії серця, після ішемії, виявлено розвиток аритмій, пригнічення скоротливої активності ізольованого серця, депресію скорочувальної активності передсердної трабекули і артеріальної судинної смужки. Ці зміни пов'язують з вивільненням фактора при відкритті мітохондріальної пори [73]. При ішемії-реперфузії міокарда в артеріальній крові та міокарді значно зростають рівні продуктів деградації пуринових аденін- і гуанін-нуклеотидів (АТФ і ГТФ) – ксантину, гіпоксантину та інозину [74, 75, 76, 77].

### **1.3. ПОРУШЕННЯ КАРДІОГЕМОДИНАМІКИ В УМОВАХ ФОКАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ-РЕПЕРFUЗІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ**

#### **1.3.1. Патофізіологічні механізми порушення кардіогемодинаміки в умовах фокальної шемії-реперфузії головного мозку**

Одним з ускладнень ІІ є ЦКС, це складні метаболічні деструктивні порушення, які розвинулись у міокарді в наслідок ішемічного пошкодження головного мозку. Першими дослідниками, які довели взаємозв'язок між враженням головного мозку та порушеннями серцевого ритму, а також смертністю від серцево-судинних захворювань, включаючи і раптову серцеву смерть були S. Lavy, L. Reinstein и J.R. Mikolich [78, 79, 80]. За даними клінічних досліджень, у хворих на ішемічний інсульт на ЕКГ визначають наступні зміни: сегмента ST (елевація, депресія), як наслідок порушення процесу реполяризації кардіоміоцитів, подовження зубця Т, його деформація, зміщення, формування негативного зубця Т або поява зубців U, порушення ритму. Може спостерігатися подовження інтервалу QT та QTU, серед порушень ритму тахікардія чи брадикардія, шлуночкові та передсердні екстрасистоли, миготлива аритмія, зрідка – порушення провідності [81, 82]. У той же час, нещодавні дослідження демонструють те, що при ехокардіографії у 13-29 % хворих з ішемічним інсультом виявляється систолічна дисфункція з підвищенням рівня серцевого тропоніну та фібриляцією передсердь, що призводить до високого ризику госпітальної смертності [83] та діастолічна дисфункція [84].

З клінічної точки зору виділяють три варіанти (форми) ЦКС [81]:

- міокардіодистрофічний варіант, який відображає первинні біохімічні та структурні зміни в міокарді;
- ішемічний варіант, при якому первинні порушення обміну речовин та структури міокарда, в наслідок інсульту, поєднуються з ішемічною хворобою серця, яка вже мала місце у хворого (вкрай важким клінічним проявом цього варіанту є інсульт-інфаркт міокарда);

- аритмічний варіант, проявами якого є синусова брадикардія (рідше тахікардія), шлуночкова або передсердна екстрасистолія, миготлива аритмія, повільний атріовентрикулярний ритм, іноді спостерігається порушення внутрішньошлуночкової провідності у вигляді минутих блокад однієї з ніжок пучка Гіса.

Функція серця регулюється центрами ствола головного мозку за допомогою симпатичної та парасимпатичної інервації, і як наслідок, враження мозкових структур супроводжується порушенням серцево-судинної автономної регуляції [85] з надмірною симпатичною активацією. Центрогене збудження симпатoadреналової системи і дисфункція автономної нервової системи призводять до посиленого викиду в плазму крові катехоламінів, які викликають порушення в роботі гуморальних систем і глибокі порушення тканинного метаболізму в міокарді, як на рівні субстратів, так і на рівні ферментативних реакцій [86].

Збудження симпатико-адреналової системи призводять до посиленого викиду в плазму крові катехоламінів. Токсичний вплив катехоламінів зменшує щільність та афінність  $\beta$ -адренорецепторів кардіоміоцитів, знижує скоротливу силу міокарду – «метаболічне пошкодження міокарда гіперадренергічного типу» [87]. Гіперкатехолемія викликає вторинні морфофункціональні зміни кардіоміоцитів по типу міоцитолізу та вогнищевих мікронекрозів міокарду – «адреналіновий міокардит» [88]. «Симпатична буря» призводить до збільшення Са-тока в кардіоміоцити та зростання внутрішньоклітинної концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Зростає проникність мембран для іонів  $\text{K}^+$ , посилюється щільність К-тока, який виходить. Як наслідок – прискорення закінчення реполяризації та скорочення потенціала дії [89].

Важливим є той факт, що при ішемії мозку мікроглія продукує токсичні для мозку прозапальні та протективні протизапальні цитокіни [90, 91]. В умовах ІІ підвищується продукція інтерлейкіну-1 (ІЛ-1), який може збільшувати набряк мозку, розмір інфарктної зони, кількість нейтрофілів, що інфільтрують ділянку ішемії. Це індукує запалення в осередку ішемії, підтримує його та може



привести до віддаленої загибелі нейронів. Експресія ІЛ-1 стимулює синтез антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 (АІІЛ-1) [92, 93]. АІІЛ-1 конкурентно зв'язується з рецепторами ІЛ-1 мембранного типу I та запобігає взаємодії рецептора ІЛ-1 з його акцесорним білком, що блокує проведення сигналу від ІЛ-1 у середину клітини [91]. Через ендотеліальні клітини та кардіоміоцити ІЛ-1 та АІІЛ-1 мають вплив на міокард. ІЛ-1 інгібує транскрипцію генів вольтажзалежних кальцієвих каналів, та пригнічує вольтажзалежний кальцієвий потенціал у кардіоміоцитах шлуночків. Крім того, ІЛ-1 знижує експресію гена фосоламбану – регулятора скоротливості кардіоміоцитів [90]. Інтерлейкін-1, фактор некрозу пухлин (ФНП) та  $\alpha$ -інтерферон активують транскрипцію гена кальцій незалежної індукцйбельної NO-синтази (iNOS), що призводить до надлишкового синтезу оксиду азоту (NO) при II. Активація конститутивних NO-синтаз (eNOS, nNOS), на відміну від iNOS здійснюється транзиторно внаслідок підвищення внутрішньоклітинного вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  та активації протеїнкінази B, яка в свою чергу знаходиться під контролем сфінгомієлінового сигнального каскаду [94].

### **1.3.2. Біохімічні аспекти пошкодження міокарда в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку**

Гіперкатехоламінове гістотоксичне ураження міокарда, токсичний вплив прозапальних цитокінів мікроглії мозку, надлишковий синтез оксиду азоту дає підстави припустити можливий розвиток потужного оксидативного та нітрозативного стресів в міокарді при цереброкардіальному синдромі. ПОЛ, як наслідок, розвитку оксидативного стресу в кардіоміоцитах, є результатом надмірної генерації активних форм кисню (АФК) в мітохондріях [95]. Окисне пошкодження білкових і ліпідних компонентів внутрішньої мембрани мітохондрій збільшує неспецифічну проникність останньої, внаслідок відкривання пори перемінної проникності [96]. Ці процеси ініціюють розвиток апоптозу кардіоміоцитів і порушення функції серця [97].

Ще одне припущення стосується можливої участі в процесах, які відбуваються в мітохондріях міокарда за фокальної ішемії-реперфузії ГМ, біологічно активного газового трансмітера сірководню ( $H_2S$ ), що інтенсивно синтезується в мітохондріях людини і тварин і бере участь у реакціях з активними формами кисню та азоту ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$ ,  $NO$ ) [98]. Сірководень є важливим регулятором *de novo* синтезу  $NO$  [99].

### 1.3.2.1. Оксидативний стрес

Зсув редокс рівноваги в організмі в бік вільнорадикального окиснення і утворення пероксидів ліпідів у сучасній науці отримало назву «оксидативний стрес» [100]. Найбільш активними є вільні радикали [101], що містять неспарені електрони в атомах  $O$  та  $N$ , і утворюють, так звані, активні форми кисню (АФК) та азоту (АФА). Відомо, що фізіологічні дози АФК, згідно з теорією „гормезису” (оксидативний стрес здатний максимально адаптувати захисні сили й адаптивні можливості організму за умов дії стресових чинників), можуть відігравати регуляторну роль в адаптації організму, в тому числі, органів серцево-судинної системи до змін навколишнього чи внутрішнього середовища [102]. Активні форми кисню та АФА є необхідними посередниками багатьох процесів нормального функціонування клітин. Так, перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) важливе для біосинтезу простагландинів, лейкотрієнів, біологічно активних речовин тощо [103]. Активні форми кисню у процесах нормальної життєдіяльності організму утворюються, наприклад, при ПОЛ – як результат активації макрофагів у запальних процесах інфекційної чи неінфекційної природи; у стані гострого й хронічного стресу; в реакціях перехідних металів з гідропероксидами. Перекисне окиснення ліпідів здійснюється, головним чином, за рахунок вільнорадикальних реакцій і являє собою ланцюговий процес, в якому беруть участь алькільні радикали  $R'$ , алкоксидні  $RO'$ , пероксидні  $ROO''$ , гідроксидні  $HO'$  радикали і АФК – синглетний кисень і супероксид аніон [104, 105, 106]. Але також відомо, що за умов патології, в нашому випадку, за умов фокальної ішемії-реперфузії головного мозку, коли утворення АФК

збільшується надмірно, як в організмі в цілому, так і в міокарді серця, воно є однією з ланок розвитку цереброкардіального синдрому [90, 107].

Головні внутрішньоклітинні джерела АФК – це електрон-транспортні системи мембран мітохондрій (дихальний ланцюг) і мікросом, де відбувається відновлення молекулярного кисню до води через утворення інтермедіатів-супероксидного й гідроксильного радикалів і пероксиду водню. До АФК, які утворились внаслідок відновлення його триплетного стану, включають супероксид аніон-радикал -  $\cdot\text{O}_2^-$ , його кон'юговану кислоту  $\cdot\text{OH}_2$  (пергідроксил радикал), пероксид водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), гідроксильний радикал  $\cdot\text{OH}$ , гіпохлоритну кислоту  $\text{HOCl}$ , пероксинітрит  $\text{ONOO}$  [108]. Найсильнішими електрофілами і найбільш реакційноздатними сполуками кисню є  $\cdot\text{OH}$  та  $\text{ONOO}$ . Надлишок активних форм кисню знижує утворення макроергів, вироблення енергії, порушує транспортні процеси в мембранах – роботу іонних каналів і насосів. Це, в свою чергу, впливає на синтез ДНК, РНК і білків, поділ клітин, обмін речовин. Ступінь пригнічення продукції енергії має вирішальне значення для нормального функціонування або загибелі клітин [103]. Враховуючи те, що активація вільнорадикального окиснення відіграє важливу роль в патофізіологічних процесах, системи антиоксидантного захисту організму виступають, як найважливіша внутрішня сила протидії пошкодженню при патології. Потужними і дуже важливими антиоксидантними ферментами є супероксиддисмутази і каталаза. Супероксиддисмутаза перетворює супероксидний йон-радикал на воду і пероксид водню, який, у свою чергу, нейтралізується каталазою. В мітохондріях знаходиться супероксиддисмутаза, що містить марганець, а в цитозолі –  $\text{Cu}$  і  $\text{Zn}$  вмісні ферменти. Каталаза знаходиться в пероксисомах. Також відомо, що в плазмі крові є  $\text{Cu}$  і  $\text{Zn}$ , вмісна супероксиддисмутаза, яка відіграє важливу роль у захисті ендотелія від пошкодження, та церулоплазмін – позаклітинний антиоксидантний фермент, який має супероксиддисмутазну активність [103]. Одним з головних факторів підтримання внутрішньоклітинного редокс-гомеостазу є відновлений глутатіон, він функціонує як кофакторі косубстрат GSH-залежних ферментів та

безпосередньо інактивує активні форми кисню, бере участь у тіол-дисульфідному обміні, відновлює дисульфідні групи до тіолових. Перетворення пероксиду водню до води глутатіонпероксидазою спряжено з окисненням глутатіону, який згодом відновлюється глутатіон-редуктазою. Глутатіонпероксидаза здатна знешкоджувати також ліпідні пероксиди в складі мембран [101]. Група ферментів, такі як цитохром-С-пероксидаза, мієлопероксидаза, NADH-пероксидаза, використовують перексид водню для окиснення інших субстратів. Клітини та тканини від оксидативного стресу також захищають ферменти і білки, які зв'язують йони металів із змінною валентністю блокуючи їхню здатність каталізувати окиснення. Як в цитозолі, так і в ядрі клітини, знаходяться малі (6,5 кДа) спеціалізовані білки, які стабілізують клітинний редокс-гомеостаз, реактивуючи тіолові групи білків, та діють як синергісти відновлення глутатіону. Коензим Q (убіхінол-убіхінон) стабілізує електронно-транспортний ланцюг. В антиоксидантному захисті приймають участь мікроелементи (Zn, Fe, Cu, Se), гормони - глюкокортикоїди, статеві гормони, пігмент меланін, опіоїдні нейропептиди - енкефаліни, ендорфіни. Жиророзчинні вітаміни Є та А захищають ліпідний шар мембран клітини. Це все має важливий внесок у редокс-гомеостаз клітин організму.

### 1.3.2.2. Нітрозативний стрес

Молекула NO відносно інертна молекула, але реагуючи з киснем може утворювати активні форми оксиди азоту (АФА), такі як нітрозоній ( $\text{NO}^+$ ), нітроксил ( $\text{NO}^-$ ), пероксинітрит ( $\text{ONOO}^-$ ) та діазоттриоксид ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) [109]. Головний механізм синтезу NO є ензиматичний окисний *de novo*, за участю NO-синтаз [110, 111, 112]. Субстратами для синтезу NO є аргінін, креатин, карнозин, брадікінін [113, 114]. Мітохондріальна NO-синтаза локалізована у внутрішній мембрані мітохондрій, вона продукує NO за наявності субстрату аргініну. Але за умов дефіциту аргініну або кофакторатетрагідробіоптерину ( $\text{BH}_4$ ) може утворювати супероксидний аніон-радикал ( $\text{O}_2^-$ ). Існує альтернативний неокисний реутилізаційний механізми утворення NO *in vivo*, це біотрансформація нітриту -

відновлення нітрат- до нітрит-аніонів ферментом нітратредуктазою, який в свою чергу перетворюється на NO, під дією нітритредуктази (гемовмісними та  $\text{Mo}^{6+}$ -вмісними білками) за умов гіпоксії та тканинного ацидозу [115, 116]. Залежно від умов утворення NO та АФА проявляють регуляторні або цитотоксичні ефекти [117, 118]. NO та АФА в низьких концентраціях фізіологічними модуляторами в мітохондріях, що регулюють синтез АТФ, споживання кисню, транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ . Високі рівні NO та утворення АФА можуть призвести до розвитку нітрозативного стресу [119]. Нітрозативний стрес характеризується посиленою продукцією та пошкоджуючою дією NO та його активних форм. Це полягає в цитотоксичній дії цих речовин, інгібуванні активності окремих ензимів, в наслідок нітрузування функціональних груп у білках [117], пошкодженні компонентів дихального ланцюга, розщепленні ДНК, РНК, пошкодженні ліпідів [120]. Крім того,  $\text{N}_2\text{O}_3$  бере участь у синтезі нітрозамінів,  $\text{ONOO}^-$  - потужний оксидант, який швидко перетворюється на  $\text{NO}_2$  і може викликати окислення ліпідів та утворення токсичних похідних. До них відносять 4-гідроксиноненал, який може викликати пошкодження ДНК та впливає на роботу сигнальних каскадів [121, 122]. Пошкоджувальна дія NO, в більшості випадків є опосередкованою за рахунок пероксинітриту, який окислює білки дихального ланцюга в мітохондріях і підвищуючи їх чутливість до індукторів відкривання мітохондріальної пори [123]. Пероксинітрит утворюється при одночасній генерації високого рівнів як NO, так і супероксид-аніона. Одночасно високий вміст NO пригнічує активність каталази, що збільшує вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$ , та активності мітохондріальної кальційзалежної NOS, а це призводить до утворення нею  $\text{O}_2^-$  замість NO [124].

При ішемії мозку мікроглія продукує токсичні прозапальні цитокіни [90, 91], які збільшують набряк головного мозку, розмір інфарктної зони, а в серці – впливають на міокард через ендотеліальні клітини та кардіоміоцити [90]. Інтерлейкін-1 (ІЛ-1), фактор некрозу пухлин (ФНП  $\alpha$ ) та  $\gamma$ -інтерферон активують транскрипцію гена кальційнезалежної індукцибельно NO-синтази (iNOS), що призводить до надлишкового синтезу оксиду азоту (NO) при ішемічному

інсульті. Активація конститутивних NO- синтаз (eNOS, nNOS), на відміну від iNOS, здійснюється транзиторно внаслідок підвищення внутрішньоклітинного вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  та активації протеїнкінази b, яка, в свою чергу, знаходиться під контролем сфінгомієлінового сигнального каскаду [94]. За умов, як фокальної так і глобальної, ішемії мозку доведено безпосередня участь NO в процесі деструкції нейронів при введенні тваринам селективних інгібіторів нейрональної та кальцій незалежної індукцйбельної NO-синтази (iNOS), а також в дослідженнях з тваринами з дефіцитом гена, iNOS [125, 126]. Вже з перших хвилин ішемії мозку починає збільшуватись концентрація NO, досягаючи максимуму на 1-3 добу. На початку ішемії мозку превалює експресія конституційної кальційзалежної NOS. Це обумовлено трансміттерним аутокоідозом. На цій стадії NO приймає участь в модуляції активності NMDA рецепторів, утворенні гідроксил-радикалу, активації фосфоліпаз, що опосередковано впливає на пошкодження нейронів, як в вогнищі ішемії, так і в пенумбрі. В подальшому, за умов фокальної ішемії, на 1-3 добу концентрація NO зростає за рахунок індукцйбельної NOS, яка активувалася токсичними прозапальними цитокінами мікроглії, макрофагів, нейтрофілів пенумбри. [126,127]. Мікроглія також має нітроредуктазну активність, відновлюючи нітрати в нітрити, що також є джерелом збільшення NO в організмі.

Утворення сильного оксиданту пероксинітриту, при патологічній гіпергенерації NO, значно збільшується. Це пов'язано з тим, що NO – єдина біомолекула, що конкурує із супероксиддисмутазою за супероксид [128]. Ліпідні мембрани більш проникливі до пероксинітриту і мають значно більше хімічних мішеней, ніж NO. Пероксинітрит модифікує білкові макромолекули, окиснюючи тіольні групи [48]; пригнічує антиоксидантні ферменти і посилює утворення супероксидного аніону; інгібує білки мітохондріального дихального ланцюга, що призводить до зниження продукування АТФ і порушення кальцієвого гомеостазу. Під дією пероксинітриту відбувається модифікація і розрив ланцюга ДНК, одночасно інгібується ДНК-лігаза, що спричиняє ще більше ушкодження ДНК і клітини в цілому [55].

Взаємодіючи з іоном кисню, пероксинітрит утворює пероксинітритну кислоту ( $\text{ONOOH}$ ), яка розпадається і дає початок молекулам гідроксирадикала і  $\text{NO}_2$  - [129, 42].

Радикали глутатіону, які утворюються за наявності пероксинітриту, мають прооксидантну дію, ініціюючи процеси ПОЛ [130].

Ще одним з механізмів нейро- та кардіоцитотоксичності пероксинітриту є його взаємодія із супероксиддисмутазою (СОД). До складу супероксиддисмутази входять метали, пероксинітрит реагуючи з ними призводить до утворення реактивного і високотоксичного іону нітрозонію ( $\text{NO}_2^+$ ), який в реакціях з фенольними групами і утворює нітрофеноли. При цій реакції супероксиддисмутази виконують роль каталізатора нітрування широкого спектра похідних фенолу, у тому числі тирозинів. Утворення нітротирозинів суттєво визначає токсичність  $\text{NO}$ , оскільки при інактивації тирозинкінази не відбувається фосфорилування білків і порушуються функції цитоплазматичних рецепторів. [129, 42].

#### **1.4. РОЛЬ СІРКОВОДНЮ В ПОРУШЕННІ ФУНКЦІЙ СЕРЦЯ**

У 90х роках було виявлено високий вміст сірководню у тканинах мозку людини, бика і щурів [131, 132]. З часом було встановлено, що  $\text{H}_2\text{S}$  підвищує активність NMDA-рецепторів, а це сприяє тривалій потенціації, яка в свою чергу забезпечує синаптичний механізм пам'яті в гіпокампі [133].

В останні роки з'являється все більше даних про кардіо- і васкулопротекторні властивості  $\text{H}_2\text{S}$ , зокрема, при ішемії-реперфузії, інфаркті міокарду. [134]. Досліджую кардіопротекторний вплив встановлено, що сірководень, який продукується ендогенно та потрапляє в судинне русло, може бути вагомим фізіологічним регулятором тону судин гладеньких м'язів [135]. Порушення його синтезу виявлено при гіпертензії [136].

В організмі, подібно до синтезу  $\text{NO}$ , існує три шляхи *de novo* синтезу сірководня, а також реутилізаційні. В процесі конститутивного та

індуцибельного синтезу *de novo* сірководень утворюється з L-цистеїну за допомогою трьох ферментів - цистатіонін-γ-ліази, цистатіонін-L-синтази і 3-меркаптопіруватсульфуртрансфери, які експресуються в мітохондріях тканин серцево-судинної та нервової систем. Реутилізаційний шлях синтезу сірководню здійснюється за допомогою сульфатредуктази та цистеїнліази, коли сульфат-аніон перетворюється на сульфід-аніон, а останній на сірководень.  $H_2S$  синтезується з L-цистеїну за допомогою ферментів цистатіонін-β-синтази (ЦБС) і цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ). У серці [137] та стінках кровоносних судин [138, 139] переважає цистатіонін-ліаза. Крім того, в серці сірководень синтезується ферментом 3-меркаптопіруватсульфуртрансфери, який активний у цитозолі та в мітохондріях [140]. Сірководень приймає участь в: зміні тонуусу гладеньких м'язів [141] та ангіогенезі, патогенезі запалення та шоку, опосередковує цитопротекцію на моделях ішемічно-реперфузійного пошкодження міокарда [142, 143]. Відкрито деякі молекулярні механізми дії сірководню: регулювання сигнальних білків, взаємодія з оксидом азоту (NO) [144] і регуляція відкривання АТФ-залежних калієвих ( $K^+$  АТФ) каналів [145, 146].

При дослідженні регуляторної дії сірководню на зміну проникності мітохондріальних мембран, впливу донора сірководню гідросульфиду натрію (NaHS) на функціональний стан і механізми попередження реперфузійних порушень функції серця, були отримані цікаві результати. Застосування NaHS супроводжувалося збільшенням функціональних резервів міокарда, попереджало розвиток реперфузійних порушень функції серця, оскільки відновлення показників кардіодинаміки після ішемії при внутрішньоочеревинному його введенні було істотно вищим, NaHS запобігав надмірному утворенню мітохондріальних пор підчас ішемії–реперфузії. Попереднє введення NaHS не впливало на рівень експресії гена UCP3, але збільшувало мембранний потенціал мітохондрій серця. [147]. Встановлено, що під дією екзогенного сірководня відбувається активація протеїнкінази C, а це призводить до хелатування іонів кальцію і зменшення пошкоджень кардіоміоцитів при реперфузії [148].



В експериментах спостерігалася стійка тенденція до підвищення коронарного потоку після застосування NaHS. Є свідчення, що розслаблювальний вплив NaHS на гладенькі м'язи аорти [149] і коронарних артерій [135] опосередковують  $K^+$  АТФ-канали [150].

Отримані данні, що преінкубація ізольованих мітохондрій серця з 5-HD викликала ослаблення протекторного ефекту донора сірководню відносно кальційіндукованого відкривання мітохондріальних пор. Це може свідчити про участь мітохондріальних  $K^+$  АТФ-каналів у  $H_2S$ -залежному інгібуванні пороутворення в серці, що спостерігається при його реперфузії даними [151].

Системи антиоксидантного захисту – супероксиддисмутаза, каталаза і глутатіоном також забезпечують цілісність мембран мітохондрій. Є данні, що  $H_2S$  знижував концентрацію малонового діальдегіду та підвищував активність супероксиддисмутази в серцях щурів за умов шоку [152].  $H_2S$  зв'язується з активним центром  $Cu-Zn$ -залежної супероксиддисмутази і є алостеричним регулятором, стимулюючи активність ензиму. Вживання кардіоміоцитів після ішемії збільшується під впливом екзогенного сірководню, внаслідок підвищення активності супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази [153].

Як вже було вказано вище введення донора сірководню попереджує пошкодження міокарда при ішемії-реперфузії [154, 155, 156] за рахунок протиапоптотичної і протизапальної його дії. Концентрацію ендогенного сірководню також можна підвищити не тільки введенням його донорів, але і за допомогою з попередника його синтезу - L-цистеїну [157]. Відомі наступні ефекти останнього, а саме: зменшує негативний вплив ішемії-реперфузії на міокард, обмежує зону інфаркту [158], пригнічує продукцію активних форм кисню та збільшує активність супероксиддисмутази [159]. L-цистеїн може використовуватися клітиною для синтезу сірководню, який відіграє роль тригера у кардіопротекторних механізмах міокарда [160].

Доведено, що L-цистеїн як сам по собі, так і на тлі дії DL-пропаргілгліцину зменшував вихідний рівень коронарного потоку, можливо підвищення тонуусу коронарних судин при блокаді синтезу сірководню стимулювало запуск

механізмів розслаблення, одним з яких може бути активація синтезу оксиду азоту. Який в такому випадку відіграє роль прекондиціонера при ішемії-реперфузії, впливаючи на роботу дихального ланцюга мітохондрій, інгібує утворення мітохондріальних пор [161]. Так після послідовного введення DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну киснева вартість роботи серця тварин під час реперфузії практично не змінювалася, в той час як у контрольній групі цей показник зростав у 2,4 раза. [160]. Це вказує на те, що міокард більш ефективно використовує кисень, можливо за рахунок зменшення проникності мітохондріальних мембран при реперфузії, зберігалась енергосинтезувальна функція мітохондрій і захисні механізми до окисидативного стресу. А, як відомо, утворення надмірної кількості АФК при реперфузії міокарда є основним пошкоджувальним фактором і супроводжується розвитком оксидативного стресу [156].

Можливо що пригнічення активності цистатіонін- $\gamma$ -ліази DL-пропаргілгліцином, під дією якої з L-цистеїну синтезується сірководень, стимулює активність іншого ферменту синтезу сірководню – 3-меркаптопіруватамінотрансферази (3MST), і саме синтезований цим шляхом сірководень зумовлює захисний ефект [160]. Виявлено, що H<sub>2</sub>S, який продукується 3MST, що локалізована головним чином в мітохондріях, зменшує генерацію активних форм кисню в цих органелах [162].

Як відомо виживання клітин та відновлення функцій при окисному стресі залежить від активності антиоксидантної системи. Можливо застосування L-цистеїну на тлі попереднього введення DLпропаргілгліцину давало змогу активізувати захисні властивості міокарда за рахунок перетворення L-цистеїну в антиоксидантні сполуки, а саме – глутатіон [160]. Є данні про H<sub>2</sub>S-опосередкований захист клітин, який пов'язаний з балансом між відновним і окисненим глутатіоном (GSH /GSSG) [163, 164].

Введення L-цистеїну на фоні інгібування цистатіонін- $\gamma$ -ліази перед ішемією-реперфузією запускає каскад захисних механізмів, в якому можуть брати участь оксид азоту, глутатіон і сірководень, синтезований 3MST.

## РОЗДІЛ 2.

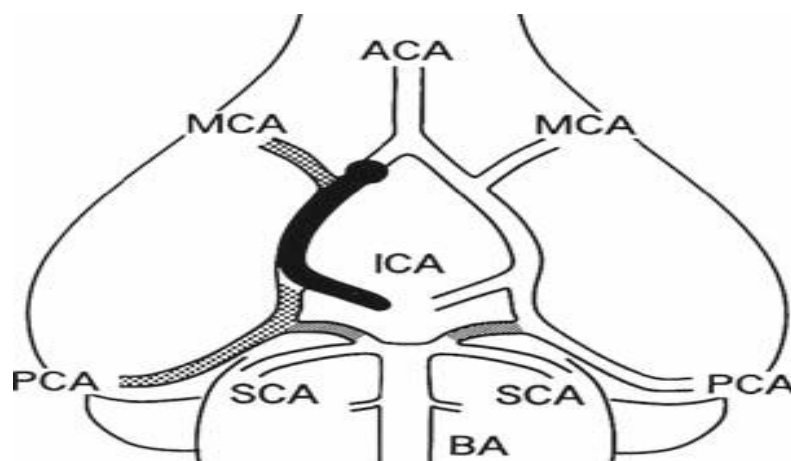
### МОДЕЛЬ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Модель фокальної церебральної ішемії-реперфузії

Приблизно 30-40% ІІ зумовлені атеросклеротичним та емболічними ураженням магістральних артерій голови [128,165,166,167]. Значна частина пацієнтів мають не одну, а декілька причин емболії. Крім артеріо-артеріальних емболій приблизно у 23-25% випадках ІІ зумовлені кардіогенною емболією, яка часто виникає при миготливій аритмії, ендокардиті, пороках серця, дилатаційній кардіоміопатії та інфаркті міокарда. Ішемічний інсульт може локалізуватися в різних відділах головного мозку, але у 86% випадків він розвивається в басейні внутрішньої сонної артерії, найчастіше (близько 50%) - у басейні середньої мозкової артерії [21]. Це обумовлено тим, що внутрішні сонні артерії особливо часто вражаються атеросклеротичним процесом у місцях їх поділу (наприклад біфуркація сонної артерії), звивистості (сифон сонної артерії) та злиття [168].

На сьогодні запропонована велика кількість моделей ішемії головного мозку, які умовно можна поділити на: моделі глобальної і фокальної церебральної ішемії (ФЦІ); постійні та тимчасові (реперфузійні) оклюзії. Оскільки ІІ є локальним ураженням тканин головного мозку і, як вже зазначено вище, великий відсоток випадків виникає внаслідок оклюзії середньої мозкової артерії (СМА) або однієї з її гілок, саме модель ФЦІ басейна СМА була обрана для дослідження – МСАО (від англійського – middle cerebral artery occlusion) [169,170]. Моделі МСАО широко використовуються через патогенетичну подібність до тромбоемболічного інсульту людини [171,172,173,174].

У дослідженні була використана модель інтралюмінальної оклюзії середньої мозкової артерії у щурів, в якій застосовували виключення екстракраніальних колатералей сонної артерії та оклюзію СМА (рис. 2.1) монофіламентним оклюдером 4/0 (Dossolcorp., US) з силіконовим покриттям довжиною 5-6 мм, діаметром дистального кінця 0,38 мм, довжиною 3 см та позначкою на відстані 18-20 мм від дистального кінця (фото. 1).



**Рис. 2.1.** Схема розташування оклюдера у просвіті внутрішньої сонної артерії [за Smrcka MI 2001, Traystman RJ 2003] ICA – внутрішня сонна артерія; ACA – передня мозкова артерія, MCA – середня мозкова артерія, PCA – задня мозкова артерія, SCA – верхня мозочкова артерія, BA – основна артерія

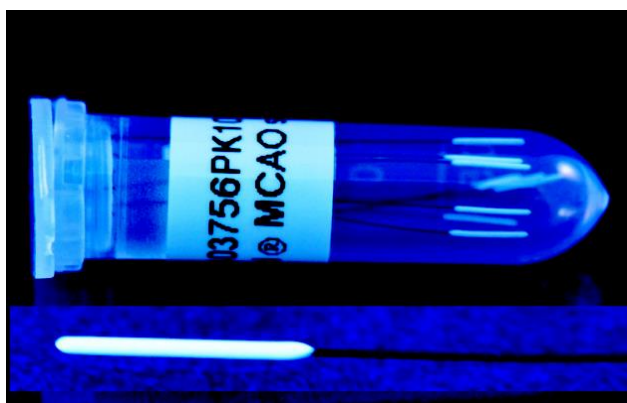


Фото. 1. Монофіламентний оклюдер 4/0 (Doccolcorp., USA)

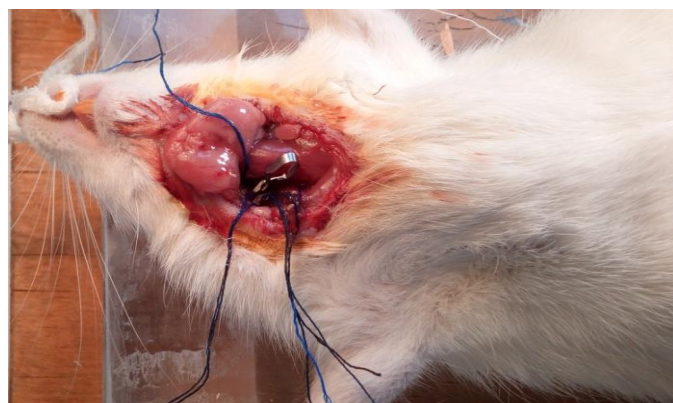


Фото. 2. Вигляд операційного поля при моделюванні MCAO

Дослідження проводили на щурах лінії Вістар масою 280-320 г, згідно з вимогами Європейської конвенції із захисту хребетних тварин (Страсбург, 1986). Моделювання фокальної ішемії-реперфузії головного мозку проводили оперативним шляхом під наркозом (внутрішньоочеревинно). Для введного наркозу вводили розчин кетаміну з розрахунку 150 мг/кг маси тіла тварини, підтримуюча доза 50-75 мг/кг маси тіла тварини по потребі.

Оперативне втручання відбувалося на операційному столику, тварина знаходилася у положенні на спині. Передня поверхні шийі голилася та оброблялася розчинами антисептиків - бетадином, 70 % етиловим спиртом та

асептично обкладалася серветками. По середній лінії, від під'язикової кістки до яремної вирізки груднини, проводився лінійний розріз довжиною 3-4 см. По обидва боки від розрізу шкіру відсепаровували та розводили за допомогою хірургічних затискачів – «маскітів». Вилочкову та щитоподібну залози виділяли єдиним блоком та відводили вгору. Грудинно-ключично-соскоподібний та двочеревцевий м'язи розводилися в сторони, а лопатково-під'язиковий м'яз пересікався (фото.2). Виділяли праву загальну (ЗСА), зовнішню (ЗоСА) та внутрішню сонну (ВСА) артерії (фото.3).



Фото.3. Біфуркація правої загальної сонної артерії під час операції  
 CCA – загальна сонна артерія; ICA – внутрішня сонна артерія;  
 ECA – зовнішня сонна артерія

За допомогою лігатур блукаючий нерв відділяли від судин та відводили. Виділяли, перев'язували та пересікали потиличну гілку ЗоСА, верхню щитоподібну та висхідну глоткову артерії. Накладали лікатуру та перевязували ЗСА на відстані 1-2 мм від біфуркації. При дисекції у ділянці петлі язикоглоткового нерва ідентифікували та виділяли крилопіднебінну артерію, яка відходить від ВСА, її перев'язували та пересікали. Накладали мікросудинні тимчасові кліпси на ВСА. Перев'язували та на відстані 1 мм вище від біфуркації пересікали ЗоСА.

В просвіт 3оСА вводили монофіламентний оклюдер 4/0 (Dorcolcorp., USA), якій через біфуркацію 3СА потропляв в ВСА. Оклюдер вводився до позначки на відстані 18-20 мм від дистального кінця, нанесеною за допомогою перманентного срібного маркера, до відчуття легкого опору (що свідчило про його потрапляння у просвіт передньої мозкової артерії та блокування СМА). При цьому мікросудинна кліпси на ВСА тимчасово знімалася. Після введення оклюдера у ВСА до позначки, на куксі 3оСА накладалась лігатура та щільно затягувалась, фіксуючи монофіламент у просвіті судини. Ішемія здійснювали протягом 60 хв., потім оклюдер видаляли і починалась реперфузія. Рану зашивали пошарово нитками Vicryl 4/0 (Ethicon, US). Шви на шкірі оброблялися антисептиками. Оперативне моделювання МСАО тривало протягом 50-60 хв.

Після пробудження тварин перевіряли наявність фокального ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку. Для цього щура утримували за хвіст на відстані 1-2 см від поверхні. В нормі щури симетрично витягують обидві кінцівки в напрямку до підлоги. При наявності фокального ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку визначається тонічна флексія контралатеральної передньої лапи. Тварин, у яких цей феномен не спостерігався, в дослідження не брали. Для виключення геморагічних ускладнень операції, пошкодження та розриву судин, після закінчення дослідження проводили краніотомію і макроскопічну оцінку стану ГМ та судин.

## **2.2. Дослідження показників кардіодинаміки щурів з фокальною церебральною ішемією-реперфузією**

Для оцінки кардіодинаміки у щурів під час операції до моделювання фокальної ішемії (контроль) ГМ, після ішемії, та після реперфузії вивчалися наступні показники систолічної функції:

- ударний об'єм (УО),
- хвилинний об'єм крові (ХОК),
- фракція викиду (ФВ),
- кінцево-сistolічний тиск (КСТ),

- кінцево-сistolічний об'єм лівого шлуночка (КСО),
- максимальна швидкість наростання тиску ( $dP/dt_{\max}$ )
- частота серцевих скорочень (ЧСС);

та показники діастолічної функції серця:

- кінцево-діастолічний об'єм лівого шлуночка (КДО),
- максимальна швидкість падіння тиску ( $dP/dt_{\min}$ ),
- кінцево-діастолічна жорсткість міокарда ( $ЖМ_{\text{кд}}$ ),
- константа активного розслаблення ( $\text{Tau}$ ),
- максимальна швидкість зниження тиску.

**Показники кардіодинаміки** реєстрували за допомогою ультрамікрокатетера 2F з датчиком тиску на кінці (Millar Instruments, Houston, TX), який через праву сонну артерію ретроградно вводили у ЛШ серця. Реєстрували сигнали тиску і об'єму ЛШ з візуалізацією кривих залежності цих величин протягом серцевого циклу за допомогою Millar Pressure-Volume System. Співвідношення тиску і об'єму лівого шлуночка аналізували за допомогою програми PVAN 3.6 (Millar Instruments) з конвертацією відносних одиниць об'єму (RVU) в абсолютні одиниці об'єму (мкл) за допомогою формули ( $\text{slope } 20,25 * \text{RVU} - \text{intercept } 29,05$ ). Для цього катетер калібрували за об'ємом шляхом занурення катетера у калібрувальну кювету, яка складає ряд циліндричних отворів відомого діаметру та об'єму, наповнених стабілізованою гепарином кров'ю щура [175,176].

Після 20 хвилин встановлення рівноваги, починали реєстрацію показників кардіогемодинаміки:

- у вихідному стані, як контрольні показники;
- після введення монофіламентного оклюдера 4/0 (Doccolcorp., USA) та його потрапляння у просвіт передньої мозкової артерії та блокування СМА, на 1-й, 10-й, 30-й та 60-й хвилинах моделювання фокальної ішемії ГМ;
- після видалення монофіламентного оклюдера 4/0 (Doccolcorp., USA) з просвіту передньої мозкової артерії і початку реперфузії ГМ, на 10-й, 30-й хвилинах та через 24 години.

В дослідженнях була група тварин – «шам», яким проводилось оперативне втручання та реєстрували показники кардіодинаміки, но не проводили оклюзію СМА. Ці тварини не перебували в умовах фокальної ішемії-реперфузії ГМ.

За концепцією Suga [177,178,179,180], лівий шлуночок (ЛШ) серця, можна розглядати як модель, що характеризується змінною у часі жорсткістю. Протягом серцевого циклу ЛШ розвиває відповідний об'єму тиск, що описується кривими залежності тиску і об'єму. Еластичні властивості ЛШ, в кожній точці серцевого циклу, можна оцінити за допомогою показника жорсткості міокарда (ЖМ), яка зростає при переході серця із діастолічної фази у систолічну.

### **2.3. Метод виділення фракції мітохондрій із серця щурів**

Виділення фракції мітохондрій із серця щурів здійснювалося за методом диференційного центрифугування [181]. Видаляли серце та промивали охолодженим 0,9% розчином KCl. Далі ножицями тканину подрібнювали та гомогенізували у середовищі виділення в співвідношенні 1:9, що містило (ммоль/л): ЕДТА – 1, сахарозу – 250, тріс-HCl – 25, pH 7,4. Гомогенат центрифугували при 700 g протягом 8 хв (4°C) для осадження ядер і грубої клітинної фракції. Для осадження мітохондрій отриманий супернатант центрифугували при 11000 g протягом 15 хв (4°C). Отриманий мітохондріальний осад ресуспендували в середовищі виділення, що містив (мМ): сахароза – 250, тріс – HCl – 25 (pH 7,2 при 23 °C) та одразу використовували в експеримент. Вміст білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі [182].

### **2.4. Методики досліджень біохімічних змін в міокарді**

#### **2.4.1. Методики дослідження оксидативного стресу**

*Визначення швидкості утворення  $O_2^{\bullet-}$ .* Швидкість утворення супероксиду визначали за окисненням цитохрому С [183,184,185]. Глутатіон, клітинні редуктази, аскорбінова кислота здатні відновлювати цитохром С, який може бути реокислен цитохром С-оксидазою та пероксидазою. Враховуючи вище



вказане для підвищення специфічності вимірювання супероксиду, цитохром С частково ацетилювали, що зменшувало швидкість його відновлення мітохондріальними і мікросомальними редуктазами і швидкість окиснення цитохром С-оксидазою, при цьому здатність цитохрому С відновлюватись супероксидом зберігалась. Відновлення цитохрому С реєстрували спектрофотометрично за ростом поглинання при довжині хвилі 550 нм.

*Визначення вмісту  $H_2O_2$ .* Вміст  $H_2O_2$  визначали лактопероксидазним методом [186]. У кварцеву кювету (1 см), в якій було 2 мл 0,1 М розчину KJ (ч.д.а.), надлишку лактопероксидази (50 нМ) (“Sigma”, США) в 0,05М фосфатному буфері рН =7,33 додавали безбілкові аліквоти гомогенатів та плазми крові (100-250 мкг білку). Вимірювали швидкі зміни екстинції проб при 353 нм. Кількість  $H_2O_2$  виражали в пмоль на мг білку проби, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції  $\epsilon = 26000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [187].

*Визначення швидкості утворення  $\cdot\text{OH}$ -радикалу.* Визначали методом окиснення дезоксирибози [188]. До аліквот проб додавали суміш, у загальному об’ємі 0,6 мл, яка містить 20 мМ дезоксирибози (ч.д.а.), 1мМ  $H_2O_2$  (“Sigma”, США), 20 мМ фосфату калію і 20 нг цинку. Інкубували протягом 1 год при температурі 37°C. Після чого додавали 0,5 мл 1 % розчину тіобірбітуратової кислоти (ч.д.а.) з 50 мМ NaOH (ч.д.а.) і 0,5 мл 2,8 % розчину трихлороцтової кислоти (ч.д.а.). Отриману суміш протягом 20 хв. нагрівали при 100°C. Швидкість утворення  $\cdot\text{OH}$ -радикалу визначали за ростом поглинання при довжині хвилі 532 нм [189].

*Визначення вмісту сечової кислоти.* Вміст сечової кислоти визначали за допомогою добірки реактивів фірми «Філіст-Діагностика» (м. Дніпро, Україна), в аліквотах проб колориметричним методом. До аліквот додавали розчин карбонату натрію та фосфорновольфрамowego реактиву зі стандартного набору. Визначали величину екстинції при 650 нм після інкубації суміші 30 хв. при кімнатній температурі. Кількість сечової кислоти в пробах розраховували за екстинцією стандартного розчину сечової кислоти.

*Визначення вмісту тромбоксану B2 та лейкотрієну C4.* Вміст ейкозаноїдів – LTC<sub>4</sub> та TxB<sub>2</sub> визначали в спиртових екстрактах гомогенатів мітохондрій серця радіоімунним методом, користуючись стандартними добірками реактивів фірми «Amersham», Англія. Спиртові екстракти висушували при 40°C у повітряному термостаті та зберігали при -20°C. Радіоактивність проб визначали на лічильнику фірми «Beckman», Німеччина.

*Визначення вмісту дієнових кон'югатів (ДК).* Вміст ДК визначали спектрофотометрично за поглинанням при  $\lambda$ –232 нм гептанових екстрактів проб [190].

*Визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА).* Вміст МДА визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [191]. До аліквот проб додавали 0,5 мл 1 % розчину тіобарбітурової кислоти в 50 мМ NaOH і 0,5 мл 2,8 % розчину трихлороцтової кислоти. Отриману суміш витримували 20 хв. на киплячій водяній бані, охолоджували і визначали величину екстинції при 532 нм.

*Вміст вільного заліза* визначали модифікованим фотометричним методом, використовуючи реактиви фірми «Філісіт-Діагностика» [192].

#### **2.4.2. Методики дослідження нітрозативного стресу**

*Визначення базальної активності ферментів синтезу оксиду азоту de novo.* Визначали базальну активність ферментів de novo синтезу оксиду азоту. Активність кальційзалежних конститутивних (cNOS=eNOS+nNOS) та кальційнезалежної iNOS оцінювали за комбінацією класичного метода [193] та сучасної його модифікації [194], пристосовану до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції - L-цитруліну.

У 10 разів збільшили об'єм субстратної суміші і визначення активності ферменту проводили з мінімальною кількістю кофакторів для наближення активності NO-синтаз, що визначалися, до існуючого (базального) рівня активності. L-аргінін добавляли з надлишком, враховуючи його можливу утилізацію в аргіназній реакції. Активність ферментів виражали в пікомолях новоутвореного L-цитруліну за 1 хв. в розрахунку на 1 мг загального білка в

пробі. Вміст цитруліну вимірювали високочутливим колориметричним методом [195].

*Визначення активності сумарної NO-синтази (cNOS+iNOS).* Аліквоти проб, в яких було 500-1000 мкг білка, інкубували протягом 60 хв. при 37°C в загальному об'ємі 1 мл субстратної суміші (мкмоль/мл):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (ч.д.а.) – 50,  $\text{CaCl}_2$ (ч.д.а.) – 2,  $\text{MgCl}_2$ (ч.д.а.) – 1, НАДФН (“Sigma”, США) -1, L-аргінін (ч.д.а.) -2, рН 7,0. Додаючи 0,3 мл 2 N  $\text{HClO}_4$ . (ч.д.а.) реакцію зупиняли. Для контролю використовувала проби, що містили повну субстратну суміш і попередньо денатурований 2 N  $\text{HClO}_4$  білок. Суміш центрифугували при 3500 об./хв протягом 10 хв і в надосадковій безбілковій суміші, спектрофотометричним методом за кольоровою реакцією з антипірином, визначали вміст L-цитруліну. Цей метод має високу чутливість – 0,2 мкг L-цитруліну у 1 мл, завдяки чому може використовуватися для дослідження активності NO-синтаз.

*Визначення активності iNOS.* Методика майже аналогічна попередній. Відмінність полягає в тому, що в інкубаційну суміш замість  $\text{CaCl}_2$  добавляли 2 мкмоль ЕДТА.

*Розрахунок активності cNOS.* Віднімаючи від сумарної активності NOS активність iNOS отримували сумарну активність cNOS (eNOS+nNOS).

*Визначення нітратредуктазної активності.* Активність НАДН-залежної нітратредуктази, що характеризує інтенсивність неокисного реутилізаційного синтезу NO, визначали за зменшенням вмісту нітрат-аніона в інкубаційному середовищі [196].

*Визначення вмісту  $\text{NO}_2^-$ .* Мітохондріальні пули нітрит-аніону ( $\text{NO}_2^-$ ) визначали в безбілкових аліквотах проб в колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна в модифікації. Реактив Гріса готували безпосередньо перед визначенням, змішуючи рівні частини 0,1 % водного розчину нафтилетилендіаміндігیدрохлориду (“Sigma”, США) з 1 % розчином сульфаніламіну (“Sigma”, США) в 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (ч.д.а.). Кількість  $\text{NO}_2^-$  визначали за допомогою калібрувальної кривої, побудованої з використанням  $\text{NaNO}_2$  (х.ч.).

*Визначення вмісту  $\text{NO}_3^-$ .* Мітохондріальний пул нітрат-аніону ( $\text{NO}_3^-$ ) визначали бруциновим методом [197]. При  $100^\circ\text{C}$  протягом 10 хв. аліквоти проби інкубували, після чого охолоджували і визначали величину екстинції при 405 нм. Бруциновий реактив готували шляхом розчинення 60 мг бруцину (“Sigma”, США) у 100 мл 50 % сірчаної кислоти (х.ч.). Кількість  $\text{NO}_3^-$  визначали за допомогою калібрувальної кривої, побудованої з використанням  $\text{NaNO}_3$  (х.ч.).

*Визначення вмісту нітрозотіолів.* Вміст високо- і низькомолекулярних нітрозотіолів визначали за методом Saville, суть якого полягає у визначенні вмісту додаткового нітрит-аніону після гідролізу  $\text{S-NO}$  – зв’язку катіонами двовалентної ртуті [198]. Протягом ночі в присутності іонів  $\text{Hg}^{2+}$  (нітрат ртуті, ч.д.а., Україна) здійснювали гідроліз білкових розчинів проб, після чого в гідролізат додавали рівний об’єм 1 N  $\text{HClO}_4$  для осадження білку, витримували на холоді для повного осадження білку, центрифугували, і вже в безбілкових розчинах визначали вміст  $\text{NO}_2^-$  ( $\text{RSNO}$ ). НМНТ розраховували як різницю між вмістом  $\text{NO}_2^-$  в безбілковому розчині після гідролізу і кількістю  $\text{NO}_2^-$  в безбілковому розчині без гідролізу.

*Визначення активності аргінази.* Аргіназну активність визначали стандартним методом за утворенням карбаміду в інкубаційній суміші, що містила L-аргінін і аліквоти проб в тріс- $\text{HCl}$  (фірма “Calbiochem”) буфері ( $\text{pH}=8,0$ ) [199]. Інкубацію проводили при  $37^\circ\text{C}$  протягом 60 хв., додаючи 0,3 мл 2N  $\text{HClO}_4$  реакцію зупиняли. Осад видаляли центрифугуванням і в надосадковій визначали вміст сечовини.

## **2.5. Дослідження впливу L-цистеїну та пропаргілгліцину на кардіогемодинаміку при фокальній ішемії-реперфузії ГМ**

Моделювання фокальної ішемії-реперфузії головного мозку проводили оперативним шляхом під наркозом (внутрішньоочеревинно) використовуючи модель МСАО.

Пропаргілгліцин вводили внутрішньоочеревинно в концентрації 11,31 мг/кг в 1мл 0,9 %  $\text{NaCl}$ , через 10 хв. вводили L-цистеїн

внутрішньоочеревинно в концентрації 112,1 мг/кг в 1мл 0,9 % NaCl. Через 30 хвилин в просвіт ЗоСА вводили монофіламентний оклюдер 4/0 (Doccolcorp., USA), який через біфуркацію ЗСА потропляв в ВСА, і таким чином моделювали оперативним шляхом фокальну ішемію головного мозку. Фокальна ішемія тривала 60 хвилин, після чого оклюдер видаляли – починалася реперфузія. Реєстрація показників кардіодинаміки проводилася за допомогою мікрокатетера 2F (Millar Instruments, Houston, TX) і Millar Pressure-Volume System, який вводили через праву сонну артерію ретроградно у ЛШ.

## **2.6. Методика дослідження маркерів ПОЛ в венозній крові відтікаючий від ГМ та впливу на їх зміни екдистерону**

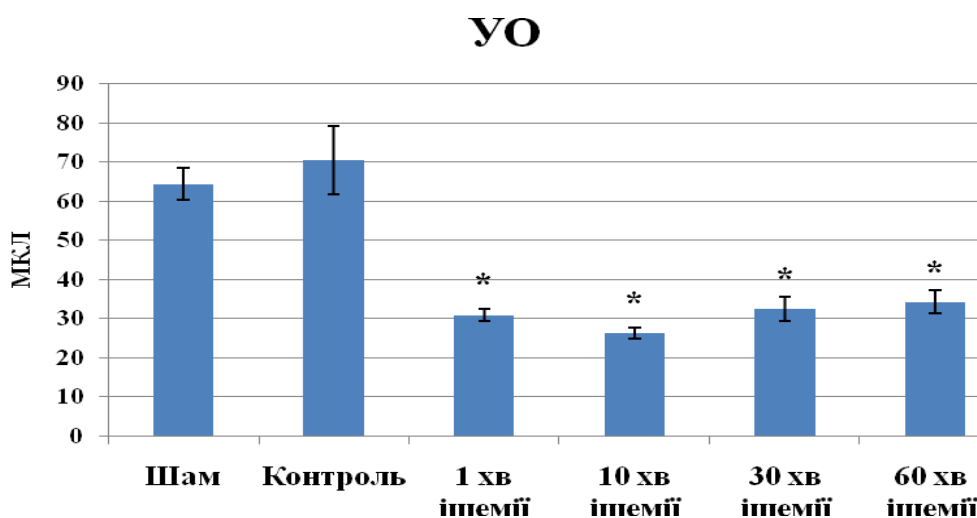
Експерименти проводили на трьох групах щурів лінії Вістар масою 280-320 г, ішемію-репрфузію викликали оклюзією середньої мозкової артерії, як описано раніше. Першу групу складали інтактні тварини, у яких визначали лише контрольні показники кислотного гемолізу (0 точка, перфузійний контроль до початку ішемії). До другої групи входили тварини, які утримувались в стандартних умовах і яким моделювалась фокальна ішемія-реперфузія ГМ. До третьої групи входили тварини, які отримували екдистерон протягом 18 діб по 1мг/кг маси тіла на добу з питною водою у вигляді стандартизованого екстракту рослини *Serratula coronata* (препарат «Біоспон» виробництва І-ту біохімії ім. О.В.Палладіна АН України), після чого їм оперативним втручанням моделювалась фокальна ішемія-реперфузія ГМ. У тварин другої і третьої груп із яремної вени в динаміці ішемії (через 15, 30, 45 і 60 хв), а також через 5 хв і 24 год реперфузії відбирали по 0,1 мл відтікаючої від ГМ крові для визначення біохімічних показників і проведення кислотного гемолізу. Пули ДК і LTC<sub>4</sub> визначали у плазмі відтікаючої від ГМ венозної крові, як описано раніше. Кислотний гемоліз еритроцитів венозної крові проводили 0,004н HCl за методом Терскова і Гіттельзона [200]. Загальний білок в крові визначали методом Лоурі [182].

### РОЗДІЛ 3

## ЗМІНИ В ФУНКЦІОНАЛЬНОМУ СТАНІ СЕРЦЯ ЩУРІВ ПРИ ФОКАЛЬНІЙ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

### 3.1. Показники насосної та скоротливої функції серця при фокальній ішемії-реперфузії головного мозку

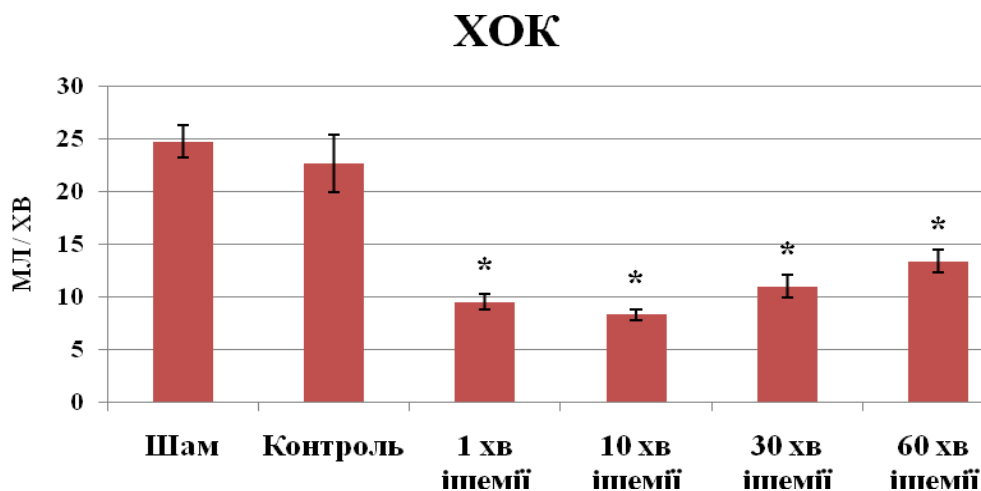
Під час фокальній ішемії головного мозку відбувалось порушення насосної функції серця. Так ударний об'єм (рис.3.1 та табл.1) вже на 1 хвилині ішемії зменшився на 55,9 % ( $p<0,05$ ), на 10-ту, 30-ту і 60-ту хвилини – на 62,6 %, 53,8 % і 51,6 % відповідно.



**Рис.3.1.** Зміни ударного об'єму серця при фокальній ішемії-реперфузії ГМ.

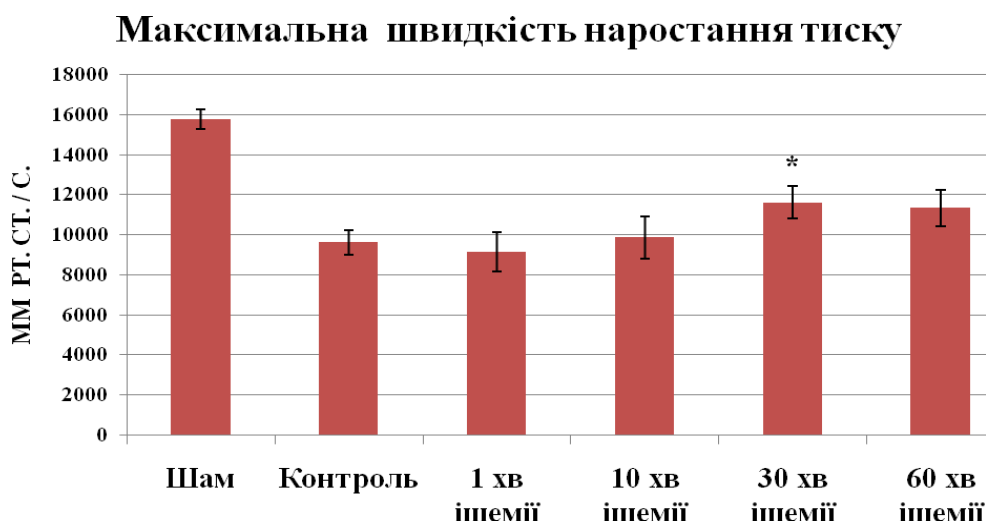
\*  $P<0,05$  відносно контролю

Хвилинний об'єм крові на 1 хвилині ішемії зменшився на 58,6 % ( $p<0,05$ ), на 10-ту, 30-ту і 60-ту хвилини – на 63,3 %, 51,4 % і 41 % відповідно (рис.3.2 та табл.1). Це може свідчити про зниження насосної функції серця.



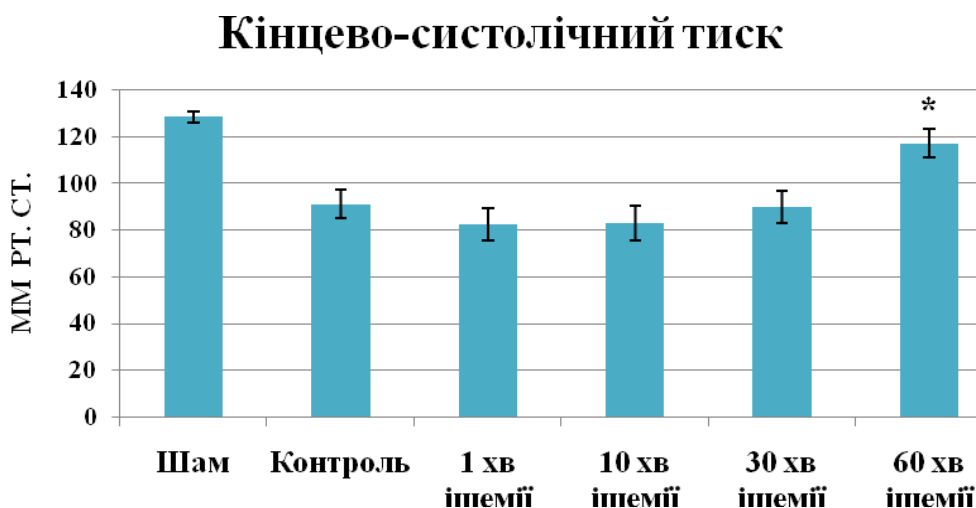
**Рис.3.2.** Зміни хвилинного об'єму крові серця при фокальній ішемії-реперфузії ГМ. \*  $P < 0,05$  відносно контролю

При дослідженні показників скоротливої активності міокарда, виявлено що максимальна швидкість наростання тиску ЛШ ( $dP/dt \max$ ) на 1-й та 10-й хвилинах ішемії головного мозку вірогідно не змінювалася, проте на 30-й хвилині – збільшилася на 20,8 % ( $p < 0,05$ ), на 60-й – на 17,8 %. (рис.3.3 та табл.1).



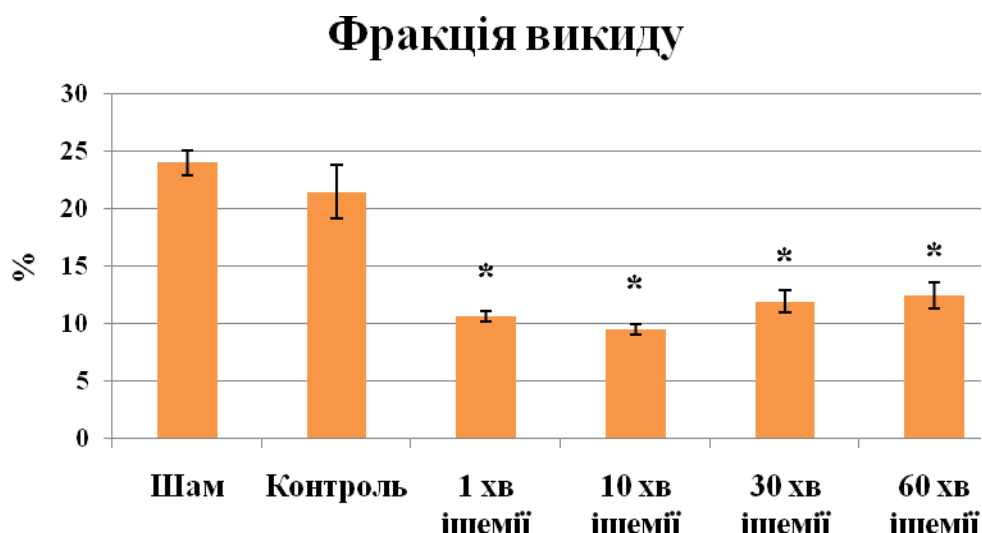
**Рис.3.3.** Зміни максимальної швидкості наростання тиску ЛШ серця при фокальній ішемії-реперфузії ГМ. \*  $P < 0,05$  відносно контролю

Кінцево-сistolічний тиск на 1-й хвилині ішемії головного мозку зменшився на 9,5 %, на 10-й – на 9 %, а на 60-й збільшився на 28,5 % ( $p < 0,05$ ) (рис.3.4 та табл.1).



**Рис.3.4.** Зміни кінцево-сistolічного тиску ЛШ серця при фокальній ішемії-реперфузії ГМ. \*  $P < 0,05$  відносно контролю

Водночас, фракція викиду вірогідно зменшувалась на 1-ій хвилині і становила  $10,6 \pm 0,44$  %, на 10-й –  $9,5 \pm 0,47$  %, на 60-й –  $12,4 \pm 0,86$  % ( $p < 0,05$ ), порівняно з  $21,5 \pm 2,35$  % у контролі. Що вказує на зниження скоротливої активності міокарда (рис.3.5 та табл.1).



**Рис.3.5.** Зміни фракції викиду серця при фокальній ішемії-реперфузії ГМ.

\*  $P < 0,05$  відносно контролю

За умов ішемії головного мозку також відбувалось збільшення ЧСС (табл.1). На 10-й хвилині ЧСС збільшилася на 6,8 %, на 30-й – на 7,5 %, на 60-й – на 21,1 %, що може свідчити про намагання організму компенсувати недостатній



УО. Збільшення показників скоротливої активності міокарда та ЧСС ймовірно відбувалось за рахунок активації симпато-адреналової системи, що може бути пов'язано з компенсаторною реакцією організму на значне зниження УО підчас ішемії головного мозку [201].

Таблиця 1.

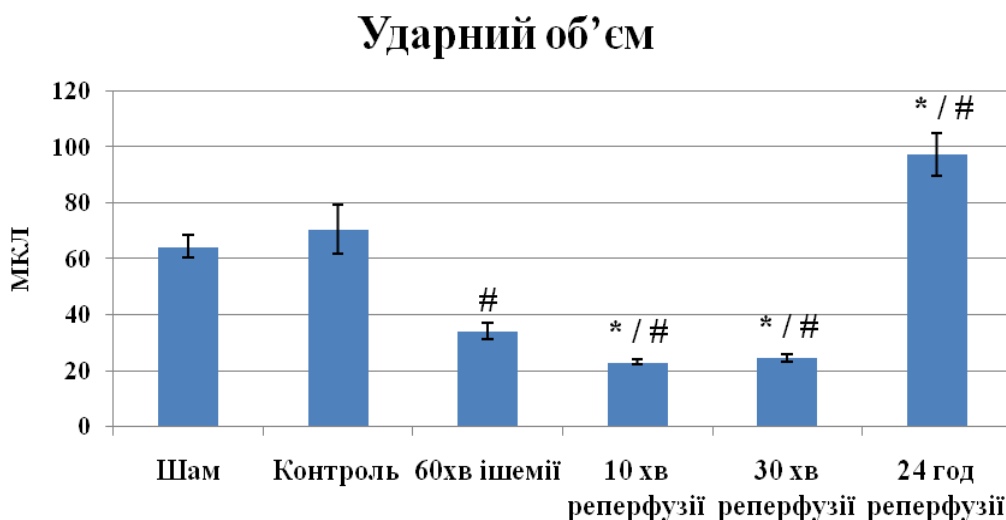
**Показники систолічної функції серця при фокальній ішемії головного мозку**

Показники	Контроль	Ішемія головного мозку			
		1 хв	10 хв	30 хв	60 хв
Кінцево-систолический тиск, мм рт.ст.	91,2±6,1	82,5±7,12	83±7,41	90±6,76	117,2±5,99*
Кінцево-систолический об'єм, мкл	234,8±6,37	259,4±3,11	251,2±3,15	233,4±4,9	241,7±4,27
Кінцево-діастолічний об'єм, мкл	305,3±5,64	290,5±3,77	277,6±3,26	267,6±6,04	275,8±2,8
Ударний об'єм, мкл	70,5±8,71	31,07±1,52*	26,4±1,35*	32,61±3,15*	34,1±2,98*
Фракція викиду, %	21,5±2,35	10,6±0,44*	9,5±0,47*	11,9±0,97*	12,44±1,13*
Хвилинний об'єм крові, мл/хв	22,7±2,72	9,5±0,73*	8,3±0,53*	11±1,05*	13,4±1,04*
dP/dt max, мм рт.ст./с	9624±607,7	9158±967,6	9864±1031,5	11629±813,7*	11341±928,8
Частота серцевих скорочен, хв <sup>-1</sup>	331,6±7,75	308,9±12,33	331±17,29	356,7±9,89	401,5±10,26*

\*P<0,05 відносно значень у контролі.

Під час ранньої реперфузії головного мозку виявлено значні порушення показників систолічної функції серця, які порівнювали з зареєстрованими на останній (60-й хвилині) ішемії головного мозку, перед початком реперфузії.

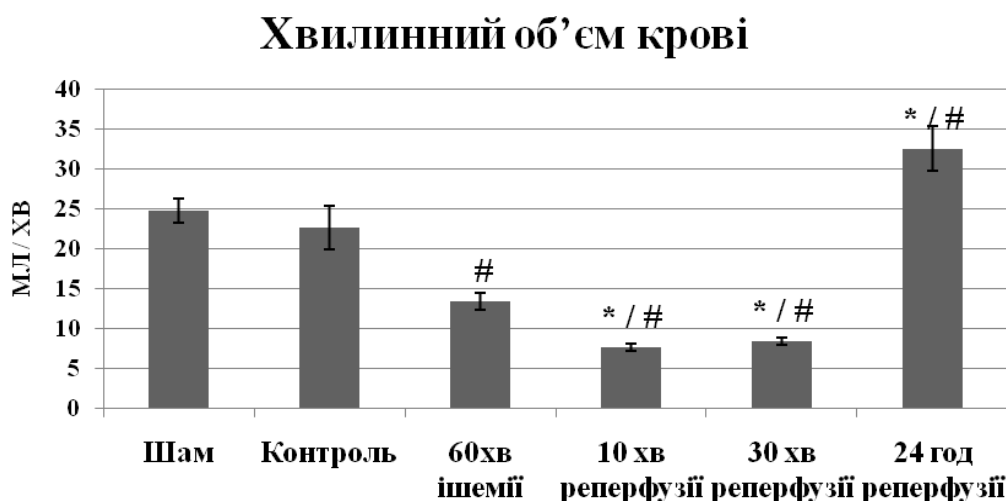
Ударний об'єм на 10-й хвилині реперфузії знизився на 32,6 %, на 30-й хвилині на 27,9 % (p<0,05) (рис.3.6 та табл.2).



**Рис.3.6.** Зміни ударного об'єму серця при фокальній ішемії-реперфузії ГМ.

\* $P < 0,05$  відносно ішемії; # $P < 0,05$  відносно контролю

ХОК знизився на 10-й хвилині – на 43,3 %, на 30-й – на 37,3 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з показником при ішемії головного мозку (рис.3.7 та табл.2).

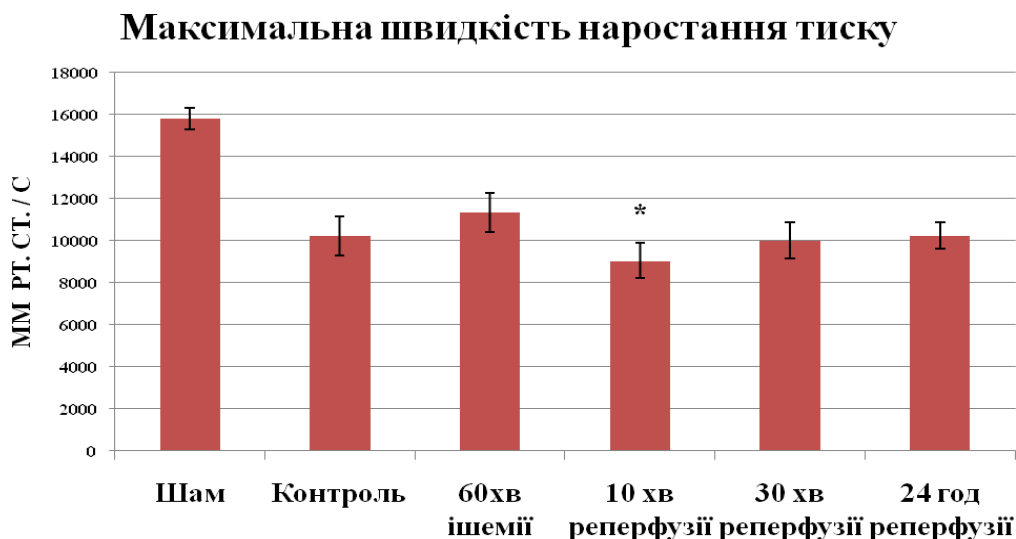


**Рис.3.7.** Зміни ударного об'єму серця при фокальній ішемії-реперфузії ГМ.

\* $P < 0,05$  відносно ішемії; # $P < 0,05$  відносно контролю

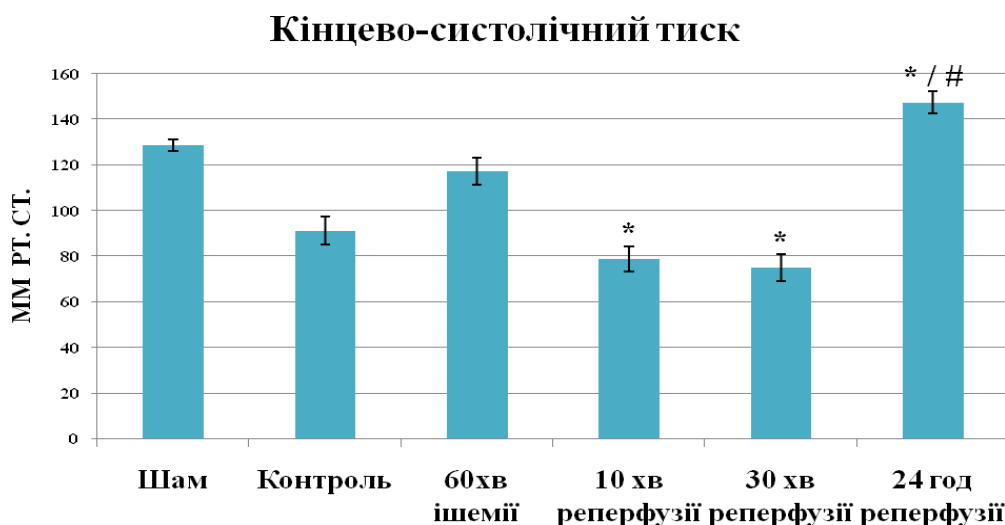
Під час реперфузії головного мозку ЧСС зменшувалася на 10-й хвилині – на 13,4 %, на 30-й хвилині – на 7 %. (табл.2).

При дослідженні показників скоротливої активності міокарда виявлено, що максимальна швидкість наростання тиску ( $dP/dt \max$ ) на 10-й хвилині реперфузії зменшилася на 25,4 %, на 30-й – на 11,7 % ( $p < 0,05$ ) (рис.3.8 та табл.2).



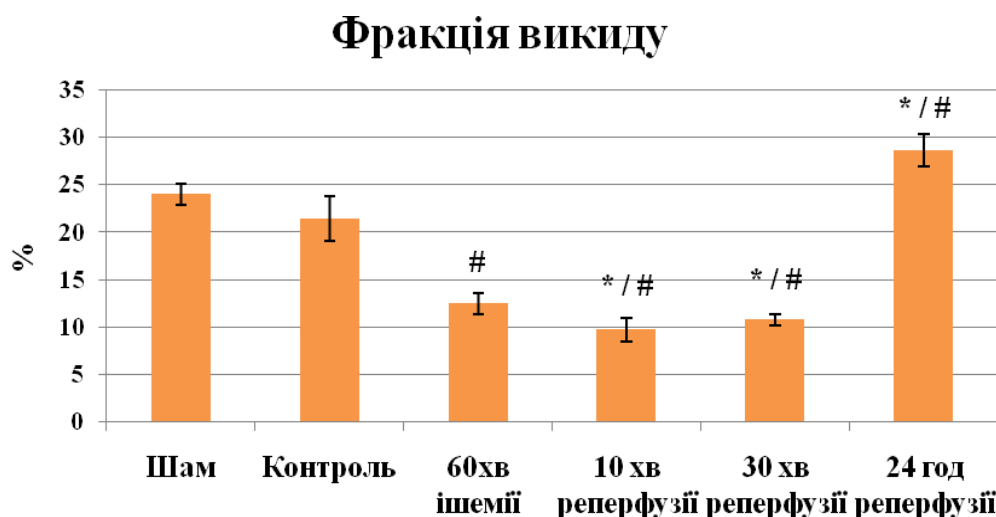
**Рис.3.8.** Зміни максимальної швидкості наростання тиску при фокальній ішемії-реперфузії ГМ. \* $P < 0,05$  відносно ішемії; # $P < 0,05$  відносно контролю

Кінцево-сistolічний тиск знизився на 32,7 % – на 10-й хвилині, на 36,1 % – на 30-й і становив  $74,9 \pm 6,02$  мм рт.ст. (рис.3.9 та табл.2).



**Рис.3.9.** Зміни кінцево-сistolічного тиску лівого шлуночка при фокальній ішемії-реперфузії ГМ. \* $P < 0,05$  відносно ішемії; # $P < 0,05$  відносно контролю

Про зниження як насосної, так і скоротливої активності міокарда під час ранньої реперфузії також свідчить зменшення фракції викиду (рис.3.10 та табл.2.).



**Рис.3.10.** Зміни фракції викиду лівого шлуночка при фокальній ішемії-реперфузії ГМ. \* $P < 0,05$  відносно ішемії; # $P < 0,05$  відносно контролю

Слід зауважити, що довготривала 24 годинна реперфузія ГМ сприяла відновленню функціональних показників серця після ішемії і ранньої реперфузії. Показники насосної функції серця: ударний об'єм, хвилинний об'єм крові, фракція викиду суттєво збільшувались порівняно з показниками останньої (60 хв) ішемії головного мозку. Так, 24-годинна реперфузія збільшувала УО в 2,9 рази порівняно з 60-й хвилинною ішемією і в 1,38 рази порівняно з контролем. ХОК збільшився в 2,4 і 1,4 рази відповідно; фракція викиду була достовірно вищою, ніж під час ішемії головного мозку. Водночас кінцево-сistolічний тиск через 24 години реперфузії збільшився на 25,8 % порівняно з ішемією і залишався на 61,6 % більше від показника контрольної групи. Індекс скоротливості ( $dP/dt \max$ ) достовірно не відрізнявся від контролю (рис.3.6 -3.10 та табл.2).

Таким чином, за рахунок збільшення показників систолічної функції, серце намагалося компенсувати порушення гемодинаміки, які відбулися під час ішемії та ранньої реперфузії головного мозку [202].

Таблиця 2.

**Показники систолічної функції серця при фокальній ішемії-реперфузії  
головного мозку**

Показники	Контроль (вихідні значення)	Ішемія (60хв)	Реперфузія		
			10 хв	30 хв	24 год
Кінцево-сistolічний тиск, мм рт.ст.	91,2±6,1	117,2±6	78,9±5,44*	74,9±6,02*	147,4±4,87***
Кінцево-сistolічний об'єм, мкл	234,8±6,37	241,7±4,27	214±5,96*	203±6,05*	232,9±10,23
Кінцево-діастолічний об'єм, мкл	305,3±5,64	275,8±2,8	237±6,69*	227,7±6,67*	330,4±13,33**
Ударний об'єм, мкл	70,5±8,71	34,1±2,98**	23±0,91*	24,6±1,5*	97,4±7,73***
Фракція викиду, %	21,5±2,35	12,44±1,13**	9,7±1,19*	10,8±0,57*	28,7±1,67***
Хвилинний об'єм крові, мл/хв	22,7±2,72	13,4±1,04**	7,6±0,46*	8,4±0,47*	32,6±2,77***
Максимальна швидкість наростання тиску, мм рт.ст./с	10222,3 ±938,84	11341,4 ±928,8	9042,7 ±843,82*	10011,1 ±865	10236,3 ±619,28
Частота серцевих скорочень, хв <sup>-1</sup>	331,6±7,75	401,5±10,26**	347,8±11,12*	374,3±10,31	347,2±9,56*

\*P<0,05 відносно ішемії; \*\*P<0,05 відносно контролю.

### **3.2. Показники діастолічної функції серця при фокальній ішемії-реперфузії головного мозку**

На моделі фокальної ішемії-реперфузії головного мозку, при вивченні показників діастолічної функції лівого шлуночка, виявлено порушення функції розслаблення міокарда. Відбувалося збільшенням КДТ: на 1-й хвилині він підвищився на 5,7 %, на 10-й – на 38,7 %, на 30-й – на 62,4 %, на 60-й в 3 рази порівняно з контролем (табл. 3.3).

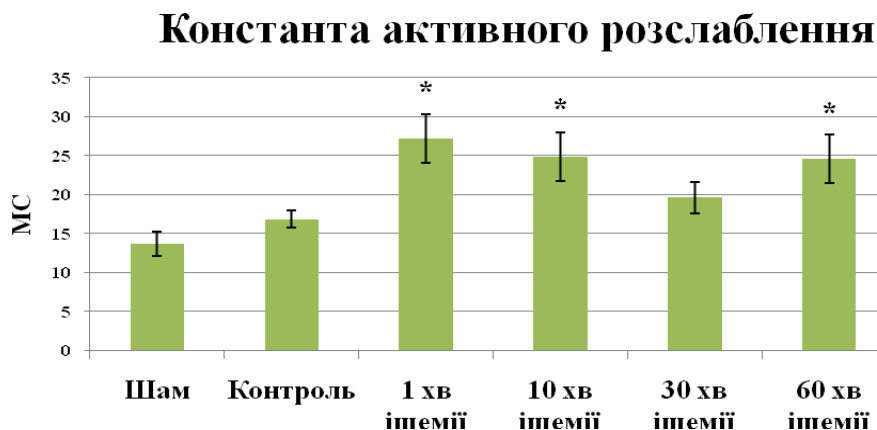
Відмічено суттєве зниження у них максимальної швидкості зниження тиску. Так dP/dtmin на 1-й хвилині ішемії головного мозку знизилась на 22,2 %

( $p<0,05$ ), на 10-й – на 16,2 %, на 30-й – на 21,7 %, на 60-й – на 54,3 % ( $p<0,05$ ) (рис.3.11 та табл.3).



**Рис.3.11.** Зміни максимальної швидкості зниження тиску лівого шлуночка при фокальній ішемії-реперфузії ГМ. \* $P<0,05$  відносно контролю

При цьому збільшилась жорсткість камери ЛШ, яка визначає наповнення шлуночка в період пізньої діастоли. Так, кінцево-діастолічна жорсткість міокарда на 1-ій хвилині ішемії підвищилася у 2 рази, на 10-ій – 2,7 рази, на 60-й – 3,8 рази відносно значення контрольної групи ( $p<0,05$ ). Збільшення кінцево-діастолічної жорсткості міокарда вказує на порушення процесів релаксації ЛШ (табл.3). Водночас виявлено, що константа активного розслаблення у щурів під час ішемії головного мозку була суттєво більша, ніж у контрольній групі (рис.3.12 та табл.3), що також свідчить про порушення процесу релаксації серця.



**Рис.3.12.** Зміни константи активного розслаблення лівого шлуночка при фокальній ішемії ГМ. \* $P < 0,05$  відносно контролю

Зменшення максимальної швидкості зниження тиску при збільшенні КДТ, кінцево-діастолічної жорсткості міокарда та константи активного розслаблення вказує на діастолічну дисфункцію лівого шлуночка і порушення релаксації серця у щурів під час фокальної ішемії головного мозку [201].

*Таблиця 3.*

**Показники діастолічної функції серця при фокальній ішемії головного мозку**

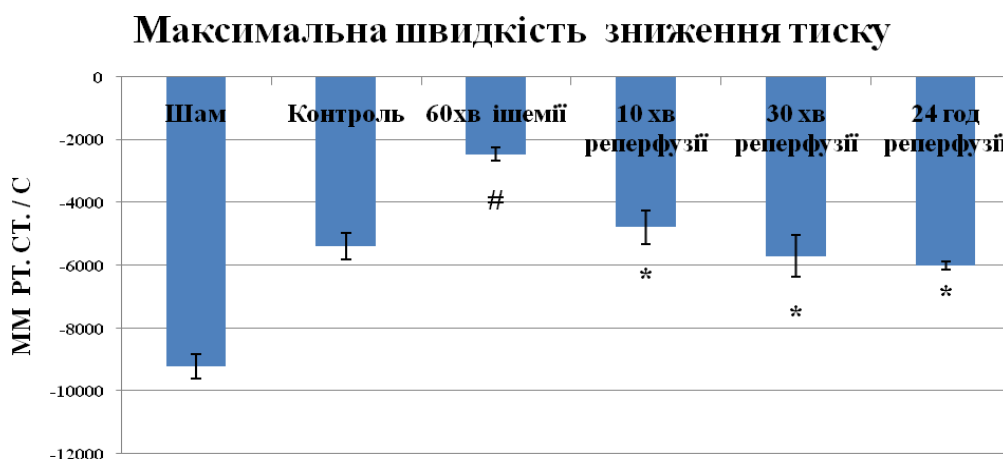
Показники	Контроль	Ішемія головного мозку			
		1 хв	10 хв	30 хв	60 хв
Максимальна швидкість зниження тиску $dP/dt_{min}$ , мм рт.ст./с	-5382±427	-4183±521	-4513±740	-4214±583	-2458±207*
Кінцево-діастолічна жорсткість міокарда, мм рт.ст./мкл	0,129±0,04	0,258±0,026*	0,349±0,05*	0,367±0,055*	0,49±0,06*
Константа активного розслаблення (tau), мс	16,8±1,13	27,2±3,11*	24,8±3,13*	19,6±2,31	24,6±3,12*

\* $P < 0,001$  відносно значень у контролі.

Під час реперфузії головного мозку зниження кінцево-діастолічного тиску мало транзиторний характер, і через 24 год він залишався збільшеним у 2,75 рази

порівняно з контролем. Кінцево-діастолічна жорсткість міокарда у цей час знизилася на 61,2 % відносно показника останньої хвилини ішемії, однак залишалась на 47,2 % більше від контролю (табл.4).

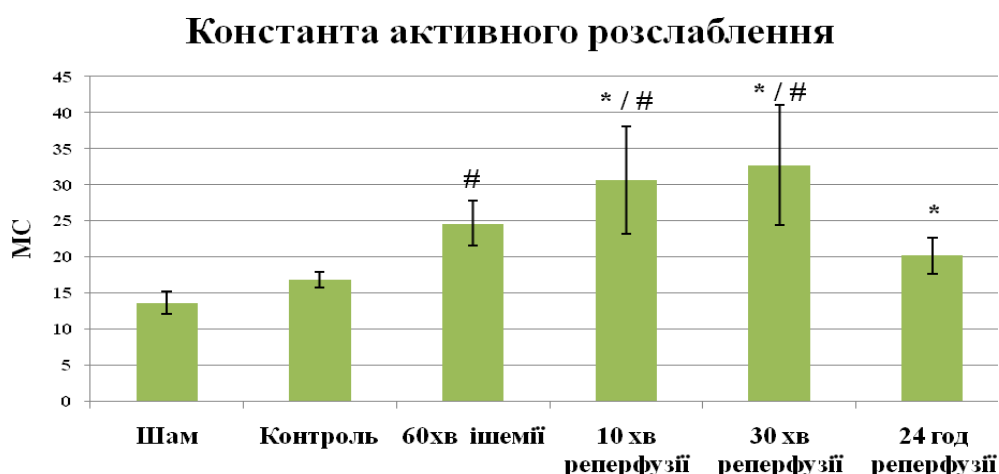
Виявлено що значення  $dP/dt_{min}$  збільшилося в 2,4 раза порівняно з ішемією і достовірно не відрізнялося від контролю (рис.3.13 та табл.4).



**Рис.3.13.** Зміни максимальної швидкості зниження тиску лівого шлуночка при фокальній ішемії-реперфузії ГМ.

\* $P < 0,05$  відносно ішемії; # $P < 0,05$  відносно контролю

Константа активного розслаблення під час ранньої реперфузії збільшилась, в порівнянні і з контролем і з 60-й хвилиною ішемії, а через 24 години від реперфузії зменшилась (рис.3.14 та табл.4).



**Рис.3.14.** Зміни константи активного розслаблення лівого шлуночка при фокальній ішемії-реперфузії ГМ.

\* $P < 0,05$  відносно ішемії; # $P < 0,05$  відносно контролю



Таким чином, через 24 години реперфузії головного мозку відмічалось відновлення насосної функції серця і скоротливої активності міокарда, часткове покращення діастолічної функції серця. Проте кінцево-сistolічний тиск і кінцево-діастолічний тиск, кінцево-діастолічна жорсткість міокарда залишались на високому рівні, як наслідок ішемічно-реперфузійних порушень головного мозку [201].

Таблиця 4.

**Показники діастолічної функції серця при фокальній ішемії-реперфузії  
головного мозку**

Показники	Контроль (вихідні значення)	Ішемія (60 хв)	Реперфузія		
			10 хв	30 хв	24 год
Кінцево-діастолічний тиск, мм рт.ст.	5,27±0,79	15,7±1,36**	6,2±0,91*	5,9±1,26*	14,5±1,96**
Максимальна швидкість зниження тиску, мм рт.ст./с	-5382±427	-2458±207**	-4775±553,6*	-5703,64±670,8*	-5998,3±139,1*
Кінцево-діастолічна жорсткість міокарда, мм рт.ст./мкл	0,129±0,04	0,49±0,06**	0,48±0,04**	0,46±0,075**	0,19±0,033*
Константа активного розслаблення, мс	16,8±1,13	24,6±3,12**	30,6±7,47**	32,7±8,31**	20,13±2,49

\*P<0,05 відносно ішемії, \*\*P<0,05 відносно контролю.

## РОЗДІЛ 4

### ДАНІ ДОСЛІДЖЕНЬ РОЗВИТКУ ОКСИДАТИВНОГО ТА НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСІВ В СЕРЦІ ЩУРІВ ПРИ ФОКАЛЬНІЙ ЦЕРЕБРАЛЬНІЙ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ

#### 4.1. Зміни показників та маркерів оксидативного стресу

При дослідженні розвитку оксидативного стресу в мітохондріях серця щурів в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку, визначалися: швидкість генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  та  $\cdot\text{OH}$ ; вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; інтенсивність ліпоксигеназного (маркер лейкотрієн  $\text{C}_4$  ( $\text{LTC}_4$ ), циклооксигеназного (маркер тромбоксан  $\text{V}_2$  ( $\text{TxB}_2$ )) та ксантиноксидазного (маркер сечова кислота) шляхів генерації  $\cdot\text{O}_2^-$ ; інтенсивність неферментативного вільнорадикального ПОЛ оцінювали за вмістом маркерів цього процесу – дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА), а також за вмістом вільного негемового заліза – активатора утворення в реакції Фентона  $\cdot\text{OH}$ , що є ініціатором ПОЛ.

Після моделювання фокальної ішемії-реперфузії головного мозку в мітохондріях серця щурів, через 24 год., спостерігається значне збільшення генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  і  $\cdot\text{OH}$  та зростання пулів стабільного  $\text{H}_2\text{O}_2$  (табл.5).

При оксидативному стресі важливими шляхами генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  в мітохондріях серця є дихальний ланцюг, та реакції в яких приймають участь ксантиноксидаза, циклооксигеназа, ліпооксигеназа тощо. Під час деградації пуринових нуклеотидів під дією ксантиноксидази одночасно утворюються  $\cdot\text{O}_2^-$  і сечова кислота. Тому визначали вмісту сечової кислоти в мітохондріях серця щурів, як маркера ксантиноксидазного шляху генерації супероксиду. В дослідженнях було виявлено достовірне збільшення рівня сечової кислоти у тварин 2-ї групи порівняно з контролем (табл.5). Як відомо з фосфоліпідного пулу клітинних мембран під дією фосфоліпази  $\text{A}_2$  відщеплюється вільна арахідонова кислота. Циклооксигеназним шляхом вільна арахідонова кислота перетворюється на простагландини та стабільний  $\text{TxB}_2$ , що є маркером

інтенсивності циклооксигеназного шляху, а ліпоксигеназним шляхом – в лейкотрієни, в т.ч. пептидолейкотриєн LTC<sub>4</sub>, що є маркером його інтенсивності. Після фокальної ішемії-реперфузії головного мозку у тварин 2-ї групи рівні TxV2 та LTC<sub>4</sub> в мітохондріях серця достовірно збільшувалися в порівнянні з контрольними тваринами (табл.5).

ДК, МДА, тощо є високотоксичними вторинними кінцевими сполуками, що утворюються при розпаді нестійких гідроперикисив ліпідів в процесі ПОЛ. Вони не лише негативно впливають на мембрани, але й ініціюють мітохондрій-залежний процес апоптозу пошкоджених клітин. Надмірна активація ПОЛ в мітохондріях серця при фокальній ішемії-реперфузії головного мозку може ініціювати набухання мітохондрій з роз'єднанням окисного фосфорилування й інактивацією толових ферментів, що беруть участь у диханні та гліколізі [203,204]. У дослідженнях спостерігається достовірне збільшення рівня ДК та МДА в мітохондріях серця тварин 2-ї групи, після фокальної ішемії-реперфузії головного мозку в порівнянні з тваринами 1-ї групи (табл.5).

При визначенні рівня вільного заліза було встановлено, що у тварин 2-ї групи його рівень в мітохондріях серця на порядок перевищував рівень у тварин 1-ї групи (табл.5). Надмірне збільшення пулу вільного заліза в мітохондріях серця за фокальної ішемії-реперфузії може бути причиною дуже інтенсивного утворення (табл.5)  $\cdot\text{OH}$ , що є ініціатором ПОЛ, в реакції Фентона, так як іони двохвалентного заліза є потужним активатором цієї реакції.

При дослідженні показників оксидативного стресу в гомогенаті тканин серця щурів в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку також виявлено зміни. У тварин після фокальної ішемії-реперфузії головного мозку в тканинах серця спостерігається збільшення генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  і  $\cdot\text{OH}$  та зростання пулів стабільного  $\text{H}_2\text{O}_2$ , збільшувався рівень ДК (табл.5).

**Показники оксидативного стресу в мітохондріях  
та гомогенаті тканин серця щурів при фокальній  
ішемії-реперфузії головного мозку**

Таблиця 5.

Показник	Контроль, n=8 у мітохондріях n=12 у гомогенаті тканин	Ішемія-реперфузія, n=5 у мітохондріях n=8 у гомогенаті тканин
$\cdot\text{O}_2^-$ , у мітохондріях, ум.од	4,61±0,58	15,06±2,11 *
$\cdot\text{O}_2^-$ , у гомогенаті тканин, нмоль/ хв мг білка	0,83± 0,12	1,64 ± 0,21 *
$\cdot\text{OH}$ , у мітохондріях, ум.од	0,42±0,05	2,51±0,79 *
$\cdot\text{OH}$ , у гомогенаті тканин, нмоль/ хв мг білка	1,18 ±0,22	4,25 ± 0,08 *
$\text{H}_2\text{O}_2$ , у мітохондріях, пмоль/мг білка	14,77±1,64	397,32±142,79 *
$\text{H}_2\text{O}_2$ , у гомогенаті тканин, мкмоль/ хвмг білка	2,24 ±0,37	0,51 ± 0,03 *
Сечова кислота, у мітохондріях, нмоль/мг білка	1,17 ± 0,22	18,14 ± 5,56 *
$\text{TxV}_2$ , у мітохондріях, пмоль/мг білка	1,92± 0,65	5,48 ±1,91*
$\text{LTC}_4$ , у мітохондріях, пмоль/мг білка	0,44 ±0,06	2,61±0,89 *
ДК, у мітохондріях, нг/мг білка	2,73± 0,58	27,12 ± 9,51 *
МДА, у мітохондріях, нмоль/мг білка	2,22 ±0,45	10,07 ±3,42 *
МДА, у гомогенаті тканин, нмоль/мг білка	6,34± 1,06	19,96±2,24*
Вільне залізо, у мітохондріях, пмоль/мг білка	50,17 ±7,84	500,78±188,66 *

\* $P < 0,05$  відносно контрольної групи.

#### 4.2. Зміни показників та маркерів нітрозативного стресу

Через 24 години після моделювання фокальної ішемії-реперфузії ГМ (табл.6), у мітохондріях серця щурів відбувається значне збільшення активності iNOS, порівнянно з тваринами контрольної групи. Це вказує на активізацію синтезу газового трансмітера NO із L-аргініну киснезалежним шляхом *de novo*. Активація системи NO призводить до збільшення рівнів АФА та особливо

небезпечного пероксинітриту ( $\text{ONOO}^-$ ), що особливо небезпечно, бо в цих умовах значно зростає генерація АФК, у т.ч. необхідного для його утворення  $\text{O}_2^\cdot$ . Таким чином, підвищення рівня  $\text{O}_2^\cdot$ , при посиленні активності iNOS, що має значно більшу продуктивність синтезу NO ніж cNOS, призведе до утворення пероксинітриту та подальшої активації процесів нітрозативного стресу та апоптозу.

В умовах гіпоксії крім кисне залежного *denovo* синтезу NO (окиснення L-аргініну NOS) значно активується кисненезалежний реутилізаційний шлях утворення NO (відновлення нітрату нітратредуктазою до нітриту, а останнього нітритредуктазою до NO).

Основними продуцентами реутилізаційного NO ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ ) в мітохондріях серця є цитохром C-оксидаза та ксантинооксидаза [205]. Тому в мітохондріях серця досліджували сумарну НАДН-залежну нітратредуктазну активність. У тварин 2-ї групи нітратредуктазна активність була посилена порівняно з контролем (табл.6), що вказує на активізацію реутилізаційного синтезу NO в мітохондріях серця щурів за умов фокальної ішемії-реперфузії ГМ. Інтенсифікація нітратредуктазного (реутилізаційного синтезу NO із його стабільних метаболітів  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ ) діє лише в умовах гіпоксії, за умов фокальної ішемії-реперфузії ГМ, це вказує на порушення оксигенації міокарда. Високий рівень NO, що утворюється в цих умовах, може бути причиною значного підвищення вмісту пероксинітриту ( $\text{ONOO}^-$ ) [206] і підвищення рівнів генерації таких радикалів, як  $\text{NO}_2^\cdot$  (представник нітрозативного стресу), так і  $\text{OH}^\cdot$  (представник оксидативного стресу), які обидва є продуктами вільнорадикального шляху розпаду пероксинітриту ініціаторами ПОЛ.

Отже, не виключено, що за умов розвитку цереброкардіального синдрому в мітохондріях серця виникає дефіцит кисню, який зумовлює значне посилення реутилізаційної генерації NO [207].

Досліджуючи прояви нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів за експериментальної фокальної ішемії-реперфузії ГМ також визначали зміни пулів стабільних метаболітів NO: нітрит-аніона ( $\text{NO}_2^-$ ), нітрат-аніона ( $\text{NO}_3^-$ ) (табл.6) та

продуктів нітрозилування АФА низькомолекулярних тіолів, в основному глутатіону – низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ) і високомолекулярних нітрозотіолів (ВМНТ), що є продуктами нітрозилування SH-груп цистеїну в білках.

У мітохондріях серця тварин 2-ї групи достовірно зростали пули  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  порівняно з контролем.

Як правило, в умовах патології, чи при старінні рівні нітриту знижуються, що, власне, часто є головною причиною дисфункції мітохондрій органів. Враховуючи існуючий *de novo* синтез сірководню в мітохондріях серця, а також його антиоксидантну дію, в тому числі взаємодію з пероксинітридом, стає зрозумілим, що поява надлишкового нітриту-аніона, більше того, і зростання мітохондріальних пулів сірководню може бути зумовлена взаємодією сірководню з пероксинітридом. Це може бути ще одним (крім зростання мітохондріальних пулів нітрат-аніону і нітрозотіолів) доказом значного утворення пероксинітриту, а, отже, доказом розвитку нітрозативного стресу в мітохондріях серця за ішемії-реперфузії ГМ.

Нітрат-аніон є найбільш окисленим стабільним метаболітом NO, а також субстратом нітратредуктази для ресинтезу NO [208]. За умови ішемії-реперфузії ГМ значно підвищуються пули нітрату в мітохондріях серця. В умовах гіпоксії утворення нітрат-аніона при ферментативному окисненні NO є маловірогідним. У той час, як його частка утворення при спонтанній деградації пероксинітриту зростає [209]. Враховуючи ці факти, а також те, що пероксинітрит утворюється лише при одночасній генерації як NO, так і  $\text{O}_2^-$ . підвищення вмісту нітрат-аніону в мітохондріях серця за умови ішемії-реперфузії ГМ, свідчить не лише про активацію синтезу NO, тобто розвиток нітрозативного стресу, але також про активацію генерації супероксидного аніона, (що неминуче призводить до утворення  $\text{H}_2\text{O}_2$  і  $\text{OH}^\cdot$ ). Отже, одночасно з нітрозативним, за ішемії-реперфузії ГМ в мітохондріях серця розвивається і оксидативний стрес [102].

В умовах ішемії-реперфузії ГМ в мітохондріях серця зростають пули НМНТ (які є в основному нітрозоглутатіоном) а, отже, може мати місце

зниження мітохондріальних пулів самого глутатіону, що є потужним низькомолекулярним антиоксидантом. Також зростають пули ВМНТ (які є нітрозильованими білками), при цьому певним чином змінюються функції цих білків мітохондрій, що, подібно фосфорилуванню, є проявом сигнальної функції АФА. Нітрозотіоли є ендogenousними донорами NO, а також його депо. У процесі декомпозиції нітрозотіолів може звільнятися NO, причому як ферментативно, так і неферментативно. Зміни вмісту нітрозотіолів у мітохондріях серця за умов ішемії-реперфузії ГМ вказують на дві можливі причини їх виникнення: з одного боку – можливе зростання їх утворення (процес нітрозилування за дії різних АФА, особливо пероксинітриту), а з іншого – можливе пригнічення процесу їх декомпозиції.

Вміст маркерів нітрозативного стресу, якими є нітрозотіоли, змінювалися аналогічно пулам  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  (табл.6).

Досліджували активність неокисного метаболізму L-аргініну в мітохондріях серця за умов ішемії-реперфузії ГМ, визначавши активність індуцибельної аргінази II, що є основним ізоферментом мітохондрій, а також мітохондріальні пули карбаміду (один із продуктів аргіназної реакції гідролізу L-аргініну). Як відомо, потужна мітохондріальна аргіназа II (аргіназний неокисний метаболізм L-аргініну) може конкурувати із мітохондріальними ізоферментами cNOS (окисним метаболізмом L-аргініну). Також відомо, що в умовах гіперпродукції NO та можливої нестачі субстрату L-аргініну (за високої активності його деградації аргіназою), кальційзалежні cNOS (як eNOS, так і nNOS) замість NO можуть інтенсивно генерувати супероксид-радикал, тим самим підсилюючи утворення  $\text{ONOO}^-$ . Рівень активності аргінази в мітохондріях серця тварин 2-ї групи достовірно збільшився порівняно з контролем. При дослідженні вміст карбаміду було достовірне збільшення останнього в мітохондріях серця тварин 2-ї групи відносно контролю(табл.6).

**Показники нітрозативного стресу в мітохондріях  
та гомогенаті тканин серця щурів при фокальній  
ішемії-реперфузії головного мозку**

Таблиця 6.

Показник	Контроль, n=8 у мітохондріях n=12 у гомогенаті тканин	Ішемія-реперфузія, n=5 у мітохондріях n=8 у гомогенаті тканин
Активність iNOS у мітохондріях, пмоль- хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> білка	1,52 ± 0,19	5,01 ± 0,75*
Активність iNOS у гомогенаті тканин, пмоль- хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> білка	2,06 ± 0,24	4,34 ± 0,2*
Нітратредуктазна активність у мітохондріях, нмоль хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> білка	0,49 ± 0,11	1,58 ± 0,2*
Вміст NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> у мітохондріях, пмоль / мг білка	68,9 ± 5,53	211,98 ± 33,13*
Вміст NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> в гомогенаті тканин, пмоль / мг білка	8,81 ± 0,71	18,88 ± 2,45 *
Вміст низькомолекулярних нітрозотіолів у мітохондріях, пмоль / мг білка	259,9 ± 27,6	889,14 ± 170,3*
Вміст високомолекулярних нітрозотіолів у мітохондріях, пмоль / мг білка	164,4 ± 28,9	1033,8 ± 91,21*
Активність аргінази II у мітохондріях, нмоль- хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> білка	1,18 ± 0,1	8,21 ± 1,5*
Вміст карбаміду у мітохондріях, нмоль / мг білка	6,1 ± 0,8	134,07 ± 10,59*

\*P<0,05 відносно контрольної групи.

Після фокальної ішемії-реперфузії ГМ також досліджували прояви нітрозативного стресу в гомогенаті тканин серця. Було виявлено що в умовах ішемії-реперфузії ГМ, через 24 години в тканинах серця зростає активність iNOS та вміст NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (табл.6). Вищесказане є вагомим доказом індукції нітрозативного стресу.



## РОЗДІЛ 5

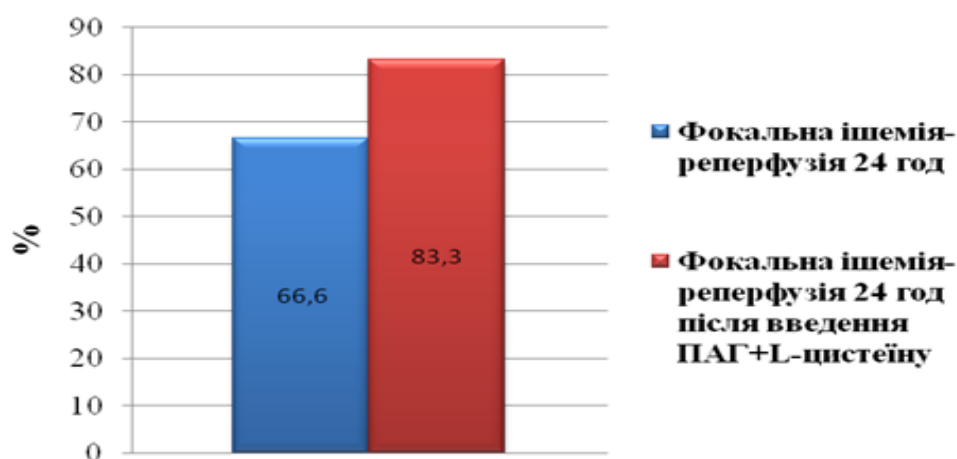
### КОРЕКЦІЯ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ПОРУШЕНЬ КАРДІОГЕМОДИНАМІКИ КОМБІНАЦІЄЙ L-ЦИСТЕЇНА ТА ПРОПАРГІЛГЛІЦИНА

В нашому відділі, для підтвердження кардіопротекторного ефекту L-цистеїну використовували інгібітор цистаті-онін- $\gamma$ -ліази - пропаргілгліцин. Були отримані несподівані результати застосування L-цистеїну на фоні пропаргілгліцину, перед ішемією-реперфузією мало потужний захисний вплив на міокард.

Стимуляція синтезу ендогенного сірководню, через введення його попередника L-цистеїну, зменшувала ступінь реперфузійних порушень функції міокарда. Введення L-цистеїну на тлі блокади цистатіонін- $\gamma$ -ліази - одного з ферментів його синтезу - за допомогою DL-пропаргілгліцину, мало більш потужний кардіопротекторний ефект при ішемії-реперфузії, а також збільшувало ефективність кисневого метаболізму. Одним з можливих механізмів позитивного впливу комбінованої дії DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну може бути - запобігання утворенню мітохондріальних пор.[160].

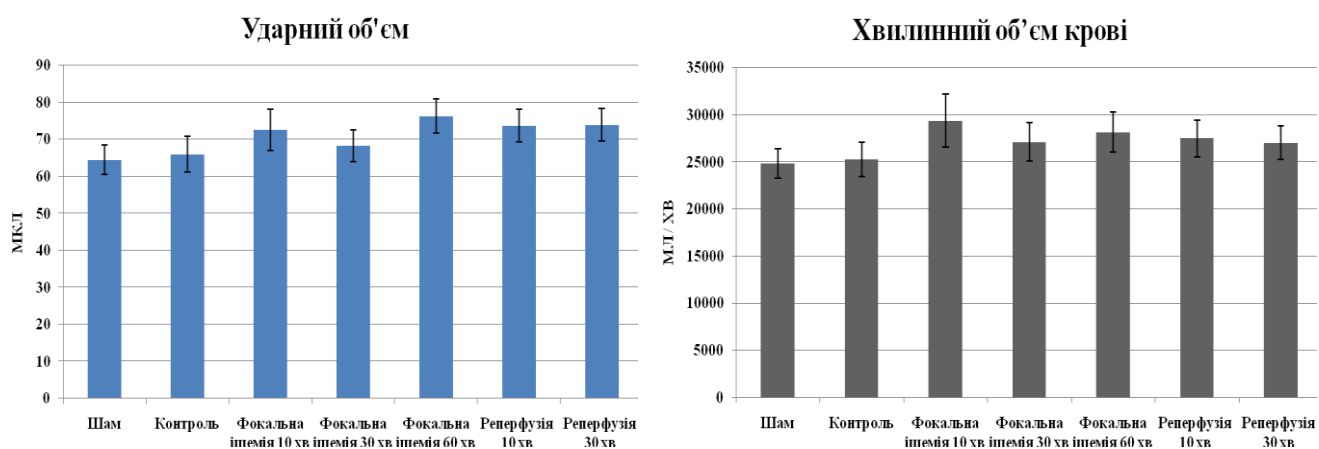
Комбінація L-цистеїну та пропаргілгліцину була використана на моделі фокальної ішемії-реперфузії ГМ з метою попередження розвитку кардіальної дисфункції.

Слід відмітити, що через 24 год виживання тварин, які до моделювання фокальної ішемії-реперфузії ГМ отримали DL-пропаргілгліцин та L-цистеїн, було вищим, ніж у щурів, яким ці препарати не вводили на 25% (рис.5.1 ).



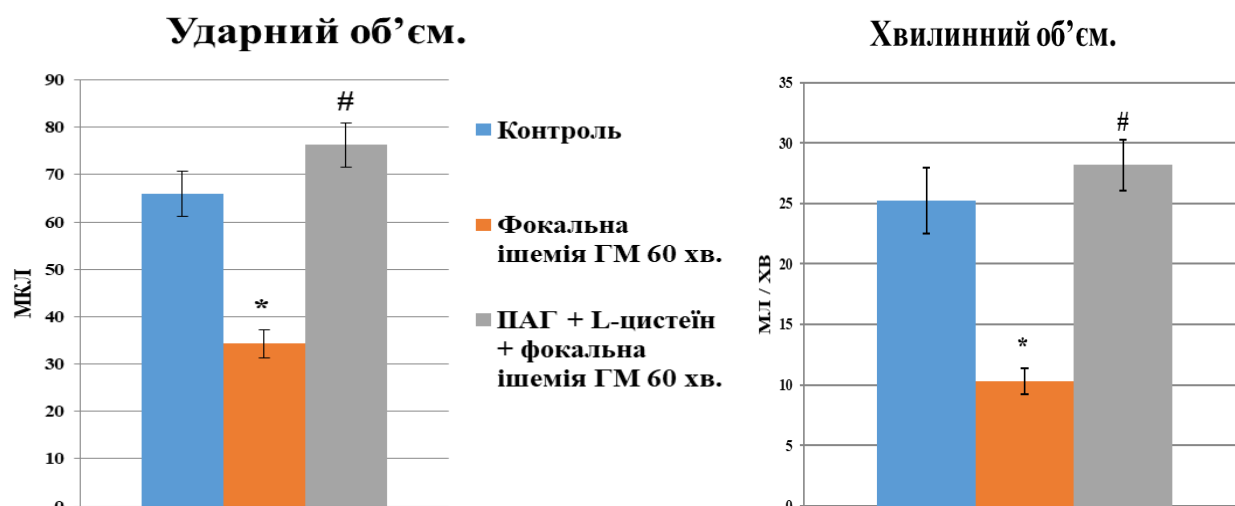
**Рис.5.1.** Вживання тварин в експерименті в умовах фокальної ішемії-реперфузії ГМ через 24 год

Як вже було вказано вище, показники насосної функції серця під час фокальної ішемії ГМ були достовірно нижче, ніж у контрольній групі. Попереднє введення комбінації DL-пропаргілгліцину та L-цистеїну попереджувало зниження ударного об'єму серця та хвилинного об'єму крові у щурів в умовах фокальної церебральної ішемії-реперфузії (рис.5.2).



**Рис.5.2.** Кардіопротекторна дія комбінації DL-пропаргілгліцину та L-цистеїну на насосну функцію серця під час фокальної ішемії-реперфузії ГМ

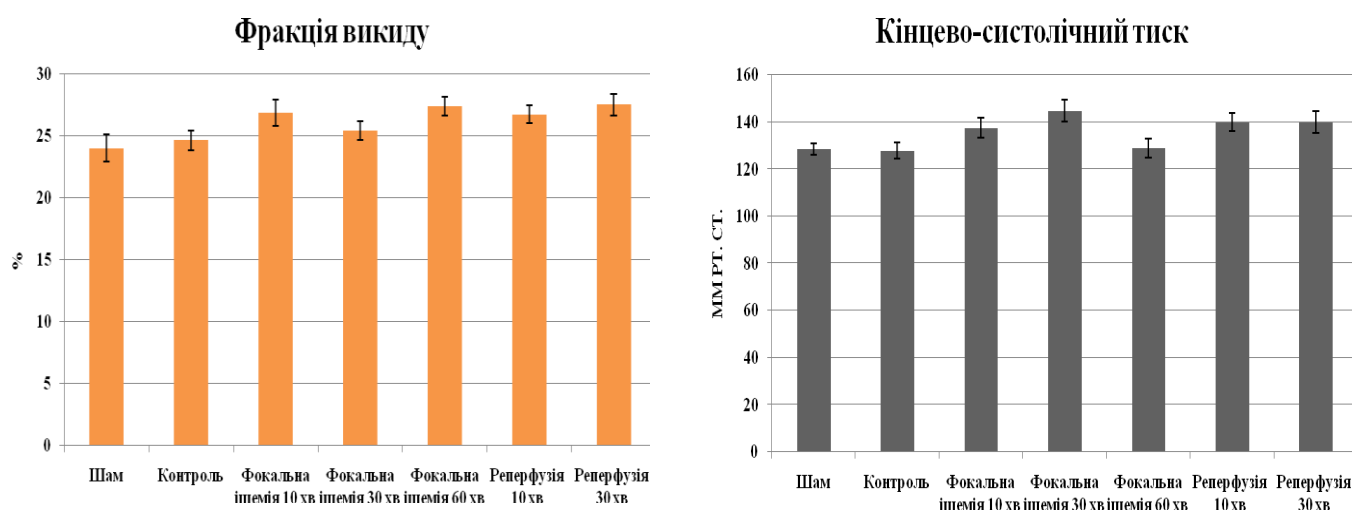
Так, показники ударного об'єму на 60-й хв фокальної ішемії ГМ зменшились на 48,4 %, а хвилинного об'єму крові -на 59 % відносно контролю ( $P < 0,05$ ). Після введення комбінації пропаргілгліцину та L-цистеїну ударний об'єм достовірно не змінювався, навіть збільшився на 15,8 %, хвилинний об'єм крові збільшився на 11,6 % (рис.5.3).



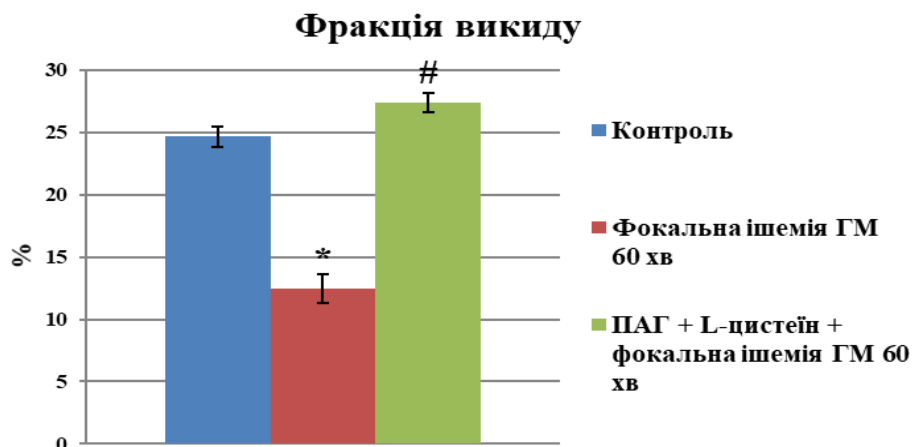
**Рис.5.3.** Вплив попереднього введення комбінації ПАГ та L-цистеїну на насосну функцію серця в умовах фокальної ішемії ГМ.

\*  $P < 0,05$  відносно контролю; #  $P < 0,05$  відносно фокальної ішемії ГМ 60 хв

Було виявлено покращення скоротливої функції серця. Комбінація DL-пропаргілгліцину та L-цистеїну попереджала зниження фракції викиду та суттєві зміни кінцево-сistolічного тиску під час фокальної ішемії-реперфузії ГМ у щурів (рис.5.4 та рис.5.5).



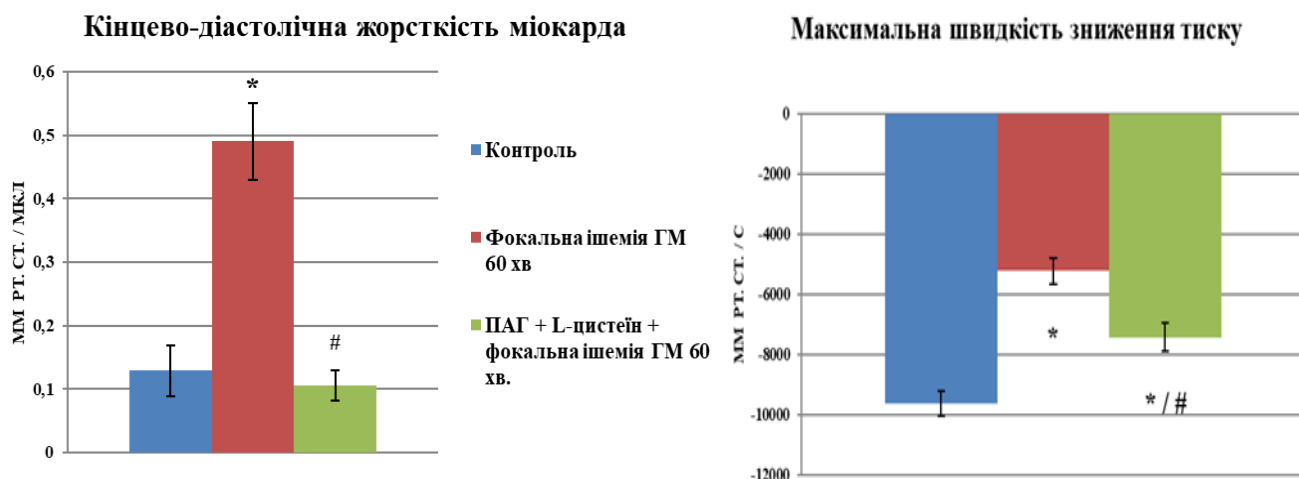
**Рис.5.4.** Кардіопротекторна дія комбінації DL-пропаргілгліцину та L-цистеїну на показники скоротливої функції серця під час фокальної ішемії-реперфузії ГМ



**Рис.5.5.** Вплив попереднього введення комбінації ПАГ +L-цистеїн на фракцію викиду серця в умовах фокальної ішемії-реперфузії ГМ.

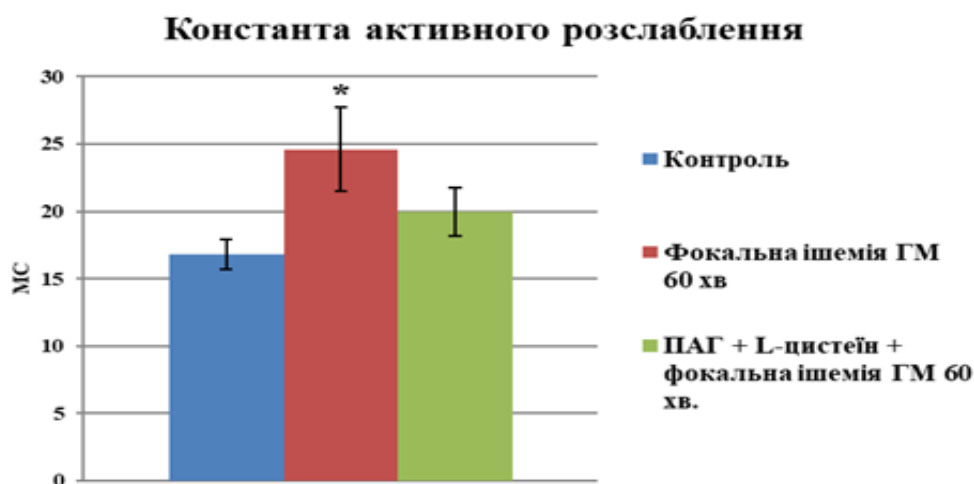
\* $P < 0,05$  відносно контролю; # $P < 0,05$  відносно фокальної ішемії ГМ 60 хв

Слід зауважити, що фокальна ішемія ГМ призводила до збільшення кінцево-діастолічної жорсткості міокарда в 3,8 рази, зменшення в 2 рази максимальної швидкості зниження тиску, підвищення на 46,4 % константи активного розслаблення на 60-й хв фокальної ішемії ГМ. В той час, як попереднє введення комбінації DL-пропаргілгліцин та L-цистеїн попереджувало порушення діастолічної функції серця, кінцево-діастолічна жорсткість міокарда, яка визначає наповнення шлуночка в період пізньої діастоли достовірно не змінювалась, навіть зменшилась на 18,6 % відносно контролю, максимальна швидкість знижувалась лише на 21,7 % (рис.5.6), а константа активного розслаблення залишалась в межах норми (рис.5.7).



**Рис.5.6.** Вплив попереднього введення комбінації ПАГ +L-цистеїн на кінцево-діастолічну жорсткість міокарда та максимальну швидкість зниження тиску в умовах фокальної ішемії ГМ.

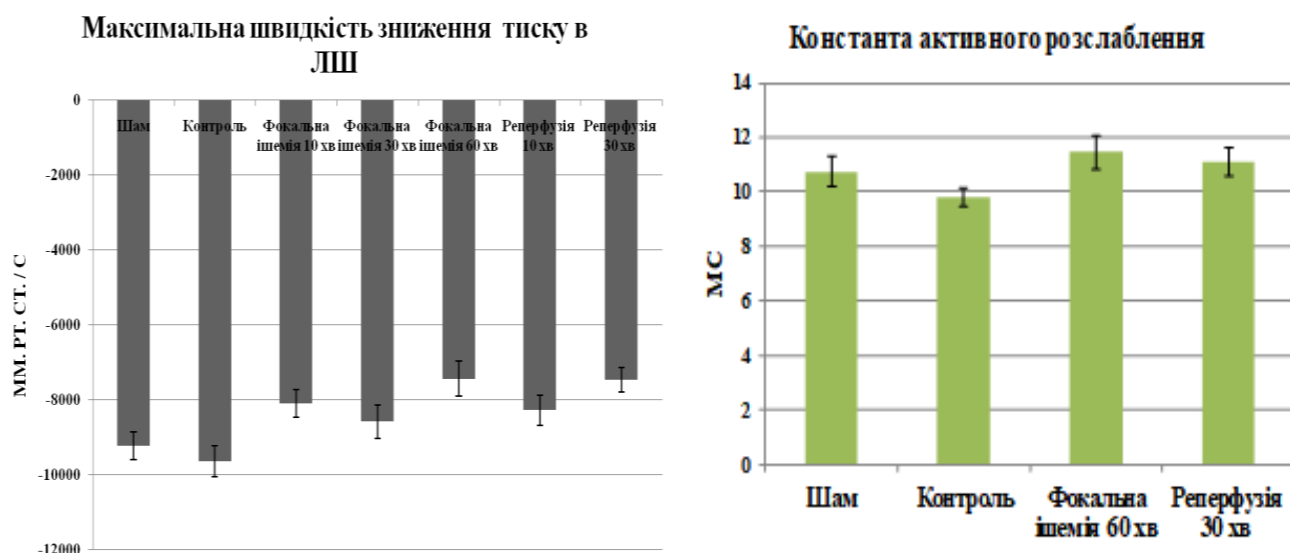
\* $P < 0,05$  відносно контролю; # $P < 0,05$  відносно фокальної ішемії ГМ 60 хв



**Рис.5.7.** Вплив попереднього введення комбінації ПАГ +L-цистеїн на константу активного розслаблення за умов фокальної ішемії-реперфузії ГМ.

\* $P < 0,05$  відносно контролю; # $P < 0,05$  відносно фокальної ішемії ГМ 60 хв

Як при ішемії, так і під час реперфузії, під впливом комбінації DL-пропаргілгліцину та L-цистеїну максимальна швидкість зниження тиску та константа активного розслаблення частково покращувались (рис.5.8).

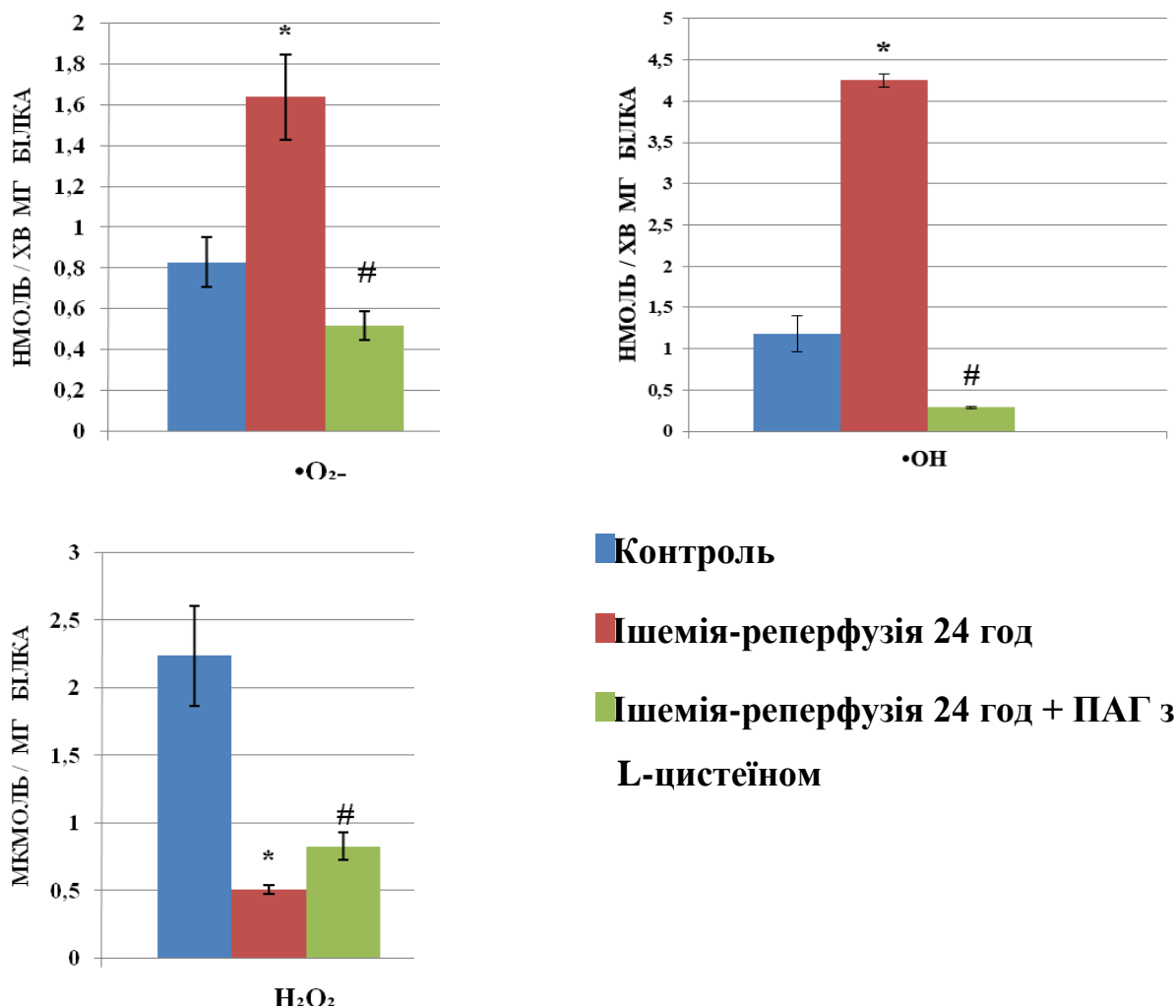


**Рис.5.8.** Кардіопротекторна дія комбінації DL-пропаргілгліцину та L-цистеїну на показники діастолічної функції серця під час фокальної ішемії-реперфузії ГМ

Таким чином, при фокальній ішемії ГМ введення комбінації пропаргілгліцин та L-цистеїн сприяло: збільшенню показників насосної функції серця, попереджувало порушення діастолічної функції серця, поліпшенню процесу релаксації лівого шлуночка.

Враховуючи отримані результати впливу комбінації DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну на гемодинаміку щурів в умовах фокальної церебральної ішемії-реперфузії, були проведені біохімічні дослідження.

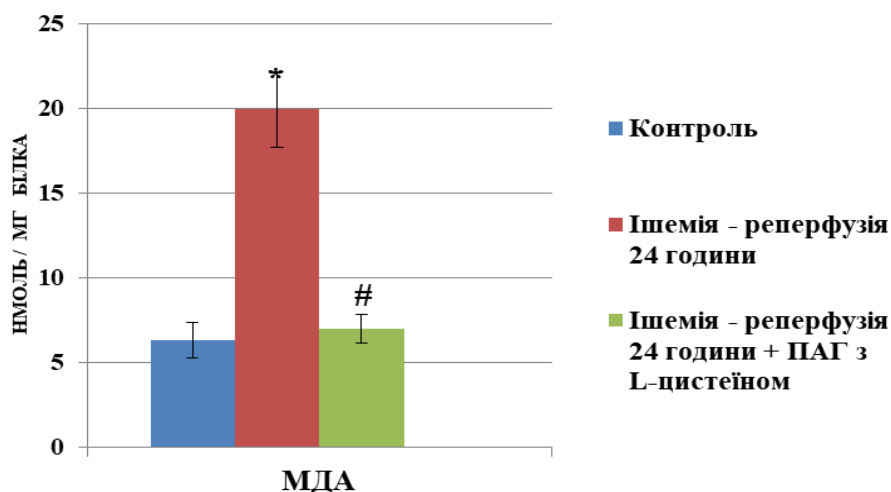
При дослідженні впливу DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну на показники оксидативного стресу в гомогенаті тканин серця через 24 год після ішемії-реперфузії ГМ виявлено достовірне зниження вмісту генерації вільних радикалів  $\cdot\text{O}_2^-$  і  $\cdot\text{OH}$  та пулів  $\text{H}_2\text{O}_2$  відносно групи тварин, які їх не отримували. (рис.5.9).



**Рис.5.9.** Вплив попереднього введення комбінації DL-пропаргілгліцину та L-цистеїну на рівні генерації вільних радикалів та пули H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при фокальній ішемії-реперфузії ГМ.

\*P<0,05 відносно контролю; #P<0,05 відносно ішемії-реперфузії ГМ

Попереднє введення комбінації DL-пропаргілгліцину та L-цистеїну впливало на ПОЛ в тканинах серця, зменшувало вміст МДА, який є високотоксичною кінцевою сполукою, що утворюється при розпаді нестійких гідропероксидів ліпідів у процесі ПОЛ (рис.5.10).



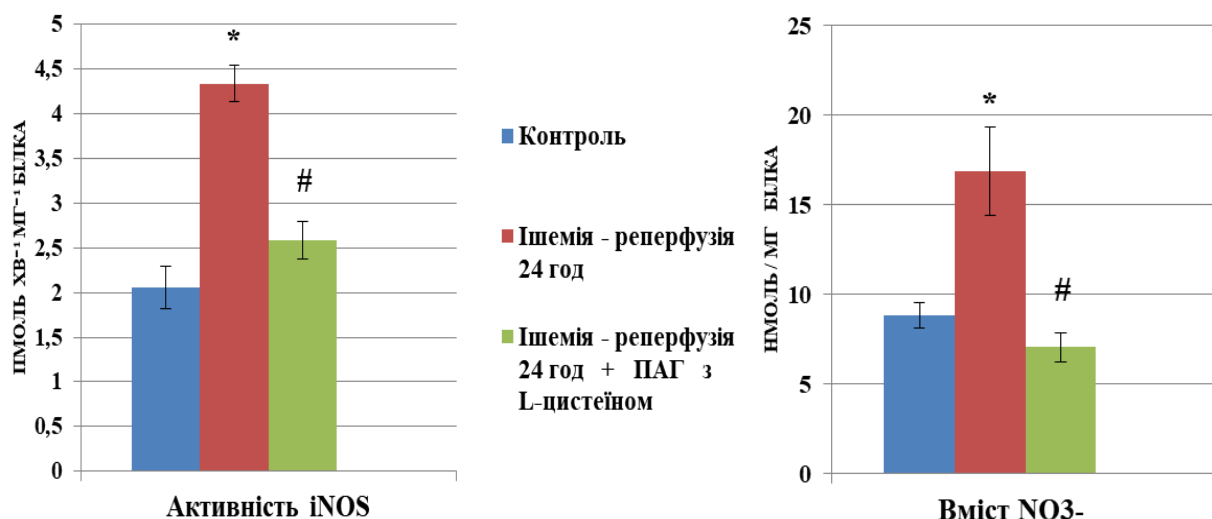
**Рис.5.10.** Вплив попереднього введення комбінації DL - пропаргілгліцину та L - цистеїну на рівень малонового діальдегіду при фокальній ішемії-реперфузії ГМ.

\*P<0,05 відносно контролю; #P<0,05 відносно ішемії-реперфузії ГМ

Як вже було відмічено вище, в умовах ішемії – реперфузії ГМ, через 24 години в тканинах серця зростає активність iNOS та вміст  $\text{NO}_3^-$  (табл.6), що є вагомим доказом індукції нітрозативного стресу. Виявлено, що комбінація DL-пропаргілгліцину та L – цистеїну зменшує прояви нітрозативного стресу, індукованого фокальною ішемією-реперфузією ГМ та має протекторний вплив на міокард.

В досліджах достовірно знижувалися активність iNOS та вміст  $\text{NO}_3^-$  в гомогенаті тканин серця через 24 год після ішемії-реперфузії ГМ, відносно значень групи тварин, яким ці препарати не вводили (рис.5.11).

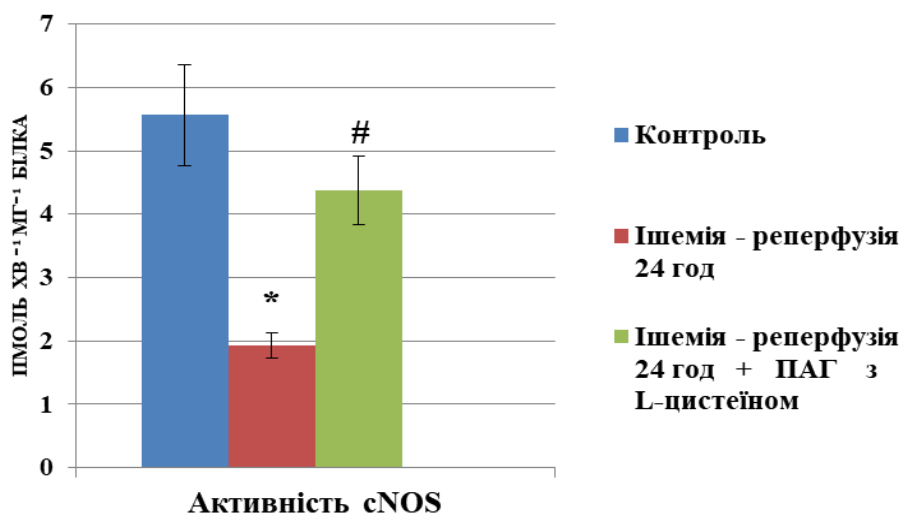




**Рис.5.11.** Попереднє введення DL-пропаргілгліцину та L-цистеїну зменшувало прояв нітрозативного стресу в серці при фокальній ішемії-реперфузії ГМ

\* $P < 0,05$  відносно контролю; # $P < 0,05$  відносно значень при ішемії-реперфузії ГМ

Також було виявлено ще один позитивний ефект цих препаратів, а саме підвищення активності cNOS (рис.5.12).



**Рис.5.12.** Попереднє введення DL-пропаргілгліцину та L-цистеїну попереджало зниження активності cNOS в серці при фокальній ішемії-реперфузії ГМ

\* $P < 0,05$  відносно контролю; # $P < 0,05$  відносно значень при ішемії-реперфузії ГМ

## РОЗДІЛ 6

### ВПЛИВ ЕКДИСТЕРОНА НА ОСКИДАТИВНИЙ ТА НІТРОЗАТИВНИЙ СТРЕСИ В СЕРЦІ ТА ПОКАЗНИКИ МАРКЕРІВ ПОЛ В ВЕНОЗНІЙ КРОВІ ВІДТІКАЮЧИЙ ВІД ГОЛОВНОГО МОЗКУ ПРИ ФОКАЛЬНІЙ ЦЕРЕБРАЛЬНІЙ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ

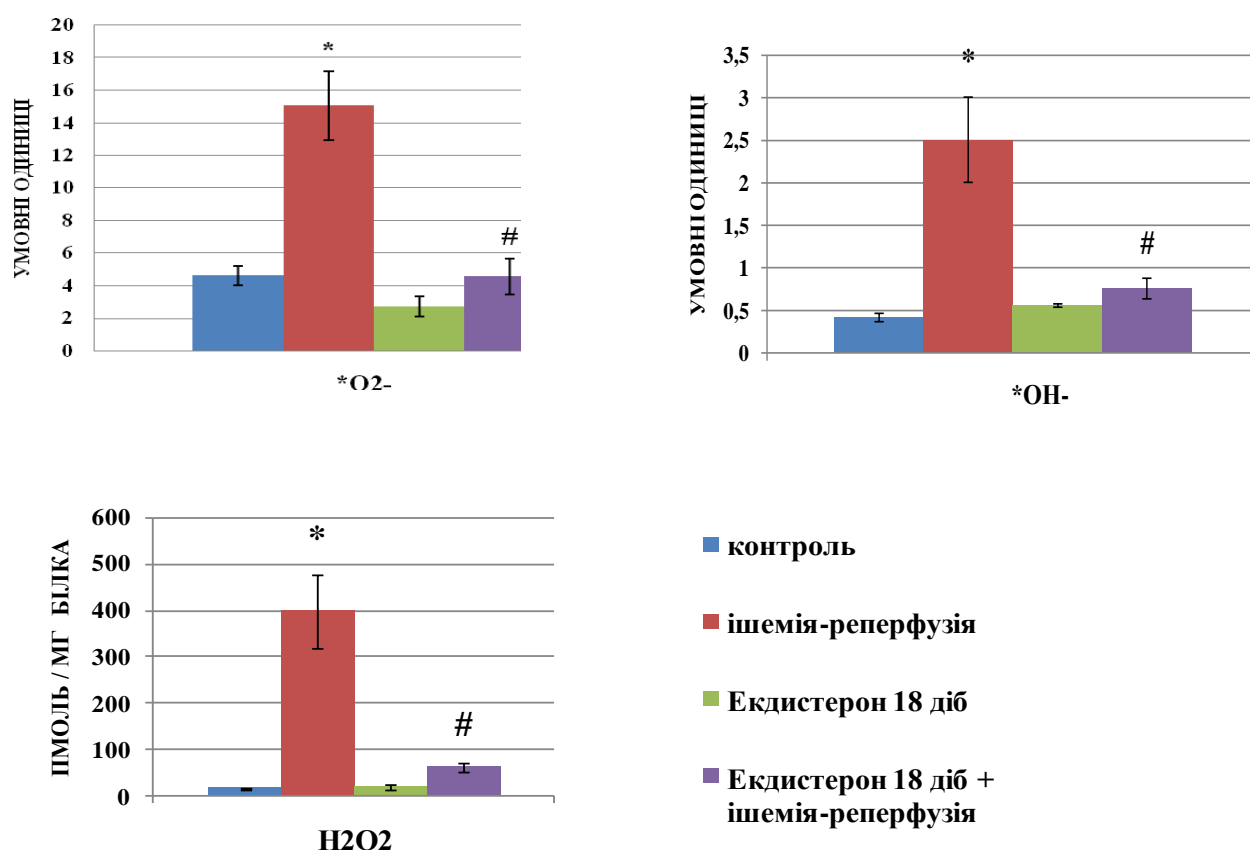
Відомо, що  $C_{27}$ -стероїдний гормон кальцитріол ( $1\alpha, 25$ -дигідроксिवітамін D3), є ефективним кардіопротектором, внаслідок нормалізації генерації АФК та АФА в мітохондріях серця [210]. Екдистерон є природним аналогом кальцитріолу, був виділений із рослини *Serratula coronata*. Він має потужні антирадикальні та антиоксидантні властивості [211]. Внаслідок фосфорилювання протеїнкіназою він активує кальційзалежний та кальційнезалежний синтез NO в кардіоміоцитах. Кальцитріол активує: фосфатидилінозитольний, коли відбувається підвищення концентрації іонів кальцію в цитозолікардіоміоцитів [212], сфінгомієліновий, під час якого утворюються регулятори апоптозу і проявляється активність протеїнкінази В (PKB/Akt) [213], а також eNOS/NO сигнальні каскади [210], які є регуляторами апоптозу. Ці властивості екдистерону зумовлюють його здатність інгібувати як кальцій-, так і АФК-залежне відкривання мітохондріальної пори перемінної проникності.

Для дослідження впливу екдистерону на оксидативний та нітрозативний стреси тварин поділили на чотири групи. Перша контрольна група, в якій визначали контрольні показники ( $n=8$ ). До 2-ї групи увійшли тварини, яких утримували в стандартних умовах і яким моделювали фокальну ішемію-реперфузію головного мозку оперативним шляхом ( $n=5$ ). Тварини 3-ї групи протягом 18 діб отримували екдистерон, їм не проводили оперативного втручання ( $n=8$ ). Тварини 4-ї групи отримували екдистерон протягом 18 діб, після чого їм оперативним шляхом моделювали фокальну ішемію-реперфузію головного мозку ( $n=8$ ). Тварини 2-ї та 4-ї груп отримували екдистерон 100

мкг/100 г маси тіла на добу з питною водою у вигляді препарата «Біоспон» – екстракту екдистерону з рослини *Serratula coronata*.

### 6.1. Протекторна дія екдистерона при оксидативному стресі в мітохондріях серця в умовах фокальної церебральної ішемії-реперфузії

Після моделювання фокальної ішемії-реперфузії головного мозку, через 24 години, в мітохондріях серця щурів спостерігалось збільшення генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  і  $\cdot\text{OH}$ , та зростання пулів стабільного  $\text{H}_2\text{O}_2$ . У мітохондріях серця тварин 4-ї групи, які отримували екдистерон, спостерігаються менші рівні генерації АФК ( $\cdot\text{O}_2^-$  і  $\cdot\text{OH}$ ), так і суттєве зниження вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$  (рис.6.1).

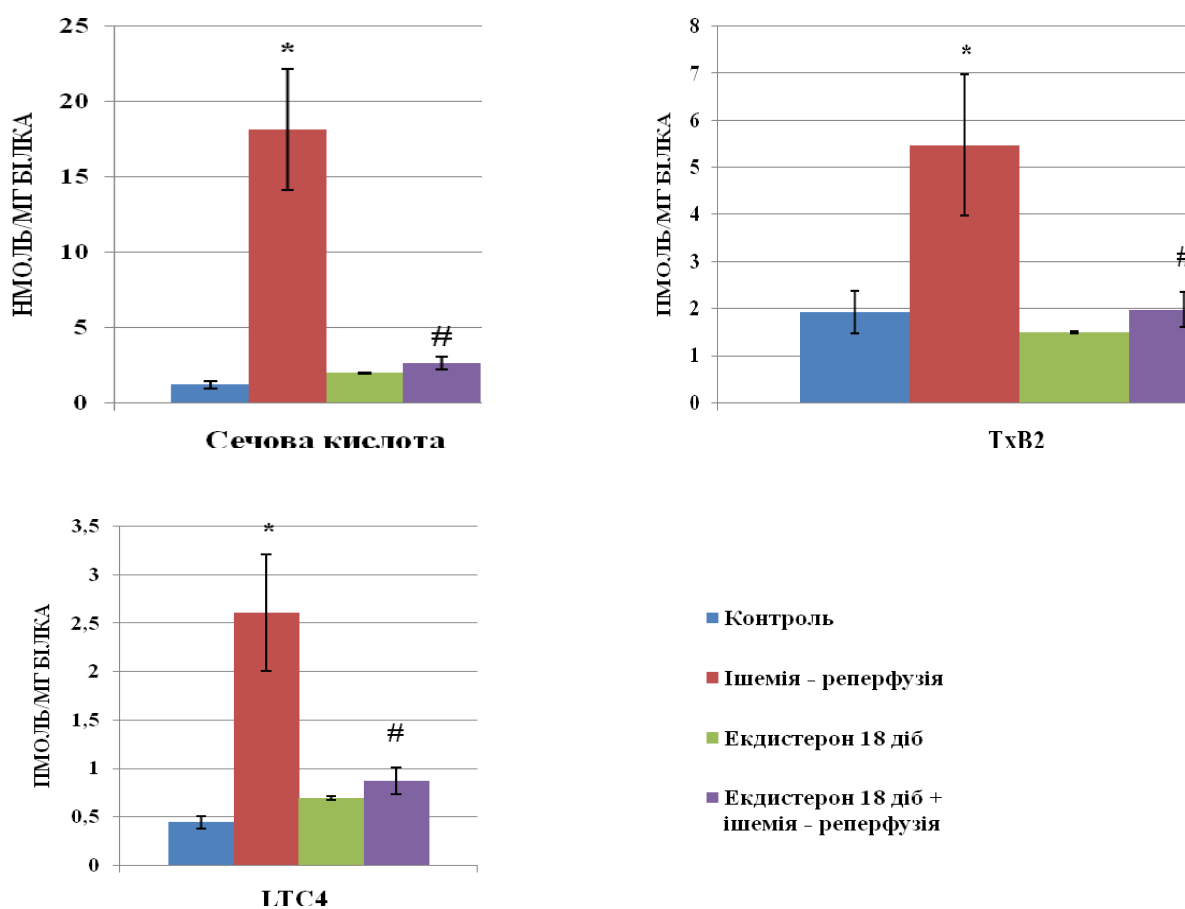


**Рис.6.1.** Рівні генерації АФК та вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$  в мітохондріях серця, при ішемії-реперфузії головного мозку та протекторна дія екдистерона ( $M \pm m$ ;  $n=5-8$ ).

\* $P < 0,05$  відносно контрольної групи 1; # $P < 0,05$  відносно другої групи

Зменшення генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  у тварин 3-ї групи порівнянно з інтактними тваринами 1-ї групи, може свідчити, про адаптогенну дію екдистерону в мітохондріях серця за фізіологічних умов [211, 214].

Антирадикальна дія екдистерону була виявлена і при дослідженні шляхів генерації  $\cdot\text{O}_2^-$ , а саме його інгубуючий ефект, що підтверджується нижчими рівнями маркерів цих шляхів в мітохондріях серця тварин після фокальної ішемії-реперфузії ГМ (рис.6.2).

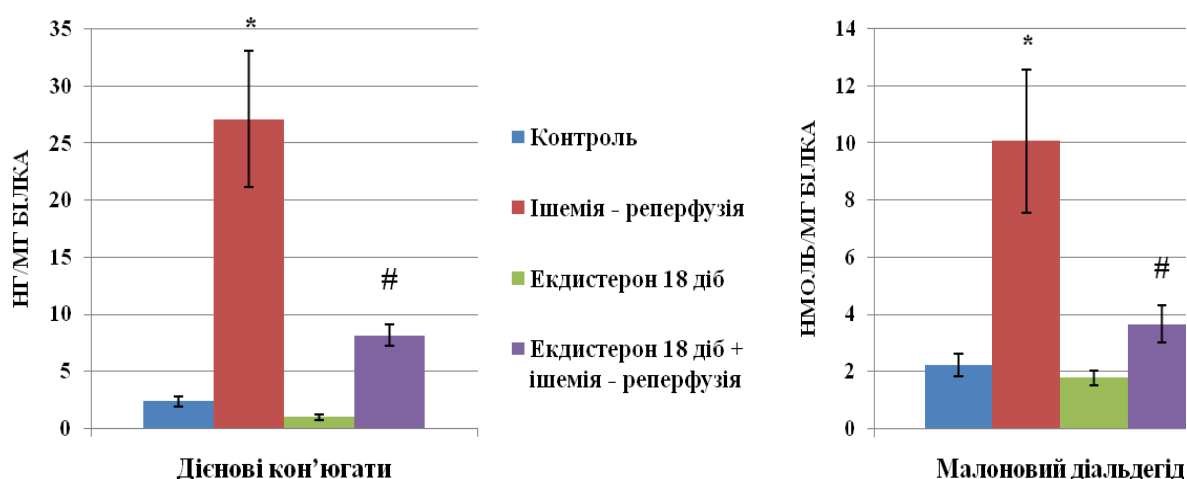


**Рис.6.2.** Вміст маркерів шляхів генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  в мітохондріях серця при ішемії-реперфузії головного мозку та протекторна дія екдистерона ( $M \pm m$ ;  $n=5-8$ ). \* $P < 0,05$  відносно контрольної групи 1; # $P < 0,05$  відносно другої групи

Сечова кислота є маркером ксантиноксидазного шляху генерації супероксиду. Визначення вмісту сечової кислоти в мітохондріях серця щурів показало її достовірне збільшення у тварин 2-ї групи порівняно з контролем. У тварин 4-ї групи, достовірно менше зростання рівню сечової кислоти в мітохондріях серця після фокальної ішемії-реперфузії головного мозку

порівняно з показниками тварин 2-ї групи (рис.6.2). Стабільний  $\text{TxV}_2$ , що є маркером інтенсивності циклооксигеназного, а пептидолейкотрієн  $\text{LTC}_4$  є маркером ліпоксигеназного шляху генерації  $\cdot\text{O}_2^-$ . Якщо у тварин 2-ї групи, після фокальної ішемії -реперфузії головного мозку, рівні  $\text{TxV}_2$  та  $\text{LTC}_4$  в мітохондріях серця достовірно збільшувалися в порівнянні з контрольними тваринами, у тварин 4-ї групи їх збільшення було достовірно меншим порівняно з показниками 2-ї групи (рис.6.2). Отримані результати вказують на наявність у екдистерона інгібуючої дії на всі три досліджені шляхи генерації  $\cdot\text{O}_2^-$ . [102].

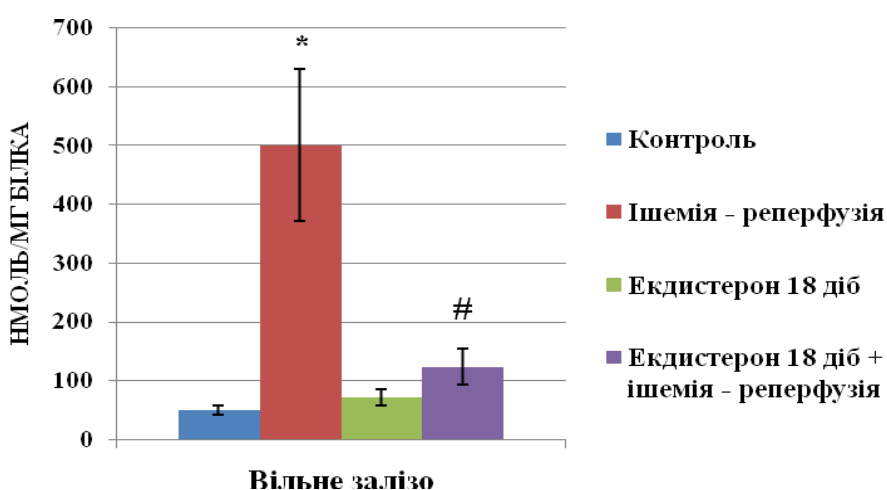
У процесі ПОЛ утворюються нестійкі гідроперикиси ліпідів, розпад яких призводить до появи різноманітних вторинних і кінцевих продуктів - ДК, МДА, що є високотоксичними сполуками. Екдистерон також може уповільнювати ланцюгову реакцію ПОЛ внаслідок зменшення генерації її ініціатора –  $\cdot\text{OH}$  [213] (рис. 6.1). У тварин 2-ї групи в мітохондріях серця, після фокальної ішемії-реперфузії головного мозку, виявлено достовірне збільшення рівня ДК та МДА в порівнянні з тваринами 1-ї групи. У тварин 4-ї групи, які отримували екдистерон, збільшення рівнів маркерів ПОЛ (ДК і МДА) було достовірно нижчим в порівнянні з показниками 2-ї групи, що його не отримували. При цьому у 3-й групі тварин які отримували екдистерон протягом 18 діб, рівень ДК був навіть достовірно нижчим, ніж в 1-й групі (рис.6.3).



**Рис.6.3.** Вміст ДК та МДА в мітохондріях серця при ішемії-реперфузії головного мозку та протекторна дія екдистерона ( $M \pm m$ ;  $n=5-8$ ).

\* $P < 0,05$  відносно контрольної групи 1; # $P < 0,05$  відносно другої групи

Іони двохвалентного заліза є потужним активатором реакції Фентона утворення  $\cdot\text{OH}$ , що є ініціатором ПОЛ. При дослідженні виявлено, що у тварин 2-ї групи в мітохондріях серця рівень вільного заліза на порядок перевищував такий у тварин 1-ї групи, в той час, як у тварин 4-ї групи, рівень вільного заліза зростав в значно меншій мірі (рис.6.4). Не виключено, що саме більш низький рівень вільного заліза в 4-й групі тварин, які приймали екдистерон, в порівнянні з 2-ю, зумовлює і значно меншу інтенсивність протікання реакції Фентона і генерації  $\cdot\text{OH}$  -і, як наслідок, процесу ПОЛ в мітохондріях серця в умовах фокальної ішемії-реперфузії ГМ.



**Рис.6.4.** Вміст вільного заліза в мітохондріях серця при ішемії-реперфузії головного мозку та протекторна дія екдистерона ( $M \pm m$ ;  $n=5-8$ )

\* $P < 0,05$  відносно контрольної групи 1; # $P < 0,05$  відносно другої групи

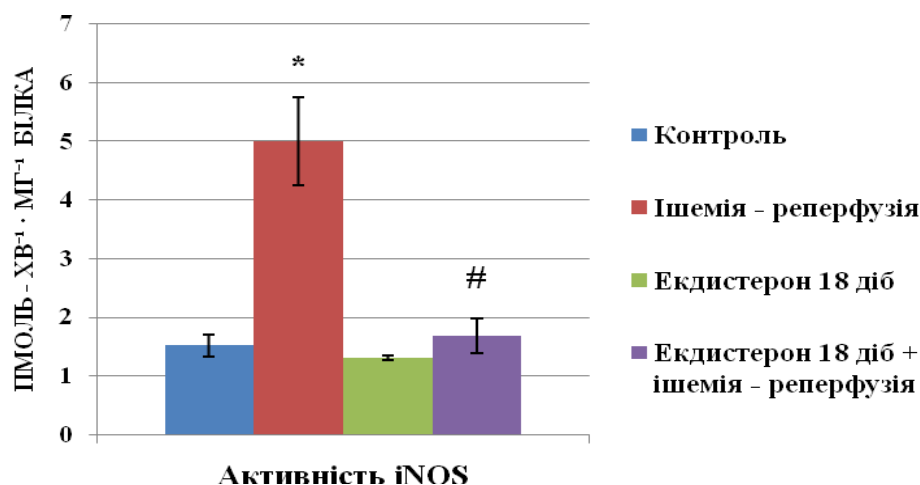
Це може бути одним з важливих біохімічних механізмів кардіопротекторної дії екдистерону в умовах фокальної ішемії-реперфузії ГМ [102].

## **6.2. Корекція екдистероном індукції нітрозативного стресу в мітохондріях серця при фокальній церебральній ішемії-реперфузії**

При дослідженні ефективності кардіопротекторної дії екдистерону в умовах фокальної ішемії-реперфузії ГМ було виявлено зміни маркерів нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів.

Через 24 години після моделювання фокальної ішемії-реперфузії ГМ в мітохондріях серця щурів підвищується синтез NO із L-аргініну киснезалежним шляхом *denovo*, про що свідчить значне збільшення активності iNOS, порівнянно з тваринами контрольної групи (рис.6.5).

У тварин 4-ї групи, які перед моделюванням фокальної ішемії-реперфузії головного мозку отримували екдистерон, підвищення активності iNOS порівняно зі щурами 2-ї групи не спостерігали, яка наближалася до значень активності ферментів у мітохондріях 1-ї та 3-ї груп (рис.6.5).



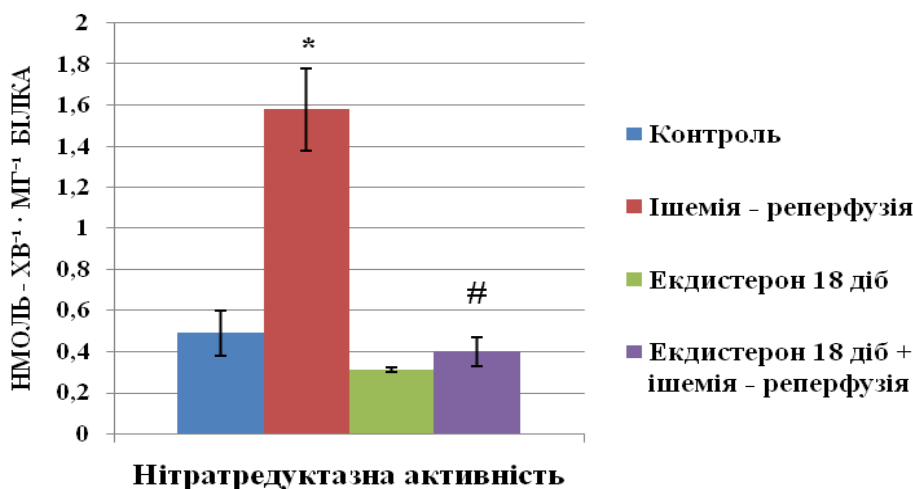
**Рис.6.5.** Активність iNOS в мітохондріях серця, в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку та дії екдистерону ( $M \pm m$ ;  $n=5-8$ ).

\* $P < 0,05$  відносно контрольної групи 1; # $P < 0,05$  відносно другої групи

Екдистерон, як свідчать отримані результати, інгібує підвищення синтезу NO *denovo*, тим самим зменшує ймовірність утворення АФА і, що особливо небезпечно, пероксинітриту ( $\text{ONOO}^-$ ) бо, в цих умовах значно зростає генерація АФК, у т.ч. необхідного для його утворення  $\cdot\text{O}_2^-$  [207].

Як вже вказувалось вище, в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку в мітохондріях серця значно активується киснезалежний реутилізаційний шлях утворення NO (відновлення нітрату нітратредуктазою до нітриту, а останнього нітритредуктазою до NO). При дослідженні сумарної НАДН-залежної нітратредуктазної активності виявлено, що у тварин 4-ї групи,

які перед моделюванням фокальної ішемії-реперфузії головного мозку отримували екдистерон, не виявлено її зростання (рис.6.6) [207].



**Рис.6.6.** Активність НАДН-залежної нітратредуктази в мітохондріях серця, в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку та дії екдистерону ( $M \pm m$ ;  $n=5-8$ ). \* $P < 0,05$  відносно контрольної групи 1; # $P < 0,05$  відносно другої групи

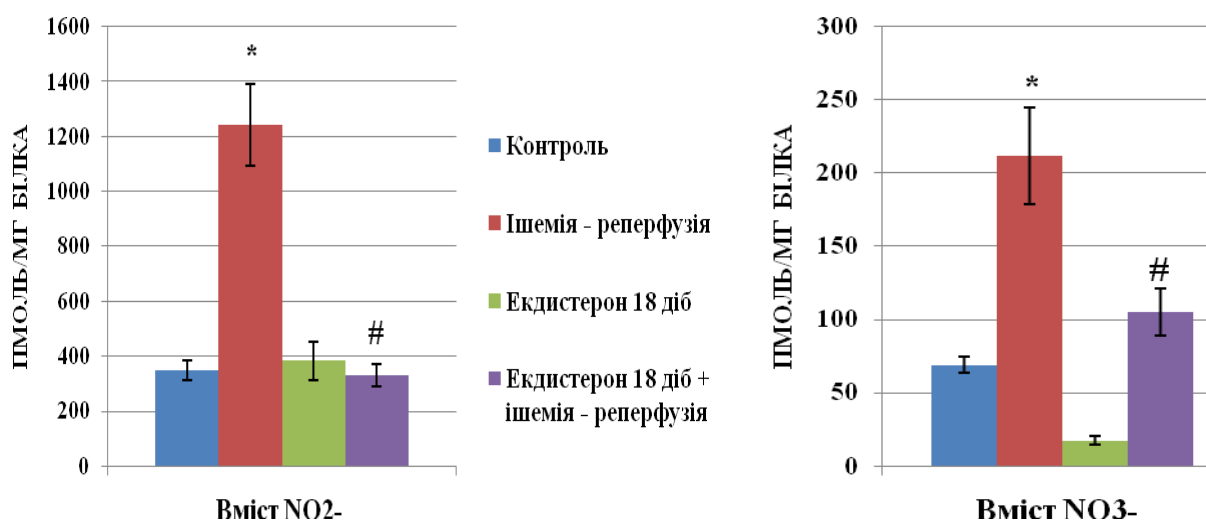
За умов розвитку цереброкардіального синдрому в мітохондріях серця виникає дефіцит кисню, який зумовлює значне посилення реутилізаційної генерації NO. Ці зміни синтезу NO не відбувалися при попередньому введенні гормону екдистерону – регулятора синтезу в мітохондріях кальційзв'язувального білка (calbindin D28K), а в плазматичних мембранах кардіоміоцитів кальцій селективного каналу TRPV6 та активатора багатьох сигнальних каскадів, у т.ч. сфінгомієлінового [215].

Досліджуючи кардіопротекторну дію екдистерону при розвитку нітрозативного стресу, в мітохондріях серця щурів, за експериментальної фокальної ішемії-реперфузії головного мозку досліджували зміни пулів стабільних метаболітів NO: нітрит-аніона ( $\text{NO}_2^-$ ) та нітрат-аніона ( $\text{NO}_3^-$ ) (рис.6.7).

У тварин 2-ї групи в мітохондріях серця зростали пули  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  порівняно з контролем. У тварин 3-ї групи, вміст нітритів не змінювався; а вміст нітратів, що є продуктом нерадикального розпаду пероксинітриту-зменшився в



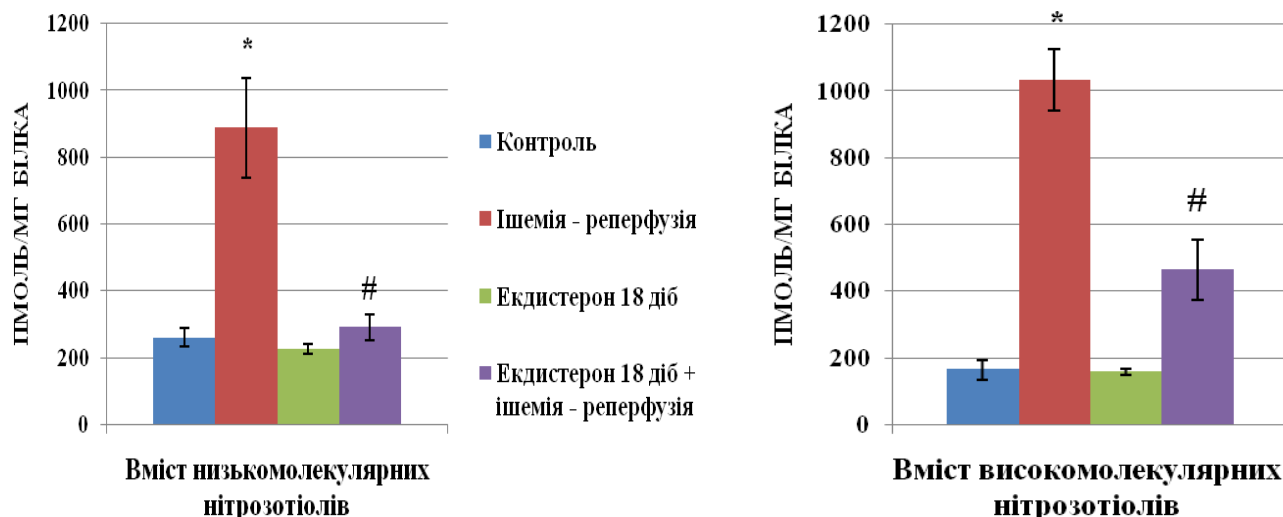
декілька разів, в порівнянні з тваринами контрольної групи. У 4-й групі тварин-вміст нітритів у мітохондріях серця не змінився, а вміст нітратів достовірно збільшився порівняно з тваринами 3-ї групи. На відміну від тварин 2-ї групи, у тварин 4-ї групи вміст нітритів і нітратів у мітохондріях серця достовірно менші. Особливо несподіваним виявилось значне підвищення пулів нітриту у тварин 2-ї групи (ішемія-реперфузія ГМ без протекції екдистероном). Як правило, в умовах патології чи при старінні рівні нітриту знижуються, що, власне, часто є головною причиною дисфункції мітохондрій. Враховуючи існуючий *de novo* синтез сірководню в мітохондріях серця, а також його антиоксидантну дію, в тому числі взаємодію з пероксинітридом, стає зрозумілим, що поява надлишкового нітрит-аніона, більше того, і зростання мітохондріальних пулів сірководню може бути зумовлена взаємодією сірководню з пероксинітридом [207].



**Рис.6.7.** Вміст NO<sub>2</sub><sup>-</sup> та NO<sub>3</sub><sup>-</sup> в мітохондріях серця, в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку та дії екдистерону (M±m; n=5-8).

\*P<0,05 відносно контрольної групи 1; #P<0,05 відносно другої групи

Аналогічно пулам NO<sub>2</sub><sup>-</sup> та NO<sub>3</sub><sup>-</sup> змінювався вміст нітрозотіолов - маркерів нітрозативного стресу (рис.6.8).



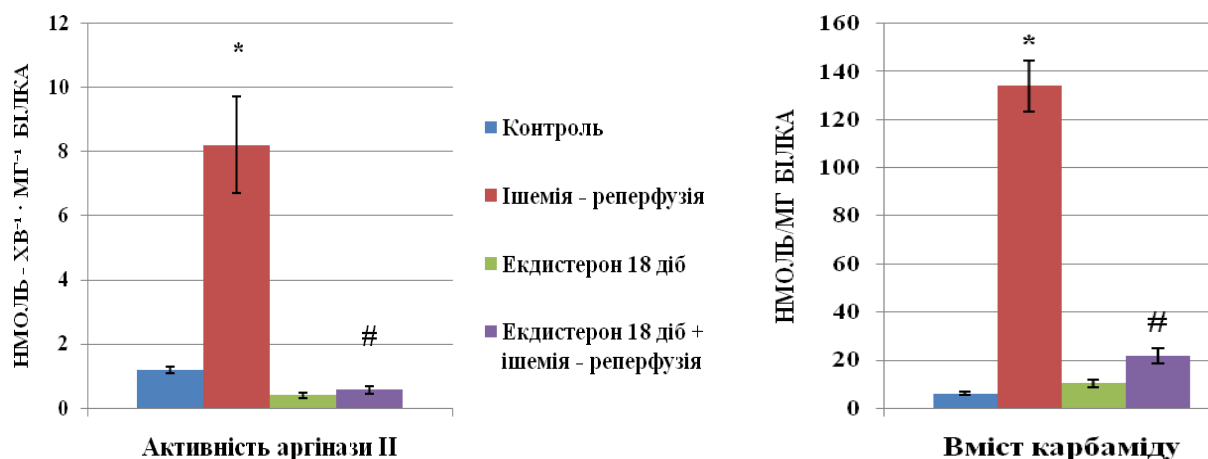
**Рис.6.8.** Вміст НМНТ та ВМНТ в мітохондріях серця, в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку та дії екдистерону (M±m; n=5-8).

\*P<0,05 відносно контрольної групи 1; #P<0,05 відносно другої групи

Досліджуючи активність неокисного метаболізму L-аргініну та L-цистеїну в мітохондріях серця за умов ішемії-реперфузії ГМ, визначали активність індукцибельної аргінази II, що є основним ізоферментом мітохондрій, а також мітохондріальні пули карбаміду (один із продуктів аргіназної реакції гідролізу L-аргініну).

В мітохондріях серця щурів 3-ї групи – рівень аргіназної активності не підвищувався. У тварин 4-ї групи, після фокальної ішемії-реперфузії головного мозку - так само активність не збільшилась (рис. 6.9).

При дослідженні вмісту карбаміду у тварин 4-ї групи, які отримували екдистерон, за умов фокальної ішемії-реперфузії ГМ вміст карбаміду достовірно більший ніж у контролі, але значно нижчий порівняно з тваринами 2-ї групи (рис.6.9).



**Рис.6.9.** Активність аргінази II та карбаміду в мітохондріях серця, в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку та дії екдистерону ( $M \pm m$ ;  $n=5-8$ )

\* $P < 0,05$  відносно контрольної групи 1; # $P < 0,05$  відносно другої групи

Отримані результати вказують на кардіопротекторну дію екдистерона за умов фокальної ішемії-реперфузії головного мозку. Можливим механізмом є нормалізація синтезу NO в мітохондріях ізоферментом iNOS, внаслідок інгібування активності мітохондріальної аргінази II. Ізофермент iNOS не конкурує з аргіназою за субстрат, а використовує механізм ресинтезу свого субстрату – L-аргініну з копродукту синтезу NO – L-цитруліну. Це можливо відбувається через інгібування активуючого ферменту iNOS, його вільнорадикального окиснення за рахунок обмеження перетворення  $\text{H}_2\text{O}_2$  в  $\cdot\text{OH}$  радикал шляхом реакції Хабера-Вайса чи Фентона, що відбувається внаслідок інгібування генерації  $\cdot\text{OH}$ - радикала за рахунок хелатування вільного заліза карбамідом (продуктом аргіназної реакції). Але більш вірогідним є інгібування iNOS гуанідиносукцинатом, попередником якого може бути карбамід (це рідкісна, поряд з реакцією карбаміювання, реакція прямого включення молекул карбаміду в обмін речовин) внаслідок прямого інгібування ресинтезу L-аргініну із L-цитруліну в цитруліновому циклі [216]. Карбамід є одним із продуктів аргіназної реакції разом із орнітином, який у мітохондріях переважно метаболізується в глютамінову кислоту. Остання використовується в мітохондріях для утилізації в циклі трикарбонових кислот. Встановлено

здатність фізіологічних концентрацій карбаміду карбаміювати різні білки, що призводить до зміни їх властивостей. В такому разі, пригнічувальна дія екдистерону щодо активності мітохондріальної аргінази (рис.6.9.) може бути ще одним механізмом в його кардіопротекторній дії, яка реалізується через інгібування мітохондріальної пори [207].

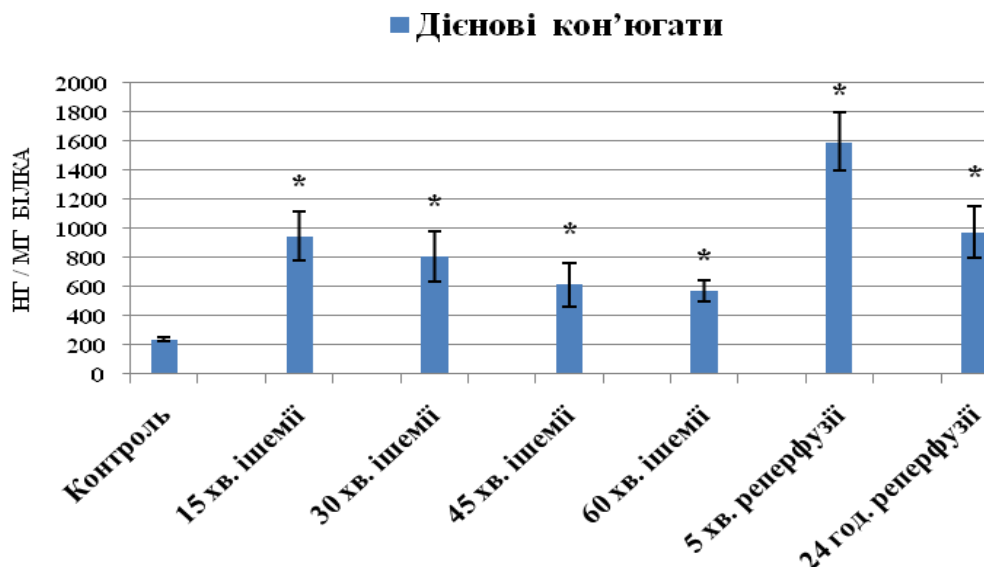
### **6.3. Зміни показників маркерів ПОЛ в венозній крові відтікаючий від головного мозку при фокальній церебральній ішемії-реперфузії під впливом екдистерону**

Експерименти проводили на трьох групах щурів лінії Вістар масою 280-320 г, згідно з вимогами Європейської конвенції із захисту хребетних тварин (Страсбург,1986). Ішемічний інсульт викликали оклюзією середньої мозкової артерії, як описано раніше. Першу групу складали інтактні тварини, у яких визначали лише контрольні показники. До другої групи входили тварини, які утримувались в стандартних умовах, і яким моделювалась фокальна ішемія-реперфузія ГМ. До третьої групи входили тварини, які отримували екдистерон протягом 18 діб по 1мг/кг маси тіла на добу з питною водою у вигляді стандартизованого екстракту рослини *Serratula coronata* (препарат «Біоспон» виробництва І-ту біохімії ім. О.В.Палладіна АН України), після чого їм оперативним втручанням моделювалась фокальна ішемія-реперфузія ГМ. У тварин другої і третьої груп із яремної вени в динаміці ішемії (через 15, 30, 45 і 60 хв), а також через 5 хв і 24 год реперфузії відбирали по 0,1 мл відтікаючої від ГМ крові для визначення біохімічних показників. Пули ДК і LTC<sub>4</sub> визначали у плазмі відтікаючої від ГМ венозної крові.

#### **6.3.1. Показники маркерів ПОЛ в венозній крові відтікаючий від головного мозку при фокальній церебральній ішемії-реперфузії**

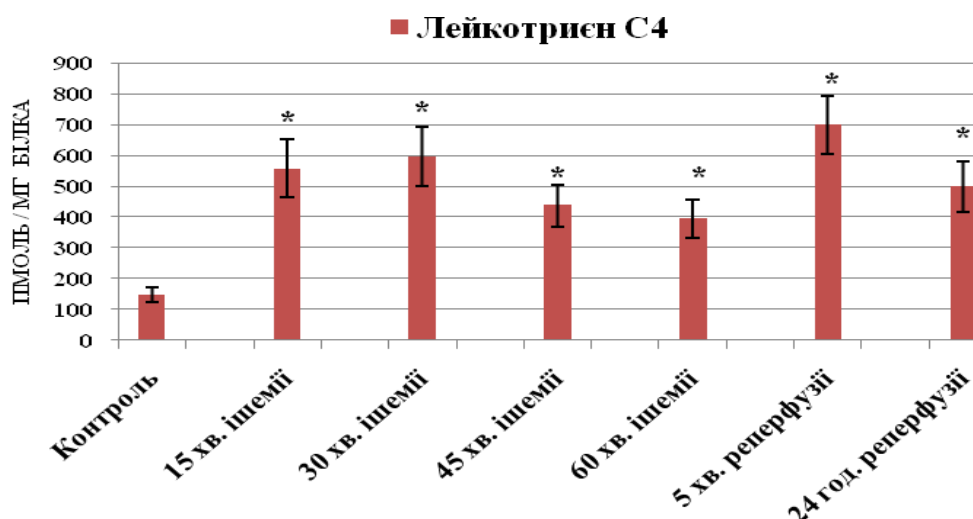
Шукаючи зв'язок між ішемією ГМ та змінами кардіогемодинаміки досліджували зміни вмісту дієнових кон'югатів та лейкотриєну C<sub>4</sub> у відтікаючій від головного мозку крові. Вміст ДК та LTC<sub>4</sub> у венозній крові з різною

інтенсивністю зростає як в ішемічний, так і в реперфузійний, особливо ранній, період (рис.6.10 та рис.6.11).



**Рис 6.10.** Зміни вмісту дієнових кон'югатів у відтікаючій від головного мозку крові при фокальній ішемії-реперфузії ГМ ( $M \pm m$ ;  $n=8$ ).

\*- різниця достовірна ( $P < 0,05$ ) відносно контрольних значень (до початку фокальної ішемії-реперфузії ГМ).

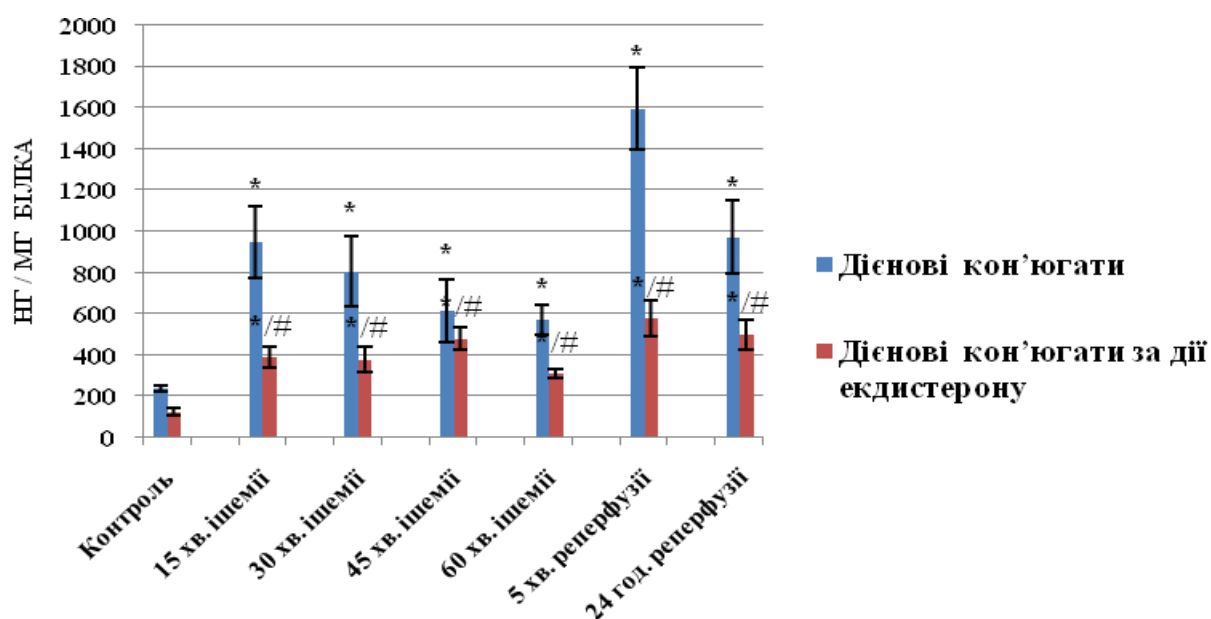


**Рис 6.11.** Зміни вмісту лейкотриєну C4 у відтікаючій від головного мозку крові при фокальній ішемії-реперфузії ГМ ( $M \pm m$ ;  $n=8$ ).

\*- різниця достовірна ( $p < 0,05$ ) відносно контрольних значень (до початку фокальної ішемії-реперфузії ГМ).

### 6.3.2. Вплив екдистерону на зміни показників маркерів ПОЛ в венозній крові відтікаючий від головного мозку при фокальній церебральній ішемії-реперфузії

Як вже вище зазначалося, у венозній крові, відтікаючій від ГМ в умовах фокальної ішемії-реперфузії, зростає з різною інтенсивністю вміст ДК, в ішемічний та реперфузійний періоди. Отримані данні вказують на те, що екдистерон інгібував підвищення вмісту ДК (рис.6.12).



**Рис.6.12.** Зміни вмісту дієнових кон'югатів у відтікаючій від головного мозку крові за умов фокальної ішемії-реперфузії і дії екдистерону ( $M \pm m$ ;  $n=8$ ).

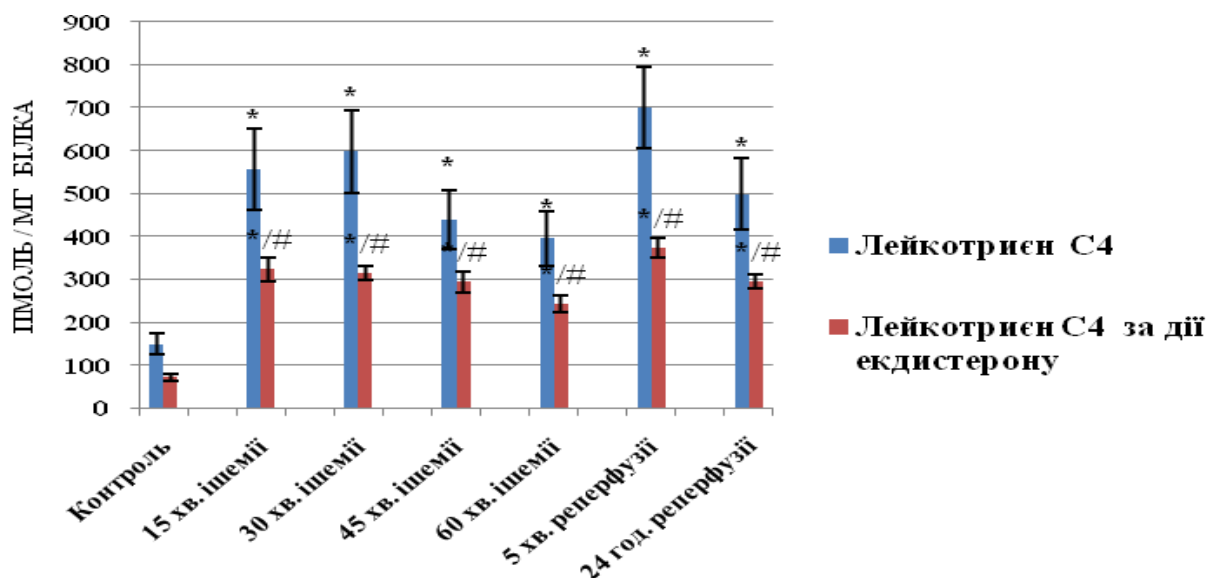
\* різниця достовірна ( $P < 0,05$ ) відносно контрольних значень;

# різниця достовірна ( $P < 0,05$ ) відносно значення у щурів, які не отримували екдистерон.

Окисна модифікація ліпідного оточення  $Ca^{2+}$ -АТФази в плазматичній мембрані внаслідок інтенсифікації ПОЛ може бути ще одним механізмом регуляції спряження  $Ca^{2+}$ -АТФази, а, отже, і інтенсивності входу  $H^+$  в еритроцити.

Також можлива регуляторна роль у процесі транспорту  $H^+$  в еритроцити лейкотриєна  $C_4$ , який в них не лише інтенсивно синтезується, але і має специфічний рецептор CysLT1 на плазматичній мембрані [217]. Вміст  $LTC_4$  у

венонній крові (рис.6.13) зростає як протягом ішемії, так і під час реперфузії. Екдистерон інгібував підвищення вмісту LTC<sub>4</sub>, тим самим зберігаючи необхідний для його синтезу глутатіон. Останній має велике значення для захисту органів від пошкодження за ішемії-реперфузії [218].



**Рис.6.13.** Зміни вмісту лейкотриєну C4 у відтікаючій від головного мозку крові за умов фокальної ішемії-реперфузії і дії екдистерону ( $M \pm m$ ;  $n=8$ ).

\* різниця достовірна ( $P < 0,05$ ) відносно контрольних значень;

# різниця достовірна ( $P < 0,05$ ) відносно значення у щурів, які не отримували екдистерону.

В умовах фокальної ішемії-реперфузії ГМ в еритроцитах відтікаючої від ГМ венонної крові відбуваються певне підвищення концентрації  $Ca^{2+}$  в цитозолі еритроцитів, для запобігання її подальшого підвищення «включає»  $Ca^{2+}/H^{+}$  обмін за якого іони  $Ca^{2+}$  «викидаються» назовні в плазму, що підвищує плазмову концентрацію  $Ca^{2+}$ , але недостатню для інгібування подальшого «виходу»  $Ca^{2+}$  із еритроцитів. Внаслідок цього із плазми протони входять в еритроцити. Цьому сприяє ацидоз плазми крові за умов ішемії. Далі, щоб зменшити внутрішньоклітинну концентрацію протонів, запобігти розвитку внутрішньоклітинного ацидозу, в еритроцитах активуються процеси їх видалення в плазму через аніонний канал аніонів бікарбонату ( $HCO_3^-$ ), а також, як було встановлено зовсім недавно, і іонів гідросульфиду ( $HS^-$ ) [219]..

Руйнування плазматичної мембрани еритроцитів за гемолізу, в т.ч. і кислотного, приводить не лише до виділення в плазму токсичних сполук (в першу чергу, вільного гемоглобіну, скавенжера оксиду азоту, але і до виділення потужного газового трансмітера – оксиду вуглецю (CO), що може, як і NO, знижувати цитозольні пули іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , в ендотеліальних і гладкомязевих клітинах судин і в кардіоміоцитах, активуючи сигнальний каскад sGC/cGMP/PKG [220]. CO має важливу роль в регуляції синтезу потужних регуляторів серцево-судинної системи – NO та сірководню [221]. Виділення CO відбувається внаслідок розщеплення гему гемоглобіну, що «виходить» із еритроцитів внаслідок їх гемолізу, ферментом гемоксидазою. Варто зазначити, що крім гемоглобіну при гемолізі еритроцитів виділяється АТР [222,223], який може стимулювати конститутивний синтез NO *denovo* ферментом eNOS в клітинах серцево-судинної системи.



## АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Згідно з міжнародними епідеміологічними дослідженнями (World Development Report), в більшості країн інсульт посідає 2-3-є місце в структурі загальної смертності населення (в Україні – друге), поступаючись лише кардіоваскулярній патології. За даними популяційних досліджень, на підставі аналізу світової динаміки передбачається, що до 2020 р. інсульт як самостійна причина смертності посяде 4-те місце [224].

Кардіальна дисфункція є частим та загрозливим ускладненням гострого інсульту [225]. Незважаючи на те, що відновленням перфузії можливо «врятувати» життєздатні клітини ішемічної напівтіні головного мозку, реперфузія може викликати реперфузійне ушкодження клітин мозку. Іноді реперфузія призводить до більшого тканинного пошкодження, ніж її відсутність [226]. Кардіальна дисфункція або цереброкардіальний синдромом (ЦКС), проявляється патологічними змінами у серці та функціональними порушеннями серцево-судинної системи.

Проведені нами дослідження доводять, що в умовах фокальної ішемії головного мозку змінюється кардіогемодинаміка щурів.

Під час ішемії головного мозку виявлено систолічну дисфункцію. При вивченні показників насосної функції серця нами виявлено, що значення УО, ХОК під час ішемії ГМ були достовірно нижче, ніж у контрольній групі. Ці зміни визначалися вже з перших хвилин ішемії. При цьому організм за рахунок змін ЧСС намагався компенсувати недостатню насосну функцію серця. Ішемія ГМ впливала на скоротливу активність міокарда – збільшилася максимальна швидкість наростання тиску ЛШ на 30-ій хвилині на 20,8 % ( $P<0,05$ ), кінцево-сistolвчний тиск на 60-ій хвилині збільшився на 28,5 % ( $P<0,05$ ). Ці зміни можуть відбуватися за рахунок активації симпато-адреналової системи і бути компенсаторною реакцією організму на значне зниження УО підчас ішемії. Про зниження скоротливої активності міокарда також свідчить зниження фракції викиду.

В умовах ішемії головного мозку у щурів виявлено порушення функції розслаблення міокарда, діастолічна дисфункція. На це вказує збільшення КДТ, зниження максимальної швидкості зниження тиску, збільшення кінцево-діастолічної жорсткості міокарда та константи активного розслаблення.

За даними клінічних досліджень, у хворих на ішемічний інсульт нещодавно виявили що при ехокардіографії у 13-29 % хворих виявляється систолічна дисфункція з підвищенням вмісту в крові рівня серцевого тропоніну та фібриляцією передсердь, що призводить до високого ризику госпітальної смертності [83] та діастолічної дисфункції [84]. Серцева діастолічна дисфункція призводить до підвищення кінцевого діастолічного тиску у лівому шлуночка та збудження симпато-адреналової системи, що може спричинити до дисфункцію ендотелію та подальшу гіперкоагуляцію крові. [84].

Таким чином, отримані результати досліджень *in vivo* на щурах в умовах фокальної ішемії головного мозку збігаються з клінічними дослідженнями у хворих з ішемічним інсультом.

Рання реперфузія головного мозку супроводжувалась порушенням показників насосної функції серця (ударний об'єм зменшився на 32,6 %, хвилинний об'єм крові – на 43,3 %) та скоротливої активності міокарда (зменшення  $dP/dt_{max}$  на 25,4 %). Показники насосної функції серця: ударний об'єм, хвилинний об'єм крові, через 24 години збільшувались порівняно з показниками, зареєстрованими перед реперфузією ГМ.

Під час ранньої реперфузії показник кінцево-діастолічної жорсткості міокарда залишався на високому рівні, як і під час ішемії. Константа активного розслаблення була подовжена, що може вказувати на більш тривалий період активного розслаблення, який супроводжується значними енерговитратами.

Проте через 24 години реперфузії кінцево-діастолічна жорсткість міокарда знизилась на 61,2 % відносно показника останньої хвилини ішемії, але залишалась на 47,2 % більше контролю; максимальна швидкість зниження тиску збільшилась в 2,4 рази порівняно з ішемією і достовірно не відрізнявся від контролю; константа активного розслаблення суттєво знизилась.

Отримані данні вказують, що неможливо виключити нейрогенний реперфузійний вплив на функцію серця під час ішемії і особливо при реперфузії тканин ГМ, що може супроводжуватись суттєвою активацією симпатoadреналової системи, та зростанням рівня катехоламінів крові. А гіперкатехолемія в свою чергу може мати негативний вплив на функцію серця [227].

Для вивчення цереброкардіального синдрому нами були проведені біохімічні дослідження. Під час біохімічних досліджень, направлених на вивчення механізмів розвитку цереброкардіального синдрому, ми визначали зміни показників оксидативного та нітрозативного стресів. Маркери оксидативного та нітрозативного стресів досліджували як в виділених мітохондріях міокарда так і в гомогенаті тканин серця.

Фізіологічні дози АФК, згідно з теорією „гормезису” (оксидативний стрес здатний максимально адаптувати захисні сили і адаптивні можливості організму за умов дії стресових чинників), можуть відігравати регуляторну роль в адаптації організму, у тому числі органів серцево-судинної системи, до змін навколишнього чи внутрішнього середовища. Відомо, що в умовах патології, в нашому випадку – фокальна ішемія-реперфузія головного мозку, коли утворення АФК збільшується надмірно, як в організмі в цілому, так і в міокарді серця, це може бути одним з механізмів розвитку цереброкардіального синдрому [90, 107]. Через 24 год. після моделювання фокальної ішемії-реперфузії головного мозку в мітохондріях серця щурів спостерігається як значне збільшення генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  і  $\cdot\text{OH}$ , так і надмірне зростання пулів стабільного  $\text{H}_2\text{O}_2$ , при цьому значно активуються ксантинооксидазний, циклооксигеназний та ліпооксигеназний шляхи генерації  $\cdot\text{O}_2^-$ , підтвердженням чого є збільшення рівнів сечової кислоти,  $\text{TxB}_2$  та  $\text{LTC}_4$ , як маркерів цих процесів. В умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку в мітохондріях серця значно зростає інтенсивність процесу ПОЛ, підтвердженням цього є підвищення пулів ДК і МДА внаслідок активації генерації  $\cdot\text{OH}$ -радикалу, що є ініціатором ПОЛ, в реакції Фентона, на що вказує збільшення рівня вільного заліза, каталізатора цієї

реакції, в мітохондріях. При дослідженні показників оксидативного стресу в гомогенаті тканин серця також виявлено зростання пулів стабільного  $\text{H}_2\text{O}_2$ , збільшення генерації вільних радикалів  $\text{O}_2^{\cdot-}$  і  $\text{OH}^{\cdot}$ , відбувається значне підвищення перекисного окиснення ліпідів, про що свідчить збільшення пулів ДК і МДА. Збільшення генерації вільних радикалів, активація ПОЛ підтверджують розвиток оксидативного стресу в кардіоміоцитах, в умовах ішемії-реперфузії головного мозку. Оксидативний стрес в міокарді, таким чином, є одним з механізмів розвитку і прояву цереброкардіального синдрому.

Ми встановили, що в гомогенаті тканин серця та мітохондріях міокарда щурів, в умовах ішемії-реперфузії головного мозку, відбувається активація індукцйбельного *de novo* синтезу NO за рахунок окиснення L-аргініну, про це свідчить зростання активності iNOS. Активізується неокисний, реутилізаційний синтез NO, за рахунок відновлення окиснених стабільних метаболітів NO-мітохондріальних пулів нітрат- і нітрит-аніонів, які при цьому зростають, що є доказом утворення і розпаду АФА пероксинітриту ( $\text{ONOO}^-$ ) – основного маркера розвитку нітрозативного стресу. Серед пошкоджуючих впливів останнього слід окремо відмітити його здатність індукувати ПОЛ. Одночасне посилене утворення NO і  $\text{O}_2^{\cdot-}$  створює умови для їх взаємодії між собою із утворенням високотоксичного  $\text{ONOO}^-$  [228, 229, 230]. Доказом індукції нітрозативного стресу також є зростання пулів нітрузо тіолів.

Розвиток оксидативного та нітрозативного стресів, в міокарді при цереброкардіальному синдромі призводить до порушення електрогенезу, ініціює патологічні морфофункціональні зміни кардіоміоцитів, призводить до погіршення перебігу ішемічного інсульту [90]. Окисне пошкодження білкових і ліпідних компонентів внутрішньої мембрани мітохондрій збільшує неспецифічну проникність останньої, внаслідок відкривання пори перемінної проникності [96]. Ці процеси ініціюють розвиток апоптозу кардіоміоцитів і порушення функції серця [97]. Ступінь гіперперфузії головного мозку корелює з кардіальними порушеннями [81].

Кардіопротекторний ефект введення L-цистеїну на тлі блокади цистатіонін-γ-ліази - одного з ферментів його синтезу, за допомогою DL-пропаргілгліцину, який був отриманий при ішемії-реперфузії міокарда, був підтверджений і в умовах фокальної церебральної ішемії-реперфузії.

Попереднє введення комбінації DL-пропаргілгліцину та L-цистеїну попереджувало систолічну та діастолічну дисфункції ЛШ при фокальній ішемії-реперфузії ГМ.

Зниження вмісту генерації вільних радикалів  $\cdot\text{O}_2^-$  і  $\cdot\text{OH}$  та пулів  $\text{H}_2\text{O}_2$  в гомогенаті тканин серця через 24 год після фокальної ішемії-реперфузії ГМ вказує на можливість комбінації вище вказаних сполук зменшувати розвиток та прояви оксидативного стресу. Підтвердженням цього також є зменшення вмісту МДА, кінцевої високотоксичної сполуки у процесі ПОЛ.

Зменшувалась індукція нітрозативного стресу після введення комбінації DL-пропаргілгліцину та L – цистеїну, що підтверджено достовірним зниженням активності iNOS та вмісту  $\text{NO}_3^-$  в гомогенаті тканин серця через 24 год після моделювання фокальної ішемії-реперфузії ГМ.

При розвитку оксидативного стресу в мітохондріях серця, в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку, екдистерон проявив потужну антирадикальну дію. В мітохондріях серця тварин, які отримували екдистерон, спостерігаються, як значно менші рівні генерації АФК ( $\cdot\text{O}_2^-$  і  $\cdot\text{OH}$ ), так і суттєве зниження вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Важливими шляхами генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  в мітохондріях серця, особливо при оксидативному стресі, є дихальний ланцюг, а також діяльність ксантинооксидази, циклооксигенази, ліпооксигенази. У тварин, які отримували екдистерон, достовірно менше зростали рівні сечової кислоти,  $\text{TxB}_2$  та  $\text{LTC}_4$  в мітохондріях серця після фокальної ішемії-реперфузії головного мозку порівняно з показниками тварин, яким моделювалася ішемія-реперфузія головного мозку, але які його не отримували. Отримані результати вказують на наявність у екдистерона інгібуючої дії на всі три досліджені шляхи генерації  $\cdot\text{O}_2^-$ . Зниження ферментативного окиснення вільної арахідонової кислоти і пригнічення

генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  передбачає не лише можливе інгібування активності ліпідних оксидаз, але і пригнічення гідролізу фосфоліпідів фосфоліпазою A2, тобто можливість екдистерону запобігати пошкодженню мембран мітохондрій міокарда в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку.

В процесі ПОЛ утворюються нестійкі гідроперикиси ліпідів, розпад яких призводить до появи різноманітних вторинних продуктів - ДК, МДА, тощо. Надмірна активація ПОЛ в мітохондріях серця в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку може ініціювати набухання мітохондрій з роз'єднанням окисного фосфорилування й інактивацією тілових ферментів, що беруть участь у диханні та гліколізі [203, 204]. Відомо [212, 214], що екдистерон внаслідок зменшення генерації ініціатора ПОЛ –  $\cdot\text{OH}$ , може уповільнювати ланцюгову реакцію ПОЛ. Це повністю підтверджують наші результати.

Профілактичне вживання рослинного екстракту *Serratula coronata*, збагаченого екдистероном, попереджало індукцію нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку. Про це свідчать отримані нами результати. В виділених мітохондріях міокарда тварин, які отримували екдистерон, в умовах фокальної ішемії-реперфузії головного мозку, зменшувалась активність iNOS, тим самим зменшує ймовірність утворення АФА.

Досліджуючи прояви нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів за експериментальної фокальної ішемії-реперфузії головного мозку та кардіопротекторної дії екдистерону, ми також визначали продукти нітрозилювання АФА низькомолекулярних тіолів, в основному глутатіону - низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ) і високомолекулярних нітрозотіолів (ВМНТ), що є продуктами нітрозилювання SH-груп цистеїну в білках. У тварин, які перед моделюванням фокальної ішемії-реперфузії головного мозку отримували екдистерон рівні маркерів нітрозативного стресу – нітрозотіолів, у мітохондріях серця були достовірно менші.

Таким чином, одним із можливих механізмів кардіопротекторної дії екдистерону є нормалізація синтезу NO в мітохондріях ізоферментом iNOS, (що

не конкурує з аргіназою за субстрат, позаяк використовує механізм ресинтезу свого субстрату – L-аргініну виключно із копродукту синтезу NO– L-цитруліну) внаслідок інгібування активності мітохондріальної аргінази II. Причини таких взаємостосунків iNOS та аргінази II в мітохондріях ще мають бути встановлені. Однією із можливих причин може бути інгібування активуючого фермента iNOS, його вільнорадикального окиснення за рахунок обмеження перетворення  $H_2O_2$  в  $\cdot OH$  радикал в реакціях Хабера-Вайса чи Фентона. Це відбувається внаслідок інгібування генерації  $\cdot OH$ -радикала за рахунок хелатування вільного заліза карбамідом, що є продуктом аргіназної реакції. Але більш вірогідним є інгібування iNOS гуанідиносукцинатом, попередником якого може бути карбамід (це рідкісна, поряд з реакцією карбаміювання, реакція прямого включення молекул карбаміду в обмін речовин) внаслідок прямого інгібування ресинтезу L-аргініну із L-цитруліну в т.з. цитруліновому циклі [231].

## ВИСНОВКИ

Проведено дослідження з вивчення патофізіологічних механізмів розвитку і корекції кардіальних порушень при фокальній церебральній ішемії-реперфузії. Виявлено, що основним індуктором таких порушень є розвиток окисно-нітрозативного стресу в тканинах і мітохондріях серця, в той час, як корекція окисного метаболізму за допомогою DL-пропаргілгліцину – L-цистеїну та екдистерону супроводжувалася попередженням функціональних порушень роботи серця.

1. Виявлено, що фокальна ішемія ГМ супроводжувалась проявами систолічної дисфункції: УО на 1-й хвилині ішемії зменшився на 55,9 %, на 10-й, 30-й і 60-й хвилині – на 62,6 %, 53,8 % і 51,6 % відповідно. ХОК залишався суттєво зниженим: на 1-й хвилині ішемії ГМ – на 58,6 %, на 10-й – на 63,3 %, на 30-й – на 51,4 %, на 60-й – на 41 %. Порушувалися процеси релаксації ЛШ – діастолічна дисфункція. КДТ на 60-й хвилині ішемії ГМ підвищився в 3 рази. Кінцево-діастолічна жорсткість міокарда на 1-й хвилині ішемії підвищилася у 2 рази, на 60-й – 3,8 рази. Також виявлено суттєве збільшення константи активного розслаблення.

2. У ранній період реперфузії проявляються порушення насосної функції серця (УО зменшився на 32,6 %, ХОК – на 43,3 %) та скоротливої активності міокарда – зменшення максимальної швидкості наростання тиску, в порівнянні з останньою хвилиною ішемії. Порушувалася релаксація ЛШ – кінцево-діастолічна жорсткість міокарда залишалася на високому рівні, константа активного розслаблення була подовжена. Через 24 год після фокальної ішемії-реперфузії ГМ виявлене відновлення і навіть перевищення показників систолічної функції серця.

3. У мітохондріях та гомогенаті тканин серця в умовах фокальної ішемії-реперфузії ГМ показано розвиток оксидативного стресу: активація генерації АФК, інтенсифікація ПОЛ, про що свідчить підвищення пулів ДК і МДА.



4. В умовах ішемії-реперфузії ГМ у мітохондріях та гомогенаті тканин серця щурів визначалась індукція нітрозативного стресу: активація індукцибельного *de novo* синтезу NO; підвищення пулів нітрат-аніонів.
5. Попереднє введення комбінації сполук DL-пропаргілгліцину та L-цистеїну збільшувало виживання тварин через 24 год після моделювання фокальної ішемії-реперфузії ГМ; сприяло збереженню показників насосної функції серця; попереджувало порушення діастолічної функції серця – поліпшенню процесу релаксації лівого шлуночка, зниженню кінцево-діастолічної жорсткості міокарда. В серці зменшувалися прояви окисно-нітрозативного стресу, індукованого фокальною ішемією-реперфузією ГМ, що може бути використане в клінічній практиці для профілактики і попередження наслідків ішемічно-реперфузійного пошкодження.
6. Дія екдистерону суттєво зменшувала прояви оксидативного та попереджувала індукцію нітрозативного стресів у мітохондріях серця щурів при фокальній ішемії-реперфузії ГМ.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Li WA, Geng X, Ding Y. Stroke is a global epidemic: new development sinclinical and translational cerebrovascular diseases research. *Neurol Res.* 2017 Jun;39(6):475-476
2. Mendis S, Davis S, Norrving B. Organizational update: the world health organization global status report on noncommunicable diseases 2014. — one more landmark step in the combat against stroke and vascular disease. *Stroke.* 2015 May;46(5):e121-2.
3. Thrift AG, Thayabaranathan T, Howard G, Howard VJ, Rothwell PM, Feigin VL, et al. Global stroke statistics. *Int J Stroke.* 2017 Jan;12(1):13-32.
4. Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, Moran AE, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2014 Jan 18;383(9913):245-54.
5. Huang SW, Chi WC, Chang KH, Yen CF, Liao HF, Escorpizo R, Liou TH. World health organization disability assessment schedule 2.0 as an objective assessment tool for predicting return to work after a stroke. *Disabil Rehabil.* 2018 Oct;40(21):2592-97.
6. Toyoda K. Epidemiology and registry studies of stroke in Japan. *J Stroke.* 2013 Jan;15(1):21-6.
7. Мищенко ТС. Епидемиологія цереброваскулярних захворювань і організація допомоги больним с мозговим інсультом в Україні. *Укр. вісн. психоневрол.* 2017; 25, вип. 1 (90):22-4.
8. Стрес і хвороби системи кровообігу : посібник / за ред.: В. М. Коваленко, В. М. Корнацького. Київ : Колосішин В. Ю., 2015. 352 с.
9. Ahluwalia N, Drouet L, Ruidavets JB, Perret B, Amar J, Boccalon H, et al. Metabolic syndrome is associated with markers of subclinical atherosclerosis in a French population-based sample. *Atherosclerosis.* 2006 Jun; 186(2):345-53.
10. Adams RJ, Chimowitz MI, Alpert JS, Awad IA, Cerqueria MD, Fayad P. Coronary risk evaluation in patients with transient ischemic attack and ischemic

stroke: a scientific statement for health care professionals from the Stroke Council and the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. American Stroke Association. Stroke. 2003 Sep;34(9):2310-22.

11. Олешко ТБ, Сотніков ДД. Роль ендотеліальної дисфункції в патогенезі ішемічного інсульту: (огляд літератури). Журн. клін. та експерим. мед. дослідж. 2015;3(2):165-73.

12. Зозуля ІС, Мошенська ОП. Гострий період ішемічного інсульту: сучасний погляд на проблему. Український медичний часопис. 2009; 4:67-73.

13. Vernino S, Brown RD Jr, Sejvar JJ, Sicks JD, Petty GW, O'Fallon WM. Cause-specific mortality after first cerebral infarction (a population-based study). Stroke. 2003 Aug;34(8):1828-32.

14. European Stroke Prevention Study. ESPS Group. Stroke. 1990 Aug;21(8):1122-30.

15. Swedish Aspirin Low-Dose Trial (SALT) of 75 mg aspirin as secondary prophylaxis after cerebrovascular ischaemic events. The SALT Collaborative Group. Lancet. 1991 Nov 30;338(8779):1345-9.

16. Schwartz PJ, Zaza A, Locati E, Moss AJ. Stress and sudden death. The case of the long QT syndrome. Circulation. 1991 Apr;83(4 Suppl):II71-80.

17. Benerjee A, Silver LE, Heneghan C. et al. Population-based comparison of risk factors for ischaemic stroke versus acute coronary syndromes: identical twins or distant relatives? Cerebrovascular diseases. Abstracts of 17th European Stroke conference, Nice, France. 2008; 25(2):16.

18. Hyvärinen M, Qiao Q, Tuomilehto J, Söderberg S, Eliasson M, Stehouwer CD. The difference between acute coronary heart disease and ischaemic stroke risk with regard to gender and age in Finnish and Swedish population. Int J Stroke. 2010 Jun;5(3):152-6.

19. Угрюмов В.М. Проблема нейродистрофий внутренних органов центрального происхождения //Л. «Медицина» 1972.

20. Wolfe CD, Giroud M, Kolominsky-Rabas P, Dundas R, Lemesle M, Heuschmann P, Rudd A. Variations in stroke incidence and survival in 3 areas of Europe. European Registries of Stroke (EROS) Collaboration. *Stroke*. 2000 Sep;31(9):2074-9.
21. Віничук С.М. Мозковий інсульт: Навчальний посібник. К., 1998. 4-5 с.
22. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol*. 1994 Oct;36(4):557-65.
23. Baron JC, Boussier MG, Rey A, Guillard A, Comar D, Castaigne P. Reversal of focal "misery-perfusion syndrome" by extra-intracranial arterial bypass in hemodynamic cerebral ischemia. A case study with 15O positron emission tomography. *Stroke*. 1981 Jul-Aug;12(4):454-9.
24. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981 Nov-Dec;12(6):723-5.
25. Grau AJ, Weimar C, Buggle F, Heinrich A, Goertler M, Neumaier S, Glahn J, et al. Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke*. 2001 Nov;32(11):2559-66.
26. Ringelstein EB, Weiller C. Pattern of cerebral infarct in computerized tomography. Pathophysiologic concepts, validation and clinical relevance *Nervenarzt*. 1990 Aug;61(8):462-71.
27. Kushch KO, Klygunenko OM, Zozulya OO. Effect of combination neurometabolic therapy on regression of neurological symptoms in patients with acute ischemic stroke. *Медицина невідкладних станів*. 2017;5(84):86-90.
28. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*. 1999 Oct;79(4):1431-568.
29. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4:399-415.
30. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*. 2000 May;6(5):513-9.

31. Pallast S, Arai K, Wang X, Lo EH, van Leyen K. 12/15-Lipoxygenase targets neuronal mitochondria under oxidative stress. *J Neurochem.* 2009 Nov;111(3):882-9.
32. Kuzhandaivel A, Nistri A, Mladinic M. Kainate-mediated excitotoxicity induces neuronal death in the rats pinal cord *in vitro* via a PARP-1 dependent cell death pathway (Parthanatos). *Cell Mol Neurobiol.* 2010 Oct;30(7):1001-12.
33. Aarts M, Iihara K, Wei WL, Xiong ZG, Arundine M, Cerwinski W, MacDonald JF, et al. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell.* 2003 Dec 26;115(7):863-77.
34. Sen N, Hara MR, Ahmad AS, Cascio MB, Kamiya A, Ehmsen JT, et al. GOSPEL: a neuroprotective protein that bindsto GAPDH upon S-nitrosylation. *Neuron.* 2009 Jul 16;63(1):81-91.
35. Qin AP, Zhang HL, Qin ZH. Mechanisms of lysosomal proteases participating in cerebral ischemia-induced neuronal death. *Neurosci Bull.* 2008 Apr;24(2):117-23.
36. Kent TA, Soukup VM, Fabian RH. Heterogeneity affecting outcome from acute stroke therapy: making reperfusion worse. *Stroke.* 2001; 32(10):2318-27.
37. Lee SH, Lee JJ, Kim GH, Kim JA, Cho HS. Role of reactive oxygen species at reperfusion stage in isoflurane preconditioning-induced neuroprotection. *Brain Res.* 2019 Nov 15;1723:146405.
38. Obadia N, Lessa MA, Daliry A, Silvaes RR, Gomes F, Tibiriçá E, Estado V Cerebral microvascular dysfunction in metabolic syndrome is exacerbated by ischemia-reperfusion injury. *BMC Neurosci.* 2017 Sep 8;18(1):67.
39. Forster C, Clark HB, Ross ME, Iadecola C. Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts. *Acta Neuropathol.* 1999 Mar;97(3):215-20
40. Влияние окислительного стресса на активность синтазы оксида азота мозга *in vivo* и *in vitro* / М.В. Онуфриев, М.Ю. Степаничев, О.С. Митрохина [и др.] // *Рос. физиол. ж. им. И.М. Сеченова.* – 1999. – № 4. – С. 531-538.

41. Роль оксида азота в ишемических и ишемически-реперфузионных повреждениях головного мозга. В.О. Куровская, В.П. Пишак, С.С. Ткачук Вук. Med. Herald. – 2008. – Vol.12, №4.–Р.143-149
42. Оксид азоту та імунна система організму / А.І. Гоженко, І.В. Ніколаєвська, С.Г. Котюжинська [та ін.] // Мед. хімія. – 2001. - № 3. - С. 5-8.
43. Роль оксида азота в регуляції мікроциркуляції і агрегантного стану крові / А.І. Гоженко, С.Г. Котюжинська, А.П. Котюжинський [и др.] // Укр. мед. альманах. – 2000. – № 1. – С. 197-200.
44. Малышев И. Стресс, адаптация и оксид азота / И.Малышев, Е.Манухина // Биохимия. – 1998. – № 7. – С. 992-1006.
45. Максимович Н.Е. Особенности формирования уровня оксида азота в плазме крови крыс при ишемических и реперфузионных повреждениях головного мозга / Н.Е.Максимович // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2004. – № 3. – С. 55-60.
46. Зайниддинова Р. Роль нитроксидергической системы в патогенезе поражения головного мозга / Р.Зайниддинова, А.Степанов // Рос. педиатр. ж. – 2005. – № 5. – С. 21-25.
47. Зенков Н.К. NO-синтазы в норме и при патологии различного генеза / Н.К.Зенков, Е.Б.Меньщикова, В.П.Реутов // Вестн. РАМН. – 2000. – № 4. – С. 30-34.
48. Реутов В. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота / В.Реутов, Е.Сорокина // Биохимия. – 1998. – № 7. – С. 1029-1040.
49. Реутов В.П. Медико-биологические аспекты циклов оксида азота и супероксидного анионрадикала / В.П.Реутов // Вестн. РАМН. – 2000. – № 4. – С. 35-41.
50. Механизмы передачи сигнала оксидант-оксид азота в сосудистой ткани / М.С.Волин, К.А.Девидсон, П.М.Камински [и др.] // Биохимия. – 1998. – № 7. – С. 958-965.

51. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях / А.Ф.Ванин // Вестн. РАМН. – 2000. – № 4. – С. 3-5.

52. Дослідження антирадикальних властивостей s-карбоксалкільних похідних 4-тіохіназоліну в дослідах *in vitro* у системі утворення оксиду азоту / С.І.Коваленко, І.Ф.Бєленічев, О.В.Карпенко [та ін.] // Ліки. – 2003. - № 1-2. – С. 68-72.

53. Семакс предупреждает повышение генерации оксида азота в мозге крыс, обусловленное неполной глобальной ишемией / О.Е.Фадюкова, А.А.Алексеев, В.Г.Башкатова [и др.] // Эксперим. и клин. фармакол. – 2001. – № 2. – С. 31-34.

54. Gajkowska B. Endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium of rat hippocampus after ischemia: evidence and significance / B.Gajkowska, M.J.Mossakowski // *Fol. Neuropathol.* – 1997. – № 3. – P. 171-180.

55. Гипоксия и оксид азота / И.Ю.Малышев, Е.А.Монастырская, Б.В.Смирин [и др.] // Вестн. РАМН. – 2000. – № 9. – С. 44-48.

56. Пархоменко А.М. Патологические механизмы ишемического и реперфузионного повреждения миокарда в экспериментальных и клинических исследованиях / Пархоменко А.М. // Український кардіологічний журнал. – 2000. – № 5-6. – С. 95-99.

57. Бобров В.А. Реперфузионные аритмии: механизмы формирования / Бобров В.А., Долженко М.Н., Довганич Н.В. // Український кардіологічний журнал. – 2003. – № 3. – С. 99-103.

58. Бобров В.А. Реперфузионные аритмии: теоретические предпосылки и клинические аспекты / Бобров В.А., Малиновская И.Э. // Врачебное дело. – 1993. – № 7. – С. 23-30. 302.

59. Бобров В.А. Реперфузионные аритмии: механизмы развития, пути коррекции / Бобров В.А., Симорот В.Н. // Терапевтический архив. – 1993. – Т. 65, № 9. – С. 56-62.

60. Aufderheide T.P. Arrhythmias associated with acute myocardial infarction and thrombolysis / Aufderheide T.P. // *Emerg. Med. Clin. N. Amer.* – 1998. – Vol. 16, № 3. – P. 583-600.

61. Van Wagoner D.R. Reperfusion arrhythmias: new insights into the role of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger / V. Wagoner D.R., Bond M. // *J. Moll. Cell. Cardiology.* – 2001. – V. 33. – P. 2071-2074.

62. Carmeliet E. Cardiac ionic current and acute ischemia: from channels to arrhythmias / Carmeliet E. // *Physiol. Res.* – 1999. – V. 99, № 3. – P. 917-1017.

63. Сагач В. Ф., Шиманська Т. В., Надточій С. М. Попередження постреперфузійних порушень функції серця та неефективного використання кисню за допомогою інгібіторів відкриття мітохондріальної пори. // *Фізіол. журн.* – 2002. – Т.48, №1. – С.3-10.

64. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // *Biochem.J.* 1999. 341. P.233 249.

65. Crompton M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death // *J. Physiol.* 2000. 529, N1. P.11 21.

66. Hausenloy D.J., Maddock H.L., Baxter G.F., Yellon D.M. Inhibiting induces mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning ? // *Cardiovas. Res.* 2002. 55. P. 534 543.

67. Kroemer G., Zamzami N., Susin S.A. Mitochondrial control of apoptosis // *Immunol. Today.* 1997. 18. P. 44 51.

68. Mather M., Rottenberg H. Ageing enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria // *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 2000.- 273. P. 603 608.

69. Halestrap A. Mitochondria and cell death // *The Biochemist.* 2000. P.19 24.

70. Crompton M., Costi A. A heart mitochondrial Ca induced pore of possible relevance to reperfusion injury // *Biochem.J.* 1990. 266. P.33 39.

71. Hunter P., Haworth R. The Ca induced membrane transition in mitochondria // *Arch. And Biochem.Biophys.* 1979. 195. P.468 477.



72. Nazareth W., Yafei N., Crompton M. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A // J.Mol.Cell.Cardiol. 1991. 23. P.1351-1354.

73. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Акопова О.В. Вплив індукторів та інгібіторів мітохондріальної пори на її утворення та на вивільнення не ідентифікованого мітохондріального фактора. // Фізіол. журн. – 2003. – Т.49, №1. – С.3-11.

74. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мохорт М.А., Шаламай А.С. Організація промислового виготовлення препарату Флокалін - нового вітчизняного міотропного спазмолітика і кардіопротектора // Наука та інновації. - 2009. - Т.5, №1. - С.80-84.

75. Струтинський Р.Б. Основні кардіопротекторні ефекти нового вітчизняного фторвмісного активатора КАТФ каналів – препарату Флокалін // Медична гідрологія і реабілітація. -2009. – Т.7, №4. - С.4-12.

76. Струтинський Р.Б., Коцюрба А.В., Нещерет О.П., Ровенець Р.А., Мойбенко О.О. Зміни метаболізму в міокарді при ішемії-реперфузії та активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів // Фіз.журн. – 2012. – Т.58, №1 – С.13-26.

77. Струтинський Р., Мохорт М., Ягупольський Л., Мойбенко О. Флокалін - новий вітчизняний кардіопротектор// Вісник фармакології та фармації. – 2010. – №3. - С.44-56.

78. Lavy S, Yaar I, Melamed E, Stern S. The effect of acute stroke on cardiac functions as observed in an intensive stroke care unit Stroke. 1974 Nov-Dec;5(6):775-80.

79. Reinstein L, Gracey JG, Kline JA, Van Buskirk C. Cardiac monitoring of the acute stroke patient. Arch Phys Med Rehabil. 1972 Jul;53(7):311-4.

80. Mikolich JR, Jacobs WC, Fletcher GF. Cardiac arrhythmias in patients with acute cerebrovascular accidents. JAMA. 1981 Sep 18;246(12):1314-7.

81. Долгов АМ. Цереброкардиальный синдром при ишемическом инсульте. Вестн. интенс. тер. 1995;2:15-18.

82. Лиманкина ИН. Цереброкардиальный синдром. Вестн. аритмологии. 2009;58:26-34.
83. Wira CR, Rivers E, Martinez-Capolino C, Silver B, Iyer G, Sherwin R, Lewandowski C. Cardiac Complications in Acute Ischemic Stroke. West J Emerg Med. 2011;12(4):414–20.
84. Mitsuma N, Ito D, Hattori M, Nishi R, Kawabata K, Yamada S, Yokoi S, et al. Cardiac diastolic dysfunction is associated with elevation of coagulability in acute cerebral infarction patients. Cerebrovascular disorders II. 2012.
85. Korpelainen JT, Sotaniemi KA, Mäkikallio A, Huikuri HV, Myllylä VV. Dynamic behavior of heart rate in ischemic stroke. Stroke. 1999 May;30(5):1008-13.
86. Tung P, Kopelnik A, Banki N, Ong K, Ko N, Lawton MT, Gress D et al. Predictors of neurocardiogenic injury after subarachnoid hemorrhage. Stroke. 2004 Feb;35(2):548-51.
87. Кушаковский М.С. Метаболические болезни сердца. // СПб Фолиант. 2000.
88. Johnson RH, Lambie DG, Spalding JMK. Neurocardiology: The Interrelationships Between Dysfunction in the Nervous and Cardiovascular System. //London, England: WB Saunders; 1984: 66-70.
89. Raab W. The Neurogenic Metabolic Factor in Ischemic Heart Disease. Chest. 1964;46:150-7.
90. Жданов ГН, Герасимова ММ. Изучение содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных в остром периоде ишемического инсульта. Цитокины и воспаление. 2006;5(1):27-30.
91. Симбирцев АС. Цитокины: классификация и биологические функции. Цитокины и воспаление. 2004;3(2):16-22.
92. Bartko D., Ducat A., Janc oS. Et al. The heart and brain. Aspects of their interrelation. Vnitr Lec. 1996; 42: 482-9.

93. Ferrarese C., Mscarucci P., Zoai C et al. Increase cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke. *J Cerebr Blood Flow Metab.* 1999;19(9):1004-09.
94. di Villa Bianca RD, Sorrentino R, Sorrentino R, Imbimbo C, Palmieri A, Fusco F, et al. Sphingosine 1-phosphate induces endothelial nitric-oxide synthase activation through phosphorylation in human corpus cavernosum. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Feb;316(2):703-8.
95. Costantini P, Belzacq AS, Vieira HL, Larochette N, de Pablo MA, Zamzami N, Susin SA, et al. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene.* 2000;19(2):307-314.
96. Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD. Calcium and mitochondria. *FEBS Lett.* 2004;567(1):96-102.
97. Crompton M. Bax, Bidand the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000;12(4):414-19.
98. Sojitra B, Bulani Y, Putcha UK, Kanwal A, Gupta P, Kuncha M, Banerjee SK. Nitric oxidesynthase inhibition abrogates hydrogensulfide-induced cardio protectionin mice. *Mol. CellBiochem.* 2012;360: 61-9.
99. Ali MY, Ping CY, Mok YY, Ling L, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogensulphide? *Brit. J. Pharmacol.* 2006;149: 625-34.
100. Барабой ВА, Резнікод ОТ. Фізіологія, біохімія і психологія стресу. - Інтерсервіс. - К., 2013. - С. 314.
101. Schulz JB1, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 2000 Aug;267(16):4904-11.
102. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kopyak BS, Sagach VF. Induction of Oxidative Stress in Heart Mitochondria under Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion and Protective Effect of Ecdysterone. *Inte J Physiol and Pathophysiol.* 2015; 6 (2);,157-164.

103. Polumbryk M, Polymbryk O, Balion Y, Reznikov O. Proantioxidant system of a human body, oxidative stress, its effect and ways to over come. Scientific Works of NUFT. 2014; 20(4):19-29.
104. Min DB, Doff IM. Chemistry and Reaction of Singlet Oxygenin Foods // Comp. Rev. Food. Sei Food Safety. 2002;l:58-72.
105. Choe E, Min DB. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. Compreh. Rev Food Sei Food Safety.2009;8:345-58.
106. Polumbryk M, Ivanov S, Polumbryk O. Antioxidants in food systems. Mechanism of action. Ukr. J. Food Science.2013;.1:15-40.
107. Mayer SA1, Lin J, Homma S, Solomon RA, Lennihan L, Sherman D, Fink ME6 et al. Myocardial injury and left ventricular performance afters ubarachnoid hemorrhage. Stroke 1999;30(4):780-6.
108. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals and functional foods: impact on human health. Pharmacogn Rev. 2010 Jul;4(8):118-26.
109. Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB. Nitric oxideprotects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygens pecies Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Nov 1;90(21):9813-7.
110. А. К. Ф. Горпен, Б. Майер // Биохимия. – 1998. – № 7. – С. 870–880.
111. Меньщикова Е Б, Ланкин В З. Окислительный стрес. Проксиданты и антиоксидант. М.: "Слово", 2006. С 556 .
112. Alaghband-Zaden J, Mehdizadeh S, Khan NS, O'Farrell A, Bitensky L, Chayen J. The natural substrate for nitric oxide synthase activity. Cell Biochem Funct. 2001 Dec;19(4):277-80
113. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. 1988; L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. Biochem Biophys Res Commun. 1988 Jun 30;153(3):1251-6.
114. Дмитренко НП, Кишко ТО, Шандренко СГ, Аргинин СГ. Биологическое действие, влияние на синтез азота. Український хіміотерапевтичний журнал. 2008;. 1-2 (22): 137-140.

115. Reutov, V. P., Sorokina, E. G., Ohotin, V. E., Kosicin, N. S. (1998). *Ciklichesкое превращение оксида азота в организме млекопитающих*. Moscow: Nauka, 159.

116. Nakamura M, Yoshida H, Arakawa N, Mizunuma Y, Makita S, Hiramori K. Endothelium-dependent vasodilatation is not selectively impaired in patients with chronic heart failure secondary to valvular heart disease and congenital heart disease. *Eur Heart J*. 1996 Dec;17(12):1875-81.

117. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 1986 Apr 3-9;320(6061):454-6.

118. Башкатова В, Раевский К. Оксид азота в механизмах повреждения мозга, обусловленных нейротоксическим действием глутамата. *Биохимия*. 1998; 7: 1020–1028.

119. Nitric Oxide (NO) and Cancer. Prognosis, Prevention, and Therapy / Benjamin Bonavida Editor. — Springer. New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 2010. — 513 p.

120. Arteel GE, Briviba K, Sies H. Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett*. 1999 Feb 26;445(2-3):226-30.

121. Cline SD, Riggins JN, Tornaletti S, Marnett LJ, Hanawalt PC. Malon dialdehyde adducts in DNA arrest transcription by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 11;101(19):7275-80.

122. West JD, Ji C, Duncan ST, Amarnath V, Schneider C, Rizzo CJ, Brash AR, Marnett LJ. Induction of apoptosis in colorectal carcinoma cells treated with 4-hydroxy-2-nonenal and structurally related aldehydic products of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol*. 2004 Apr;17(4):453-62.

123. Giulivi C, Boveris A, Cadenas E. The steady state concentration of oxygen radicals in mitochondria. — *Reactive Oxygen Species in Biological System*. — New York; 1999:77-101.

124. Rhee HJ, Kim EJ, Lee JK. Physiological polyamines: simple primordial stress molecules. *J Cell Mol Med.* 2007 Jul-Aug;11(4):685-703.

125. Соловьев АИ, Стефанов АВ. Фармакология и токсикология оксида азота: два лица одной и той же молекулы. *Соврем. проблемы токсикологии.* 1998;1: 35-38.

126. Di Matteo MA, Loweth AC, Thomas S, Mabley JG, Morgan NG, Thorpe JR, Green IC. Superoxide, nitric oxide, peroxynitrite and cytokine combinations all cause functional impairment and morphological changes in rat islets of Langerhans and insulin secreting cell lines, but dictate cell death by different mechanisms Apoptosis. 1997;2(2):164-77.

127. Strick AT, Hogg N, Thomas JP. Nitric oxide donor compounds inhibit the toxicity of oxidized low-density lipoprotein to endothelial cells // *FEBS Lett.* 1995; 361: 291-4.

128. Зозуля Ю. Мультифункциональность и метаболизм оксида азота в центральной нервной системе / Ю.Зозуля, Л.Сенько // *Ж. Акад. мед. наук України.* – 2000. – № 1. – С. 3-26.

129. Викторов И.В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга / И.В.Викторов // *Вестн. РАМН.* – 2000. – № 4. – С. 5-10.

130. Оксид азота как активная форма кислорода / Т.В.Звягина, И.Е.Белик, А.А.Кривошей [и др.] // *Укр. мед. альманах.* – 2001. – № 6. – С. 203-206.

131. Goodwin L. R. Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis chromatography: postmortem studies and two case reports / L. R. Goodwin, D. Francom, F. P. Dieken [et al.] // *J Anal Toxicol.* – 1989. – V. 13, № 2. – P. 105-9.

132. Savage J. C. Determination of sulfide in brain tissue and rumen fluid by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography / J. C. Savage, D. H. Gould // *J Chromatogr.* – 1990. – V. 526, № 2. – P. 540– 5.

133. Abe K. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator / K. Abe, H. Kimura // J Neurosci. – 1996. – V. 16, № 3. – P. 1066–71.

134. The Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Heart Diseases: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential. [Электронный ресурс] / [Y. Shen, Z. Shen, S. Luo S та ін.] // Oxid Med Cell Longev. – 2015. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=PMC4442295>.

135. Cheang W.S., Wong W.T., Shen B., Lau C.W., Tian X.Y., Tsang S.Y., Yao X., Chen Z.Y., Huang Y. 4-aminopyridinesensitive K<sup>+</sup> channels contributes to NaHS-induced membrane hyperpolarization and relaxation in the rat coronary artery // Vascul. Pharmacol. – 2010. – 53, №3-4. – P. 94–98.

136. Van Zwieten P.A. Hydrogen sulphide: Not only foul smelling, but also pathophysiologically relevant // J. Hyperten. – 2003. – 21, №10. – P. 1819–1820.

137. Geng B., Chang L., Pan C., Qi Y., Zhao J., Pang Y., Du J., Tang C. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 2004. – 318. – P. 756–763.

138. Lowicka E., Beltowski J. Hydrogen sulfide the third gas of interest for pharmacologists // Pharmacol. Reports. – 2007. – 59. – P. 4–24.

139. Wang, R. Signal transduction and the gasotransmitters. NO, CO and H<sub>2</sub>S in biology and medicine. – Totowa: Humana press, 2004. – 377 p.

140. Kamoun P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals // Amino Acids. – 2004. – 26. – P. 243–254.

141. Hosoki R., Matsuki N., Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1997. – 237, №3. – P. 527–531.

142. Geng B., Yang J., Qi Y., Zhao J., Pang Y., Du J., Tang C. H<sub>2</sub>S generated by heart in rat and its effects on cardiac function // Ibid. – 313, №2. – P. 362–368.

143. Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener // *EMBO J.* – 2001. – 20. – P. 6008–6016.

144. Yong Q.C., Hu L-F., Wang S., Huang D., Bian J.S. Hydrogen sulfide interacts with nitric oxide in the heart: possible involvement of nitroxyl // *Cardiovascular. Res.* – 2010. – 88, №3. – P.482–491.

145. Bian J.S., Yong Q.C., Pan T.T., Feng Z.N., Ali M.Y., Zhou S., Moore P.K. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2006 – 316. – P. 670–678.

146. Sivarajah A., Collino M., Yasin M., Benetti E., Gallicchio M., Mazzon E., Cuzzocrea S., Fantozzi R., Thiemermann C. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial i/r // *Shock.* – 2009. – 31. – P. 267–274.

147. Т.В. Шиманська, Ю.В. Гошовська, О. М. Семеніхіна, В.Ф. Сагач Вплив сірководню на реакції ізольованого серця щурів при навантаженні об'ємом і ішемії–реперфузії *Фізіол. журн.*, 2012, Т. 58, № 6 P 57-66.

148. Pan T.-T., Neo K. L., Hu L.-F., Yong Q. C., Bian J.-S. H<sub>2</sub>S preconditioning-induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes // *Amer. J.*

149. Al-Magableh M. R., Hart J. L. Mechanism of vasorelaxation and role of endogenous hydrogen sulfide production in mouse aorta // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 2011. – 383. – P. 403–413.

150. Zhao W., Wang R. H<sub>2</sub>S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms // *Amer. J. Physiol. Heart. Circul. Physiol.* – 2002. – 283. – P. 474–480.

151. Струтинська Н. А., Семенихіна О.М., Чорна С.В., Вавілова Г. Л., Сагач В. Ф. Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкриття



мітохондріальної пори у серці дорослих і старих щурів / Там само. – 2011. – 57, №6. – С. 3–13.

152. Chai W., Y. Wang, J.Y. Lin, X.D. Sun, L.N. Yao, Y.H. Yang, H. Zhao, W. Jiang, C.J. Gao, Q. Ding. Exogenous hydrogen sulfide protects against traumatic hemorrhagic shock via attenuation of oxidative stress // J. Surg. Res. – 2011. – 176, №1. – P. 210–219.

153. Sun W.-H., Liu F., Chen Y., Zhu Y.-Ch. Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion//Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 2012. – 421, №2. – P. 164–169.

154. Шиманська Т.В., Гошовська Ю.В., Семенихіна О.М., Сагач В.Ф. Вплив сірководню на реакції ізольованого серця щурів при навантаженні об'ємом і ішемії–реперфузії // Фізіол. журн. – 2012. – 58, № 6. – С.57–66.

155. Шиманская Т.В., Струтинская Н.А., Вавилова Г.Л., Гошовская Ю.В., Семенихина Е.Н., Сагач В.Ф. Циклоспорин А-чувствительная митохондриальная пора как мишень кардиопротекторного действия донора сероводорода // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2013. – 99, №2. – С.261–272.

156. Moody B.F., Calvert J.W. Emergent role of gasotransmitters in ischemia-reperfusion injury // Med.Gas Res. – 2011. – 1, №1. – P. 3.

157. Lefler C.W., Parfenova H., Basuroy S., Umstor E.S., Fedinec A.L. Hydrogen sulfide and cerebralmicrovascular tone in newborn pigs// Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. –2011. – 300. – P.H440–H447.

158. Elsey D.J.,Fowkes R.C., Baxter G.F. L-cysteine stimulates hydrogen sulfide synthesis in myocardium associated with attenuation of ischemia-reperfusion injury // J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. – 2010. – 15, №1. – P. 53–59.

159. Xue M., Cui J., Xia W., Li Y., Qian L.B., Ye Z.G., Wang H.P., Xia Q. Effect of S-allyl-L-cysteine on isolate heart subject to ischemia/reperfusion // Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi. – 2011. – 27, №1. – P. 13–17.

160. В.Ф. Сагач, Т.В. Шиманська, Ю.В. Гошовська Вплив стимуляції та блокади синтезу ендogenous сірководню на функцію серця в умовах ішемії–реперфузії Фізіол. журн., 2013, Т. 5.

161. Шиманская Т.В, Ф.В.Добровольский, Г.Л.Вавилова, Н.А.Струтинская, Е.В.Рудык, Сагач В.Ф. NO-зависимая модуляция чувствительности открытия митохондриальной поры при ишемии–реперфузии изолированного сердца // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2009. – 95, №1. – С.28–37.

162. Kimura H. Hydrogen sulfide: Its production and functions // Exp. Physiol. – 2011. – 96, №9. – P. 833–835.

163. Jha S., Calvert J.W., Duranski M.R., Ramachandran A., Lefer D.J.. Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemiareperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling // Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2008 – 295, №2. – P.H801–H806.

164. Kimura, Y., Goto, Y., Kimura, H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria //Antioxid. Redox Signal. – 2010. – 12. – P.1–13.

165. Черенько ТМ. Маркеры воспаления и изменение церебрального кровотока у больных с различным клиническим течением ишемического инсульта. Серце і судини. 2004; 2: 39-46.

166. Norris JW, Zhu CZ, Bornstein NM, Chambers BR. , 1991; Vascular risks of asymptomatic carotid stenosis.Stroke. 1991 Dec;22(12):1485-90.

167. Wilterdink JL, Easton JD Prevention and treatment of stroke. Heart Dis Stroke. 1992 Mar-Apr;1(2):51-2.

168. Worlow C.P., Dennis M.S., Van Gayn J., Hanks G. J., Sanderok P. A. G., Bamford J. M., Wardlove F. Stroke. Practical guide for the management of patients, (first from Eng. AV Borisov, L.V. Bulba). Under the editorship of Skoromtsya AA, Sorokoumova VA SA-Pb, 1998.

169. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. ILAR J. 2003;44(2):85-95.

170. Smrcka M1, Otevrel F, Kuchtícková S, Kotala V, Muzík J. Experimental model of reversible focal ischemia in the rat. *Scriptamedica (BRNO)* 2001;(74):391-398.
171. Garcia JH. Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke*. 1984 Jan-Feb;15(1):5-14.
172. Mies G, Ishimaru S, Xie Y, Seo K, Hossmann KA. Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1991 Sep;11(5):753-61.
173. Hossmann KA. Studies of experimental cerebral ischemia with NMR spectroscopy. *Arzneimittelforschung*. 1991 Mar;41(3A):292-8.
174. Takizawa S, Hogan M, Hakim AM. The effects of a competitive NMDA receptor antagonist (CGS-19755) on cerebral blood flow and pH in focal ischemia Review. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1991 Sep;11(5):786-93.
175. Burkhoff D, Mirsky I, Suga H. Assessment of systolic and diastolic ventricular properties via pressure-volume analysis: a guide for clinical, translational, and basic researchers *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Aug;289(2):H501-12.
176. Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Batkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice. *Nat. Protoc*. 2008;3 (9):1422-34.
177. Suga H, Sagawa K. Graphical estimation of ventricular wallforce and stress from pressure-volume diagram. *Am J Physiol*. 1979 Jun;236(6):H787-9.
178. Suga H. Comments on "Pressure-Volume Relations in Isolated Cat Trabecula" letter to editor. *Circulation Research*.1984; February, 54 (2):208-9.
179. Suga H. Ventricular energetics.*Physiol. Rev*.1990;70 (2):247–77.
180. Suga H. How we view systolic function of the heart: Emax and PVA.- In:Systolic and diastolic function of the heart. Amsterdam: IOS Press and Ohmsha.1995;215–25.

181. Костерин СА, Браткова НФ, Курский МД. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия. Биохимия. 1985;50(8):1350-61.
182. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov;193(1):265-75.
183. Conte D, Narindrasorasak S, Sarkar B. In vivo and in vitro iron-replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage. J. Biol. Chem. 1996;271(9):5125-30.
184. McCord JM, Roy RS. The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. Can J Physiol Pharmacol. 1982 Nov;60(11):1346-52.
185. Forman HJ, Fridovich I. Superoxide dismutase: a comparison of rate constants Arch Biochem Biophys. 1973 Sep;158(1):396-400.
186. Kuthan H, Ullrich V, Estabrook RW. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. Biochem. J. 1982;203(3):551-8.
187. Huwiler M, Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / iodide system / Eur J Biochem. 1984 May 15;141(1):69-74.
188. Humphries KM, Yoo Y, Szweda LI. Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal. Biochemistry 1998;37(2):552-7.
189. Halliwell B, Grootveld M, Gutteridge JM. Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biomedical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. Methods Biochem Anal. 1988;33:59-90.
190. Gavrilov VB, Gavrilova AR, Khmara NF. Measurement of diene conjugates in blood plasma using the UV absorption of heptane and isopropanol extracts. Lab. Delo 1988;(2):60-4.
191. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal. Biochem. 1978;86(1):271-278.
192. Інструкція до набору реактивів для визначення заліза та залізо зв'язуючої здатності (Філісіт Діагностика). REF № HP012.01

193. Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent nitric oxide syntases. *FEBS Lett.* 1991 Oct 7;291(1):145-9.

194. Chin SY, Pandey KN, Shi SJ, Kobori H, Moreno C, Navar LG. Increased activity and expression of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1999 Nov;277(5):F797-804.

195. Boyde TR, Rahmatullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal Biochem.* 1980 Sep 15;107(2):424-31.

196. Alikulov ZA, L'vov NP, Kretovich VL. Nitrate and nitrite reductase activity of milk. *Biokhimiia.* 1980 Sep;45(9):1714-8. [In Ukrainian].

197. Tsukahara H1, Miura M, Tsuchida S, Hata I, Hata K, Yamamoto K, Ishii Y, et al. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. *Am J Physiol.* 1996 May;270(5 Pt 1):E840-5.

198. Gergel D, Cederbaum AI. Inhibition of the catalytic activity of alkoholdehydrogenase by NO is associated with S-nitrosylation and the release of zinc. *Biochemistry.* 1996 Dec 17;35(50):16186-94.

199. Shugalei VS, Kozina LS. Urea concentration and arginase activity in the organs of rats during acclimatization to cold *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova.* 1977 Aug;63(8):1199-1202. [In Russian].

200. Terskov IA, Gittelzon II. Method chimicheskikh (kislotnich) erythrogram. *Biophysika.* 1957; 2(2): 259-66 [In Russian].

201. Sharipov RR, Dorofeyeva NA, Sagach VF. Cardiohemodynamic Changes in Focal Cerebral Ischemia. *Inte J Physiol and Pathophysiol.* 2018; 9(4): 335-340.

202. Шаріпов Р. Р, Дорофєєва Н. О, Сагач В. Ф. Вплив реперфузії ішемізованої ділянки головного мозку на функціональний стан серця.// *Фізіол. журн.* – 2018– Т. 64, № 2. – С.90-95.

203. Gusev EI, Skvortsova VI, Kovalenko AV, Sokolov MA. Mechanisms of brain tissue damage in acute focal cerebral ischemia. Zh. Nevrol. Psikiatr. Im SS Korsakova 1999;99(2):65-70.

204. Tarasov NI, Teplakov AT, Malakhovich EV, Stepacheva TA, Fedosova NN, Kaliuzhin VV, Pushnikova EI. State of lipid peroxidation, blood antioxidant defense in patients with myocardial infarction aggravated by circulatory insufficiency. Ter Arkh. 2002;74(12):12-5. [In Russian].

205. Loke KE, Laycock SK, Mital S, Wolin MS, Bernstein R, Oz M, Addonizio L, et al. Nitric oxide modulates mitochondrial respiration in failing human heart. Circulation. 1999;100:1291-97.

206. Reutov VP, Sorokina EG, Ohotyn VE, Kosytsyn NS. Cyclic conversion of nitric oxide in the body of mammals. Science, M. 1997:158. [In Ukrainian].

207. Шаріпов Р.Р., Коцюрuba А.В., Коп'як Б.С., Сагач В.Ф. Індукція нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів за експериментальної ішемії – реперфузії головного мозку та його корекція екдистероном. // Фізіол. журн. – 2014 – Т.60, № 5. – С.3-13.

208. Moibenko OO, Sagach VF, Tkachenko MM. et al. Fundamental mechanisms of action of nitric oxide on the cardiovascular system, as the basis of pathogenetic treatment of diseases. Fiziol. Zh. 2004;50( 1):11-30. [In Ukrainian].

209. Lee CI, Liu X, Zweier JL. Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite. J Biol Chem. 2000 Mar 31;275(13):9369-76.

210. Sagach VF, Korkach YP, Kotsyuruba A. Metal Inhibition of opening mitochondrial pore by ecdysterone in the heart of old rats. Fiziol. Zh. 2008;54(4):3-10. [In Ukrainian].

211. Lafont R, Dinan L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update J. Insect. Sci. 2003;3(7):1-30.

212. Kotsiuruba AV, Bukhanevich OM, Mehed' OF et al. The (27)-steroid hormones ecdysterone and calcitriol activate the phosphoinositol cycle in its membrane phase //Ukr. Biokhim. Zh. 1999;71(1):27-32. [In Ukrainian].

213. Kotsyuruba AB, Bukhanevich OM, Tuganova AB, Tarakanov SS. Mechanisms of the early effect of biologically active hydroxysterols: calcitriol and ecdysterone. Identification of sphingomyelin as the effector mechanism of the early effect. Ukr. Biokhim. Zh. 1995;67(2):53-58. [In Ukrainian].

214. Kotsiuruba AV, Bukhanevich OM, Tuganova AV, Tarakanov SS. Mechanisms of the early effect of biologically active hydroxysterols: calcitriol and ecdysterone. Modulation of intracellular pools of arachidonic acid and products of its oxidative metabolism. Ukr. Biokhim. Zh. 1995;67(2):45-52. [In Ukrainian].

215. Korkach JuP, Rudyk OV, Kotsuruba AV, Prsyazhna OD, Sagach VF. The nitric oxide and superoxide synthesis in protective action of ecdysterone in mitochondrias of rats with streptozotocin-induced diabete. Fiziol. Zh. 2007;53(5):1-6. [In Ukrainian].

216. Kihara M1, Schmelzer JD, Poduslo JF, Curran GL, Nickander KK, Low PA. Aminoguanidine effects on nerve blood flow, vascular permeability, electrophysiology, and oxygen free radicals Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jul 15;88(14):6107-11.

217. Foller M, Mahmud H, Gu S, Wang K, Floride E, Kucherenko Y, Luik S, et al. Participation of leukotriene C(4) in the regulation of suicidal erythrocyte death. J Physiol Pharmacol. 2009 Sep;60(3):135-43.

218. van Asbeck BS, Hoida IJ, Vercellotti GM, Schwartz BA, Moldow CF, Jacob HS. Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: role of red cell glutathione. Science. 1985 Feb 15;227(4688):756-9.

219. Jennings ML. Transport of H<sub>2</sub>S and HS(-) across the human red blood cell membrane: rapid H<sub>2</sub>S diffusion and AE1-mediated Cl(-)/HS(-) exchange. Am J Physiol Cell Physiol. 2013 Nov 1;305(9):C941-50.

220. Wu L, Wang R. Carbon Monoxide: Endogenous Production, Physiological Functions, and Pharmacological Applications. Pharmacol. Rev. 2005; 57(4): 585-630.

221. Leffler CW<sup>1</sup>, Parfenova H, Jaggar JH, Wang R. Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation. *J Appl Physiol* (1985). 2006 Mar;100(3):1065-76.

222. Jiang H, Anderson GD, McGiff JC. Red blood cells (RBCs), epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and adenosine triphosphate (ATP). *Pharmacol Rep*. 2010 May-Jun;62(3):468-74.

223. Sridharan M<sup>1</sup>, Bowles EA, Richards JP, Krantic M, Davis KL, Dietrich KA, Stephenson AH, et al. Prostacyclin receptor-mediated ATP release from erythrocytes requires the voltage-dependent anion channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Feb 1;302(3):H553-9.

224. Adams H.P., G. delZoppo, M.J. Albertsetal. Guidelines for the early management of adults with i schemic stroke: a guideline from the AHA/ASA Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups.Stroke. 2007; 38:1655-76.

225. ESO-Guidelines for Management of Ischaemic Stroke and Transient Ischaemic Attack.— ESO: Heidelberg, Germany, 2008;125.

226. Lybankina IN. Cerebral-cardiac syndrome. *J Arrhythmology*. 2009; 58:26-34. [Russian].

227. Shchokina EG. Study of the cardioprotective features of the recombinant antagonist interleukin-1 receptors under conidtions of the adrenal myocarditis in rats. *Ukr. J. Biopharmaceutical*. 2012; (5-6):47-51. [Ukrainian].

228. Förstermann U. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitricoxidesynthase (eNOS) expression and preventing eNOS un coupling / U. Förstermann, H. Li // *BrJPharmacol*. – 2011. – V. 164, № 2. – P. 213–23.

229. Upmacis R. K. Profound biopterin oxidation and protein tyrosine nitration in tissues of ApoE-null mice on an atherogenic diet: contribution of inducible nitric oxide synthase / R. K. Upmacis, M. J. Crabtree, R. S. Deeb [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2007. – V. 293, № 5. – P. 2878–87.



230. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages / Y. Xia, J. L. Zweier // Proc Natl Acad Sci USA. – 1997. – V. 94, № 13. – P. 6954–8.

231. KinaraV, Schmelzer JD, Poduslo JF. Et al. Aminoguanidine effects on nerve blood flow, vascular permeability, electrophysiology and oxygen free radicals// Proc.Natl.Acad.Sci.USA.1991;88(14):6107-6111.