

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

---

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ГОНЧАРОВ СЕРГІЙ ВІКТОРОВИЧ**

УДК 616.8 : 612.825 : 612.827 : 612.826 : 577.152.34

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ПОРУШЕННЯ  
ПРОТЕАСОМНОГО ПРОТЕОЛІЗУ ПРИ АРТЕРІАЛЬНІЙ ГІПЕРТЕНЗІЇ  
ТА ПІДХОДИ ДО ЇЇ КОРЕКЦІЇ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

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

Гончаров С.В. \_\_\_\_\_

**Науковий керівник:**

**Мойбенко Олексій Олексійович**

академік НАН України, доктор

медичних наук, професор

**Досенко Віктор Євгенович**

доктор медичних наук, професор

**Київ – 2021**

## АНОТАЦІЯ

**ГОНЧАРОВ С.В. Молекулярно–генетичні механізми порушення протеасомного протеолізу при артеріальній гіпертензії та підходи до її корекції.** Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Дисертаційна робота присвячена дослідженню ролі протеасомного протеолізу при артеріальній гіпертензії. Дослідження проводилися у дітей та підлітків, що мають первинну гіпертензію та практично здорових дітей. Визначали поліморфізми генів, що кодують субодиниці протеасоми (*LMP2* Arg<sub>60</sub>→His, *LMP7* Lys<sub>145</sub>→Gln і *PSMA6* C<sup>-8</sup>→G). Отримані дані вказують на те, що розподіл алельних варіантів генів, що кодують субодиницю імунопротеасоми (*LMP2*) та протеасоми (*PSMA6*) суттєво відрізняється у контрольній групі та у дітей з артеріальною гіпертензією на відміну від поліморфізму гену *LMP7*. У подальшому дослідження виконувалося на спонтанно-гіпертензивних щурах (SHR) з корекцією за допомогою кверцетину (таблетована форма, 15 мг/кг маси тіла, щодня).

Порівняння морфологічних, гістологічних, кардіогемодинамічних та морфометричних показників аорти та серця щурів SHR з Wistar дає зрозуміти, що хронічне підвищення тиску призводить до значних порушень. Отже, у щурів лінії SHR спостерігалось зниження таких показників: ударного об'єму (у 3 рази),

фракції викиду (у 2,14 рази), ударної роботи (на 70 %), частоти серцевих скорочень (на 12 %), мінімального тиску (у 1,5 рази) та кінцево-систоличного тиску (на 15 %). Показники діастолічної функції серця були вищими у щурів лінії SHR: кінцево-діастолічний тиск у 6,5 разів,  $dp/dt \min$  на 30 % та артеріальна жорсткість у 4,4 рази.

Виявлено суттєві морфологічні зміни аорти у SHR: були більшими загальна ширина аорти (на 36 %), ширина гладеньком'язових прошарків (на 19 %) і ширина інтими (у 1,9 рази).

Доведено ефективність експериментальної терапії артеріальної гіпертензії з застосуванням інгібітору протеасоми – кверцетину. За допомогою біофлавоноїду вдалося попередити збільшення таких параметрів: ліпідоз у стінці аорти щурів SHR (у 2 рази), відсоток фібротичних змін у лівому шлуночку серця (у 2,9 рази). А також спостерігалось статистично вірогідне зменшення рівня експресії таких генів у тканинах аорти SHR: *PSMB2* (у 28 разів), *PSMB8* (у 5,5 разів), *PSMB9* (у 112 разів) та *PSME1* (у 7,8 разів). На противагу рівень мРНК гену *PSMB1* був більшим у 7,8 разів.

Ключові слова: однонуклеотидний поліморфізм, експресія генів, гіпертрофія серця, протеасомний протеоліз, артеріальна гіпертензія.

## SUMMARY

**GONCHAROV S.V. Molecular genetic mechanisms of proteasomal proteolysis disorder in arterial hypertension and approaches to its correction. Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.**

The dissertation submitted to acquire a degree of Candidate of Sciences in Medicine (Ph.D.), specialty 14.03.04 - Pathophysiology - Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to the research on the role of proteasomal proteolysis in arterial hypertension. The research was performed among a group of children and adolescents with primary hypertension and healthy children as well. We have determined gene polymorphisms that encode proteasome subunits (*LMP2* Arg<sub>60</sub>→His, *LMP7* Lys<sub>145</sub>→Gln and *PSMA6* C<sup>-8</sup>→G). The obtained data indicate that the distribution of allelic variants of genes, that encode the immunoproteasome (*LMP2*) and proteasome (*PSMA6*) subunit, significantly differs between the control group and the group of children with arterial hypertension in contradistinction with the *LMP7* gene polymorphism.

Subsequently, the research has been performed on spontaneously hypertensive rats (SHR) with the quercetin correction (tablet form, 15 mg per kg of body weight, daily).

Comparison of morphological, histological, cardiohemodynamic, and morphometric parameters of the aorta and heart of SHR with Wistar rats suggests that

a chronic increase of high blood pressure leads to significant disorders. Thus, SHR had the following parameters decreased: stroke volume (3 times), ejection fraction (2.14 times), stroke work (70 %), heart rate (12 %), minimum pressure (1.5 times), and end-systolic pressure (15 %). Diastolic heart function parameters in SHR were higher: end-diastolic blood pressure 6.5 times, dp/dt min 30 %, and arterial elastance 4.4 times.

Significant morphological changes of the aorta were detected in SHR. The following parameters were increased: aorta total width (by 36 %), smooth muscle cell width (by 19 %), and intima width (1.9 times).

The efficiency of experimental therapy of arterial hypertension with the use of a proteasome inhibitor - quercetin has been proved. Bioflavonoids could prevent the increase of the following parameters: aortic wall lipidosis of SHR (2 times) and the percentage of left ventricle fibrotic changes (2.9 times). A statistically significant decrease was observed in the expression level of the following genes in the aortic tissues of SHR: *PSMB2* (28 times), *PSMB8* (5.5 times), *PSMB9* (112 times), and *PSME1* (7.8 times). In contrast, the mRNA level of the *PSMB1* gene was 7.8 times higher.

Keywords: single nucleotide polymorphism, gene expression, cardiac hypertrophy, proteasomal proteolysis, hypertension.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

### в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Altered biogenesis of microRNA-1 is associated with cardiac dysfunction in aging of spontaneously hypertensive rats / Tetiana Lapikova-Bryhinska, Anna Zhukovska, Vasyl Nagibin, Lesia Tumanovska, Georgii Portnichenko, **Sergiy Goncharov**, Alla Portnychenko, Victor Dosenko // Molecular and cellular biochemistry. – 2019. – V. 459, №1-2. – P. - 73-82. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження у складі робочої групи).*
2. Cholesterol enriched diet suppresses ATF6 and PERK and upregulates the IRE1 pathways of the unfolded protein response in spontaneously hypertensive rats: Relevance to pathophysiology of atherosclerosis in the setting of hypertension / Lesya V. Tumanovska, R. James Swanson, Zoya O. Serebrovska, Georgii V. Portnichenko, **Sergii V. Goncharov**, Bohdan A. Kysilov, Olexandr O. Moibenko, Victor E. Dosenko. // Pathophysiology – 2019. – V. 26, №3-4. –P. - 219-226. *(Здобувач брав участь у плануванні експерименту, зборі експериментального матеріалу, аналізі отриманих результатів та написанні статті).*
3. Cholesterol-rich diet induced improvement of hemodynamic system indices in SHR / Portnichenko G.V., **Goncharov S.V.**, Stroy D.O., Dosenko V.E. // Фізіологічний журнал. – 2019. – V.65, №2. – P.68-75. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження у складі робочої групи).*

4. Cardiospecific deletion of  $\alpha$ E-catenin leads to heart failure and lethality in mice / Balatskyi V.V., Macewicz L.L., Gan A.M., **Goncharov S.V.**, Pawelec P., Portnichenko G.V., Lapikova-Bryginska T.Y., Navrulin V.O., Dosenko V.E., Olichwier A., Dobrzyn P., Piven O.O. // PflugersArch - Eur J Physiol. - 2018. – 470, №10. – P.1485-1499. *(Здобувачем проведено гемодинамічні дослідження у складі робочої групи).*
5. Вплив кверцетину на протеасомну активність в аорті та серці щурів зі спонтанною гіпертензією / **Гончаров С.В.**, Портніченко Г.В., Тумановська Л.В., Пашевін Д.О., Кузьменко М.О., Мойбенко О.О., Досенко В.Є.. // Фізіологічний журнал. – 2014. – Т. 60, № 3. - С. - 3-10. *(Здобувач брав участь у плануванні експерименту, заборі експериментального матеріалу, аналізі отриманих результатів та написанні статті).*
6. Genetic predisposition to essential hypertension in children: analysis of 17 single nucleotide polymorphisms / **Sergii V. Goncharov**, Veronika L. Gurianova, Dmytro O. Stroy, Tetyana I. Drevitska, Sergii P. Kaplinskii, Evgen A. Nastenکو, Maryna Litvinenko, Roman V. Terletskiy, Mykola V. Khaitovych, Oleksiy O. Moibenko, Viktor E. Dosenko // Fiziolohichniy zhurnal – 2013. – Т. 59 №6. - С. - 12-24. *(Здобувачем проведено генетичні дослідження деяких поліморфізмів генів у складі робочої групи, брав участь у написанні статті).*
7. Комбинация методов логистической регрессии и мультифакторной пространственной редукции (MDR) для оценки риска развития эссенциальной

гипертензии / Д.А. Строй, Е.А. Настенко, В.Л. Гурьянова, **С.В. Гончаров**, В.Е. Досенко, А.А. Мойбенко // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2011. - № 2. – С.- 78-83. *(Здобувачем проведено генетичні дослідження деяких поліморфізмів генів у складі робочої групи, брав участь у написанні статті).*

8. Allele polymorphism of genes coding proteasome subunits is associated with an enhanced risk for arterial hypertension in adolescents / **S.V. Goncharov**, V.E. Dosenko, N.V. Haitovich, A.A. Moibenko // Fiziologichnyi zhurnal – 2009. V. 55 №2. P. - 3-10. *(Здобувач брав участь у плануванні експерименту, проводив генетичні дослідження, аналіз отриманих результатів, писав статтю).*

#### **які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

1. The role of long non-coding RNAs (lncRNAs) in cardiac hypertrophy formation during physical exercise / Polishchuk A., Drozdovska S., Dosenko V., **Goncharov S.** // European Journal of Sports Medicine – 2018. – V.5 S.2 - P. 26-27. (Riga, Latvia);
2. Quercetin prevents cardiac hypertrophy, fibrosis and lipidosis in spontaneously hypertensive rats and inhibits proteasomal activity / **Goncharov S.**, Portnichenko G., Tumanovska L., Goshovska Y., Dosenko V. // Acta Physiologica. - 2017. – 217. P. 36-37;
3. Effect of cholesterol diet and corvitin at cardiohemodynamics and expression of H2S-synthesizing enzymes genes in aorta of spontaneously hypertensive rats /



- Goncharov S.**, Goshovska Y., Portnichenko G., Tumanovska L., Dosenko V., Sagach V. // European Journal Of Clinical Investigation. – 2017. – 47. – P. 130;
4. Hypotensive effect of кверцетин is possibly mediated by down-regulation of immunotroteasome subunits in aorta of spontaneously hypertensive rats / **Goncharov S.**, Portnichenko G.V., Tumanovska L.V., Goshovska Y.V., Lapikova-Bryhinska T.U., Nagibin V.S., Dosenko V.E. // Cardiovascular Research. – 2016.- 111. – P. S114;
5. Молекулярні механізми розвитку та попередження патологічних процесів у серцево-судинній системі та їх вікові особливості / Портніченко А.Г., Лапікова-Бригінська Т.Ю., Портніченко Г.В., **Гончаров С.В.**, Василенко М.І., Гарматіна О.Ю., Запара Ю.О., Гур'янова В.Л., Мойбенко О.О. // Тези доп. VII Національного. конгресу патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції», присвяченого пам'яті академіка НАН України О.О. Мойбенка, 5-7 жовтня 2016 р., Харків. – Вид НФАУ, 2016. – С. 184;
6. P476 SREBF1, SREBF2 and their target genes expression is different in Wistar and SHR rats under high cholesterol treatment conditions / Portnichenko H.V, **Goncharov S.V.**, Tumanovska L.V, Stroy D.O., Moibenko O.S., Kuzmenko M.O., Moibenko O.O., Dosenko V.E. // Cardiovascular research. – 2014. - 103 (suppl\_1). – P. S87;

7. Зміни експресії генів, що кодують субодиниці протеасоми і протеасомної активності у щурів зі спонтанною гіпертензією, вплив кверцетину / **Гончаров С.В.**, Портніченко Г.В., Тумановська Л.В., Мойбенко О.С., Пашевін Д.О., Кузьмнко М.О., Мойбенко О.О., Досенко В.Є. (тези III conference "Physiology: from molecules to the body" at Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv, October, 24-25 2013);
8. Експресія генів, що кодують субодиниці протеасоми в тканинах аорти спонтанногіпертензивних щурів / **Гончаров С.В.**, Пашевін Д.О., Досенко В.Є., Мойбенко О.О. // VI Національний конгрес патофізіологів України з міжнародною участю, Сімферополь - Місхор, 3-5 жовтня 2012 р. – Таврійський мед.-біол. вісник, 2012. – Т.15, №3, ч.2. – С. 320;
9. **Гончаров С.В.** Алельний поліморфізм генів, що кодують субодиниці протеасоми, як генетична основа розвитку і тяжкості перебігу первинної артеріальної гіпертензії у дітей – 2010.- С. 13-14 (тези доповідей другого туру Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт із природничих, технічних і гуманітарних наук у 2009/2010 навчальному році в галузі клінічна медицина: внутрішні хвороби, хірургія, дитяча хірургія, педіатрія, інфекційні хвороби, ендокринологія, імунологія, клінічна імунологія та алергологія).

## ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ЗМІСТ	11
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	15
ВСТУП	17
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	
1.1. Роль протеасомного протеолізу у клітинах судинної стінки та серця у нормі та при артеріальній гіпертензії	24
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи дослідження	42
2.1. Характеристика клінічного матеріалу	42
2.2. Генетичні методи визначення алельного поліморфізму	43
2.2.1. Виділення ДНК із біологічного матеріалу	44
2.2.2. Визначення алельного поліморфізму гену <i>LMP2</i> -субодиниці імунопротеасоми ( <i>Arg</i> <sub>60</sub> → <i>His</i> )	46
2.2.3. Визначення алельного поліморфізму гену <i>LMP7</i> -субодиниці імунопротеасоми ( <i>Lys</i> <sub>145</sub> → <i>Gln</i> )	48
2.2.4. Визначення алельного поліморфізму промотору гену <i>PSMA6</i> – субодиниці протеасоми ( <i>C</i> <sup>-8</sup> → <i>G</i> )	49
2.3. Характеристика експериментального матеріалу	50
2.4. Методика реєстрації артеріального тиску у щурів	51
2.5. Реєстрація та аналіз кардіодинамічних показників <i>in vivo</i>	54
2.6. Дослідження ліпідного спектру крові	61
2.7. Гістологічні та морфометричні дослідження	61
2.8. Ультраструктурні дослідження за допомогою електронної мікроскопії	63

2.9. Визначення трипсино-, хімотрипсиноподібної та пептидилглютамін пептид-гідролазної активностей протеасоми у тканинах серця та аорти	63
2.9.1. Отримання гомогенатів тканин аорти та серця	63
2.9.2. Визначення протеасомної активності у тканинах серця та аорти	64
2.10. Виділення РНК із тканин серця та аорти	65
2.11. Зворотна транскрипція та полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі	67
2.12. Статистичний аналіз	69
<b>РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	70
<b>РОЗДІЛ 3. Дослідження частоти алельного поліморфізму генів, що кодують різні субодиниці протеасоми у дітей з первинною артеріальною гіпертензією</b>	71
3.1. Поліморфізм C <sup>-8</sup> →G промотору гену <i>PSMA6</i>	71
3.2. Поліморфізм Arg <sub>60</sub> →His гену <i>LMP2</i>	73
3.3. Поліморфізм Lys <sub>145</sub> →Gln гену <i>LMP7</i>	75
<b>РОЗДІЛ 4. Зміни основних фізіологічних параметрів функціонування серцево-судинної системи при спонтанній гіпертензії у щурів та при її експериментальній терапії</b>	78
4.1. Кардіо-гемодинамічні показники у щурів лінії Wistar, SHR та SHR, що отримували кверцетин	79
4.2. Вміст ліпопротеїдів у крові у спонтанногіпертензивних щурів та за умов експериментальній терапії	98
<b>РОЗДІЛ 5. Морфологічні, ультраструктурні зміни у тканинах аорти при спонтанній гіпертензії у щурів та при її експериментальній</b>	100

терапії. Експресія генів субодиниць протеасоми та активність останньої у тканинах аорти	
5.1. Вплив артеріальної гіпертензії на морфометричні, патогістологічні та ультраструктурні показники структур стінки аорти	100
5.2. Визначення трипсино-, хімотрипсиноподібної та пептидилглютаміл пептид-гідролазної активностей протеасоми у тканинах аорти у щурів зі спонтанною гіпертензією та при експериментальній терапії	110
5.3. Експресія генів, що кодують різні субодиниці протеасоми у тканинах аорти при артеріальній гіпертензії та експериментальній терапії	112
<i>5.3.1. Експресія генів, що кодують каталітичні конституційні (PSMB1, PSMB2, PSMB5) та індукцйбельні субодиниці (PSMB8 (LMP7), PSMB9 (LMP2), PSMB10) протеасоми у тканинах аорти</i>	112
<i>5.3.2. Експресія генів, що кодують регуляторні субодиниці (PSME1 та PSMC1) протеасоми у тканинах аорти</i>	114
5.4. Кореляційний зв'язок між експресією генів субодиниць протеасоми та активностями протеасоми у тканинах аорти	117
РОЗДІЛ 6. Зміни основних фізіологічних параметрів функціонування серця при спонтанній гіпертензії у щурів та при її експериментальній терапії	120
6.1. Вплив артеріальної гіпертензії на морфометричні, патогістологічні та ультраструктурні показники структур серцевого м'яза	120
6.2. Визначення трипсино-, хімотрипсиноподібної та пептидилглютаміл пептид-гідролазної активностей протеасоми у	129

тканинах серця у щурів зі спонтанною гіпертензією та за умов експериментальної терапії	
6.3. Експресія генів, що кодують різні субодиниці протеасоми в тканинах серця при артеріальній гіпертензії у щурів ліній Wistar та SHR	131
<i>6.3.1. Експресія генів, що кодують каталітичні конституційні (PSMB1 (LMP2), PSMB2, PSMB5 (LMP7)) та індукцйбельні субодиниці (PSMB8, PSMB9, PSMB10) протеасоми у тканинах серця у спонтанногіпертензивних щурів</i>	131
<i>6.3.2. Експресія генів, що кодують регуляторні субодиниці (PSME1 та PSMC1) протеасоми у тканинах серця у щурів лінії SHR та Wistar</i>	133
РОЗДІЛ 7. Аналіз та узагальнення результатів	134
ВИСНОВКИ	144
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	147

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

АГ – артеріальна гіпертензія;

АС – атеросклероз;

АТ – артеріальний тиск;

ГМК – гладеньком'язові клітини;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

ПППГ – пептидилпептидгідролазна активність протеасоми;

ТП – трипсиноподібна активність протеасоми;

ХТП – хімотрипсиноподібна активність протеасоми;

ADMA – асиметричний диметиларгінін;

eNOS – ендотеліальна NO-синтаза;

iNOS – індуцибельна NO-синтаза;

dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфати;

HSP – білок теплового шоку;

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – перекис водню;

LMP – великі мультифункціональні протеїнази;

MG132 – інгібітор протеасоми;

MHC – головний комплекс гістосумісності;

NF-κB – ядерний фактор каппа B;

NO – оксид азоту;

*PSMA* – гени, що кодують некаталітичні субодиниці корової частини протеасоми;

*PSMB* – гени, що кодують каталітичні субодиниці корової частини протеасоми;

*PSMC1* – ген, що кодує некаталітичні субодиниці регуляторної частини протеасоми;

*PSME1* – ген, що кодує некаталітичні субодиниці регуляторної частини протеасоми;

*SHR* – лінія спонтанногіпертензивних щурів;

*SNP* – поліморфізм поодиноких нуклеотидів.



## ВСТУП

### Актуальність теми

Україна посідає перше місце серед країн Європи за смертністю населення від серцево-судинних захворювань, серед яких значне місце займає артеріальна гіпертензія (АГ), що спостерігається майже у 30 % дорослих мешканців та навіть у дітей (від 14,8 % до 16,3 %) [2]. У механізмах розвитку АГ важливе значення мають процеси синтезу та вчасної утилізації протеїнів як в клітинах судинної стінки, так і серця. Такою внутрішньоклітинною системою деградації зношених протеїнів є убіквітинзалежний протеасомний протеоліз, в наслідок якого руйнується до 90 % внутрішньоклітинних протеїнів [19]. Останніми роками накопичуються дані про роль порушень протеасомного протеолізу в патогенезі захворювань судин та серця і, зокрема, АГ. Застосовуючи інгібітори протеасоми, Такаока et al. [50, 66] показали, що вказані сполуки мають антигіпертензивний ефект, пригнічуючи проліферацію гладеньком'язових клітин в аорті. Duarte J. et al. [55] застосовували кверцетин, що є інгібітором протеасоми, для лікування АГ у спонтанногіпертензивних щурів (SHR) та отримали зниження систолічного тиску на 18 %, діастолічного - на 23 %, середнього на 21 %, а також уповільнення гіпертрофії серця. Однак молекулярні механізми, що забезпечують вказані ефекти (зміни протеолітичної активності протеасоми, експресії генів, що кодують субодиниці протеасоми), не досліджувались.

На активність протеасоми можуть впливати і поліморфізми генів, що

кодують її субдиниці. Так, у роботах японських дослідників встановлено, що поліморфізм гену *PSMA6* (C<sup>-8</sup>→G) позитивно впливає на транскрипційну активність цього гену і опосередковано змінює активність протеасоми [51]. Водночас значення вказаного поліморфізму та одонуклеотидних замін у генах інших субдиниць протеасоми не вивчалися та навіть не розглядалася їхня роль як факторів ризику розвитку АГ.

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

Роботу виконано в рамках наукової тематики відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Вивчення молекулярно-генетичних механізмів розвитку ішемії-реперфузії та розробка нових методів генотерапії інфаркту міокарда» (№ держреєстрації 0107U005336), «Дослідження ендогенних, молекулярно-генетичних механізмів ушкодження та цитопротекції при ішемічній патології» (№ держреєстрації 0107U005323), «Вивчення механізмів розвитку серцево-судинної патології за допомогою багаторівневих досліджень: від поліморфізму та експресії генів до патофізіологічних проявів» (№ держреєстрації 0107U005336).

**Метою дослідження** було визначити роль протеасомного протеолізу у розвитку АГ в умовах тваринної моделі та клініки і запропонувати метод експериментальної терапії цієї патології із застосуванням інгібітору протеасомної активності.

**Задачі дослідження:**

1. З'ясувати роль алельного поліморфізму генів, що кодують субодиниці протеасоми при есенціальній АГ у дітей та підлітків.
2. Провести порівняльну характеристику кардіогемодинамічних та морфологічних параметрів нормотензивних та гіпертензивних щурів лінії Wistar і SHR.
3. Визначити рівень експресії мРНК генів, що кодують конститутивні, індукцйбельні та регуляторні субодиниці протеасоми у тканинах серця та аорти щурів.
4. Встановити зміни трипсиноподібної, хімотрипсиноподібної та пептидилглютаміл пептидгідролазної активностей протеасом у тканинах аорти та серця спонтанно-гіпертензивних щурів.
5. Оцінити ефективність терапії АГ із застосуванням інгібітору протеасомної активності в умовах експериментальної моделі.

**Предмет дослідження** – роль алельних поліморфізмів генів, що кодують субодиниці протеасоми, у формуванні ризику АГ; стан протеасомного протеолізу як фактор розвитку спонтанної АГ.

**Об'єкт дослідження** – активність протеасом; ДНК, виділена з венозної крові хворих на артеріальну гіпертензію та букального епітелію практично здорових осіб; РНК, виділена із тканин аорти та серця нормотензивних та гіпертензивних щурів.

**Методи дослідження:** виділення ДНК та РНК, полімеразна ланцюгова реакція із подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів, полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі, зворотна транскрипція із полімеразною ланцюговою реакцією, визначення активності протеасоми, оцінка параметрів кардіогемодинаміки за допомогою катетеризації серця, гістологічні, морфометричні, електронно мікроскопічні.

### **Наукова новизна одержаних результатів**

Вперше на сучасному методичному рівні отримано інформацію про розподіл різних алельних варіантів промотору гену *PSMA6* та генів, що кодують субодиниці імунопротеасоми (*LMP2* та *LMP7*) у дітей з первинною артеріальною гіпертензією в українській популяції. Показано, що розподіл алельних варіантів *PSMA6* та *LMP2* у нормо- та гіпертензивних осіб має суттєві відмінності. Вперше доведено, що в аорті і серці щурів переважає експресія мРНК субодиниць імунопротеасом, а при АГ експресія генів, що кодують конститутивні та регуляторні субодиниці протеасом у нормо- та гіпертензивних щурів суттєво розрізняються. Доведено, що біофлавоноїд кверцетин, який є інгібітором протеасом, забезпечує суттєве зниження артеріального тиску у щурів з генетично детермінованою гіпертензією, впливаючи як на експресію низки субодиниць протеасом, так і на протеолітичну активність останніх.

## **Практичне значення одержаних результатів**

Проведені дослідження обґрунтували висновок про істотне значення генетичних факторів (однонуклеотидних замінів) у генах, що кодують субодиниці протеасом, у етіології АГ. Це дає застосувати генотипування за цими сайтами з метою оцінки ризику виникнення вказаної патології. Експериментальні дослідження на щурах зі спонтанною гіпертензією дали змогу встановити особливості експресії генів, що кодують різні субодиниці протеасом та вперше вказати на більше значення імунопротеасом у порівнянні з конституційними протеасомами у тканинах аорти та серця. Застосування інгібітору протеасом кверцетину в експерименті на SHR дало показати його ефективність як антигіпертензивного засобу при експериментальній терапії і створило підґрунтя для розширення показань для застосування цього кардіо- та ангіопротектора у клініці при лікуванні АГ.

## **Особистий внесок здобувача**

Аналіз літературних джерел, задач, дослідження та розробку дизайну експерименту проведено спільно з науковим керівником. Здобувач особисто провів необхідні експериментальні дослідження та виконав статистичну обробку результатів. Деякі експерименти були проведені разом зі співробітниками відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, які є співавторами опублікованих робіт.

Діагностику АГ та відбір пацієнтів для генотипування було проведено співробітниками кафедри педіатрії №4 Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця під керівництвом професора д.м.н. М.В. Хайтовича.

### **Апробація результатів дисертації**

Результати роботи доповідалися на профільних наукових форумах: Frontiers in CardioVascular Biology 2014 (Barcelona, Spain); 25th Anniversary of the FEPS, 168th Anniversary of French Physiological Society, June 29th - July 1st 2016 (Paris, France); Frontiers in Cardio Vascular Biology 2016 (Barcelona, Spain); ESC Congress 2017, 26-30 Aug 2017 (Barcelona, Spain); 51st Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, May 17th-19th 2017 (Genoa, Italy); другий тур Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт із природничих, технічних і гуманітарних наук у 2009/2010 навчальному році в галузі клінічна медицина: внутрішні хвороби, хірургія, дитяча хірургія, педіатрія, інфекційні хвороби, ендокринологія, імунологія, клінічна імунологія та алергологія (Івано-Франківськ, 2010); VI Національний конгрес патофізіологів України з міжнародною участю «Від експериментальних досліджень до клінічної патофізіології» 3-5 жовтня 2012 р. (Сімферополь-Місхор); Third young physiologists and biophysicists conference: “Physiology: from molecules to the body” Kyiv, 2013; VII Національний конгрес патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції», присвячений пам’яті академіка НАН України О.О. Мойбенка, 5-7 жовтня 2016 р., (Харків).

**Публікації.** Матеріали дисертації опубліковано у 17 наукових працях, у тому числі у 8 статтях у наукових журналах, а також у 9 тезах доповідей (у тому числі у 5 представлених на зарубіжних конференціях).

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертація складається із вступу, основної частини (огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, 4 розділів результатів досліджень, аналізу результатів та їхнього обговорення), висновків та списку використаних джерел (91 найменувань). Робота викладена на 162 сторінках машинописного тексту та проілюстрована 43 рисунками.

Автор висловлює велику подяку за керівництво та цінні поради під час виконання роботи завідувачу відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця, академіку НАН України О.О. Мойбенку та професору В.Є. Досенку та н.с. Л.В. Тумановській.

## РОЗДІЛ 1. Огляд літератури

Протеасомний протеоліз – є універсальною внутрішньоклітинною системою деградації пошкоджених та модифікованих білків, що бере участь у регуляції практично усіх елементів функціонування клітини, починаючи від поділу клітини, її диференціації, виконання специфічних функцій та апоптозу [85, 14, 19]. Зважаючи на таке велике значення протеасомного розщеплення білків, можна передбачити роль порушень цього процесу в патогенезі різних захворювань, у тому числі артеріальної гіпертензії (АГ). Розвиток цього захворювання, безумовно, передусім пов'язаний із патологією регуляції судинного тонуусу, однак тривале підвищення артеріального тиску збільшує післянавантаження на серце та спричинює розвиток гіпертрофії міокарда. У який спосіб змінюється активність протеасоми чи експресія генів, що кодують її субодиниці, за такої умови не відомо, однак наразі проведена значна кількість наукових робіт, присвячених вивченню ролі убіквітин-залежного протеасомного протеолізу при АГ та гіпертрофії серця. Саме вони були предметом огляду літератури.

### **1.1. Роль протеасомного протеолізу у клітинах судинної стінки в нормі та при артеріальній гіпертензії**

Починаючи з робіт японських дослідників [20, 50, 66], що вперше встановили антигіпертензивний ефект інгібіторів протеасоми, протягом останніх років проведена велика кількість досліджень, у яких було доведено роль убіквітин-залежного протеасомного протеолізу у деградації або



модуляції роботи цілої низки білків, що мають безпосереднє відношення до механізмів розвитку АГ (Табл. 1). Серед останніх найбільш важливе значення мають: ендотелін 1 [20], амilorід-чутливі Na(+) канали (ENaC) [75, 45], індукцiбельна NO-синтаза [75], протеїн, що зв'язується з цАМФ чутливим елементом (CREB) [86], рецептор ангіотензину 1-го типу [16], міокардин [34, 79], транскрипційний фактор NF-κB [60, 39, 56], тiazид-чутливий Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> котранспортер [41], ГТФ циклогiдрoлаза I [61], Na(+)-K(+)-2Cl(-) котранспортер, iзоформа 2 (NKCC2) [78], мiозинфосфатаза субодиниця 1-го типу (MYPT1) [7].

*Таблиця 1. Білки клітин судинної стінки та убiквітин-залежний протеасомний протеоліз*

<b>Назва протеїну</b>	<b>Функціональне значення</b>	<b>Роль протеасомного протеолізу</b>	<b>Результат деградації чи модуляції</b>	<b>Посилання</b>
<b>Ендотелін 1</b>	Вазоконстиктор	Активация утворення	Збільшення продукції	20
<b>Амilorід чутливі Na(+) канали</b>	Реабсорбція іонів Na(+) в дистальних каналцях	Деградація	Зниження кількості каналів	67
<b>Ендотеліальна NO синтаза</b>	Вазодилатація	Деградація	Зниження кількості ферменту	4, 38, 89
<b>Індукцiбельна NO синтаза</b>	Вазодилатація	Деградація	Зниження кількості ферменту	75
<b>ГТФ циклогiдрoлаза I</b>	Продукція тетрогiдробіоптерину (кофактор у eNOS)	Деградація	Зниження продукції NO, ендотеліальна дисфункція, зменшення здатності до релаксації	84
<b>Протеїн, що зв'язується з</b>	Попередження проліферації гладеньких м'язів та	Деградація	Проліферація гладеньких м'язів	86

<b>цАМФ чутливим елементом</b>	ремоделювання судинної стінки			
<b>Міокардин</b>	Регуляція експресії генів міозину, актину та інших, диференціація м'язів	Деградація	Проліферація гладеньких м'язів та переключення на синтетичний фенотип	34, 79
<b>Транскрипційний фактор NF-κB</b>	Збільшення експресії прозапальних цитокінів та вазоконстрикторів	Деградація інгібітору NF-κB	Транс локація в ядро NF-κB, після протеасомної деградації інгібітора	33, 58
<b>Тіазидчутливий NaCl котранспортер</b>	Реабсорбція Na та Cl в нирках	Деградація	Прискорення виведення солі з організму	41

Як видно з Табл. 1, першим поліпептидом у судинній стінці, зміни кількості якого залежали від протеасоми, виявився ендотелін 1. Добре відомо, що ендотелін 1 є одним з найпотужніших вазоконстрикторів, який активуючи власні рецептори, що пов'язані з G білками активують утворення інозитол 3 фосфату, який за рахунок мобілізації кальцію з ендоплазматичного ретикулуму, та інших ефектів, викликає скорочення гладеньких м'язів судин.

Okamoto H. et. al. [50, 66, 67] у своїх роботах при моделюванні DOCA гіпертензії, встановили підвищення вмісту ендотеліну 1 в аорті в 5 разів, проте застосування інгібітору протеасоми (PSI) зменшувало вміст даного вазоконстриктору у понад 3 рази (з 2,43 до 0,73 нг/г тканини). Автори ставлять слушне запитання: за рахунок чого активація протеасомного протеолізу при гіпертензії у щурів збільшує продукцію ендотеліну 1? І

частково знаходять ймовірну відповідь у роботі Corder et al. [33]. У якій показано, що  $\text{TNF}\alpha$  та  $\text{TGF}\beta$  опосередковано стимулюють продукцію ендотеліну 1 за допомогою протеасоми.  $\text{TNF}\alpha$  активує фосфорилування інгібітору транскрипційного фактору NF- $\kappa$ B, що є сигналом для його протеасомної деградації і саме тому, інгібітори протеасоми запобігають відповіді на цей цитокін. Фосфорилування інгібітору NF- $\kappa$ B забезпечує транслокацію транскрипційного фактору в ядро та активацію цільових генів, серед яких, і ген ендотеліну 1. Про це вперше повідомив у 2000 році Quehenberger et. al [58]. При дослідженні ефекту продуктів глікозилювання на експресію мРНК ендотеліну 1 у аортальних ендотеліальних клітинах бика, цими дослідниками була встановлена активація промоторного регіону ендотеліну 1 та потенційно зв'язуючий сайт з NF- $\kappa$ B (-2090 bp). Гіперекспресія NF- $\kappa$ B у цих клітинах індукувала експресію ендотеліну 1 навіть без впливу продуктів глибокого глікозилювання. В подальшому з'ясувалось, що ендотелін 1, в свою чергу, може активізувати утворення NF- $\kappa$ B. Отже, замикається хибне коло: прозапальні цитокіни стимулюють експресію ендотеліну 1, опосередковано через NF- $\kappa$ B, а ендотелін 1, що утворюється за цих умов, активує NF- $\kappa$ B, який активує гени, що кодують прозапальні цитокіни.

Можливість активації ендотеліном 1 системи NF- $\kappa$ B була вперше доведена німецькими дослідниками Gerstung M et. al., які показали на клітинах проксимальних каналців нирки, що активація NF- $\kappa$ B відбувається тільки через ендотелін 1-специфічні рецептори А типу у людей (рецептори

В типу у тварин) [17]. Ці вчені показали два незалежних шляхи активації NF-κB (через рецептор ендотеліну 1 типу А і за допомогою діацилгліцеролу). У іншій роботі цих авторів наводяться докази того, що ендотелін 1 індукує прозапальний сигнальний шлях із залученням кінази MAPK 38, яка є партнером NF-κB у транскрипційному комплексі [17]. Також в цій роботі було встановлено вплив біофлавоноїдів, а саме хризин (chrisine), що здатний пригнічувати ліпосахарид індуковане виділення цитокінів (інтерлейкін бета та TNFα), а також інгібітор протеасоми MG132. У результаті цих дослідів було показано, що хризин активує NF-κB в клітинах HeLa, а MG132 індукував утворення p38. У цих даних легко побачити неузгодженість з попередніми заключеннями щодо запобігання активації NF-κB при застосуванні інгібіторів протеасоми. А у щойно процитованій роботі йдеться про те, що біофлавоноїд (вони, як відомо, є інгібіторами протеасоми) та, власне, хімічний інгібітор протеасоми (MG132) сприяли активації транскрипційного фактору NF-κB. Не виключено, що ці розбіжності у висновках різних дослідників пов'язані з використанням різних ліній клітин.

Амilorид чутливі Na(+) канали наведені у Табл. 1 як одна з мішеней протеасомного протеолізу. І не випадково, справа в тому, що при мутації в гені, що кодує ENaC призводить до розвитку синдрому Лідла – аутосомно домінантною, сіль-чутливої гіпертензії. Важливо, що ця мутація зачіпає сайт убіквітинізації (регіон багатий на пролін), що унеможлиблює убіквітинізацію каналу специфічною убіквітин-лігазою (NEDD 4) і не дає

протеасомі зруйнувати цей білок. У результаті цього кількість каналів збільшується, натрієвий струм також, і спостерігається затримка натрію в нирках. Malik B et. al показали, що специфічний інгібітор протеасоми збільшує експресію всіх трьох субодиниць амілорід чутливого Na(+) каналу і водночас збільшує струм через ці канали. За цих обставин інгібітор лізосом не змінював рівень субодиниць і не впливав на їхню здатність до трансмембранного транспорту [45]. У більш пізній роботі з Нової Зеландії Wiemuth et. al поставили питання про роль лізосомального протеолізу у регуляції ENaC. Результати експериментів повністю збіглися, рівень усіх трьох субодиниць цього каналу значно збільшувався при застосуванні MG132. Але при блокаді хлорохіном лізосомного протеолізу, вони також виявили більше білку як у лізаті, так і у мембранній фракції. У такий спосіб, у регуляції рівня ENaC приймає участь не тільки протеасомний, а й лізосомний протеоліз [45].

Ендотеліальна NO синтаза, безумовно, може бути віднесена до важливих ферментів регуляції судинного тону. Але зв'язок цього ферменту з протеасомним протеолізом досить довго залишався невивченим. У дисертаційній роботі Досенка В.Є. [89] вперше були проведені експерименти з вивчення впливу протеасомної фракції із ретикулоцитів кроля на активність NOS у ізольованих тромбоцитах. При інкубації тромбоцитів із протеасомною фракцією із ретикулоцитів кроля активність eNOS статистично достовірно збільшувалася на 24,6 %. Метильований убіквітин чи інгібітор протеасоми (класто-лактацистин  $\beta$ -лактон) значною

мірою відмінляли цей ефект. Автори зробили висновок, що протеасомній деградації за таких умов, очевидно, підлягає не сама eNOS, а якийсь негативний регулятор її активності. Вони припустили, що для запуску убіквітинізації і гідролізу протеасомою eNOS необхідна певна модифікація протеїну.

Відкритим питанням залишається вплив монооксиду азоту на протеасому, причому вчені не можуть досі дійти до спільної думки: підвищує NO активність протеасоми чи знижує?

За даними Thomas et. al під впливом перекису водню збільшується продукція монооксиду азоту у ендотеліоцитах, а внаслідок цього підвищується активність протеасоми, що підтверджується тим, що інгібітор останньої запобігає підвищенню протеолітичної активності [4]. Однак при збільшенні продукції або часу впливу перекису водню активність NOS, навпаки, зменшувалась і, разом з тим, зменшувалась активність протеасоми. Протилежні дані щодо впливу NO на протеасому було отримано у роботі Liu H et al.[38]. На ендотеліальних клітинах умбілікальної вени людини із застосуванням фармакологічних та генетичних підходів було показано, що збільшення продукції NO зменшує хімотрипсиноподібну активність протеасоми та спричинює накопичення репортерних по відношенню до 26S протеїнів.

Клітини нокаутних мишей за *eNOS* виявляли підвищену протеасомальну активність, що дозволило авторам зробити висновок про те,

що NO, який продукується eNOS, є фізіологічним супресором 26S у ендотеліальних клітинах.

Порушення оксидативного шляху у спонтанногіпертензивних щурів, показано ще у 2002 році. Briones et al. при дослідженні церебральних артерій показали, що ендотелій-залежна відповідь на нітропрурид натрію значно менша саме у SHR [5]. Ці та багато інших опосередкованих даних дають змогу стверджувати, що продукція NO при гіпертензії зменшується, а отже, зростає можливість для підвищення активності протеасоми.

Індуцибельна NO синтаза не так часто згадується у регуляції судинного тонуусу як ендотеліальна, проте біохімічні та фармакологічні дослідження досить чітко вказують на її функціональне значення у регуляції судинного тонуусу, зокрема при споживанні солі з харчовими продуктами. W.-Z. Ying and P.W. Sanders провели дослідження на лінії сіль-чутливих щурів Dahl/Rapp, у яких виникає гіпертензія при збільшенні NaCl у раціоні, які не здатні підвищити продукцію NO у відповідь на таку дієту. У результаті генетичних досліджень було встановлено, що причиною ареаактивності NO синтази у цих щурів є точкова мутація, що спричинює заміну проліну на серин у 714-му положенні її гену. Ця заміна сприяє пришвидшенню убіквітинізації індукцибельної NO синтази *in vivo* та *in vitro* із подальшою деградацією у протеасомі. Кількість ферменту зменшується, що зі свого боку зменшує продукцію NO та пояснює розвиток гіпертензії у цієї лінії щурів. Це дає нагоду припустити наявність аналогічного механізму у патогенезі АГ у людини [75].

Важливим фактором регуляції активності NO синтаз є ГТФ циклогідролаза 1 – рівень-лімітуючий фермент у синтезі тетрогідробіоптерину (BH4) (*de novo*). BH4 є одним з головних кофакторів NO синтази, без нього продукція NO ендотеліальними клітинами різко знижується. У роботі Xu J. et al. показано, що за впливу ангіотензину II виникає ендотеліальна дисфункція, що супроводжується зниженням рівня BH4 та активацією протеасомного протеолізу одночасно [83, 84, 85]. У результаті молекулярних досліджень було встановлено, що ангіотензин II підвищує рівень нітרוзування тирозину в білку PA 700, одного з активаторів 26S протеасоми, спостерігається їхня взаємодія (доведена коімунопреципітація), що веде до зменшення вмісту ГТФ циклогідролази 1 та її продукту. Інфузія ангіотензину II мишам також зменшувала рівень BH4 та порушувала ендотелій-залежну релаксацію ізольованої аорти. Ці ефекти попереджувалися застосуванням MG132. Цей приклад добре ілюструє антагоністичні взаємодії між ендотеліальною та індукційною NO синтазами, бо саме пероксинітрит, що продукується першим ферментом, спричинює нітрозилування PA 700 та запускає деградацію ГТФ циклогідролази 1, що продукує кофактор ендотеліальної NO синтази. Пригнічення продукції ONOO<sup>-</sup> L-NAME або сечовою кислотою запобігало впливу ангіотензину II на активність протеасомної деградації.

У більш пізній роботі S. Sharma et al. [84] було повністю підтверджено результати Xu J. et al. і додатково показано, що порушення функції ендотеліальної NO синтази, що викликана протеасомною деградацією ГТФ



циклогідролази 1 спричинюється асиметричним диметиларгініном (ADMA). Ця молекула завжди визначається у плазмі крові і є побічним метаболічним продуктом модифікації протеїнів у цитоплазмі всіх клітин людини. Підвищення рівня цієї сполуки спостерігається при серцево-судинних захворюваннях, метаболічних порушеннях, при інших захворюваннях, пов'язаних з віком, її рівень пов'язаний з підвищенням рівня гомоцистеїну, що також вважається важливим фактором ушкодження судинної стінки та збільшує ризик серцево-судинної патології. ADMA, конкуруючи з L-аргініном, зменшує продукцію NO та спричинює ендотеліальну дисфункцію. Застосування L-карнітину уповільнює ADMA індуквану протеасомну деградацію ГТФ циклогідролази 1, попереджуючи асоціацію цього ферменту PA 700 та білком CHIP. Це так само попереджує зниження рівня BH4 та зберігає продукцію NO. Слід зазначити, що активність протеасоми підвищувалась за дії ADMA та убіквітинізація ГТФ циклогідролази 1.

Протеїн, що зв'язується з цАМФ-чутливим елементом є одним з універсальних і надзвичайно важливих транскрипційних факторів, що зв'язують сигнальні цитоплазматичні шляхи з експресією генів. Співвідношення цАМФ/цГМФ є ключовим у регуляції функцій багатьох клітин, в тому числі гладеньком'язових клітин, а CREB, що є залежним від рівня цАМФ (cAMP - response element-binding protein), передає відповідні сигнали у ядро.

У роботі Grat C. et al. вперше зроблено спробу пов'язати АГ із CREB та протеасомою [15, 16]. Показано, що ростовий фактор тромбоцитарного походження, продукція якого збільшується при АГ, спричинює зменшення концентрації CREB, що попереджається інгібітором протеасоми. Авторами доведено, що деградація вказаного транскрипційного фактору відбувається за участі убіквітину та протеасоми. Достатньо високий рівень цього протеїну потрібен для попередження проліферації гладеньких м'язів, а отже, пригнічення протеасоми при підвищенні артеріального тиску, може мати антигіпертензивний ефект. У своїх подальших роботах американські дослідники довели ці припущення. Фармакологічні препарати (з групи глітазонів) попереджують деградацію CREB у гладеньких м'язах артерій [15].

Білок міокардин (Табл. 1) є коактиватором транскрипційного фактору SRF (serum response factor), який грає вирішальну роль у диференціації гладеньком'язових клітин, а також кардіоміоцитів.

Міокардин вибірково експресується у гладеньких м'язах та серцевому м'язі, має відношення до ембріогенезу серцево-судинної системи та її адаптації до гемодинамічних порушень. Цей білок фізично взаємодіє з білком транскрипційного фактору SRF, активуючи групу генів, для диференціації зазначених вище клітин. При мутації у гені міокардину зменшується експресія скоротливих протеїнів у гладеньких м'язах. У роботі Xie P. et al. вперше отримано докази, що убіквітин залежний протеоліз має безпосереднє відношення до регуляції міокардину у гладеньких м'язах [79].

Це відбувається за рахунок наявності убіквітин-лігазної активності у протеїні, що взаємодіє з Hsc70 С кінцем (C terminus of Hsc70-interacting protein, CHIP). Добре відомо, що він є одним з провідних факторів машинерії з контролю якості протеїнів, його експресія є маркером стресу ендоплазматичного ретикулуму, що, зокрема, виникає при накопиченні білків, що здатні до агрегації. Також він грає важливу роль у клітинному рості, апоптозі та нейродегенерації.

Однак його роль у диференціації гладеньком'язових клітин та підтриманні судинного тонузу залишається маловивченою. Американськими вченими було показано, що РНК інтерференція CHIP значно збільшує експресію міокардин-індукованих генів у гладеньких м'язах, а саме актину та міозину. Навпаки, гіперекспресія CHIP спричинювала зменшення експресії цих генів, рівень мРНК та білка міокардину. Інгібітор протеасоми водночас попереджував зменшення рівня міокардину. Автори виявили колокалізацію CHIP та міокардину, а також довели убіквітинізацію *in vitro* останнього протеїну. У функціональних експериментах зі застосуванням норадреналіну, ацетилхоліну та нітропрусиду було показано, що гіперекспресія CHIP в кільцевих препаратах аорти зменшує здатність до скорочення та збільшує здатність до розслаблення судинного препарату. Таким способом, від рівня CHIP у гладеньком'язових клітинах та рівня активності протеасоми буде залежати рівень міокардину та, опосередковано, і функціональні властивості судинної стінки, а саме, чим менше міокардину, тим менша здатність до

скорочення. За даними Xie P. et al. важливе значення за такої умови має кіназа глікогенсинтази  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ): застосування специфічного інгібітору цієї кінази зменшувало рівень убіквітинованого міокардину, що свідчить про те, що СНІР розпізнає і убіквітинізує саме фосфорильовану форму міокардину, залучаючи до цього процесу GSK- $3\beta$ . Слід наголосити, що GSK- $3\beta$ , окрім міокардину має ще й інші важливі мішені, зокрема, фосфорилує  $\beta$ -катенін та ядерну форму міозину.

$\beta$ -катенін запускає убіквітинування та протеасомну деградацію, зменшуючи можливість гіпертензивного ремоделювання [60]. Фосфорилування ж ядерного міозину кіназою GSK- $3\beta$ , навпаки, захищає протеїн від протеасомної деградації, що також активує транскрипцію генів, що кодують субодиниці рибосом у G1 фазі клітинного циклу [63].

У роботі Pfisterer et. al (2012) на препаратах аортальних кілець отримано дані, що певною мірою є суперечливими відносно вищезазначених тверджень. При моделюванні DOCA-сольової гіпертензії у мишей, експресія мРНК та концентрація білку міокардину значно зменшувалась, так само як і експресія його гену-мішені – кальпоніну [56]. Автори доводять вирішальне значення біомеханічного фактору, що запускає фосфорилування міокардину при перфузії ізольованих артерій миші та за впливу циклічного розтягнення культури гладеньком'язових клітин людини. Водночас застосування інгібітору протеасоми (bortezomib) збільшувало вміст міокардину в ядрах гладеньких м'язів. Загалом цей механізм грає роль у переключенні контрактильного типу ГМК на

синтетичний при гіпертензії, тому у цьому аспекті застосування інгібіторів протеасоми має перспективи для попередження ремоделювання судинної стінки.

Активация протеасомного протеолізу є важливим елементом для звільнення NF-κB від інгібітора, а саме, останній зазнає убіквітинзалежного протеасомного протеолізу за умов дії на клітини прозапальних цитокінів, а також вазоактивних речовин, зокрема, ангіотензину II. Зрозуміло, що за цих умов пригнічення активності протеасоми запобігає експресії NF-κB залежних генів та зменшує відповідь судинної стінки на ангіотензин II, ремоделювання судинної стінки та артеріальний тиск загалом. Так, в роботі Li et.al. показано, що ангіотензин II індукована гіпертензія попереджається аплікацією bortezomib, проте спостерігається пригнічення інгібітором збільшення протеасомальної активності, попереджається збільшення товщини медії, кількість ГМК у смужках аорти, а також експресія тканинних інгібіторів матриксних протеїнів (TIMP2 та TIMP1), самої матриксної протеїнази (MMP2), нормалізація індексу клітинної проліферації у аорті [37].

Експресія гену-мішені NF-κB молекули клітинної адгезії судинних клітин (VCAM 1) також закономірно знижується при застосуванні bortezomib разом з ангіотензином II. Не зважаючи на те, що інгібітори протеасоми при низьких концентраціях, можуть запобігати прозапальній активації в ендотеліальних клітинах, у роботі Ludwig A. et al. показана активація цих імунних реакцій, опосередкованих NF-κB [39]. У лінії щурів

чутливих до високосолевої дієти, інгібітори протеасоми, зокрема bortezomib, зменшували прояви індукованого гіпертензією оксидативного стресу та експресію молекули клітинної адгезії судинних клітин (VCAM 1) у аорті.

Тіазид чутливий NaCl котранспортер (NCC), ще один фактор, що бере участь у реабсорбції солі у нирках. Цей білок є мішенню для тіазидних діуретиків, що також широко використовуються при лікуванні гіпертензії. Мутація у гені, що кодує цей котранспортер є причиною розвитку синдрому Джітельмена (Gitelman syndrome) – спадкового аутосомно-рецесивного розладу з прогресивною втратою солей внаслідок мутації та порушенням функції NCC або із прискореною його деградацією. Саме механізми прискореної деградації зацікавили P. G. Needham et al., які довели залучення ендоплазматичного ретикулуму та протеасомного протеолізу в обміні NCC [49]. У результаті дослідів було встановлено, що деградація NCC залежить від убіквітин-лігази Hrd 1, яка локалізована на мембрані ендоплазматичного ретикулуму. При від'єднанні шаперонів у просвіті ЕПР від білка NCC відбувається убіквітинування білку та його деградація, що залежить від активності цитоплазматичного Hsp 60 та, звичайно, і протеасоми. Пригнічення активності протеасоми в цих експериментах попереджувало зменшення кількості NCC. Отже, можна дійти до висновку, що висока активність протеасоми у клітинах каналців нирки буде сприяти зменшенню кількості NCC, уповільнювати реабсорбцію натрію та хлору та забезпечувати зменшення артеріального тиску, тоді як пригнічення

активності протеасоми збільшить кількість молекул NCC, підвищить ефективність реабсорбції солі та підвищить артеріальний тиск.

Роль убіквітин-залежного протеасомного протеолізу у гіпертрофії серця, що є безпосереднім наслідком АГ, активно вивчається останні 10-15 років. За цей час доведене значення протеасомного протеолізу у деградації або модуляції роботи цілої низки білків, що мають безпосереднє відношення до механізмів розвитку гіпертрофії міокарда. Серед останніх найбільш важливе значення мають: білки скоротливого серця (міозин [12], тропонін I [31], кальциневрин [10] та NFAT (ядерний фактор активованих T клітин) [69], PKCepsilon,  $\beta$ -катенін, телетонін [63], NF  $\kappa$ B [41], титін [24], низки білків регуляторів апоптозу (IAP, XIAP, каспази 3,7,9, MDM2 [31], p53 [3, 53], циклін D1 [40], HIF [87], c-Jun [35], AMPK [88], кіназа легких ланцюгів міозину (cMLCK) [74], протеїн асоційований із рецептором ангіотензину II першого типу [36], сіртуїн [28].

Перша робота присвячена дослідженню ролі протеасомного протеолізу у деградації міофібрилярних протеїнів з'явилась у 1999 році [12]. Американськими дослідниками було показано, що специфічний інгібітор протеасоми – лактацистин при додаванні у культуру неонатальних кардіоміоцитів щурів спричинює значне підвищення відношення загальної кількості протеїнів до ДНК і подовження напівжиття важких ланцюгів міозину. Інші інгібітори протеасоми давали аналогічний результат. Ефект блокаторів кальцієвих каналів, що проявляється прискоренням деградації міозину, також відмінявся інгібіторами протеасоми.

У роботі Такаока М. et. al визначили зміни активності протеасоми при розвитку АГ, а саме було встановлено підвищення хімотрипсиноподібної активності в аорті у DOCA-salt щурів [66]. Автори визначили підвищення хімотрипсиноподібної активності протеасоми в аорті при моделюванні АГ шляхом інфузій ангіотензину II та при моделюванні діабетичної та холестеринової вазопатії. Слід зазначити, що протеасомний комплекс має три протеолітичні активності (окрім зазначеної вище, ще й трипсиноподібна та пептидилглутаміл пептид-гідролазна активність), які за нашими даними [53, 54] можуть змінюватись різною мірою, і оптимальним є визначення усіх трьох активностей протеасоми.

Зовсім немає робіт, присвячених дослідженню змін експресії генів, що кодують субодиниці протеасоми, у тканинах аорти чи гладеньком'язових клітинах за нормальних умов чи АГ. Ще у 1998 році Такаока М. et al. [67] встановили антигіпертензивний ефект інгібітору протеасоми (N-benzyloxycarbonyl-Phe-Glu(O-t-Bu)-Ala-leucinal, PSI) при дезоксикортикостерон ацетат - сольової моделі артеріальної гіпертензії у щурів. Було показано, що зростання артеріального тиску у тварин збігалось з підвищенням активності та вмісту протеасоми в артеріальній стінці, а призначення PSI упродовж чотирьох тижнів експерименту попереджувало зростання артеріального тиску та вказані зміни у протеасомному протеолізі. У наступних дослідженнях цих вчених встановлено, що у реалізації антигіпертензивної дії інгібітора протеасоми має значення зниження вмісту потужного вазоконстриктора ендотеліну-1 та пригнічення проліферації



гладеньком'язових клітин у аорті [66, 20, 50]. У більш сучасних клінічних дослідженнях було доведено, що вміст та активність протеасоми у атеросклеротичних бляшках коронарних судин жінок, що отримали у постменопаузальному періоді гормонозамісну терапію, значно менше, ніж у тих жінок, що не отримували даного лікування, що збігалось зі стабілізацією артеріального тиску у перших [46].

## РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи дослідження

### 2.1. Характеристика клінічного матеріалу

У досліджувану групу увійшли 147 підлітків, хворих на есенціальну АГ, що проходили лікування у відділенні ревмокардіології Дитячої клінічної лікарні №6 м. Києва. Про первинний характер АГ робили висновки, судячи з даних клінічного дослідження, добового моніторингу АТ та дослідження функції нирок і залоз внутрішньої секреції відповідно до рекомендацій Американської робочої групи з контролю підвищеного тиску у дітей і підлітків (NHBPEP) [70]. Діагноз верифікували за результатами добового моніторингу АТ на 5-7-му добу стаціонарного обстеження з застосуванням моніторів тиску «АВРМ-04/М» (Meditech, Угорщина) з використанням плечової манжетки. Оцінку результатів добового моніторингу АТ проводили за загальноприйнятими методами [70].

Контрольну групу склали 208 школярів м. Києва відповідного віку з нормальним АТ за результатами разових вимірювань за рекомендаціями [70].

Як видно з порівняльної Табл. 2.1, дослідна та контрольна групи не відрізнялися за віком і співвідношенням статей ( $P > 0.05$  за  $\chi^2$ -критерієм), що дало нам змогу порівнювати ці групи за розподілом різних алельних варіантів досліджених генів. За такими клінічними показниками, як індекс маси тіла та діастолічний артеріальний тиск групи не відрізняються також, проте у хворих з досліджуваної групи систолічний тиск статистично достовірно вищий, ніж у практично здорових осіб контрольної групи.

*Таблиця 2.1. Основні показники хворих на артеріальну гіпертензію та практично здорових осіб (контроль), яких було включено до дослідження*

<b>Параметри</b>	<b>Контроль (n=208)</b>	<b>АГ (n=147)</b>
<b>Стать, чоловіки/жінки</b>	140/68	104/43
<b>Вік, роки <math>\pm</math> SD</b>	13,7 $\pm$ 1,12	14,3 $\pm$ 1,62
<b>ВМІ, кг/м<sup>2</sup> <math>\pm</math> SD</b>	19,3 $\pm$ 3,44	23,0 $\pm$ 4,26
<b>SBP, мм рт.ст. <math>\pm</math> SD</b>	107,5 $\pm$ 6,86	128,8 $\pm$ 7,94 *
<b>DBP, мм рт.ст. <math>\pm</math> SD</b>	68,4 $\pm$ 6,13	74,8 $\pm$ 8,82

BMI – індекс маси тіла, SBP – систолічний тиск крові, DBP – діастолічний тиск крові, SD – стандартне відхилення, \* – P<0.05.

## **2.2. Генетичні методи визначення алельного поліморфізму**

Матеріалом дослідження була периферична венозна кров або букальний епітелій підлітків. Венозну кров забирали у стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (11,7 ммоль/л) як антикоагулянта (Sarstedt, Німеччина), заморожували та зберігали при температурі -20°C. Букальний епітелій заморожувався і зберігався. Усі особи підписали згоду на використання свого біологічного матеріалу для генетичних досліджень. Комітет з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця розглянув матеріали дисертаційної роботи і вважає, що робота відповідає принципам комітету та може виконуватися як дисертаційна робота (№2/19 від 28.02.2019).

### ***2.2.1. Виділення ДНК із біологічного матеріалу***

ДНК виділяли з цільної крові або букального епітелію із використанням наборів DIAtom DNA Prep (Isogene). Даний метод базується на використанні лізуючого реагенту з гуанідин ізоціонатом, який призначений для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрису, а також для денатурації клітинних нуклеаз. За присутності лізуючого реагенту, ДНК активно сорбується на *NucleoS<sup>TM</sup>*-сорбенті, потім легко відмивається від білків та солей спиртовим розчином. Згодом ДНК екстрагують із сорбента та переносять у стерильні вільні від ДНК та РНК мікропробірки. Отримана ДНК може безпосередньо використовуватися для проведення полімеразної ланцюгової реакції. Набір дозволяє виділяти із біологічного матеріалу високомолекулярну ДНК (40-50 тисяч пар нуклеотидів високої чистоти ( $OD_{260/280nm}$  1,6 – 2,0). У процесі виділення ДНК ми дотримувалися рекомендацій наведених у комерційному наборі, та проводили маніпуляції відповідно до наступного протоколу.

#### *Протокол виділення ДНК*

1. У пробірку об'ємом 1,5 мл внести 100 мкл цільної венозної крові або внести урогенітальний зонд з букальним епітелієм та додати 400 мкл лізуючого розчину. Перемішати вміст пробірок обертанням 10 разів.
2. Термостатування суміші 5 хв при температурі 65°C.
3. Центрифугування пробірок протягом 10 с при 5 000 об/хв та додавання ретельно збовтаної на вортексі 20 мкл суспензії сорбенту *NucleoS<sup>TM</sup>*.

4. Перемішування проб упродовж 10 хвилин.
5. Центрифугування пробірок протягом 10 с при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись до осаду сорбенту.
6. Додавання 200 мкл лізуючого розчину, ретельне перемішування на вортексі до гомогенного стану.
7. Додавання 1 мл сольового розчину та перемішування пробірок 10 разів.
8. Центрифугування пробірок протягом 10 с при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись до осаду сорбенту із ДНК.
9. Додавання 1 мл сольового розчину та перемішування пробірок на вортексі до гомогенного стану.
10. Центрифугування пробірок протягом 10 с при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись до осаду сорбенту із ДНК.
11. Повторне виконання положень 9 та 10 протоколу.
12. Висушування осаду при температурі 65°C протягом 5 хв.
13. Додавання у пробірки 50 мкл ЕкстраГену™ при постійному перемішуванні останнього розчину.

14. Суспензування вмісту пробірок на вортексі до отримання гомогенної суспензії і термостатування при температурі 65°C упродовж 5 хв.

15. Суспензування вмісту пробірок та центрифугування протягом 1 хв при 10 000 об/хв.

16. Перенесення супернатанту до мікропробірок та зберігання при температурі -20°C.

### **2.2.2. Визначення алельного поліморфізму гену *LMP2*-субодиниці імунопротеасому (*Arg<sub>60</sub>→His*)**

Методом полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів визначали *Arg<sub>60</sub>→His* поліморфізм гену *LMP2* за Vinasco J. et al. з модифікаціями [72]. Для цього ампліфікували ділянку вказаного гену за допомогою пари специфічних праймерів: прямий (sense) – 5`-CTTGAACCAGGGAGGCGAAGTTTG-3` і зворотний (antisense) - 5`-CAGCTGAACCAGAGAGTGCATAGT-3` (Синтол). Для ампліфікації брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 рМ кожного з праймерів і 0.5 ОД Таq-полімерази (АмпліСенс), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері GeneAmp System 2700 (Applied Biosystems", США). Ампліфікація фрагменту гену *LMP2* складалася з 35 циклів: денатурація – 94°C (1 хв), гібридизація праймерів – 63°C (30 с) і елонгація –

74°C (1 хв). Далі 6 мкл продукту ампліфікації фрагменту гену інкубували при 37°C упродовж 18 годин з 2 ОД рестриктази *Hin*6I (Ферментас, Литва) в буфері  $Y^+$  такого складу: 33 мМ трис-ацетата (рН 7,9), 10 мМ ацетату магнію, 66 мМ ацетату калію, 0,1 мг/мл сироваткового альбуміну бика (BSA); або з 2 ОД рестриктази *Alw*21I у буфері  $O^+$  такого складу: 50 мМ трис-ацетата (рН 7,5), 10 мМ хлориду магнію, 100 мМ хлориду натрію, 0,1 мг/мл BSA (Ферментас, Литва). Якщо у гені *LMP2* знаходився гуанідин, то ампліфікат, який складався з 228 пар основ, розщеплювався рестриктазою *Hin*6I на два фрагменти – 199 і 29 пар основ. У разі заміни гуанідину на аденін сайт рестрикції для *Hin*6I втрачається, а для рестриктази *Alw*21I – з'являється і утворюються два фрагменти вказаного розміру (Рис. 2.1). Ампліфікати після рестрикції розділяли в 2,5 % агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Візуалізація ДНК після горизонтального електрофору (160 V протягом 40 хв) проводилася за допомогою транслюмінатора (Біоком) та відеосистеми ViTran.



Рис. 2.1. Результати електрофору фрагменту гену *LMP2* після рестрикції з використанням ферменту *Hin*6I. Доріжки: 2, 3, 5, 8, 12 відповідають *Arg/Arg*-генотипу, 1, 4, 6, 7, 10, 11 – *Arg/His*-генотипу, 9 – *His/His*-генотипу.

### 2.2.3. Визначення алельного поліморфізму гену *LMP7*-субодиниці імунопротеасоми (*Lys*<sub>145</sub>→*Gln*)

Алельний поліморфізм гену *LMP7* (*Lys*<sub>145</sub>→*Gln* поліморфізм) також визначали шляхом ампліфікації фрагменту із подальшою рестрикцією [72]. Послідовність нуклеотидів у специфічних праймерах була такою: прямий (sense) – 5`-CGGACAGATCTCTGGGTGCT-3` і зворотний (antisense) - 5`-СТТСССТАСТGCCCCAAGCT-3`. У ампліфікацію брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, яка містила 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 рМ кожного з двох праймерів і 0,5 ОД Таq-полімерази (АмпліСенс). Об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація фрагменту гену *LMP7* складалася з 38 циклів: денатурація – 94°C, 1 хв, гібридизація праймерів – 63°C, 35с та елонгація – 74°C, 1 хв. Для визначення SNP гену *LMP7* 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C упродовж 20 годин із 5 ОД рестриктази *Hind*III (СибЕнзим, Росія) у буфері такого складу: 10 мМ трис-гідрохлориду (рН 8,5), 10 мМ хлориду магнію, 100 мМ хлориду натрію, 0,1 мг/мл BSA, 1 мМ дитіотреїтолу; або з 2 ОД рестриктази *Mva*1269I в буфері R<sup>+</sup>.





Рис. 2.2. Результати електрофорезу фрагменту гену *LMP7* після рестрикції із застосуванням ферменту *Mva1269I*. Доріжки 1-6, 8, 9 відповідають *Lys/Lys*-генотипу, 7 – *Lys/Gln*-генотипу.

Більш розповсюджений алельний варіант гену *LMP7* з цитозином (розмір ампліфікату - 193 пар основ) розщеплювався рестриктазою *HindIII* на два фрагменти – 179 та 14 пар основ. У разі заміни цитозину на аденін ампліфікат розрізався рестриктазою *Mva1269I* на два фрагменти вказаного розміру (Рис. 2.2).

Ампліфікати після рестрикції розділяли в 2,5 % агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Візуалізація ДНК після горизонтального електрофорезу (160 V протягом 40 хв) проводилася за допомогою транслюмінатора (Біоком) та відеосистеми ViTran.

#### 2.2.4. Визначення алельного поліморфізму промотору гену *PSMA6* – субодиниці протеасоми ( $C^{-8} \rightarrow G$ )

Алельний поліморфізм гену *PSMA6* ( $C^{-8} \rightarrow G$ ) визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі із застосуванням TaqMan® SNP Assay C\_11599359\_10 та 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, США) [72]. Програма ампліфікації

складалася з 50 циклів (денатурація – 92°C, 15с, гібридизація та елонгація – 60°C, 1 хв, після чого проводили аналіз за дискримінацією алелей (Рис. 2.3).

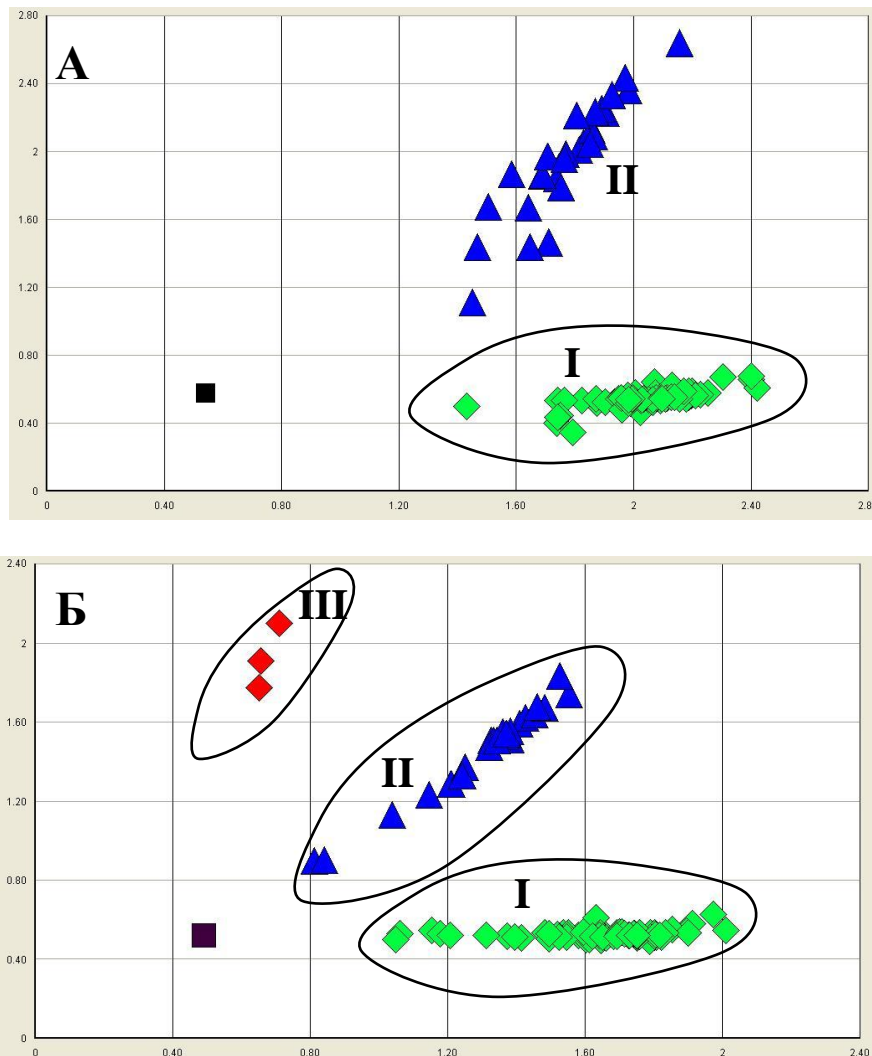


Рис. 2.3. Результати дискримінації алелей гену PSMA6 із застосування 7500 Fast Real-time PCR System у 95 дітей контрольної групи (А) та у 95 дітей хворих на артеріальну гіпертензію (Б). I – гомозиготи C/C, II – гетерозиготи C/G, III – гомозиготи G/G, ■ – проба, що не містила ДНК.

### 2.3. Характеристика експериментального матеріалу

Експерименти проводили на самцях щурів 6-ти місячного віку, ліній Wistar масою  $295 \pm 22$  г та SHR масою  $294 \pm 27$  г, які були поділені на 3 групи:

- до I – (контрольної) увійшли щури лінії Wistar (n=8),

- до II - щури лінії SHR (n=8),
- до III – щури лінії SHR (n=16), що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» упродовж 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг, щодня.

Препарат подрібнювали та домішували до стандартного корму, пресуючи гранули для згодовування щурам.

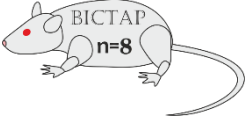
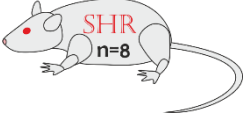
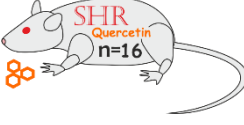
Об'єктами дослідження були тканини серця та аорти щурів обох ліній.

#### **2.4. Методика реєстрації артеріального тиску у щурів**

Гіпертензія у щурів лінії SHR підтверджували вимірюванням артеріального тиску неінвазивним шляхом у хвостовій артерії. Для цього був використаний вимірювальний комплекс SPHYGMOMANOMETER S-2 («HSE», Німеччина). Частоту пульсу реєстрували за допомогою осцилоскопа HM303-4 (HAMEG GmbH, Німеччина). Щури обережно поміщалися у циліндричну ємність так, щоб їхні хвости були доступні для проведення дослідження. Безпосередньо перед вимірюванням щурів на 20 хв залишали у спокої та при температурі навколишнього середовища 37°C, щоб вони адаптувалися й заспокоїлися, а їхні показники тиску стабілізувалися.

Виміри проводилися у 4-х місячному віці, у дослід відбирали щурів із систолічним тиском понад 150 мм рт. ст.

Таблиця 2.2. Схеми дослідження

Етапи дослідження	Дослідження впливу гіпертензії	Дослідження впливу Quercetin
Групи дослідження	 <p>1) щури Wistar, n=8</p>	
Експериментальні умови	 <p>2) Спонтанно-гіпертензивні щури, n = 8</p> <p>Стандартні умови й стандартний раціон. Спонтанногіпертензивний статус SHR підтверджено дослідженням тиску у хвостовій артерії (&gt;150 мм рт.ст).</p>	 <p>3) Спонтанно-гіпертензивні щури, n=16</p> <p>Дієта з додаванням кверцетину у дозі 15 мг/кг протягом 8 тижнів. Спонтанногіпертензивний статус SHR підтверджено дослідженням тиску у хвостовій артерії (&gt;150 мм рт.ст).</p>
Забір матеріалу	<p>Щурів наркотизували (в/о введення розчину уретану, 1,5 мг/кг), після чого проводилося визначення кардіогемодинаміки, та подальший забір крові, зразків серця та аорти для досліджень.</p>	<p>Після 8 тижнів вигодовування терапевтичною дієтою щурів наркотизували (в/о введення розчину уретану, 1,5 мг/кг), після чого проводилося визначення кардіогемодинаміки, та подальший</p>

	забір крові, зразків серця та аорти для досліджень.
Методи дослідження	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Визначення параметрів кардіогемодинаміки <i>in vivo</i> за допомогою мікрокатетерів Millar Instruments з подальшою обробкою отриманих даних на спеціалізованому програмному забезпеченні Chart™ v.5.4.2 та PVAN 3.6</li> <li>• Забір крові для подальшого біохімічного аналізу ліпідного профілю</li> <li>• Забір зразків аорти для морфо-гістологічних, ультраструктурних та морфометричних досліджень</li> <li>• Забір зразків серця та аорти подальшого визначення за допомогою ПЛР реального часу експресії генів, що кодують субдиниці протеасоми: <i>PSMB1</i>, <i>PSMB2</i>, <i>PSNB5</i>, <i>PSMB9</i>, <i>PSMB10</i>, <i>PSME1</i> та <i>PSMC1</i></li> <li>• Визначення трипсино-, хімотрипсиноподібної та пептидилглютамін пептид-гідролазної активностей протеасоми у такнинах аорти та серця досліджуваних тварин</li> </ul>
Отримані результати	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Параметри кардіогемодинаміки</li> <li>• Концентрація холестеринових фракцій у плазмі крові</li> <li>• Кількісні та якісні дані по морфо-гістологічних та ультраструктурних змінах у тканинах аорти та серця досліджуваних тварин</li> <li>• Експресія генів <i>PSMB1</i>, <i>PSMB2</i>, <i>PSNB5</i>, <i>PSMB9</i>, <i>PSMB10</i>, <i>PSME1</i> та <i>PSMC1</i> у тканинах серця та аорти</li> <li>• Статистичний аналіз</li> </ul>

## 2.5. Реєстрація та аналіз кардіодинамічних показників *in vivo*

Щурів наркотизували уретаном із розрахунку 1,5 г на 1 кг маси тіла. Тварину фіксували на операційному столі, препарували праву сонну артерію. Стандартний 2F катетер для реєстрації тиску з відстанню між сигнальними електродами у 9,0 мм (SPR-838; Millar Instruments, USA) калібрували за об'ємом шляхом занурення катетера у калібрувальну кювету (P/N 910-1048), яка складає собою ряд циліндричних отворів відомого діаметру (від 2 до 15 мм) та об'єму (від 28,27 до 1590 мкл), залитих кров'ю щура з додаванням гепарину. Катетер вводили через праву сонну артерію (right common carotid artery) ретроградно у лівий шлуночок для запису показників гемодинаміки в умовах закритої грудної порожнини за допомогою Chart™ v.5.4.2 (ADInstruments, Millar Instruments, USA). Співвідношення тиску-об'єму лівого шлуночка аналізували за допомогою пакету програм PVAN 3.6 (ADInstruments, Millar Instruments, USA) з конвертацією відносних одиниць об'єму (RVU) в абсолютні одиниці об'єму за допомогою формули ( $\text{slope } 20,25 \times \text{RVU} - \text{intercept } 29,05$ ). Водночас розрахунки базувалися на початковому калібруванні катетера і повторних калібруваннях приладу MPVS 400 Systems для реєстрації показників.

Застосування системи MPVS 400 та катетеру, на якому розташовано сенсорні електроди для визначення тиску та об'єму, дає миттєво отримувати криві, що описують залежність тиску та об'єму протягом кожного серцевого циклу. У реальному часі отримали показники максимального та

мінімального тиску, частоти серцевих скорочень, об'єму ЛШ, а також першої похідної тиску –  $dP/dt$  (Рис. 2.4).

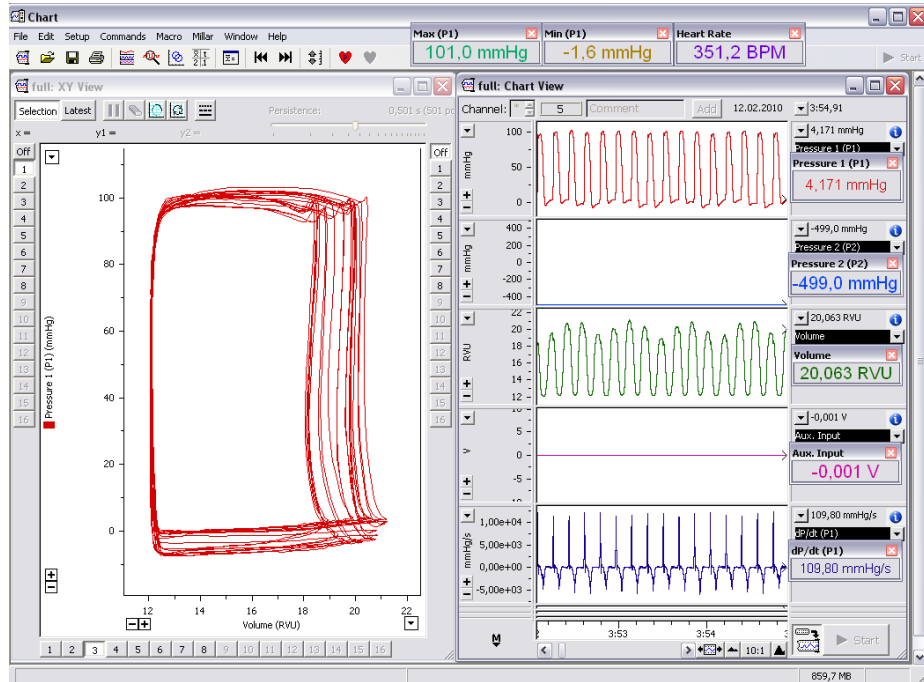


Рис. 2.4. Оригінальна крива залежності тиску від об'єму (ліворуч) та криві зміни тиску, об'єму та  $dP/dt$ .

Схематично фази серцевого циклу та окремі показники механічної функції серця зображено на Рис. 2.5.

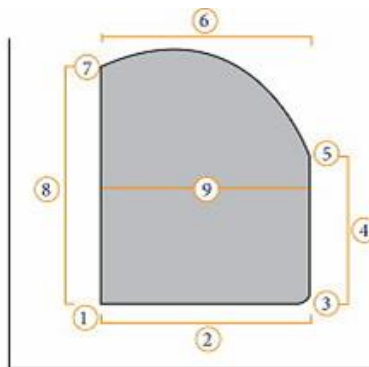


Рис. 2.5. Схематичне зображення серцевого циклу. 1 - відкриття мітрального клапану, 2 - діастолічне наповнення, 3 - закриття мітрального клапану, 4 - ізovolюмічне скорочення, 5 - відкриття аортального клапану, 6 - викид крові, 7 - закриття аортального клапану, 8

– ізвольомічне розслаблення,  $Q$  – ударний об'єм, ділянка сірого кольору – робота серця по викиду крові.

Запис показників кардіодинаміки було здійснено у двох режимах: у вихідному стані та за умов тимчасової (протягом 7-10 с) оклюзії задньої порожнистої вени.

Застосування системи MPVS 400 у вихідному стані дає оцінювати залежні від умов навантаження серця показники. Основні гемодинамічні параметри, які реєструвалися та аналізувалися, можна розбити на декілька груп: насосна функція, діастолічна функція, скоротлива функція, переднавантаження, постнавантаження, артеріально-шлуночкове спряження.

**Насосна функція** оцінювалася за комплексом показників: хвилинний об'єм крові (ХОК), фракція викиду (ФВ), ударний об'єм (УО), ударна робота (УР), частота серцевих скорочень (ЧСС).

$$\text{ХОК} = \text{УО} \times \text{ЧСС},$$

$$\text{УО} = \text{КДО} - \text{КСО},$$

$$\text{ФВ} = \text{УО} \cdot 100 \% / \text{КДО}$$

**Діастолічну функцію** досліджували за допомогою таких показників: максимальна швидкість розслаблення міокарда ( $dp/dt_{\min}$ ), константа активного розслаблення  $\tau$  за методом Glantz ( $\tau_g$ ) та за методом Weiss ( $\tau_w$ ).

**Жорсткість міокарда** оцінювали за допомогою співвідношення КДТ/КДО.



**Скоротливу функцію** вивчали за результатами визначення максимальної швидкості скорочення міокарда ( $dp/dt_{max}$ ), а також максимальної сили (МС) і максимальної сили, зрівноваженої на переднавантаження (МСЗП), що є співвідношенням максимальної величини сили під час серцевого циклу до квадрату кінцево-діастолічного об'єму [65].

**Переднавантаження і постнавантаження серця** вимірювали за допомогою визначення кінцево-діастолічного об'єму (КДО) та ефективної артеріальної жорсткості (АЖ) відповідно. Артеріальна жорсткість відображає скоріше комплекс властивостей судин, ніж напряду свідчить про їхню жорсткість. За поглядами Sagawa K. [59], артеріальна жорсткість одночасно описує такі основні елементи судинного навантаження: загальний периферичний опір судин, податливість судин, показник імпедансу, тривалість систоли та діастоли. У контексті аналізу гемодинамічних параметрів цей показник може слугувати для оцінки постнавантаження серця і розраховується за формулою  $АЖ=КСТ/УО$ .

Крім того, оцінювали кінцево-систоличний тиск (КСТ), кінцево-діастолічний тиск (КДТ), кінцево-систоличний об'єм (КСО), кінцево-діастолічний об'єм (КДО).

Застосування системи MPVS 400 за умов тимчасової оклюзії задньої порожнистої вени дає змогу оцінити незалежні від навантаження показники кардіодинаміки.

Здійснювали невеликий розріз нижче мечовидного відростку для запису показників гемодинаміки в умовах відкритої черевної порожнини (Рис. 2.6), а також для впевненості у стабільності препарату до запису показників гемодинаміки в умовах зниженого притоку крові до серця [6]. На основі кривих, отриманих під час тимчасових оклюзій задньої порожнистої вени в умовах відкритої черевної порожнини, було отримано такі параметри: кінцево-систоличне співвідношення тиску-об'єму, що є індексом кінцево-систоличної жорсткості міокарда ( $\text{ЖМ}_{\text{КС}}$ ), і максимальне значення жорсткості міокарда ( $\text{ЖМ}_{\text{макс}}$ ).

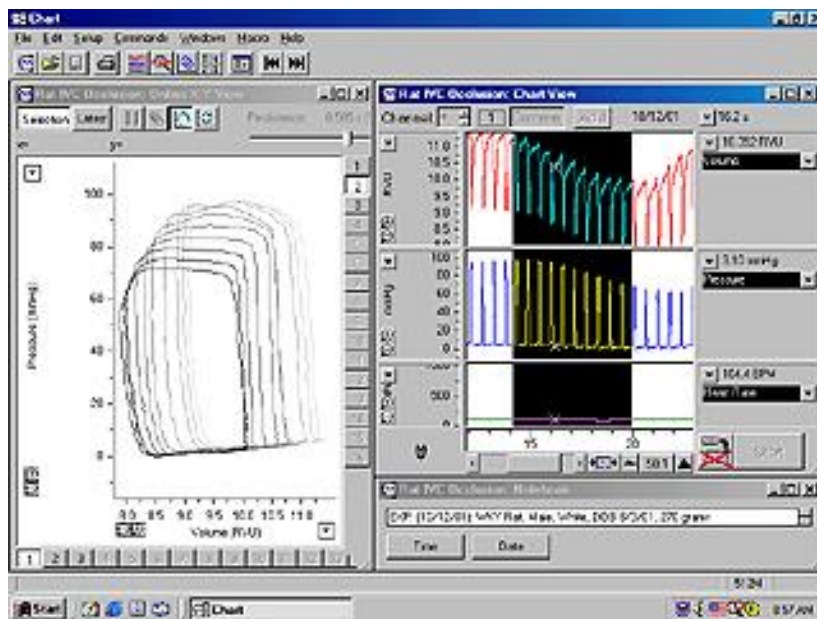


Рис. 2.6. Зміни показників кардіодинаміки при тимчасовій оклюзії задньої порожнистої вени.

За концепцією Suga H. і Sagawa K. [59], лівий шлуночок серця характеризується змінною жорсткості у часі (time-varying elastance). У кожній точці серцевого циклу еластичні властивості лівого шлуночка можна оцінити за допомогою показника жорсткості міокарда (ЖМ), який

збільшується при переході серця із діастолічної фази у систолу. Відповідно до цієї концепції при тимчасовій оклюзії задньої порожнистої вени або аорти визначають такі показники: кінцево-систолічне співвідношення тиску-об'єму, кут нахилу якого є індексом кінцево-систолічної жорсткості міокарда ( $ЖМ_{кc}$ ), максимальне значення жорсткості міокарда ( $ЖМ_{макс}$ ), та кінцево-діастолічне співвідношення тиску-об'єму, кут нахилу якого відображає здатність міокарда до розтягнення або його кінцево-діастолічну жорсткість ( $ЖМ_{кд}$ ) (Рис. 2.7). Зазначений підхід дає змогу оцінити максимальний резерв скоротливої активності ( $ЖМ_{макс}$  та  $ЖМ_{кc}$ ), що у дослідженнях Меєрсона [91] досягається встановленням величини максимального тиску лівого шлуночка ( $P_{max}$ ) із наступною можливістю побудови кривої, аналогічної кінцево-систолічному співвідношенню тиску-об'єму. Індокси  $ЖМ_{макс}$  ( $E_{max}$ ) та  $ЖМ_{кc}$  ( $E_{es}$ ) широко використовуються для оцінки скоротливої функції міокарда. Ці показники вказують на ступінь максимального або кінцево-систолічного стискання міокарда лівого шлуночка, нормалізованого до об'єму лівого шлуночка. Відомо, що вказані індокси є відносно незалежними від перед- та постнавантаження.



Рис. 2.7. Схематичне зображення залежності тиску-об'єму та похідних: кінцево-систолического та кінцево-діастолічного співвідношень,  $ЖМ_{кс}$ ,  $АЖ$ .

$АЖ/ЖМ$  є важливою детермінантою функції серця та серцевого енергетичного стану. Відповідне співвідношення між лівим шлуночком та артеріальною системою за умов спокою призводить до оптимальної передачі крові з лівого шлуночка до периферії без надлишкових змін тиску; до оптимальної ударної роботи, енергетичної ефективності, тобто кількості енергії, спожитої міокардом для розвитку необхідної ударної роботи. Співвідношення  $АЖ/ЖМ$  у межах 0,6–1,2 у стані спокою, як вважають, описує оптимальну взаємодію між системами лівого шлуночка та судин, а також вказує на близький до оптимального баланс між механічною та енергетичною ефективністю. При розвитку серцевої недостатності описано зміни в сторону збільшення цього індексу.

## **2.6. Дослідження ліпідного спектру крові**

Концентрацію холестерину, тригліцеридів, ліпопротеїдів високої, низької та дуже низької щільності було досліджено у крові щурів, за допомогою біохімічного аналізатору BioSystemA25 (Bio-SystemsS.A., Іспанія). Індекс атерогенності розраховувався за наступною формулою: (загальний холестерин – ліпопротеїди низької щільності) / ліпопротеїди низької щільності.

## **2.7. Гістологічні та морфометричні дослідження**

### **Індекс маси серця**

Оцінюючи гіпертрофію серця у щурів лінії SHR визначали індекс маси серця за співвідношенням маси серця у мг до маси тіла щура у г.

### **Фібротичні зміни у міокарді лівого шлуночка**

Для визначення фібротичних змін у міокарді лівого шлуночка щурів аналізували заморожені поперечні зрізи товщиною 10 мкм, із чотирьох ділянок серця, які фарбувалися за методом Ван Гізона (барвником служить суміш кислого фуксину й пікринової кислоти, причому перший компонент забарвлює сполучну тканину в яскраво-червоний колір, а другий надає іншим структурам тканини жовтого забарвлення). Розростання сполучної тканин оцінювали як відсоток від поперечного зрізу площі лівого шлуночка.

### **Ліпідна інфільтрація тканин аорти**

Ліпідна інфільтрація тканин аорти була визначена за допомогою специфічного барвника OilRed (Sigma-Aldrich). Заморожені дуги аорти досліджуваних тварин були використані для гістологічних досліджень. За допомогою кріомікротома були зроблені зрізи товщиною 8-10 мкм з 3 сегментів дуги аорти з інтервалом 2-3 мм. Після чого зрізи фіксувалися на склі. Базовий розчин OilRed розводився ізопропанолом у співвідношенні 3:2, відфільтровувався і використовувався надалі для забарвлення мікропрепаратів протягом 10 хв. Після чого, зразки промивалися дистильованою водою й забарвлювалися гематоксиліном упродовж 3 хв, далі зразки аналізувалися за допомогою світлового мікроскопа. Ліпідоз стінок аорти оцінювався як відсоток від загальної площі поперечного зрізу аорти.

### **Морфометричні дослідження аорти на напівтонких зрізах**

У подальшому був проведений морфометричний аналіз аорт різних експериментальних груп з оцінкою тотальної ширини аорти включаючи інтиму та медію, відстані між двома еластичними мембранами (тобто ширина прошарку ГМК), товщини інтими, співвідношення інтима/медія, кількості прошарків ГМК, що вимірювалися у 10 різних точках на кожному поперечному зрізі судин та у 5 точках по довжині судини.

## **2.8. Ультраструктурні дослідження за допомогою електронної мікроскопії**

Відібрані зразки тканин серця чи аорти фіксували протягом 120 хв розчином наступного складу: глутаральдегід (2,5 %) в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4) з подальшою постфіксацією 1 % буферним розчином осмію тетроксиду. Потім зразки дегідрували, проводячи їх через батарею спиртів (від 60 % до 100 %), та заключали в епоксидні смоли. Полімеризацію смол проводили при 60°C упродовж 24 год. Ультратонкі зрізи клітин обробляли ураніл ацетатом та цитратом свинцю для контрастування матеріалу. Зразки досліджували із застосуванням електронного мікроскопу Jem – 100 CX (Японія).

## **2.9. Визначення трипсино-, хімотрипсиноподібної та пептидилглютамін пептид-гідролазної активностей протеасоми у тканинах серця та аорти**

### ***2.9.1. Отримання гомогенатів тканин аорти та серця***

Серце звільняли від перикарду, тканину міокарду для подальших досліджень отримували з ділянки лівого шлуночка, після чого зважували і гомогенізували в Трис–HCl буфері (рН 7,4) з розрахунку 10 мкл буферного розчину на мг тканини. Отриманий гомогенат тканини центрифугували (900 g протягом 10 хв), після чого відібраний супернатант використовували для подальших біохімічних досліджень. Аорту відділяли від оточуючих тканин та відрізали на рівні відходу від серця і на рівні відходу ниркових артерій. З висхідної частини отримували ділянку для морфологічного та генетичного досліджень, після чого тканини аорти зважували, розрізали на невеликі

сегменти й гомогенізували у скляному гомогенізаторі з додаванням Трис–HCl буферу (pH 7,4) (20 мкл буферного розчину на мг тканини). Отриманий супернатант використовували для біохімічних досліджень.

Кінцевий вміст білка у гомогенатах тканин визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

### ***2.9.2. Визначення протеасомної активності у тканинах серця та аорти***

Вимірювання трьох протеасомних активностей проводили за загальною схемою з використанням супернатанту гомогенізату тканин серця та аорти. Визначення хімотрипсиноподібної (ХТП), трипсиноподібної (ТП) та пептидилглютамін пептид-гідролазної (ПГПГ) активностей протеасоми проводили в 0,025 М Трис HCl буфері (pH 7,5), що містив у кінцевій концентрації 6 мкМ одного із субстратів протеасоми: сукциніл-лейцин-лейцин-валін-тирозин-7-амідо-4-метилкумарину (LLVT-AMC), бок-лейцин-серин-треонін-аргінін-7-амідо-4-метилкумарину (LSTA-AMC) або N-Cbz-лейцин-лейцин-глутамін-амідо-4-метилкумарину (LLG-AMC). Проби інкубували із зазначеними субстратами при температурі 37°C упродовж 30 хв (при визначенні ТП активності) та 60 хв (для двох інших). Активність протеасомного протеолізу у тканинах визначали за інтенсивністю гідролізу цих специфічних флуорогенних субстратів. Флуоресценція продуктів гідролізу фіксувалася за допомогою спектрофлуориметру Hitachi-4000 (довжина хвилі збудження (Ex) становила 360 нм, а емісії (Em) – 440 нм) з використанням вільного 7-аміно-



4-метилкумарину як стандарту. Для підтвердження специфічності протеасомного гідролізу використовували специфічний інгібітор протеасоми - класто-лактистин бета-лактон у концентрації 5 мкМ. Відсоток пригнічення активності гідролізу відповідних субстратів під дією інгібітора трактували як активність протеасоми і виражали в нМ 7-аміно-4-метилкумарину на грам білку за 1 хв.

## **2.10. Виділення РНК із тканин серця та аорти**

Виділення РНК із кардіоміоцитів та тканин сердець щурів проводили із використанням набору Trizol RNA-prep (Isogen, Росія) для виділення тотальної РНК. Метод базується на використанні Trizol-реагенту, що містить гуанідинізоціонат, який призначений для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрису, денатурації клітинних рибонуклеаз, а також білків. Після цього РНК екстрагується в розчин фенол-хлороформу при центрифугуванні, відмивається від білків та переноситься у стерильні вільні від ДНК та РНК мікропробірки. Отримана РНК може безпосередньо використовуватися для проведення зворотної транскрипції. Набір дає змогу виділяти зі свіжого біологічного матеріалу високомолекулярну нативну РНК високої чистоти ( $OD_{260/280nm}$  2,0). У процесі виділення РНК дотримувалися рекомендацій, наведених у комерційному наборі, та проводили маніпуляції згідно наступного протоколу.

Протокол виділення РНК.

1. У пробірку об'ємом 1,5 мл внести 100 мкл гомогенату тканини та додати 1 мл *Trizol* реагенту. Інтенсивно перемішати вміст пробірок до гомогенного стану.
2. Термостатування суміші 5 хв при температурі 4°C.
3. Додавання у пробірку 200 мкл суміші хлороформу та ізоамілового спирту у співвідношенні 49:1 та інтенсивне перемішування вмісту пробірок.
4. Термостатування суміші 5 хв при температурі 4°C.
5. Центрифугування пробірок протягом 6 хв при 13 400 об/хв.
6. Перенесення прозорої верхньої фази до чистої пробірки того ж об'єму.
7. Додавання до проб рівного об'єму ізопропанолу (500 мкл).
8. Інтенсивне перемішування пробірок та розміщення їх у морозильній камері при -20°C на 30 хвилин.
9. Центрифугування пробірок упродовж 16 хв при 13 400 об/хв.
10. Видалення супернатанту декантуванням.
11. Додавання 1 мл холодного (4°C) 75 % розчину етилового спирту, перемішування вмісту пробірок 5 разів та центрифугування пробірок протягом 6 хв при 13 400 об/хв.
12. Видалення супернатанту декантуванням.
13. Висушування осаду при температурі 65°C протягом 5 хв.
14. Додавання у пробірки 50 мкл ЕкстраГену™ при постійному перемішуванні останнього розчину.

15. Суспензування вмісту пробірок на вортексі до отримання гомогенної суспензії та термостатування при температурі 65°C протягом 5 хв.

16. Суспензування вмісту пробірок на вортексі та негайне застосування для проведення зворотної транскрипції.

### ***2.11. Зворотна транскрипція та полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі***

*Таблиця 2.3.1. Нуклеотидна послідовність специфічних праймерів для ПЛР-аналізу експресії генів*

<b>Gene ID (accession number)</b>	<b>Послідовність праймерів</b>
<b><i>PSMB1</i></b> (NM053590)	forward: 5'-CTGТАCTCACGGCGTTTCTTC-3' reverse: 5'-ТАAGAGCTTACTGGGTCAAAGC-3'
<b><i>PSMB2</i></b> (NM017284)	forward: 5`- GAGGGGCCAGCACTTTACTAC -3` reverse: 5`- AGTATCGGTCAAGGATGCTGAG -3`
<b><i>PSMB8</i></b> (NM080767)	forward: 5`- TGTGGTGGTGATACTAGGTTGC -3` reverse: 5`- АТААAGTCCCGGTCCCTAGAAG -3`
<b><i>PSMB10</i></b> (NM001025637)	forward: 5`- AGCTTTGAGCTCACCCATAGAG -3` reverse: 5`- AGAGCTCTCACTTCCTGGGTCT -3`
<b><i>PSMC1</i></b> (NM057123)	forward: 5`- CCTGGTCACAGTGATGAAGGT -3` reverse: 5`- AAGAGGGAGCTCCACAGATTC -3`
<b><i>PSME1</i></b> (NM017264)	forward: 5`- СТТААAGGAGCCAGCTCTCAAC -3` reverse: 5`- СТСТТCTCTTTCTCCTTGACG -3`
<b><i>beta-actin</i></b> (V01217)	forward: 5`-AAGTCCCTCACCTCCCAAAAG-3` reverse: 5`-AAGCAATGCTGTCACCTTCCC-3`

Зворотну транскрипцію проводили із використанням First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва), застосовуючи 1,2-1,5 мкг загальної РНК та гексамерний праймер. Отриману внаслідок зворотної транскрипції одноланцюгову ДНК використовували для кількісної оцінки експресії генів з використанням полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі із застосуванням праймерів для відповідних генів (Табл. 2.3.1).

Експресію генів стандартизували відносно експресії гену  $\beta$ -актину, як ендogenousного контролю (одного із так званих «генів домашнього господарства»). ПЛР-ампліфікація генів проводилася у 10 мкл SYBR Green PCR Master Mix, що містив 40 пмоль кожного праймеру. Об'єм доводили до 20 мкл дейонізованою водою. Ампліфікацію здійснювали за допомогою термоциклеру 7500 Fast Real-Time PCR System. Програма ампліфікації починалася із попередньої активації AmpliTaq Gold® ДНК-полімерази протягом 10 хв при 95 та включала 45 циклів, кожен з яких складався з денатурації при 95 °C (19с), приєднання праймерів та елонгації при 58 °C (1 хв). Для контролю специфічності проводили стадію дисоціації – послідовне підвищення температури від 58°C до 95°C із реєстрацією падіння інтенсивності флуоресценції комплексів дволанцюгових ДНК з SYBR Green. Визначали відносний рівень експресії генів із застосуванням загальноприйнятої методики (рівень експресії =  $2^{-\Delta C_t}$ , де  $C_t$  – пороговий цикл ампліфікації).

Експресію генів *PSMB5* та *PSMB9* нормалізували відносно гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенузи (*GAPDH*) як ендogenousного контролю. Для кількісної оцінки експресії генів використовували набори, що були розроблені на основі послідовності мРНК щура компанією Applied Biosystems, (USA) (Табл. 2.3.2).

ПЛР-ампліфікація складалася з 50 наступних циклів: початкова денатурація при 95°C впродовж 20с, з наступною обробкою при 95°C протягом 3с, приєднання праймерів та елонгація – 60°C, 30с. Аналіз

отриманих даних проводився за допомогою 7500 Fast Real-time PCR Software.

*Таблиця 2.3.2. TaqMan набори для ПЛР-аналізу експресії генів*

<b><i>PSMB5</i></b>	TaqMan Gene Expression Assay Rn01488742_m1
<b><i>PSMB9</i></b>	Custom TaqMan Gene Expression Assay
<b><i>GAPDH</i></b>	TaqMan Rodent GAPDH Control Reagent (VIC™Probe)

## **2.12. Статистичний аналіз**

Для статистичного аналізу було використано за умови нормального розподілу та гомоскедантичності вибірок – однофакторний дисперсійний аналіз з апостеріорними попарними t-тестами з поправкою Геймса-Хоуела. У інших випадках використовувався аналіз Краскела-Уолеса з апостеріорними попарними тестами Манна-Уїтні з поправкою Бонфероні. Також було проведено регресійно-кореляційний аналіз. Результати вважалися статистично достовірними за умови  $P < 0.05$ . Використане програмне забезпечення MSEXcel 2010, SPSS Statistics 18.0, Plotus 0.2.

## РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Відомо, що гени, які кодують субодиниці протеасоми, мають певні алельні варіанти, що, можливо, впливають на функціональні властивості мультикаталітичного протеїназного комплексу, зокрема встановлені заміни поодиноких нуклеотидів (SNP) у генах імунопротеасоми - *LMP2* та *LMP7*, ( $\text{Arg}_{60} \rightarrow \text{His}$  та  $\text{Lys}_{145} \rightarrow \text{Gln}$  відповідно) [30, 44, 13]. Тривають пошуки асоціації між генетичними варіантами цих генів та ймовірністю розвитку певних захворювань [9, 13, 32, 44, 48]. Встановлено, що менш розповсюджений алельний варіант гену *LMP2* значно частіше зустрічається у хворих на деякі автоімунні захворювання [43, 32]. Нами раніше показано, що зазначені SNP цих генів не асоціюються з ймовірністю розвитку гострого коронарного синдрому, хоча впливають на каталітичну активність протеасоми [11].

У роботах японських дослідників встановлена наявність цілої низки SNP у гені, що кодує альфа-6 субодиницю протеасоми (*PSMA6*), а один з них, що найбільш розповсюджений у популяції -  $\text{C}^8 \rightarrow \text{G}$  – позитивно впливає на транскрипційну активність даного гену [11]. За даними Ozaki K. et al. [51], вказаний поліморфізм суттєво впливає на ризик розвитку інфаркту міокарда, проте інші дослідники популяції Японії заперечують такий зв'язок [68].

### РОЗДІЛ 3. Дослідження частоти алельного поліморфізму генів, що кодують різні субодиниці протеасоми у дітей з первинною артеріальною гіпертензією

Отримані дані вказують на те, що розподіл алельних варіантів генів, що кодують субодиницю імунопротеасоми (*LMP2*) та протеасоми (*PSMA6*) суттєво відрізняється у контрольній групі та у дітей з артеріальною гіпертензією на відміну від поліморфізму гену *LMP7* (Табл. 3.1).

Таблиця 3.1. Процентний розподіл генотипів досліджуваних SNP у дітей з есенціальною гіпертензією та здорових людей

Поліморфізми генів, REFERENCE SNP ID	Генотипи					
	AA		Aa		aa	
	Контроль	АГ	Контроль	АГ	Контроль	АГ
<i>LMP2</i> (Arg60→His), rs17587	63,9	42,5	28,6	46,4	7,5	11,1
<i>LMP7</i> (Lys49→Gln), rs2071543	97,3	92,4	2,7	7,6	0,0	0,0
<i>PSMA6</i> (C-8→G), rs1048990	69,8	76,2	29,7	21,1	0,5	2,7

#### 3.1. Поліморфізм C<sup>-8</sup>→G промотору гену *PSMA6*

Статистичний аналіз був проведений з метою виявлення можливої асоціації генетичного маркера із ризиком розвитку захворювання. Контрольна група складала 208 осіб, а дослідна – 147.

Відповідність розподілу генотипів до закону Харді-Вайнберга у контрольній групі була перевірена за допомогою тесту хі-квадрат із 1 ступенем свободи, з використанням корекції Йетса. Розподіл генотипів у контрольній групі відповідає закону Харді-Вайнберга ( $P>0.05$ ).

Використавши тест хі-квадрат із 2 ступенями свободи нам вдалося знайти статистично значущі відмінності у розподілі генотипів у групі хворих та у групі практично здорових дітей ( $P<0.05$ ).

Проаналізувавши усі моделі успадкування, ми вибрали найкращу модель із найнижчим інформаційним критерієм Айкайке. Такою моделлю виявилася рецесивна модель, для якої у Табл. 3.2 наведені значення відношення шансів, статистична значущість, а також інформаційний критерій Айкайке.

Таблиця 3.2

Генотип	Контроль, N	Випадок, N	Відношення шансів	p-value	AIC
<b>AA + Aa</b>	207 (99,5 %)	143 (97,3 %)	1,00		
<b>Aa</b>	1 (0,5 %)	4 (2,7 %)	5,79 (0,85 – 113,9)	0,12	19,66

Алельні варіанти гену *PSMA6* розподіляються таким чином: C/C – 69,8 %, C/G – 29,7 %, G/G – 0,5 % у контрольній групі та 76,2 %, 21,1 %, 2,7 % ( $P=0.047$ ) у дітей з АГ відповідно (Рис. 3.1).



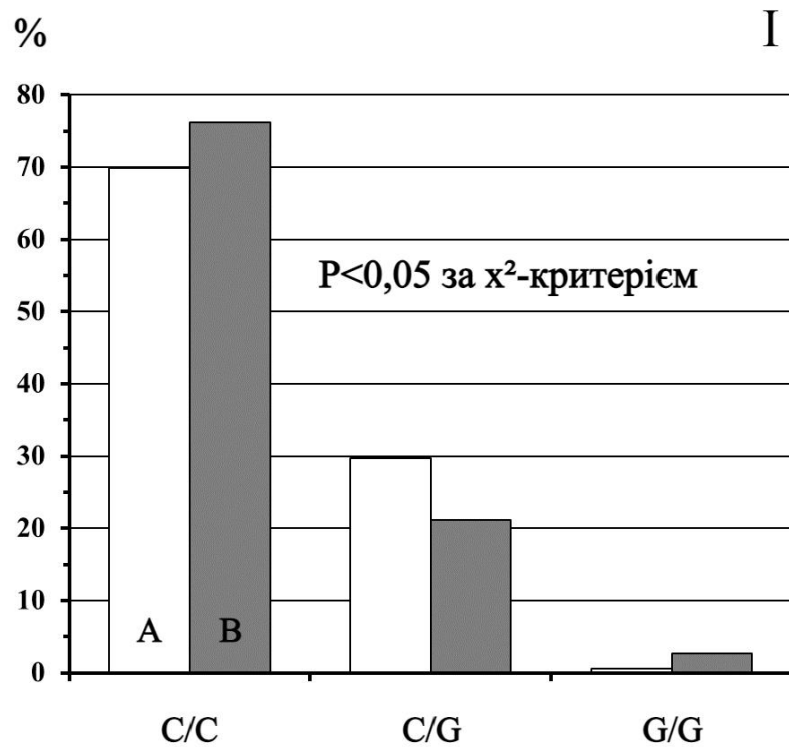


Рис. 3.1. Частота алельних варіантів гену PSMA6 ( $C^8 \rightarrow G$ ) у практично здорових осіб (A) і дітей хворих на артеріальну гіпертензію (B).

### 3.2. Поліморфізм Arg<sub>60</sub>→His гену LMP2

Статистичний аналіз був проведений з метою виявлення можливої асоціації генетичного маркеру із ризиком розвитку захворювання. Контрольна група склала 208, а дослідна – 147 відповідно.

Відповідність розподілу генотипів до закону Харді-Вайнберга у контрольній групі була перевірена за допомогою тесту хі-квадрат із 1 ступенем свободи, без використання корекції Йетса. Розподіл генотипів у контрольній групі відповідає закону Харді-Вайнберга ( $P > 0.05$ ).

Використавши тест  $\chi^2$ -квадрат із 2 ступенями свободи нам вдалося знайти статистично значущі відмінності у розподілі генотипів у групі хворих та у групі практично здорових дітей ( $P < 0.05$ ).

Проаналізувавши усі моделі успадкування, ми вибрали найкращу модель із найнижчим інформаційним критерієм Айкайке. Такою моделлю виявилася рецесивна модель, для якої в Табл. 3.3 наведені значення відношення шансів, статистична значущість, а також інформаційний критерій Айкайке.

Таблиця 3.3

Генотип	Контроль, N	Випадок, N	Відношення шансів	p-value	AIC
AA + Aa	192 (92,3 %)	130 (89 %)	1,00		
Aa	16 (7,7 %)	16 (11 %)	1,48 (0,71 – 3,08)	0,29	33,89

Частота алельних варіантів гену *LMP2* є такою: Arg/Arg – 63,9 %, Arg/His – 28,6 %, His/His – 7,5 % у контрольній групі, а у хворих на АГ іншою: Arg/Arg – 42,5 %, Arg/His – 46,4 %, His/His – 11,1 % ( $P=0.001$ ) (Рис. 3.2).

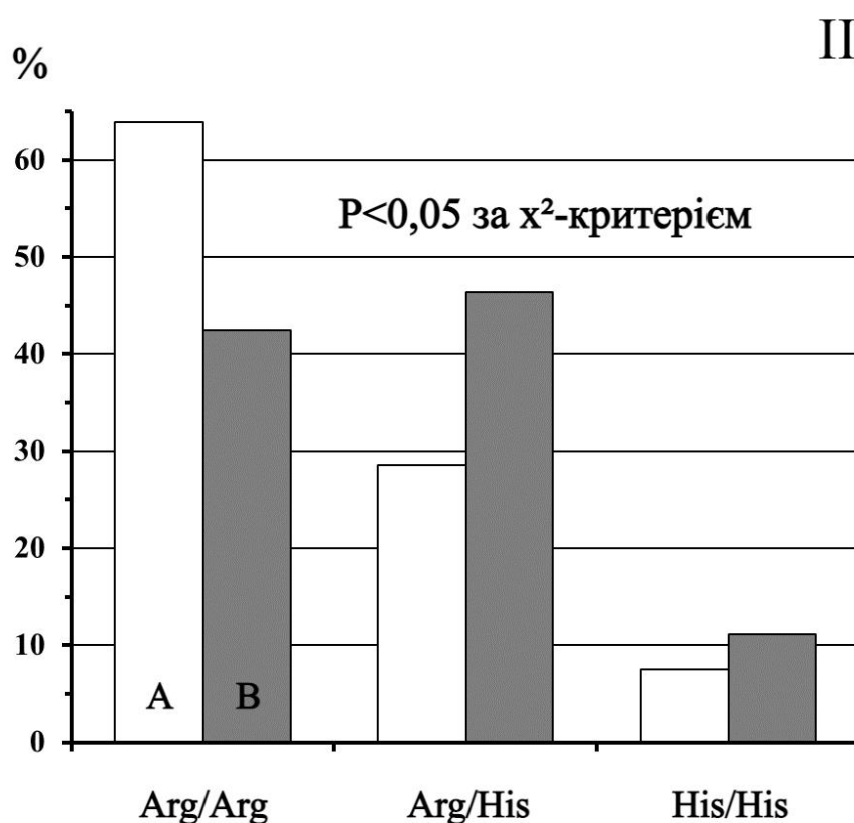


Рис. 3.2. Частота алельних варіантів гену *LMP2* ( $Arg_{60} \rightarrow His$ ) у практично здорових осіб (A) і дітей хворих на артеріальну гіпертензію (B).

### 3.3. Поліморфізм $Lys_{145} \rightarrow Gln$ гену *LMP7*

Статистичний аналіз був проведений з метою виявлення можливої асоціації генетичного маркера із ризиком розвитку захворювання. Контрольна група склала 208, а дослідна – 147 відповідно.

Відповідність розподілу генотипів до закону Харді-Вайнберга у контрольній групі була перевірена за допомогою тесту  $\chi^2$  з 1 ступенем свободи, без використання корекції Йетса. Розподіл генотипів у контрольній групі відповідає закону Харді-Вайнберга ( $P > 0.05$ ).

Використавши тест хі-квадрат із 2 ступенями свободи нам не вдалося знайти статистично значущі відмінності у розподілі генотипів у групі хворих та у групі практично здорових дітей ( $P>0.05$ ).

Проаналізувати моделі успадкування не вдалося, бо ми не знайшли у жодній з досліджуваних груп мінорної гомозиготи.

Встановлено, що розподіл алельних варіантів гену *LMP7* не відрізнявся у практично здорових та хворих на АГ осіб (Lys/Lys – 97,3 %, Lys/Gln – 2,7 %, Gln/Gln – 0 % та 92,4 %, 7,6 %, 0 % відповідно,  $P=0.16$ ) (Рис. 3.3).

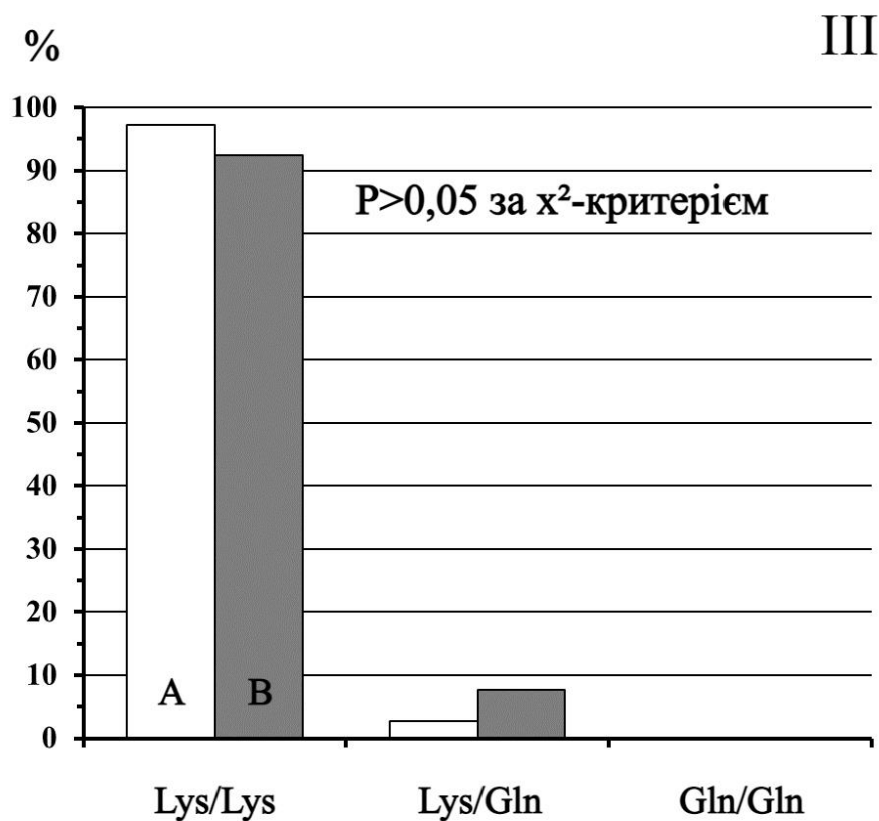


Рис. 3.3. Частота алельних варіантів гену *LMP7* ( $Lys_{145} \rightarrow Gln$ ) у практично здорових осіб (А) і дітей хворих на артеріальну гіпертензію (В).

Таблиця 3.4. Розподіл генотипів досліджуваних SNP у дітей з есенціальною гіпертензією та здорових людей. Коефіцієнти шансів з довірчими інтервалами 95 %

Поліморфізм	Генотип	Odds Ratio and 95 % CI
<i>LMP2</i> (Arg <sub>60</sub> →His)	AA	1(ref)
	Aa	0,461 (0,259 – 0,679)
	aa	0,443 (0,138 – 1,008)
<i>LMP7</i> (Lys <sub>49</sub> →Gln)	AA	1(ref)
	Aa	0,343 (0,07 – 1,679)
	aa	NA
<i>PSMA6</i> (C <sup>-8</sup> →G)	AA	1(ref)
	Aa	1,440 (0,874 – 2,373)
	aa	0,199 (0,210 – 1,751)

#### **РОЗДІЛ 4. Зміни основних фізіологічних параметрів функціонування серцево-судинної системи при спонтанній гіпертензії у щурів та при її експериментальній терапії**

Дослідження кардіодинаміки дали змогу встановити суттєві відмінності між показниками SHR у порівнянні з Wistar (Табл. 4.1 та 4.2) Серед показників насосної функції серця у SHR були вірогідно нижчими такі: ударний об'єм (у 3 рази,  $P < 0.0001$ ), фракція викиду (у 2,14 рази,  $P < 0.0001$ ), ударна робота (на 70 %,  $P < 0.0001$ ), а також частота серцевих скорочень (на 12 %,  $P = 0.006$ ). Показники діастолічної функції серця були вищими у щурів лінії SHR: кінцево-діастолічний тиск (у 6,5 разів,  $P < 0.005$ ) та  $dp/dt \min$  на 30 %,  $P < 0.0001$  (-8526,16 мм рт.ст./с у порівнянні -5962,18 мм рт.ст./с). Водночас, мінімальний тиск та кінцево-систолічний тиск були нижчими у щурів лінії SHR у 1,5 рази ( $P < 0.01$ ) та на 15 %, ( $P < 0.004$ ) відповідно. Це можна пояснити змінами артеріальної жорсткості, яка була у щурів лінії SHR вищою у 4,4 рази ( $P < 0.0001$ ).

#### 4.1. Кардіо-гемодинамічні показники у щурів лінії Wistar та SHR

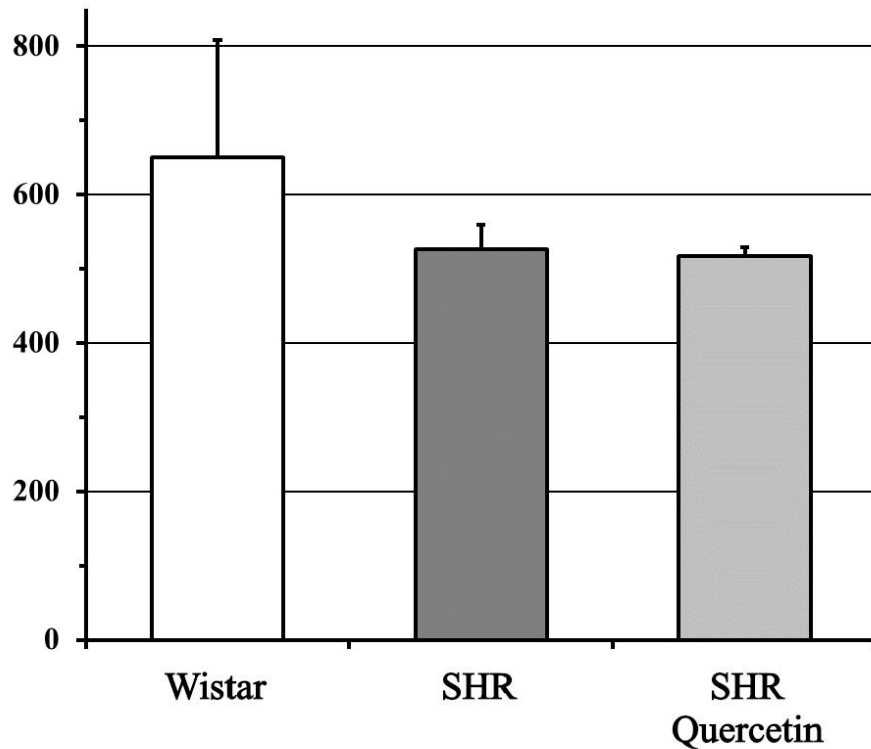
Таблиця 4.1. Показники насосної функції лівого шлуночка щурів лінії Wistar, SHR та SHR, що отримували Quercetin

Кардіогемодинамічні параметри	Wistar (n=8)	SHR (n=16)	SHR Quercetin (n=8)
Кінцево-діастолічний об'єм, мкл	650,55±15,8	526,53±32,9	517,58±11,48
Кінцево-систолічний об'єм, мкл	484,75±19,1	514,99±41,7	472,86±13,5
Ударний об'єм, мкл	239,00±13,5	79,23±7,8*	129,13±9,0#
Серцевий викид, мкл/хв	82776,59±5625,4	23756,19±2385,4*	39085,18±2477,0#
Артеріальна жорсткість, мм рт.ст./мкл	0,44±0,02	1,93±0,20*	0,86±0,07#
Фракція викиду, %	62,56±1,3	29,26±1,1*	39,26±1,1#

Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.

Кінцево-діастолічний об'єм у щурів SHR був на 19,1 % нижчим у порівнянні з таким у Wistar, та при застосуванні Quercetin кінцево-діастолічний об'єм у щурів SHR не значно зменшувався на 1,7 %.

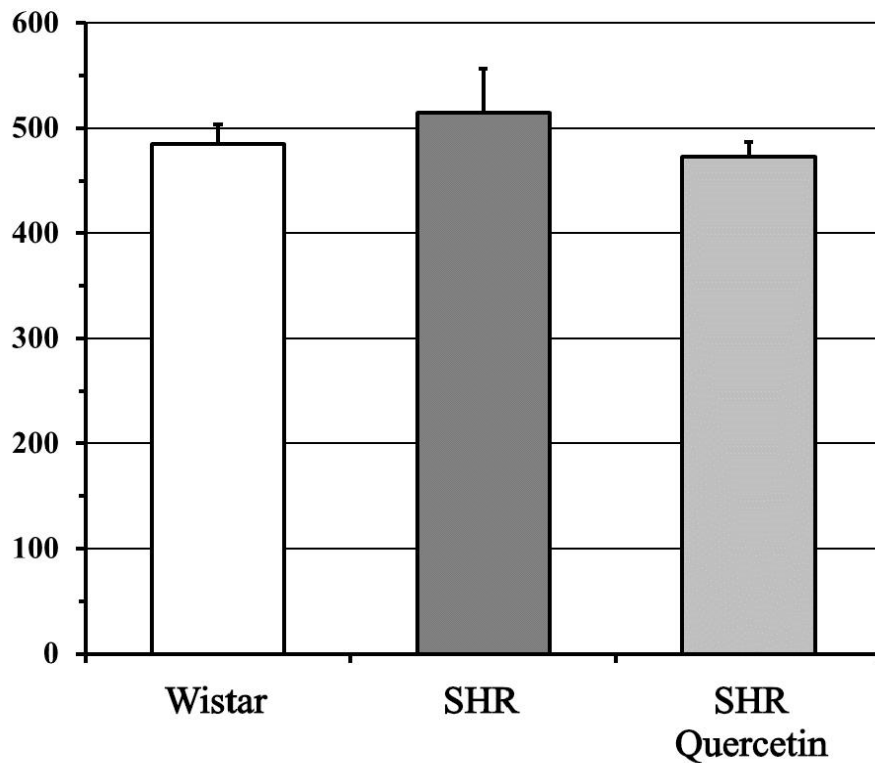
### Кінцево-діастолічний об'єм (мкл)



*Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.*

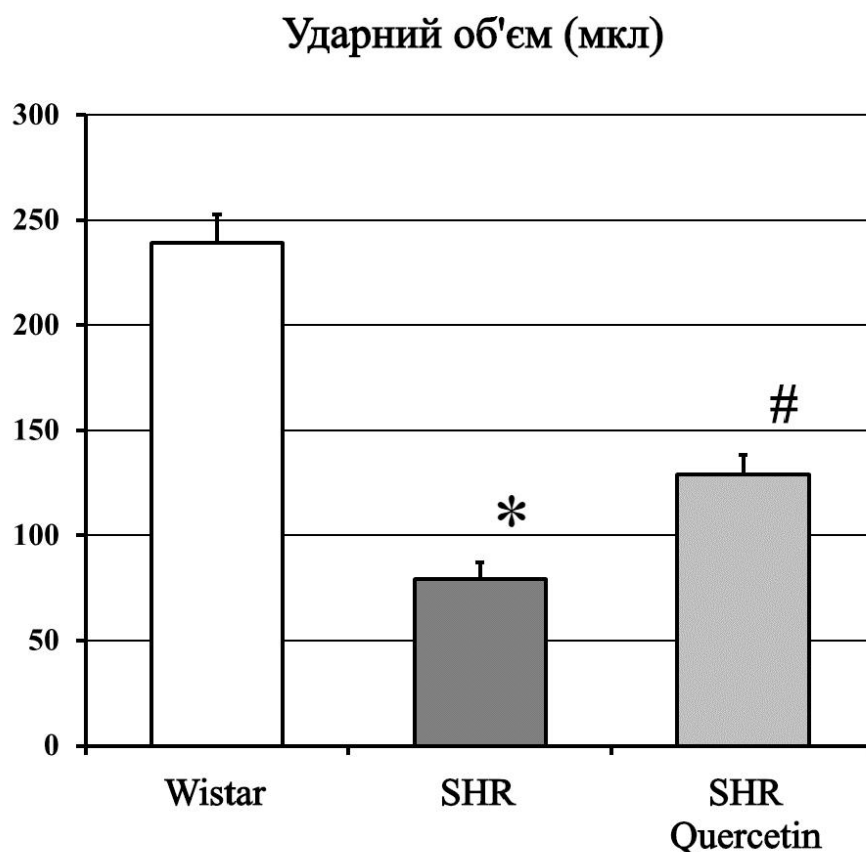
Встановлено збільшення величини кінцево-систоличного об'єму у SHR на 6,2 % у порівнянні з такою у щурів Wistar. При експериментальному лікуванні Quercetin у щурів SHR спостерігалось попередження зростання кінцево-систоличного об'єму у порівнянні з групою SHR на 8,2 %.



**Кінцево-систоличний об'єм (мкл)**

*Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.*

Ударний об'єм у щурів SHR був достовірно меншим у 3,0 рази ( $P < 0.05$ ), а при експериментальній терапії Quercetin відбулося попередження зниження даного показника у 1,6 рази ( $P < 0.05$ ).

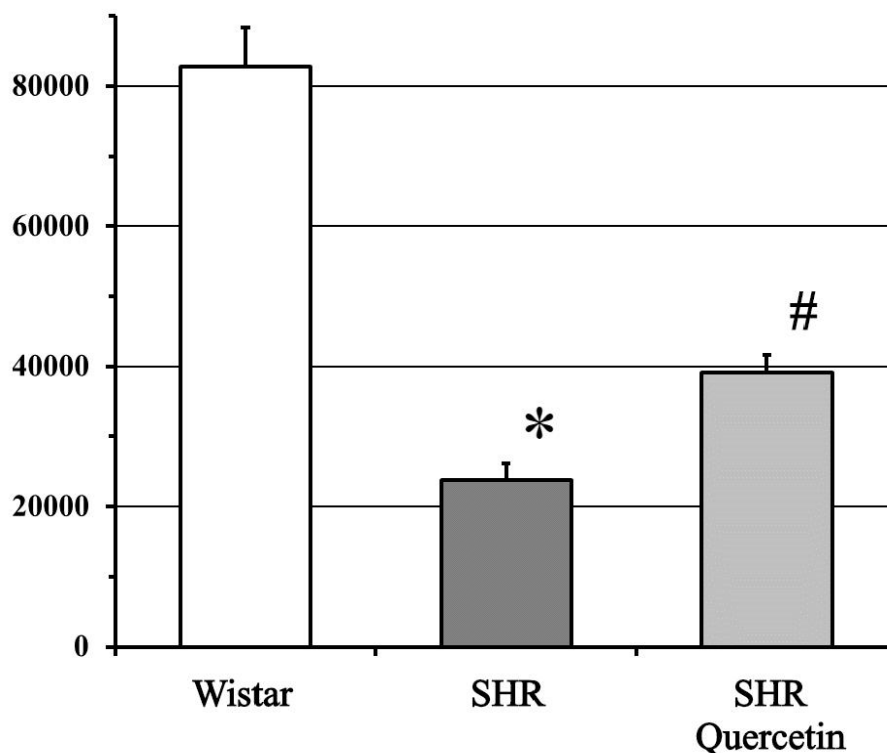


*Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.*

Ударний об'єм у щурів SHR був достовірно меншим у 3,0 рази ( $P < 0.05$ ), а при експериментальній терапії Quercetin відбулося попередження зниження даного показника у 1,6 рази ( $P < 0.05$ ).

Серцевий викид у SHR був статистично достовірно меншим у 3,5 рази у порівнянні зі щурами лінії Wistar ( $P < 0.05$ ). При 8-ми тижневій експериментальній терапії Quercetin відбулося попередження зменшення серцевого викиду порівняно зі щурами на 1,64 % ( $P < 0.05$ ).

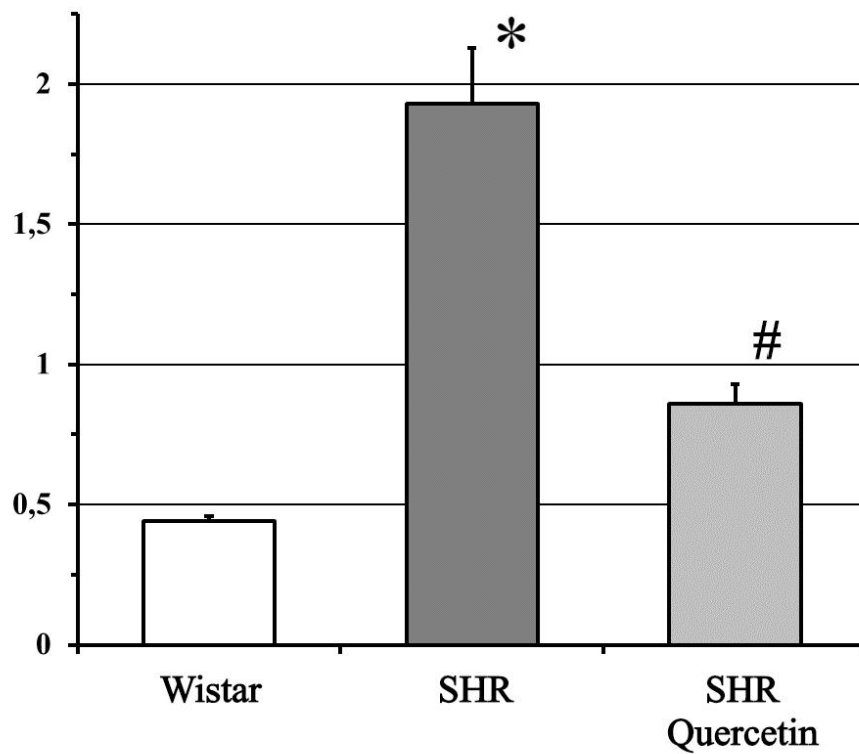
## Серцевий викид, мкл/хв



Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.

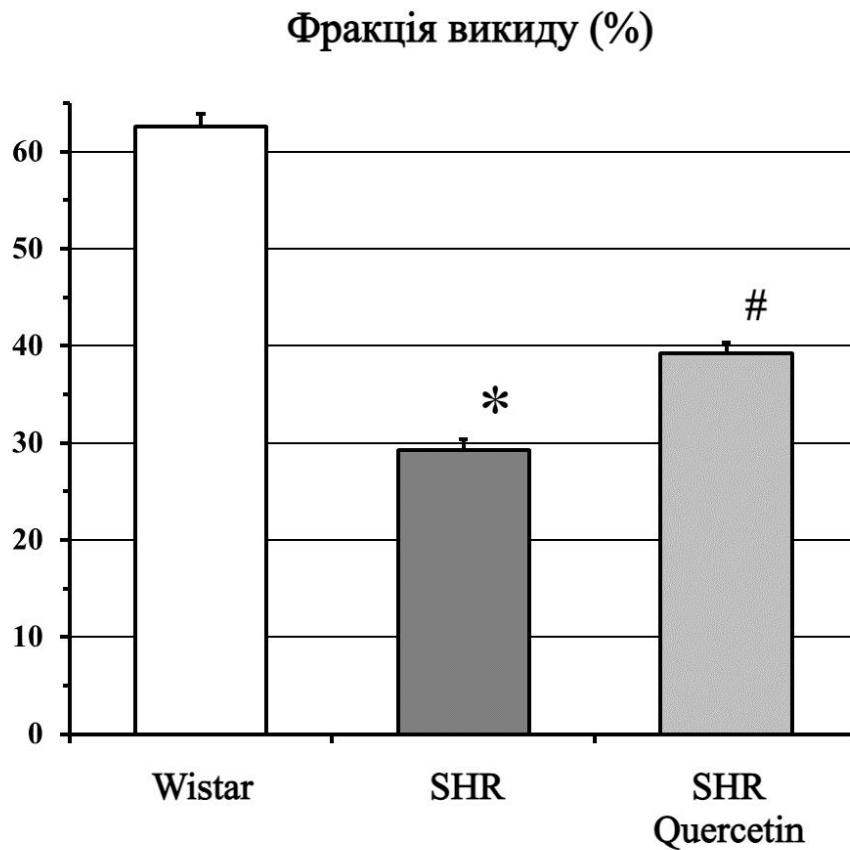
Артеріальна жорсткість у щурів зі спонтанною гіпертензією була достовірно вищою у 4,4 рази в порівнянні з Wistar ( $P < 0.05$ ). У щурів SHR, що отримували біофлавоноїд відбувалося попередження зростання артеріальної жорсткості, і вона була достовірно нижчою у 2,2 рази порівняно з групою SHR.

### Артеріальна жорсткість (мм рт. ст./мкл)



Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.

Фракція викиду у щурів SHR була достовірно меншою у 2,14 рази, ніж у щурів Wistar ( $P < 0.05$ ). За впливу Quercetin у щурів лінії SHR відбулося її збільшення у 1,6 рази ( $P < 0.05$ ).



*Примітка.* \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.

*Таблиця 4.2. Параметри скоротливої та інтегральних функцій лівого шлуночка щурів Wistar, SHR та SHR Quercetin*

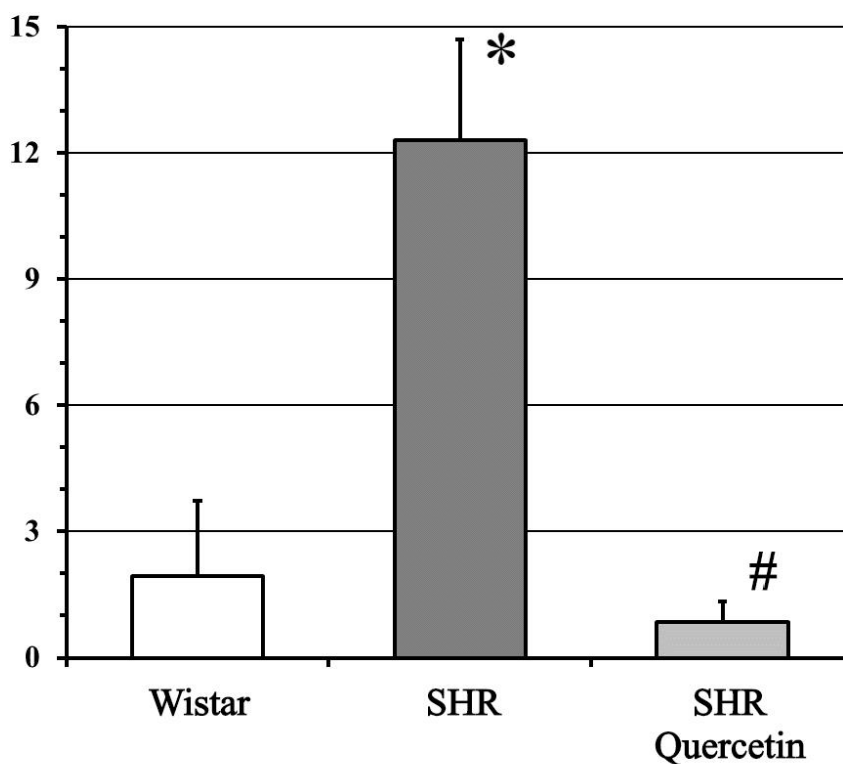
<b>Кардіогемодинамічні параметри</b>	<b>Wistar (n=8)</b>	<b>SHR (n=16)</b>	<b>SHR Quercetin (n=8)</b>
<b>Кінцево-діастолічний тиск, мм рт.ст.</b>	1,93±1,8	12,31±2,4*	0,84±0,5#
<b>Кінцево-систолічний тиск, мм рт.ст.</b>	94,48±1,9	108,33±2,9*	91,03±2,0#
<b>Максимальний тиск, мм рт.ст.</b>	102,76±3,3	109,99±3,99	92,41±3,2*

<b>Мінімальний тиск, мм рт.ст.</b>	-1,54±1,0	8,65±2,6*	4,58±0.7#
<b>Ударна робота, мм рт.ст.*мкл</b>	11613,89±1246,6	3408,57±1172,4*	4713,20±1393,2
<b>dP/dt max, мм рт.ст./с</b>	8821,78±432,45	6881,07±468,75*	6258,40±467,4
<b>dP/dt min, мм рт.ст./с</b>	-8526,17±455,45	-5962,18±529,77*	-5501,78±1369,67
<b>dV/dt max, мкл/с</b>	13338,31±2212,45	9972,29±1828,62*	9242,55±1565,0
<b>dV/dt min, мкл/с</b>	-16076,50±2132,34	-7716,43±1458,93*	-10399,90±1682,42
<b>Максимальна потужність, мВт</b>	103,30±9,42	61,74±9,48*	68,08±8,64
<b>ЧСС хв<sup>-1</sup></b>	342,94±9,5	302,28±5,4*	305,42±5,0

*Примітка. \* – P<0.05 при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # – P<0.05 при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.*

Кінцево-діастолічний тиск у SHR був достовірно вищим у 6,4 разів у порівнянні зі щурами Wistar ( $P<0.05$ ). При застосуванні Quercetin у щурів лінії SHR попереджалося збільшення у 14,6 разів ( $P<0.05$ ).

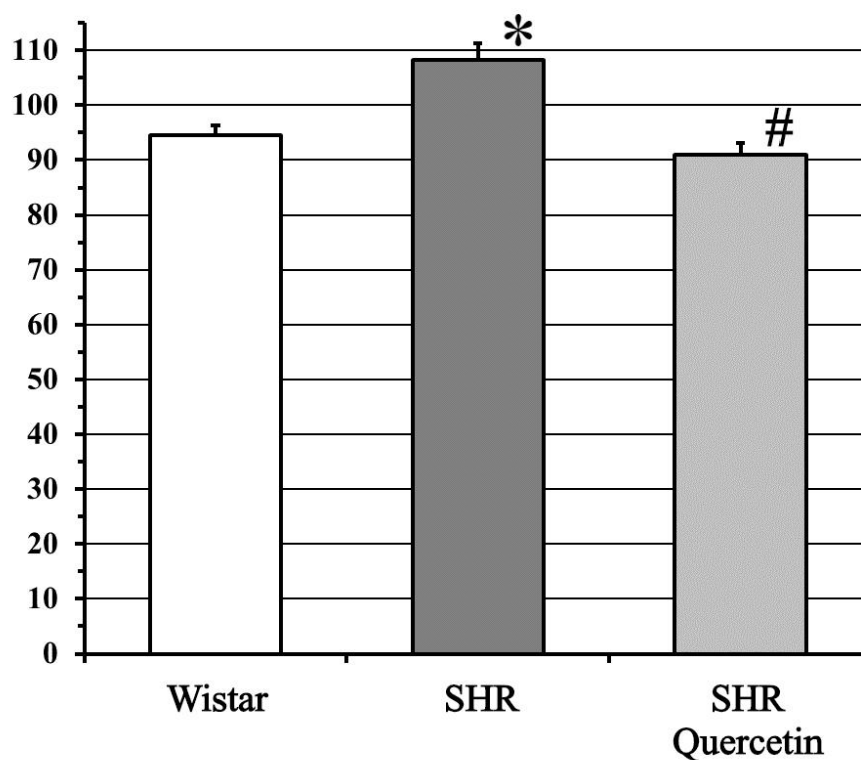
## Кінцево-діастолічний тиск (мм рт. ст.)



Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.

Кінцево-систолический тиск був достовірно більшим у SHR на 14,6 % в порівнянні з Wistar ( $P < 0.05$ ). У SHR, що отримували Quercetin відбувалося попередження збільшення, і він був меншим на 15,9 % ( $P < 0.05$ ).

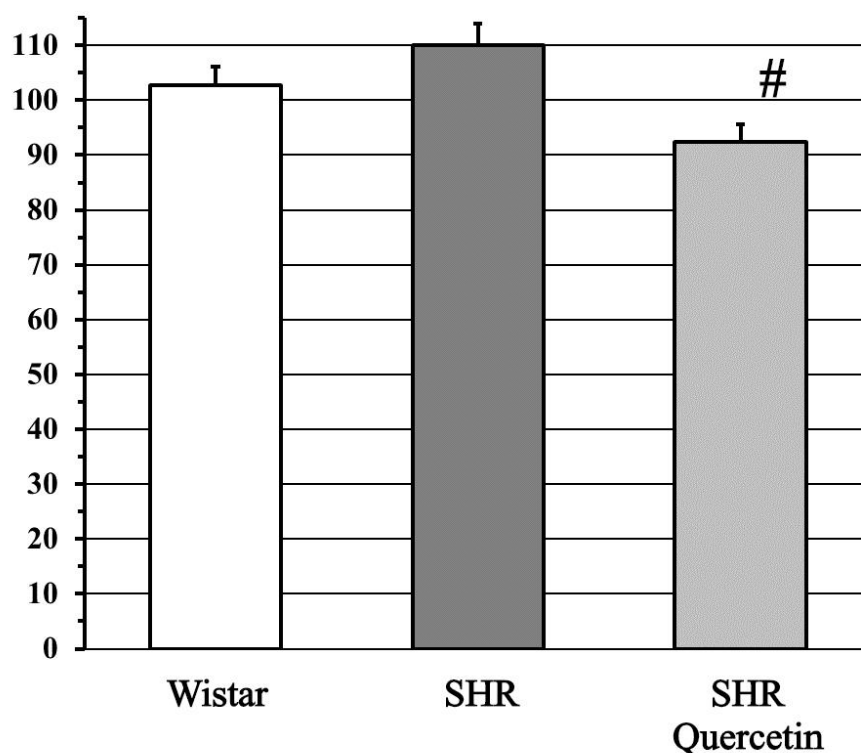
### Кінцево-систоличний тиск (мм рт. ст.)



*Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.*

Максимальний тиск у SHR був вищим, ніж у Wistar на 6,9 %, проте достовірно ( $P < 0.05$ ). При експериментальній терапії біофлавоноїдом Quercetin значення максимального тиску були нижчими на 15,9 %, ніж у SHR ( $P < 0.05$ ).

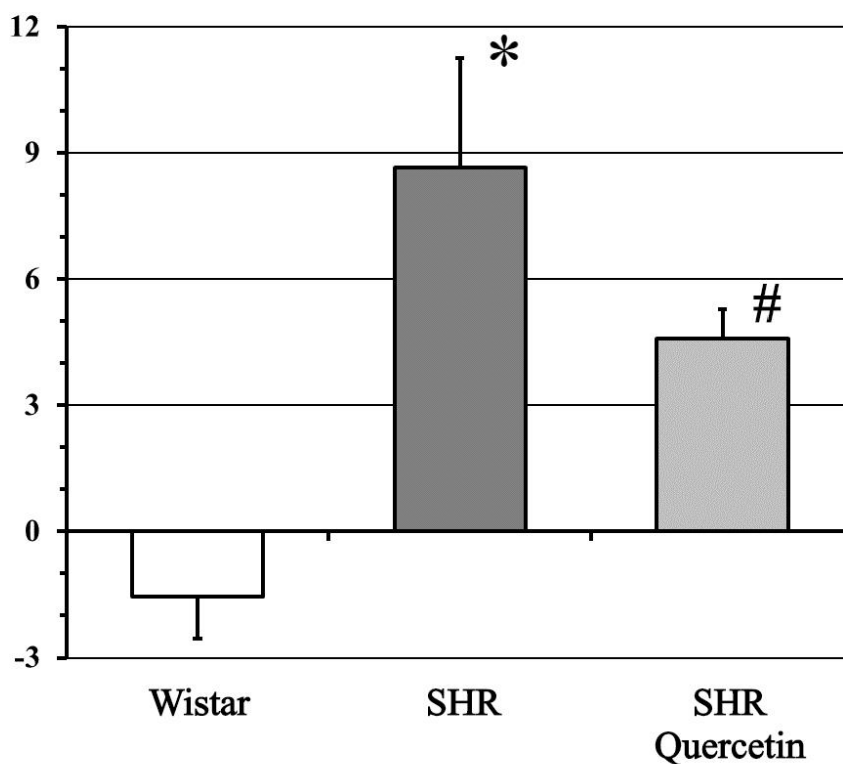


**Максимальний тиск (мм рт. ст.)**

*Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.*

Значення мінімального тиску у лівому шлуночку у щурів SHR було вищим у 5,6 разів порівняно з таким у щурів Wistar ( $P < 0.05$ ). Мінімальний тиск у SHR, що отримували Quercetin був достовірно нижчим у 1,9 рази у порівнянні з такими, що знаходилися на стандартній дієті ( $P < 0.05$ ).

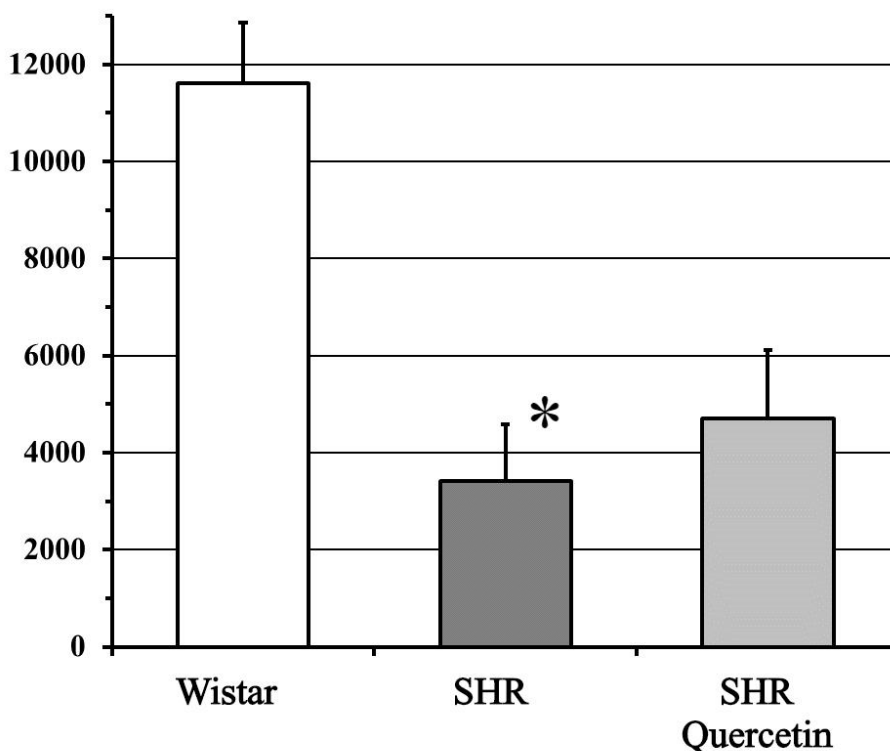
## Мінімальний тиск (мм рт. ст.)



Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.

Ударна робота була достовірно меншою у 3,4 рази у SHR порівняно з Wistar ( $P < 0.05$ ). У той же час при застосуванні Quercetin у SHR відбувалося попередження зменшення ударної роботи, збільшення у 1,4 рази.

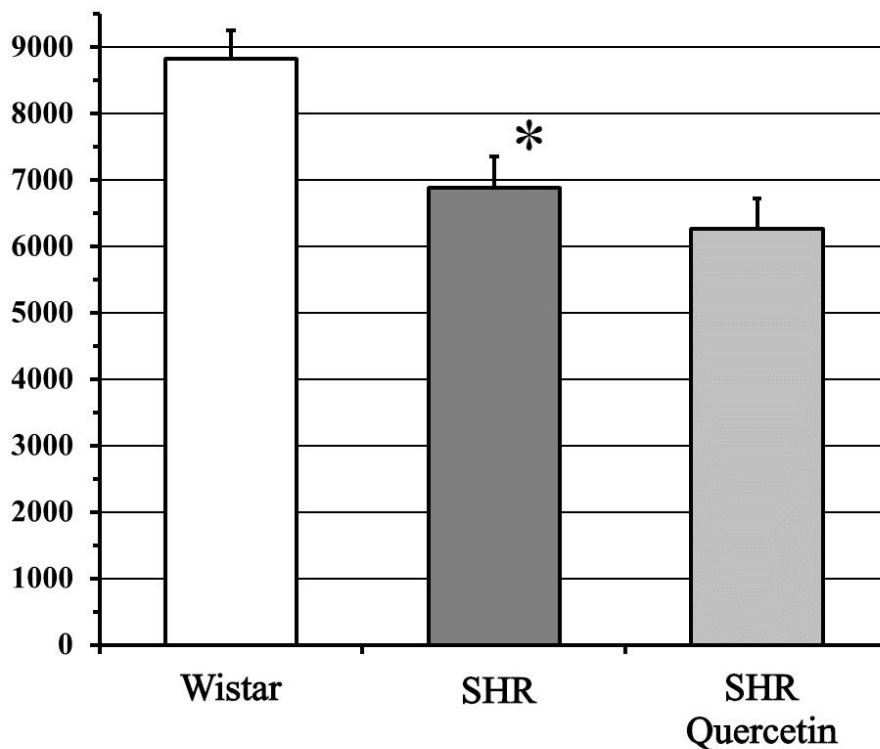
### Ударна робота (мм рт. ст. на мкл)



Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.

Значення максимальної швидкості скорочення міокарда ( $dP/dt \max$ ) у щурів лінії SHR було менше у порівнянні з Wistar на 22 % ( $P < 0.05$ ). У SHR щурів, що отримували Quercetin  $dP/dt \max$  було нижчим на 9 % порівняно з SHR, що знаходилися на стандартній дієті.

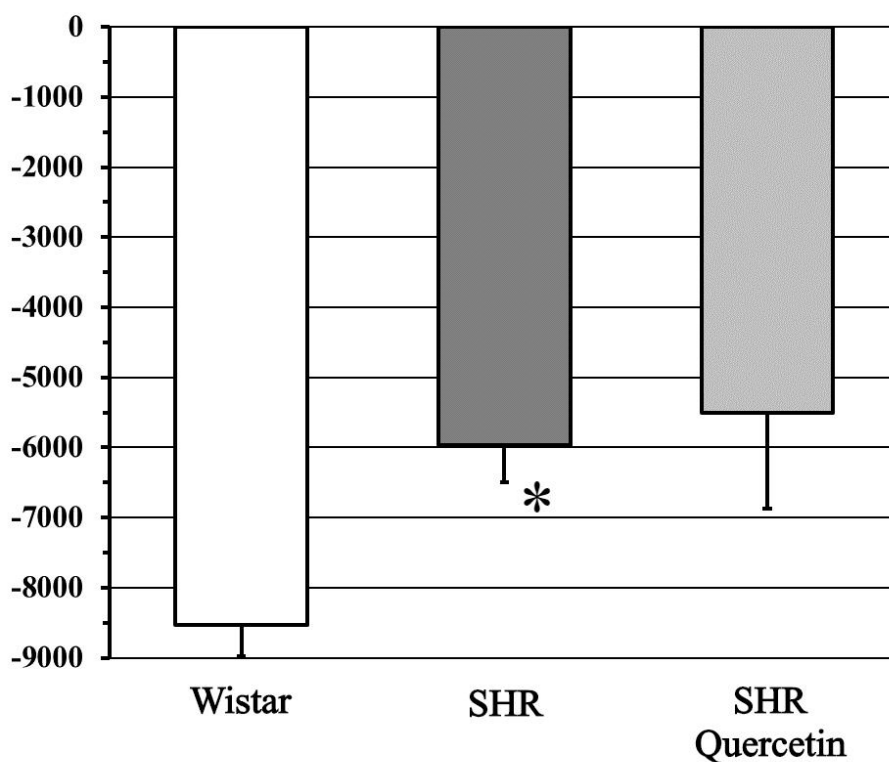
### Максимальна швидкість скорочення міокарда (мм рт. ст. на с)



*Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.*

dP/dt min або максимальна швидкість розслаблення міокарда у SHR була достовірно нижча на 30,1 % у порівнянні з такою у Wistar ( $P < 0.05$ ). При експериментальній терапії Quercetin у SHR dP/dt min була меншою на 7,7 % порівняно з SHR.

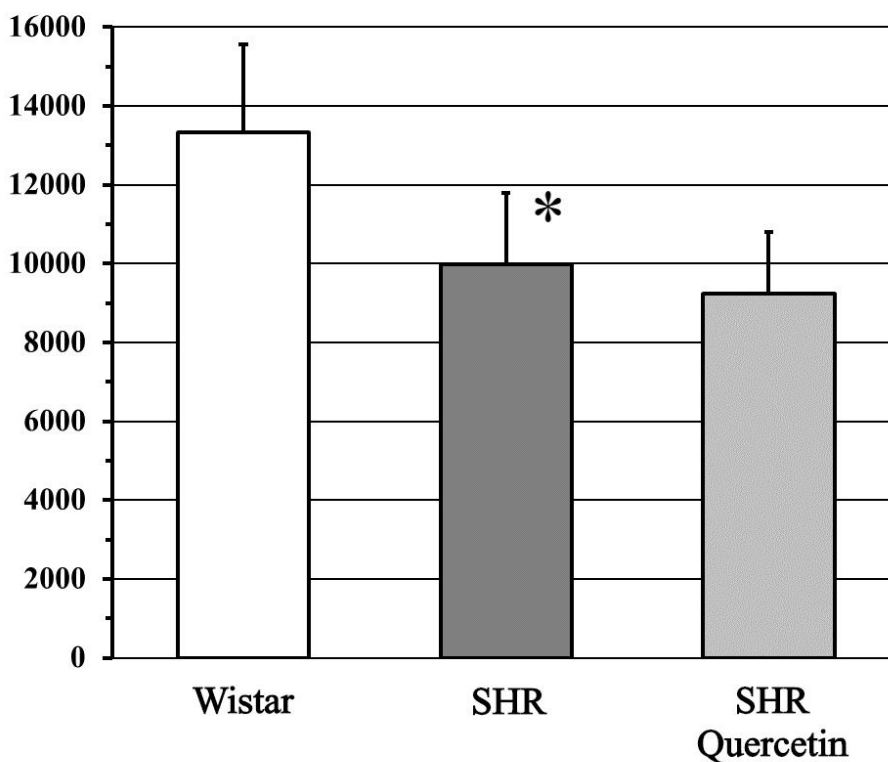
### Максимальна швидкість розслаблення міокарда (мм рт. ст. на с)



Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.

$dV/dt$  max або максимальна швидкість зміни об'єму лівого шлуночка у SHR була меншою на 25,2 % ( $P < 0.05$ ) у порівнянні з Wistar. У щурів, що отримували Quercetin не достовірно, але зменшувалася на 7,3 % у порівнянні з SHR.

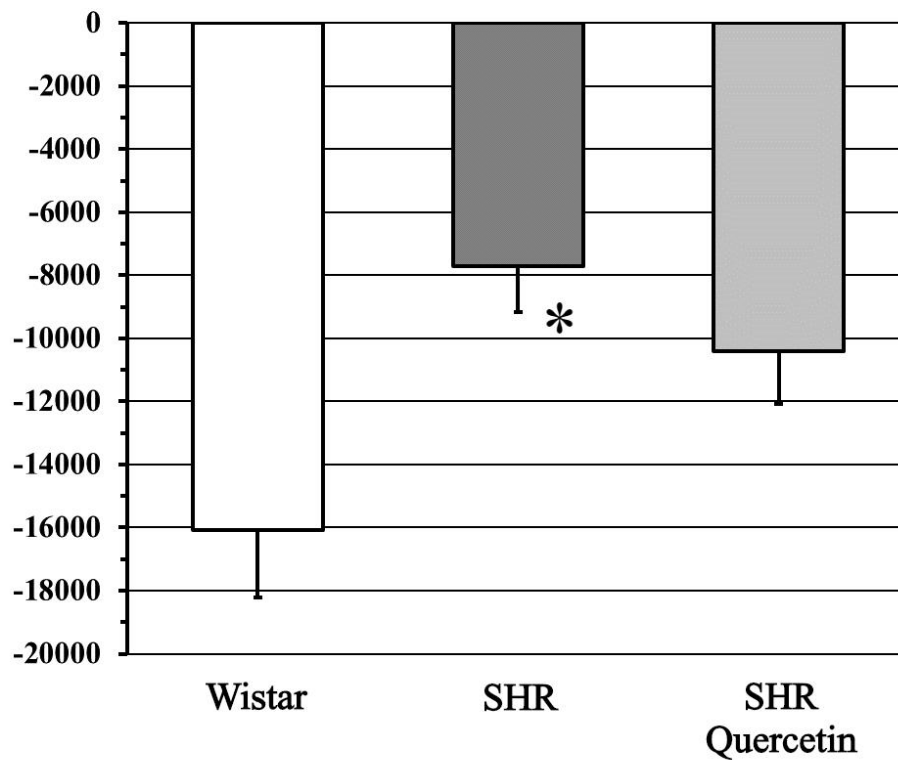
Максимальна швидкість зміни об'єму  
лівого шлуночка (мкл за с)



Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.

$dV/dt$  min або мінімальна швидкість зміни об'єму шлуночка у щурів зі спонтанною гіпертензією була у 2,1 рази меншою ( $P < 0.05$ ) у порівнянні з Wistar. У SHR, що отримували Quercetin відбувалося попередження зменшення, була вищою у 1,4 рази порівняно з SHR.

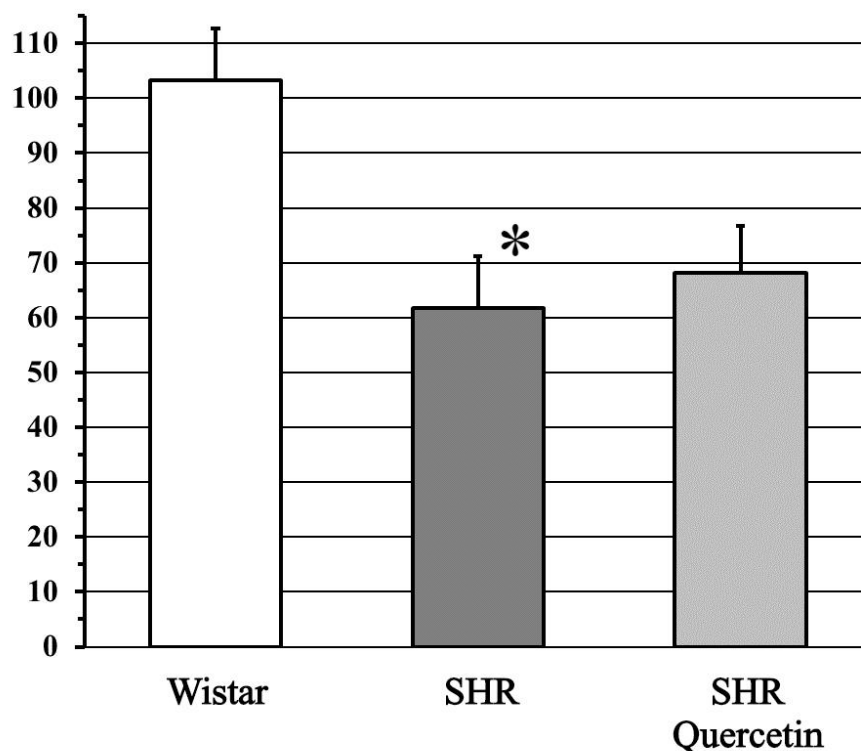
### Мінімальна швидкість зміни об'єму лівого шлуночка (мкл за с)



Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.

Максимальна потужність у щурів SHR у порівнянні з такою у Wistar була на 40,2 % нижчою ( $P < 0.05$ ). При використанні біофлавоноїду у щурів відбувалося попередження зниження максимальної потужності, збільшення її на 10,3 % у порівнянні з SHR, що знаходилися на стандартній дієті.

### Максимальна потужність (мВт)

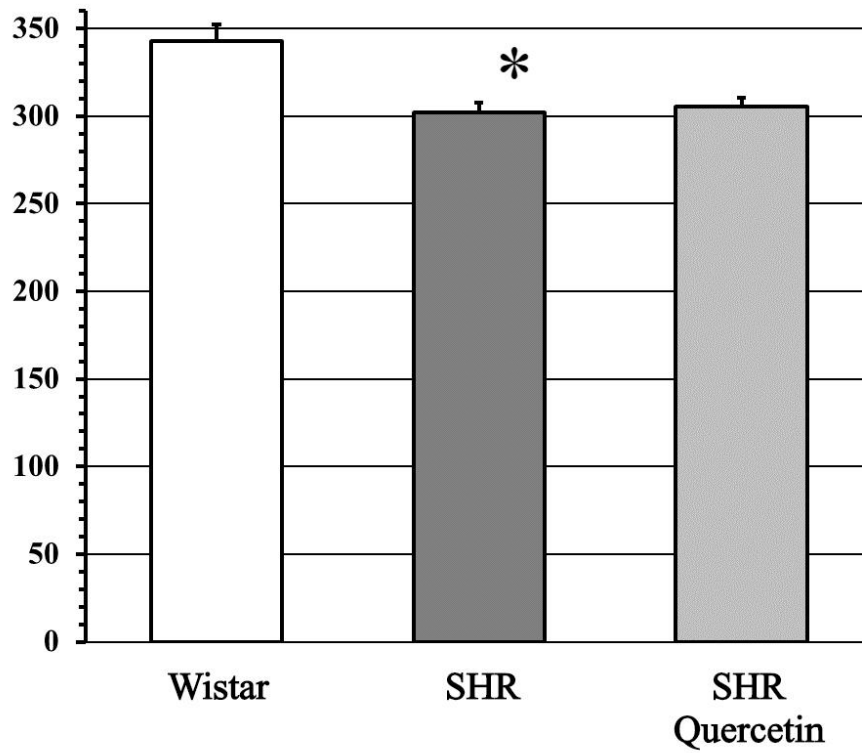


*Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.*

Частота серцевих скорочень була нижчою на 11,9 % у щурів зі спонтанною гіпертензією у порівнянні з нормотензивною лінією Wistar ( $P < 0.05$ ). Вживання Quercetin не значно попереджало зменшення ЧСС, на 1 % у порівнянні з SHR.



## Частота серцевих скорочень (уд/хв)



Примітка. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.

#### 4.2. Вміст ліпопротеїдів у крові у спонтанногіпертензивних щурів та за умов експериментальній терапії

Середні рівні загального холестерину у щурів Wistar та SHR майже не розрізнялися (1,46 та 1,42 ммоль/л відповідно). Після експериментального лікування кверцетином рівень холестерину був у середньому на 4,7 % меншим, ніж у SHR на стандартній дієті (Табл. 4.3).

Щодо рівнів тригліцеридів у групах щурів SHR та Wistar спостерігалася істотна різниця – в останніх цей рівень був меншим на 34,5 %. Застосування кверцетину компенсувало збільшений рівень тригліцеридів у тварин; цей показник був меншим у середньому на 11 % у порівнянні з таким у SHR без лікування.

Таблиця 4.3. Рівні ліпопротеїдів у сироватці крові щурів Wistar, SHR та SHR, що отримували кверцетин (ммоль/л)

	Тотальний холестерин	Тригліцериди	Ліпопротеїди високої щільності	Ліпопротеїди низької щільності	Ліпопротеїди дуже низької щільності	Індекс атерогенності
<b>Wistar</b>	1,46±0,36	1,27±0,44	0,65±0,13	0,23±0,10	0,59±0,21	1,27±0,15
<b>SHR</b>	1,42±0,26	1,71±0,47	0,57±0,09	0,07±0,06	0,79±0,21	1,48±0,11
<b>SHR Кверцетин</b>	1,35±0,34	1,52±0,41	0,64±0,14	0,01±0,001	0,70±0,19	1,13±0,19

Вміст ліпопротеїдів високої щільності у групі SHR був на 12 % меншим, ніж у щурів Wistar. Використання кверцетину усувало це зменшення рівня ліпопротеїдів високої щільності, даний показник був вищим на 13,3 %.

Рівень ліпопротеїдів низької щільності у SHR був нижчим у 3,3 рази, ніж у контрольних тварин лінії Wistar. Уведення кверцетину зменшувало цей рівень у 7 разів у порівнянні з відповідним показником у SHR без корекції.

Індекс атерогенності у SHR був більшим у середньому на 16,5 %, ніж у щурів Wistar; у SHR, що отримували кверцетин, цей індекс був нижчим на 23,6 %, ніж у SHR-тварин без лікування, тобто його збільшення у порівнянні з контролем ефективно попереджувалося (Рис. 4.1).

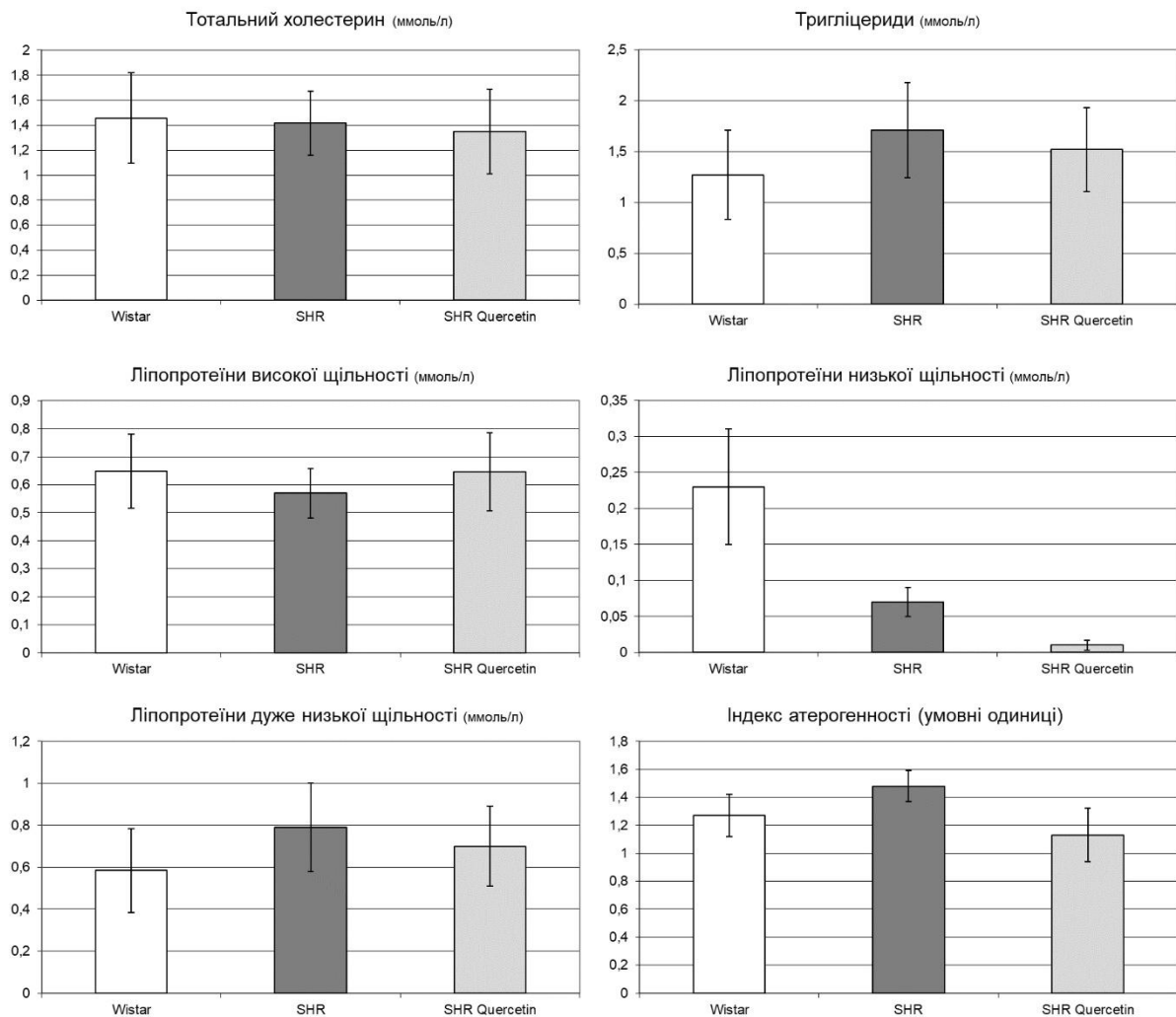


Рис. 4.1. Рівні тотального холестерину, тригліцеридів, ліпопротеїдів високої, низької та дуже низької щільності у крові щурів та індекс атерогенності у Wistar, SHR та SHR за умов лікування Quercetin.

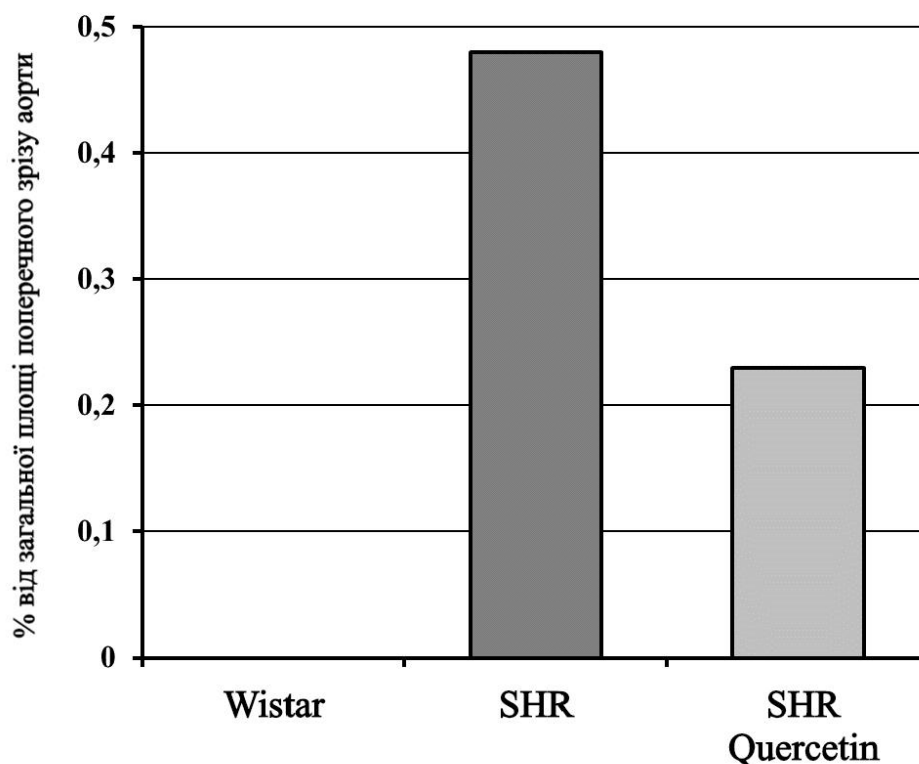
**РОЗДІЛ 5. Морфологічні, ультраструктурні зміни у тканинах аорти при спонтанній гіпертензії у щурів та при її експериментальній терапії. Експресія генів субодиниць протеасоми та активність останньої у тканинах аорти**

**5.1. Вплив артеріальної гіпертензії на морфометричні, патогістологічні та електронно мікроскопічні показники структур стінки аорти**

**Ліпідна інфільтрація тканин аорти**

Подвійне забарвлення специфічним до ліпідів фарбником Oil Red та гематоксиліном поперечних зрізів аорти експериментальних тварин показало повну відсутність ознак ліпідної інфільтрації у щурів лінії Wistar, у той час як у спонтанногіпертензивних щурів на певних ділянках стінки судин спостерігалось незначне позитивне забарвлення Oil Red, яке складало 0,48 % від загальної площі проаналізованих зрізів аорт (Рис. 5.1).

## Ліпідна інфільтрація тканин аорти



*Рис. 5.1. Відсоток ліпідних включень у стінці аорти експериментальних тварин після подвійного забарвлення гематоксиліном та специфічним для ліпідів фарбником Oil Red. Oil Red-позитивне забарвлення оцінювалося морфометрично і відображалося як відсоток від загальної площі поперечного зрізу аорти.*

Рівень ліпідної інфільтрації у групі спонтанногіпертензивних тварин, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» упродовж 8-ми тижнів знижувався до 0,23 %. Отже, застосування біофлавоноїду може суттєво впливати на процеси пов'язані з ліпідним обміном у стінці судин спонтанногіпертензивних щурів і попереджувати можливий розвиток ліпідозу (Рис. 5.2).

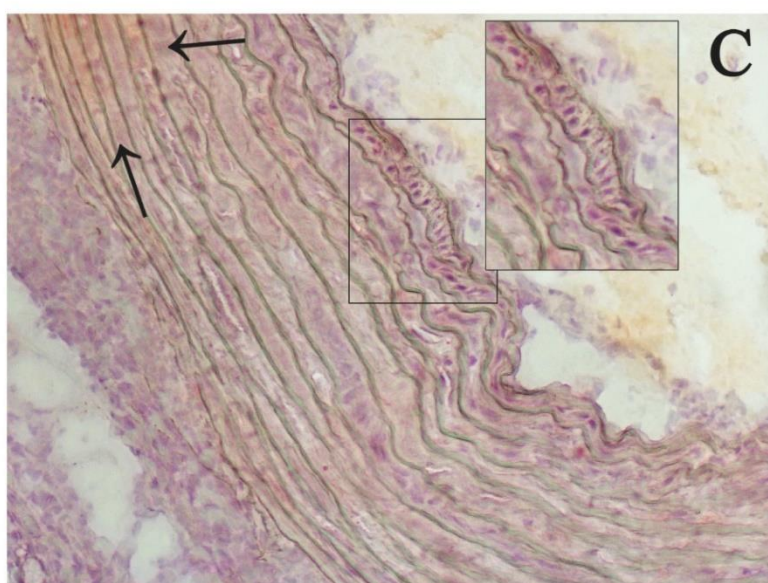
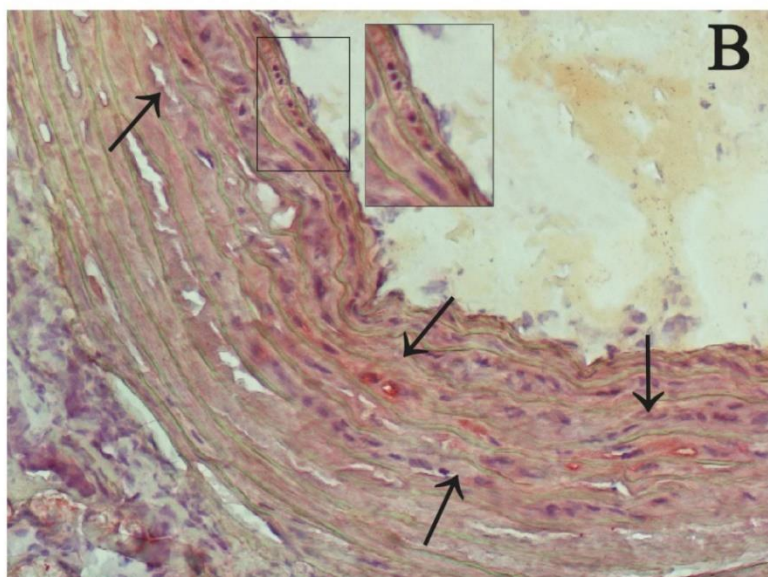
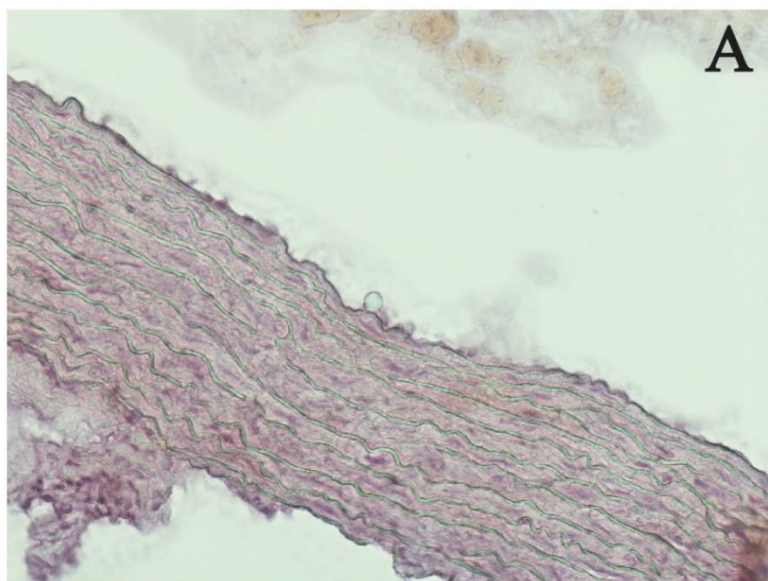


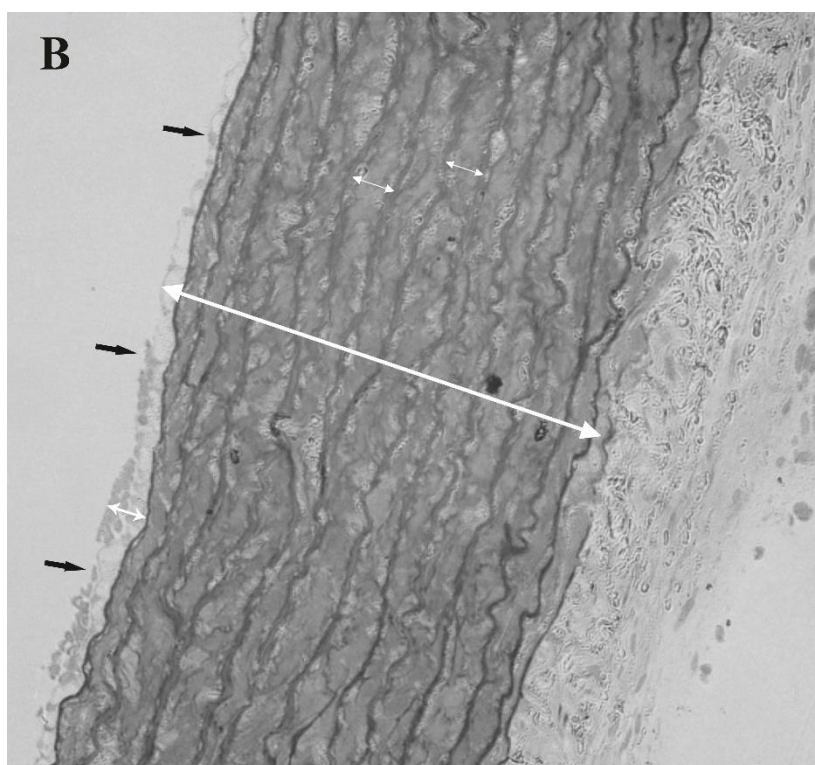
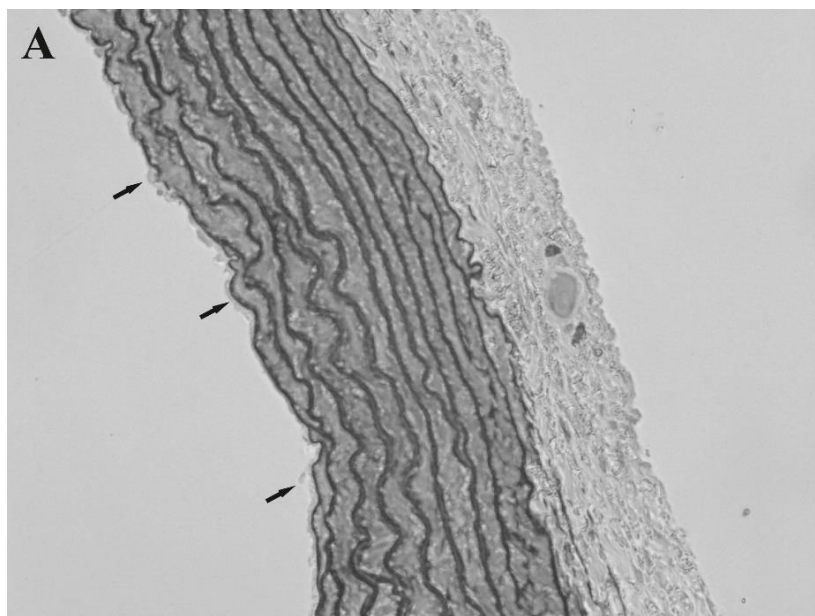
Рис. 5.2. Зрізи аорти щурів Wistar (A), SHR (B) та SHR лікованих кверцетин (C) після подвійного забарвлення гематоксиліном та Oil Red. Стрілками вказані Oil Red-позитивні ділянки у стінці аорти. У виділених прямокутниках видно переорієнтацію ГМК (збільшення: x20).

### **Морфометричні дослідження аорти на напівтонких зрізах**

У подальшому для оцінювання структурних змін судинної стінки експериментальних тварин був проведений морфометричний аналіз поперечних зрізів аорт з різних експериментальних груп з визначенням просторових параметрів, а саме: товщини інтими, товщини медії, товщини комплексу інтима-медія, ширини прошарків ГМК (відстані між двома еластичними мембранами) та кількості прошарків ГМК. Також визначалось співвідношення інтима/медія. Виміри проводились у 10 різних точках на кожному поперечному зрізі судин та у 5 точках по довжині судини (Рис. 5.3).

Морфометричний аналіз зрізів аорт показав значні відмінності по вищезазначеним параметрам між щурами Wistar та SHR (Табл. 5.1). Зокрема стійка гіпертензія у щурів лінії SHR призводила до виражених порушень в архітектоніці судин: спостерігалось потовщення комплексу інтима-медія у порівнянні із контрольною групою за рахунок збільшення кількості та потовщення прошарків ГМК на 13,3 % і 18,5 % відповідно, і як результат показники ширини медії були вищими на 34,3 %. Товщина інтими аорт щурів SHR була більшою у 1,9 рази у порівнянні з такою у щурів лінії Wistar. Показники товщини комплексу інтима-медія у SHR були більшими на 36,4 % у порівнянні з контролем. Застосування Quercetin протягом 8-ми тижнів у спонтанногіпертензивних щурів знизило показники товщини інтими і товщини комплексу інтима-медія на 6,6 % і 10,7 % відповідно. Не дивлячись на незначне зростання кількості прошарків ГМК (на 8,8 %) у результаті 8-

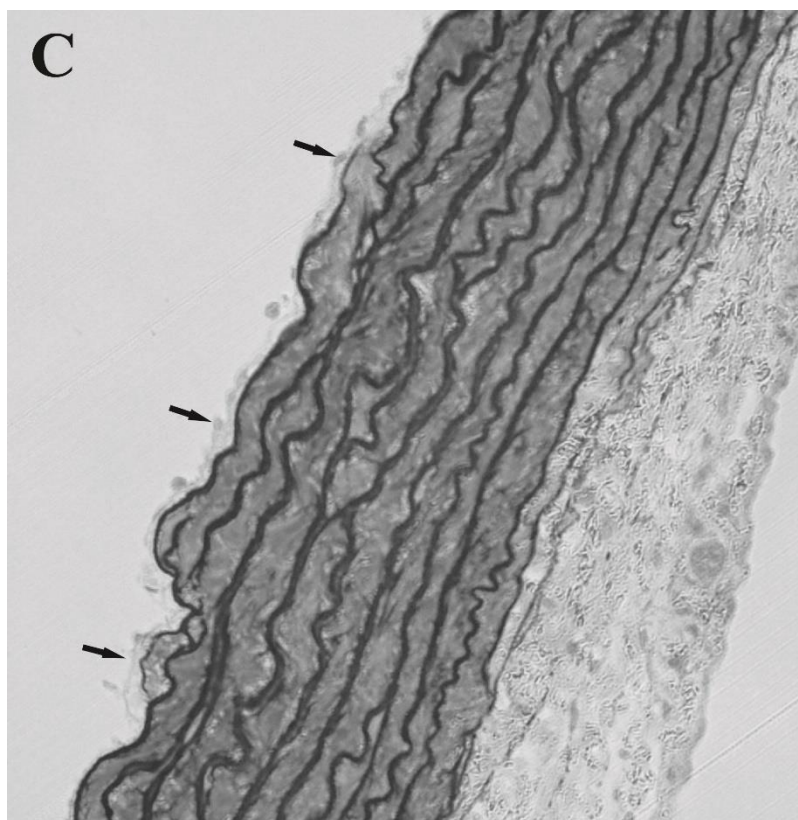
тижневого додавання Quercetin до добового раціону SHR відбулося зниження товщини медії (на 12,3 %) за рахунок потоншення кожного з наявних прошарків ГМК на 3 %.



*Рис.5.3. Напівтонкі зрізи аорт щурів Wistar (A), SHR (B) та SHR лікованих кверцетином (C). Стрілка на B вказує ділянку вимірювання загальної ширини стінки аорти (інтима-медіа).*

*Ділянки вимірювання ширини прошарку ГМК показані двосторонніми білими стрілками на B. Маленькі чорні стрілки вказують на прошарки ендотелію (збільшення: x20).*





Показник співвідношення інтима/медія у групі SHR був більшим у 1,4 рази по відношенню до такого у групі тварин лінії Wistar. У зв'язку з тим, що зміни в розмірах інтими та медії аорти щурів, що отримували Quercetin відбулися нерівномірно, а саме у більшій мірі Quercetin вплинув на розміри медії, показник співвідношення інтима/медія у групах SHR та SHR Quercetin майже не відрізнявся.

У такий спосіб, у групі спонтанногіпертензивних тварин у порівнянні з контрольною групою спостерігалось суттєве підвищення всіх просторових показників. Зміни відмічались як у інтимі, так і у медії. Quercetin у тій чи іншій мірі попереджав зазначені порушення у всіх прошарках стінки досліджених аорт, знижуючи на 10,7 % товщину комплексу інтима-медія,

показника, який розглядається як маркер атеросклеротичних змін в судинах і предиктор розвитку серцево-судинних захворювань.

*Таблиця 5.1. Морфометричні показники товщини аорт щурів Wistar, SHR та SHR Quercetin*

Морфологічні параметри	Експериментальні групи		
	Wistar	SHR	SHR Quercetin
Товщина комплексу інтима-медіа, мкм	267,5±35,7	364,9±30,8	325,7±90,3
Товщина прошарків ГМК, мкм	24,1±2,0	28,6±6,8	24,7±3,3
Кількість прошарків ГМК, шт.	9	10,2	11,1
Товщина медії, мкм	257,2±35,0	345,2±31,1	307,3±89,3
Товщина інтими, мкм	10,3±4,3	19,7±5,1*	18,4±4,1
Співвідношення інтима/медіа, умовні одиниці	0,040±0,01	0,057±0,02	0,059±0,02

*Примітка.* \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.

### Ультраструктурні дослідження аорти

Електронно мікроскопічне дослідження стінки аорти у щурів показало суттєві ультраструктурні зміни та структурну неоднорідність у всіх прошарках судин у групі SHR у порівнянні із тваринами групи Wistar. Просвіт аорти в групі контрольних тварин був вистелений круглими або полігональної форми ендотеліоцитами, які щільно прилягали до еластичної

мембрани і були зв'язані щільними міжклітинними контактами. Ендотеліоцити містили інтактні органели, цитоплазматичні гранули та піноцитозні везикули. Еластична мембрана зберігала цілісність і однорідність. В аортах групи спонтанногіпертензивних тварин спостерігалось вогнищеве потовщення інтими за рахунок вираженого набряку ендотелію і субендотеліального шару, були характерними дезорганізація ендотеліальної вистилки та розшарування внутрішньої еластичної мембрани. На окремих ділянках судини ендотеліоцити утворювали численні вирости та інвагінації плазмолемми, часто мали веретеноподібну форму та були переорієнтовані по відношенню до вісі аорти з вип'ячуванням у просвіт судини. Вогнищеве спостерігалось відшарування ендотелію аж до повної десквамації ендотеліоцитів. Ендотеліальні клітини містили велику кількість вакуолей різного походження (у тому числі і автофагічні), мітохондрії, у більшості з набряком та частковим або повним руйнуванням крист, мультимембранної структури (наявність яких свідчить про деградацію внутрішньоклітинних мембран). Гранулярний ендоплазматичний ретикулум у більшості ендотеліоцитів мав розширені цистерни, що є характерною ознакою розвитку стресу ендоплазматичного ретикулуму і вказує на втрату клітиною здатності до активного синтезу білків. Велика кількість міжендотеліальних контактів втрачала щільність. Зазначені зміни вказують на можливу часткову втрату бар'єрної функції ендотелієм, що підтверджувалось наявністю деяких формених елементів крові в субендотеліальному шарі. Також у зразках, що

вивчалися, спостерігалась вогнищева просторова переорієнтація гладеньком'язових клітин по відношенню до ендотеліального шару. Характерними були підвищена осміофілія ГМК, зменшення їхніх розмірів, виражена вакуолізація цитоплазми, розширення цистерн ендоплазматичного ретикулуму, набряк та руйнування мітохондрій. Клітини утворювали численні вирости, які можна було бачити в субендотеліальному шарі, що було результатом руйнування внутрішньої еластичної мембрани. Застосування Quercetin у групі SHR зменшувало кількість локусів, які містили вищезазначені порушення і здебільшого запобігало цим змінам аорти. Особливо слід зазначити, що Quercetin сприяв збереженню структури ендотеліоцитів та цілісності еластичної мембрани так само як і зменшенню площі люмінальної поверхні судин з десквамованим ендотелієм, частково попереджував структурні порушення та переорієнтацію ГМК (Рис. 5.4).

Проведені морфологічні дослідження аорт піддослідних тварин вказують на те, що в групі спонтанногіпертензивних щурів стінка судин вже через 6 місяців життя зазнає глибоких патологічних змін, як в інтимі, так і в медії, які проявляються певною мірою вираженою дезорганізацією ендотеліального й субендотеліального шарів та базальної мембрани, порушенням структури ГМК.

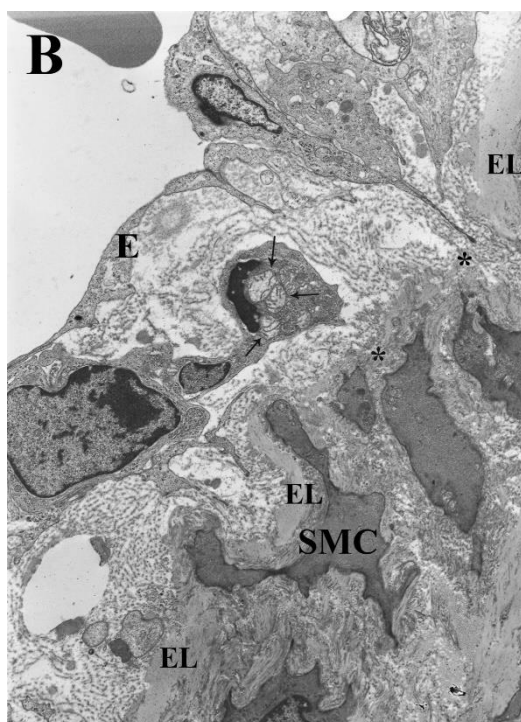
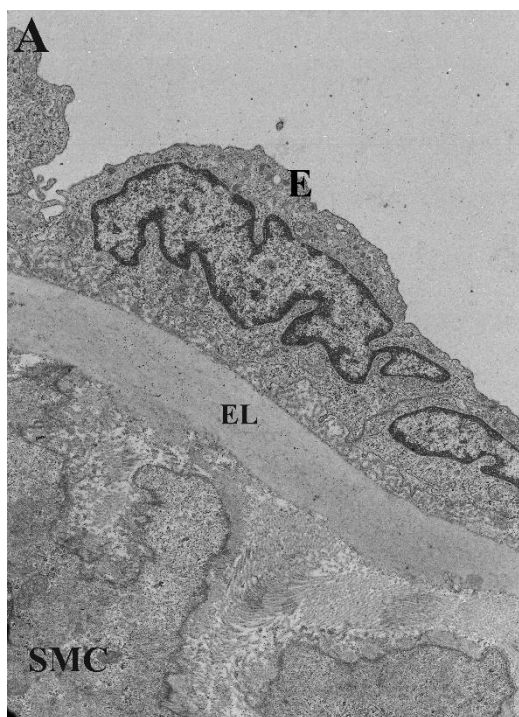
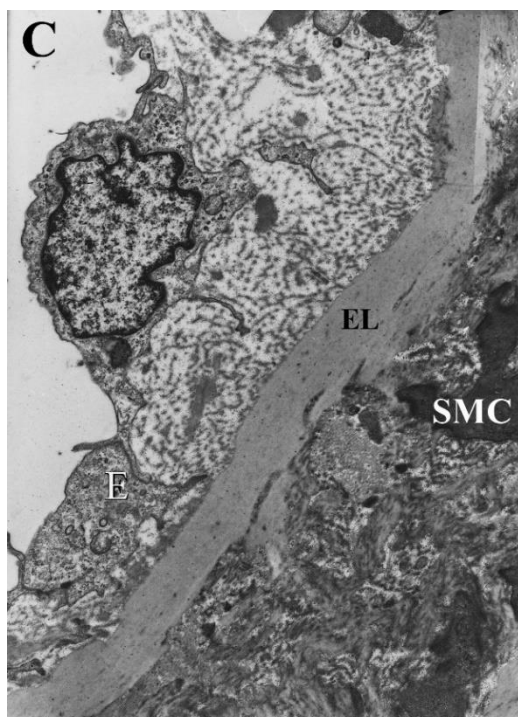


Рис. 5.4. Ультратонкі зрізи стінки аорти щурів. (А) Аорта щура лінії Wistar. Зображення ілюструє типову еластичну ламелум (EL) та ендотеліальний шар (E). В аорті спонтанно гіпертензивного щура (В) цитоплазма ГМК (SMC) підвищено осміюфільна, клітини утворюють вирости, орієнтовані перпендикулярно щодо осі судини. Внутрішня еластична мембрана вогнищево фрагментована; ендотелій частково відшарований від базальної мембрани. У субендотеліальному шарі, який містить фрагмент форменого елемента крові (стрілки), спостерігаються набряк та вакуолізація. Застосування до SHR кверцетину (С) запобігло розвитку дегенеративних процесів у стінці аорти щурів, попереджуючи



*виникнення вищезазначених ознак  
(збільшення: x5000).*

## **5.2. Визначення трипсино-, хімотрипсиноподібної та пептидилглютаміл пептид-гідролазної активностей протеасоми у тканинах аорти у щурів зі спонтанною гіпертензією та при експериментальній терапії**

У групі SHR трипсиноподібні, хімотрипсиноподібні та каспазоподібні активності у тканинах аорти зменшувалися порівняно зі щурами Wistar на 18 %, 8 % та 0,7 % відповідно, але ці зміни не є статистично значущими.

Quercetin значно знизив трипсиноподібну та хімотрипсиноподібну активність протеасоми (Рис. 5.5) у 2,7 ( $P=0.004$ ) та у 2 рази ( $P=0.002$ ) відповідно, але має незначний вплив на активність РНРГ (збільшив його на 3,6 %).

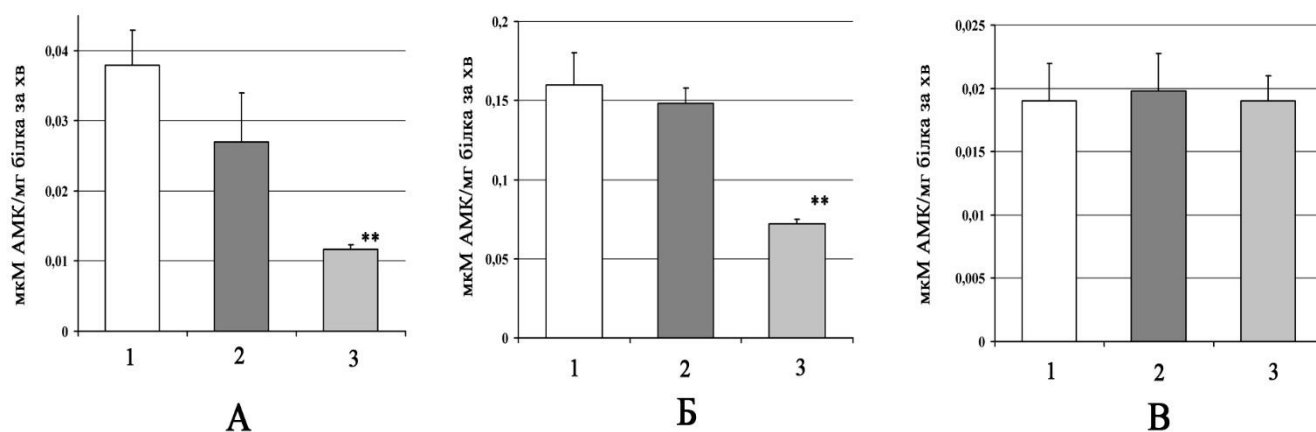


Рис. 5.5. Активність протеасоми у тканинах аорти. А) Трипсиноподібна активність; Б) Хімотрипсиноподібна активність; В) Пептидилглутаміл пептид-гідролазна активність. 1 – у щурів лінії Wistar, 2 – SHR та 3 – SHR+кверцетин. \*\* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR+кверцетин.

Таблиця 5.2. Активності протеасоми у тканинах аорти

Активність	Wistar (n=8)	SHR (n=14)	SHR+Q (n=8)
<b>Трипсиноподібна</b>	0,038±0,006	0,031±0,007	0,012±0,0008#
<b>Хімотрипсиноподібна</b>	0,16±0,026	0,15±0,015	0,07±0,004#
<b>Каспазоподібна</b>	0,019±0,003	0,019±0,004	0,019±0,002

Примітка: # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.

### **5.3. Експресії генів, що кодують різні субодиниці протеасоми у тканинах аорти при артеріальній гіпертензії та експериментальній терапії**

#### ***5.3.1. Експресія генів, що кодують каталітичні конституційні (PSMB1, PSMB2, PSMB5) та індукційні субодиниці (PSMB8 (LMP7), PSMB9 (LMP2), PSMB10) протеасоми у тканинах аорти***

При порівнянні рівнів експресії матричної РНК генів, що кодують конституційні субодиниці протеасоми у щурів лінії SHR, рівень гену *PSMB1* статистично вірогідним був нижчим у 10,6 разів порівняно з рівнем у щурів лінії Wistar ( $P=0.0014$ ). Водночас, рівень мРНК гену *PSMB5* нижчий на 5,6 % у щурів SHR, тоді як рівень мРНК гену *PSMB2* був вищим на 25 % у спонтанногіпертензивних щурів (Рис. 5.6).



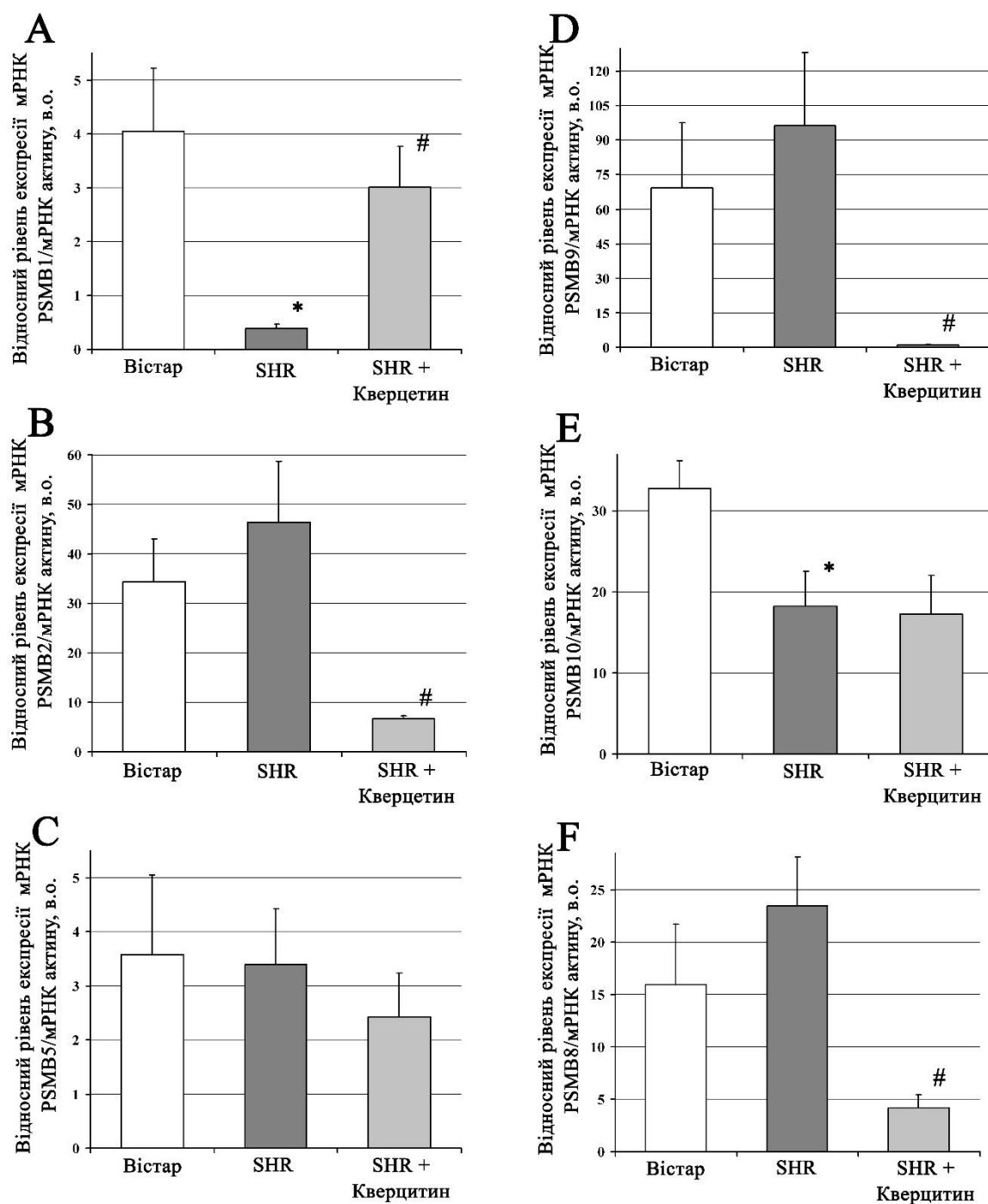


Рис. 5.6. Рівні експресії генів, що кодують конституційні субодиниці протеасом, у тканинах аорти щурів групи Wistar, SHR та SHR+кверцетин. А) Рівень експресії гену PSMB1; В) – гену PSMB2; С) – гену PSMB5. Рівні експресії генів, що кодують індукційні субодиниці протеасом: Д) Рівень експресії гену PSMB9; Е) – гену PSMB10; Ф) – гену PSMB8. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній SHR з SHR+кверцетин.

Корекція Quercetin у щурів лінії SHR наступним чином змінила рівні мРНК генів, що кодують конституційні субодиниці: *PSMB5* знижувався всього на 28 %, а у SHR, що отримували Quercetin рівень мРНК гену *PSMB2* був у 28 разів ( $P=0.003$ ) нижчим порівняно з тими, що отримували стандартний корм. Водночас рівень мРНК гену *PSMB1* був вищим у 7,8 разів у щурів лінії SHR, що отримували Quercetin (Табл. 5.3)

Порівнюючи рівні експресії мРНК генів, що кодують індукцйбельні субодиниці протеасоми у щурів лінії Wistar і SHR, спостерігалися такі зміни: статистичного недостовірне збільшення рівня експресії таких генів як *PSMB8* (47 %) та *PSMB9* (39 %) у спонтанногіпертензивних щурів, водночас виявлено статистично достовірне зниження рівня експресії мРНК гену *PSMB10* на 44 % ( $P=0.003$ ). При впливі Quercetin рівень експресії всіх індукцйбельних генів знижувався різним чином. *PSMB8* та *PSMB9* статистично вірогідно були меншими у 5,5 разів ( $P=0.004$ ) та у 112 разів ( $P=0.005$ ) відповідно. У той час, рівень мРНК гену *PSMB10* був нижчим на 5 % у щурів лінії SHR, що отримували Quercetin.

### **5.3.2. Експресія генів, що кодують регуляторні субодиниці (*PSME1* та *PSMC1*) протеасоми у тканинах аорти**

При порівнянні рівнів експресії генів, що кодують регуляторні субодиниці протеасоми між щурами Wistar і SHR вірогідно статистичної різниці не знайшли: у спонтанногіпертензивних щурів рівень експресії гену *PSMC1* у 3,4 рази був нижчим, а експресія *PSME1* була навпаки вищою на

34 % порівняно з Wistar. Застосування Quercetin у щурів лінії SHR зменшило рівні експресії мРНК генів *PSMC1* та *PSME1* на 28 % та у 7,8 разів ( $P=0.00004$ ) відповідно з тією різницею, що зниження рівня експресії гену *PSME1* статистично вірогідно, порівняно зі спонтанногіпертензивними щурами, що знаходилися на стандартній дієті (Рис. 5.7).

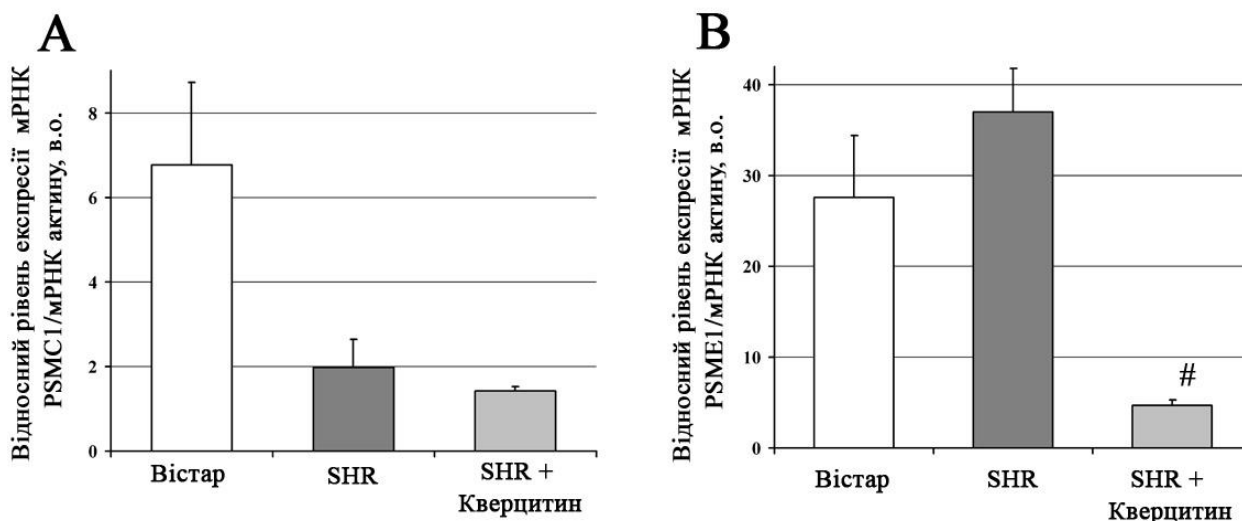


Рис. 5.7. Експресія генів, що кодують регуляторні субодиниці протеасоми, в тканинах аорти. А) Експресія гену *PSMC1*; В) – гену *PSME1*. # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR+кверцетин.

Таблиця 5.3. Експресія генів, що кодують субодиниці протеасоми у тканинах аорти щурів Wistar, SHR та SHR Quercetin

Гени	Wistar (n=8)	SHR (n=14)	SHR Quercetin (n=8)
<i>PSMB1</i>	4,04±1,17	0,38±0,08*	3,02±0,75#
<i>PSMB2</i>	34,42±8,66	46,39±12,29	6,72±0,58#
<i>PSMB5</i>	3,58±1,47	3,38±1,044	2,43±0,81
<i>PSMB8</i>	15,97±5,77	23,53±4,64	4,26±1,25#
<i>PSMB9</i>	69,27±28,19	96,45±31,70	0,86±0,26#
<i>PSMB10</i>	32,72±3,52	18,20±4,41*	17,28±4,76

<b><i>PSMC1</i></b>	6,77±1,95	1,98±0,65*	1,42±0,11
<b><i>PSME1</i></b>	27,58±6,84	36,95±4,79	4,70±0,64#

*Примітка. \* – P<0.05 при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # – P<0.05 при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.*

#### 5.4. Кореляційний зв'язок між експресією генів субодниць протеасоми та активностями протеасоми у тканинах аорти

Таблиця 5.4. Кореляційний зв'язок між експресією генів *PSMB2* та *PSMB10* і *PGPH* - активністю протеасоми у тканинах аорти щурів Wistar

		Wistar <i>PSMB2</i>	Wistar <i>PSMB10</i>	Wistar <i>PGPH</i>
Wistar <i>PSMB2</i>	Кореляція Пірсона	1	0,107	-0,781*
	Знч.(2-сторін)		0,840	0,038
	N	7	6	7
Wistar <i>PSMB10</i>	Кореляція Пірсона	0,107	1	0,147
	Знч.(2-сторін)	0,840		0,781
	N	6	6	6
Wistar <i>PGPH</i>	Кореляція Пірсона	-0,781*	0,147	1
	Знч.(2-сторін)	0,038	0,781	
	N	7	6	8

\* - кореляція значима на рівні 0.05 (2-сторін).

Рівень експресії мРНК у аортах щурів SHR гену *PSMB1* був вищим, а гену *PSMB5* був майже однаковим у порівнянні із рівнем експресії у щурів Wistar. Але обидві активності (відповідно трипсино- і хімотрипсино-подібні) були меншими. Одночасно спостерігався взаємозв'язок між експресією мРНК індукцибельних протеасомних субодниць, які також

коднують каталітичні субодиниці імунопротеасомної та протеасомної активності. Застосування Quercetin знижувало значення експресії *PSMB9* та *PSMB8*, але не впливало на рівень мРНК *PSMB10* і, відповідно, зменшувало трипсино- та хімотрипсино-подібну активності, тоді як активність *PGPH* протеасоми залишалася незмінною. Кореляційний аналіз підтвердив ці результати. Виявлено сильну позитивну кореляцію ( $r=0.93$ ) між експресією гена *PSMB9*, що кодує протеасомну субодиницю з трипсиноподібною активністю, та цією активністю у тканинах аорти SHR ( $P=0.02$ ) (Табл. 5.5). Виявлена сильна негативна кореляція ( $r= -0.78$ ) між експресією гена *PSMB2* та активністю *PGPH* конститутивної протеасоми у тканинах аорти щурів Wistar ( $P=0.04$ ) (Табл. 5.4). Так, можна припустити, що дія Quercetin на активність протеасом зумовлена зниженням рівня експресії генів та активності насамперед в імунопротеасомі. Нам вдалося знайти лише дві статті 2019 та 2020 років [80, 81]. Однак у досліджах використовували ангіотензин II для моделювання гіпертензії у мишей. І визначали експресію білків, а не мРНК і у тканинах серця, а не аорти. Попри не співпадіння у наших роботах, ми дійшли до однакового висновку: при АГ зростає експресія саме індукцйбельних субодиниць протеасоми, а їхнє пригнічення або специфічним інгібітором  $\beta 5i$  (PR-957), або Quercetin запобігає розвиток гіпертрофії серця та зменшує АТ.

Таблиця 5.5. Кореляційний зв'язок між експресією генів *PSMB1* та *PSMB9* і трипсиноподібною активністю протеасоми у тканинах аорти щурів *SHR*

		<i>SHR PSMB1</i>	<i>SHR PSMB9</i>	<i>SHR</i> Трипсиноподібна
<i>SHR PSMB1</i>	Кореляція Пірсона	1	0,644	0,570
	Знч.(2-сторін)		0,356	0,316
	N	5	4	5
<i>SHR PSMB9</i>	Кореляція Пірсона	0,644	1	0,930*
	Знч.(2-сторін)	0,356		0,022
	N	4	5	5
<i>SHR</i> Трипсиноподібна	Кореляція Пірсона	0,570	0,930*	1
	Знч.(2-сторін)	0,316	0,022	
	N	5	5	6

\* - кореляція значима на рівні 0.05 (2-сторін).

## **РОЗДІЛ 6. Зміни основних фізіологічних параметрів функціонування серця при спонтанній гіпертензії у щурів та при її експериментальній терапії**

### **6.1. Вплив артеріальної гіпертензії на морфометричні, патогістологічні та ультраструктурні показники структур серцевого м'яза**

Для оцінювання рівнів розвитку гіпертрофічних процесів у щурів із стійкою гіпертензією проводили розрахунок індекса маси серця, який визначається як відношення маси серця до маси тіла. Статистично достовірно вищим був індекс маси серця у щурів групи SHR ( $3,7 \pm 0,14$  мг/г) у порівнянні із щурами лінії Wistar  $2,9 \pm 0,17$  мг/г ( $P=0.003$ ). При додаванні Quercetin до добового раціону упродовж 8-ми тижнів у спонтанногіпертензивних щурів ІМС знижувався на 8 % і становив  $3,4 \pm 0,06$  мг/г (Рис. 6.1).



## Індекс маси серця (маса серця (мг)/маса тіла (г))

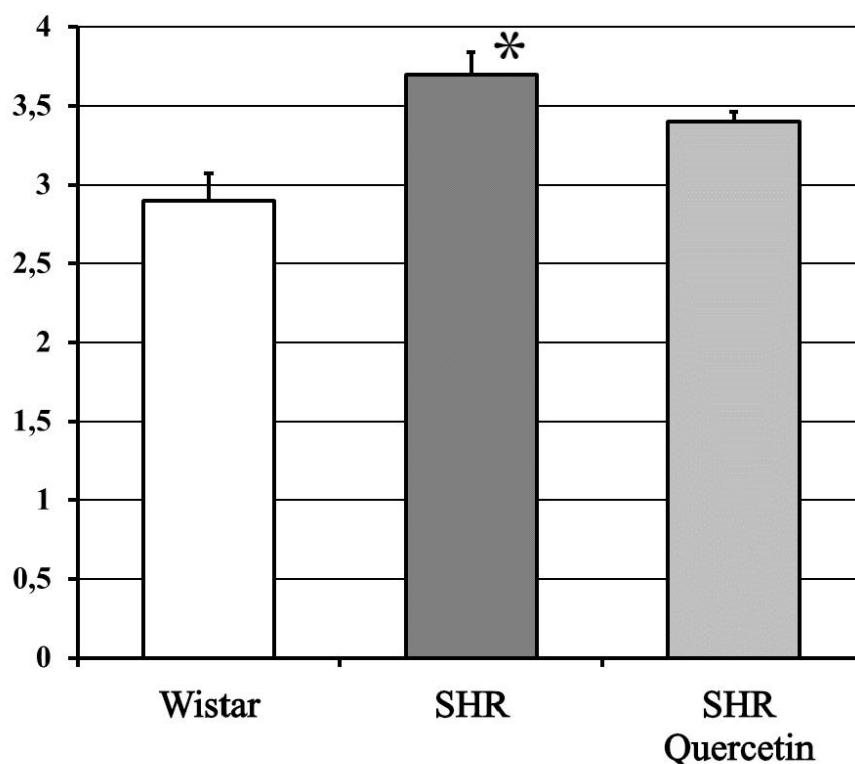


Рис. 6.1. Індекс маси серця у щурів Wistar, SHR та SHR Quercetin. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR.

Гістологічне вивчення процесів фіброзу показало підвищення вмісту сполучної тканини у 6 разів у міокарді щурів лінії SHR у порівнянні зі щурами лінії Wistar ( $4,7 \pm 0,45$  % та  $0,79 \pm 0,05$  % від площі лівого шлуночка відповідно). Прояви фіброзу були найбільш виразними в зоні ендокарду та в периваскулярних зонах (Рис. 6.3). За впливу таблетованої форми кверцетину у групі SHR відсоток фібротичних змін у лівому шлуночку серця знижувався майже у 2,9 рази ( $1,6 \pm 0,03$  %,  $P < 0.05$ ) (Рис.6.2).

### Фібріотичні зміни у міокарді лівого шлуночка (%)

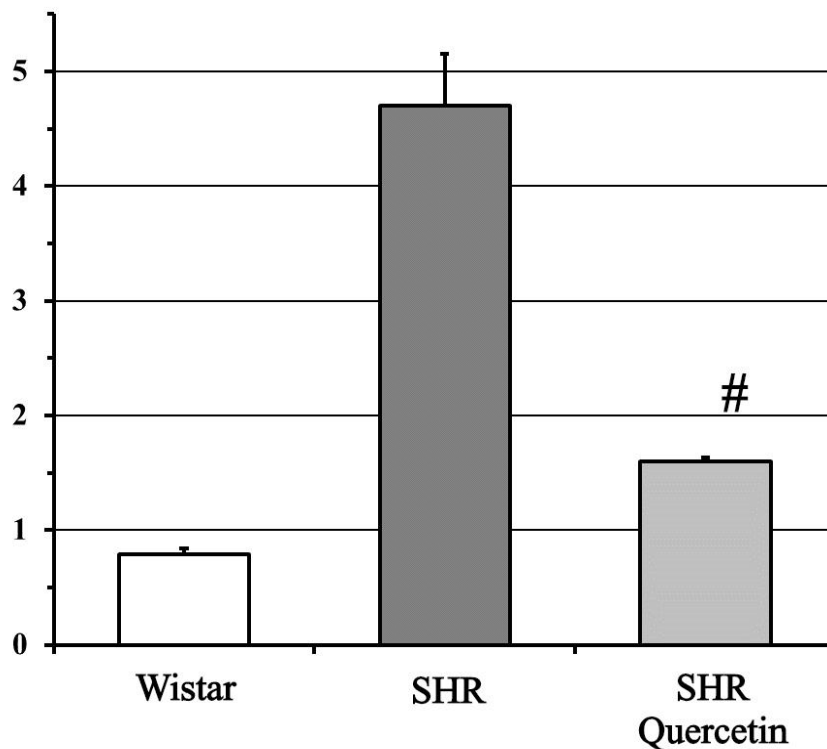
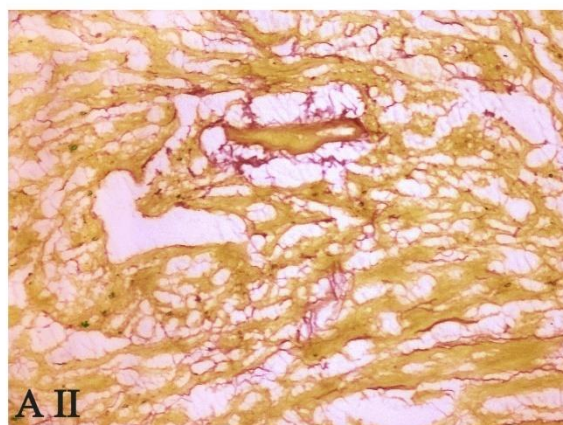
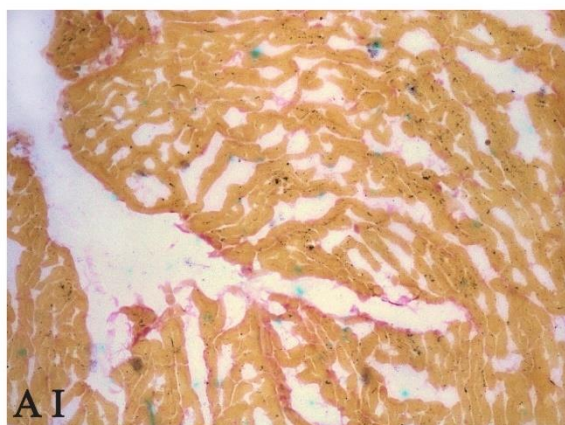
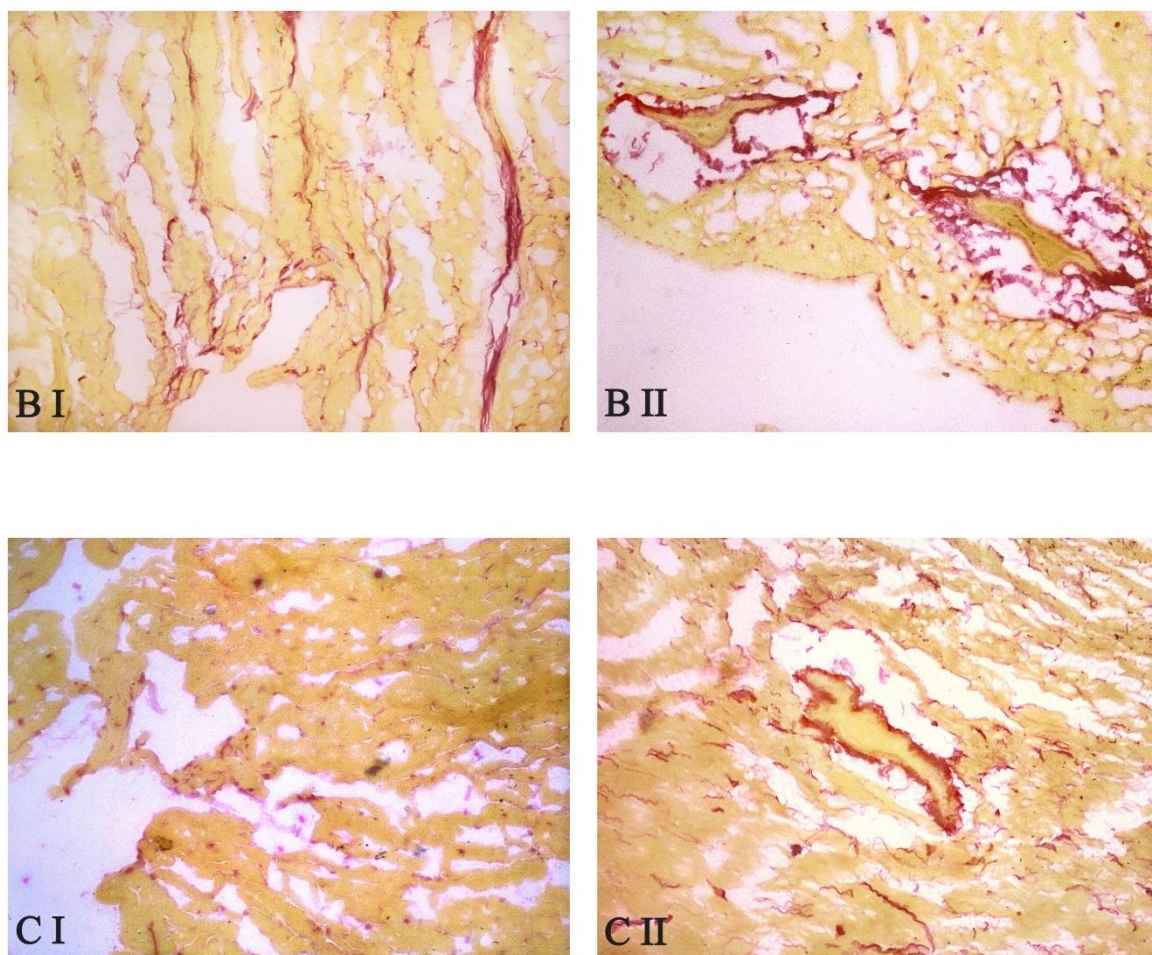


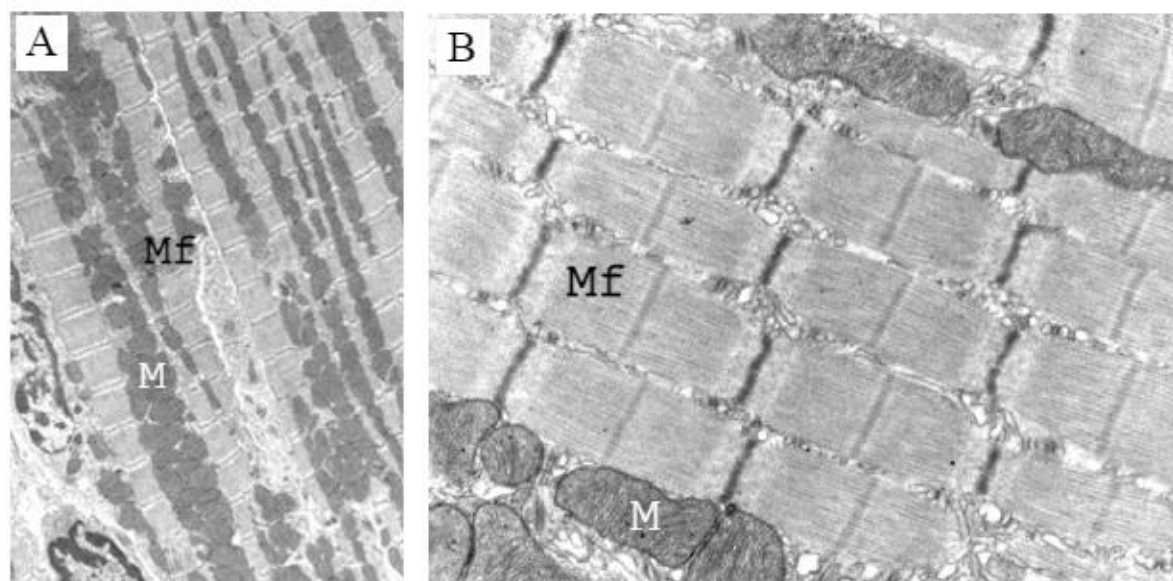
Рис. 6.2. Фібріотичні зміни у міокарді лівого шлуночка щурів Wistar, SHR та SHR Quercetin. # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR, що отримували таблетовану форму кверцетину «Квертин» протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня.





*Рис. 6.3. Гістологічні характеристики міокарду експериментальних тварин. Забарвлення сполучної тканини за Ван-Гізоном. А) Щур Wistar, В) – SHR та С) – SHR+кверцетин. У лівій колонці (I) показана ділянка ендокарду, у правій (II) фібротичні зміни у периваскулярній зоні. Червоним кольором забарвлена сполучна тканина, жовтим – цитоплазма кардіоміоцитів (збільшення:  $\times 10$ ).*

## Електронна мікроскопія міокарду

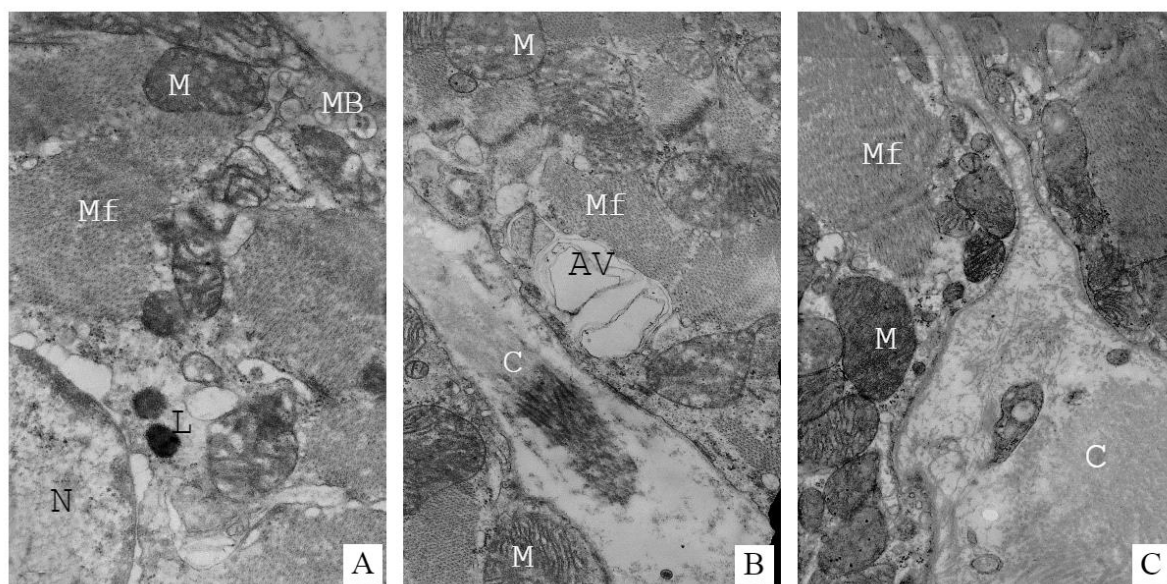


*Рис. 6.4. Ультраструктура міокарду лівого шлуночка серця щурів групи Wistar. Рівномірний розподіл міофіламентів та мітохондрій із добре організованими кристами, локалізованими паралельно в міжміофібрилярному просторі. Цистерни ендоплазматичного ретикулуму та T-системи зберігають щільність. Відсутній екстрацелюлярний та периваскулярний набряк, у міжклітинному просторі не спостерігається надлишку колагенових структур. Mf. –міофіламенти, M- мітохондрії. А) x3600; В) x10000.*

На ультраструктурному рівні в групі SHR на відміну від міокарду лівого шлуночка серця щурів групи Wistar (Рис. 6.4) всі виявлені зміни можуть свідчити про підвищений рівень метаболічних процесів. Зокрема, у кардіоміоцитах спостерігалось розширення цистерн T-системи, цистерн саркоплазматичного ретикулуму, активні процеси ендо- та екзоцитозу, які найкраще виявляються у субсарколемальній ділянці клітин, і проявляються у наявності різного типу везикул, включно з окаймованими везикулами та мультивезикулярними тільцями. Виражене збільшення кількості

мультивезикулярних тілець як в субсарколемальному, так і в інших локусах кардіоміоцитів може свідчити про активацію деградаційних процесів, пов'язаних насамперед з активацією лізосомальної системи та, можливо, і з аутофагією, оскільки за літературними даними ендосоми (а мультивезикулярні тільця розглядаються як зрілі ендосоми) можуть бути необхідним компонентом для формування аутофагосом, що певною мірою підтверджується збільшенням кількості аутофагічних вакуолей у порівнянні з контролем (Рис. 6.5, 6.6, 6.7).

У певних клітинах спостерігається зміщення апарату Гольджі на периферію кардіоміоцита. Як видно з Рис. 6.7 (А, В) цистерни апарату Гольджі знаходяться безпосередньо біля саркоплазматичної мембрани, оточені великою кількістю везикул та мультивезикулярними тільцями.



*Рис. 6.5. Ультраструктура міокарду лівого шлуночка серця щурів групи SHR. Розширення цистерн ендоплазматичного ретикулула та Т-системи, набряк мітохондрій, наявність мультивезикулярних тілець та аутофагічних вакуолей, виражене розширення міжклітинного простору,*

що заповнений колагеном. А)  $\times 100000$ ; В)  $\times 7200$ ; С)  $\times 7200$ . *Mf* – міофіламенти, *M* – мітохондрії, *AV* – аутофагічні вакуолі, *MB* – мультівезикулярні тільця, *C* – колаген, *L* – лізосоми, *N* – ядро.

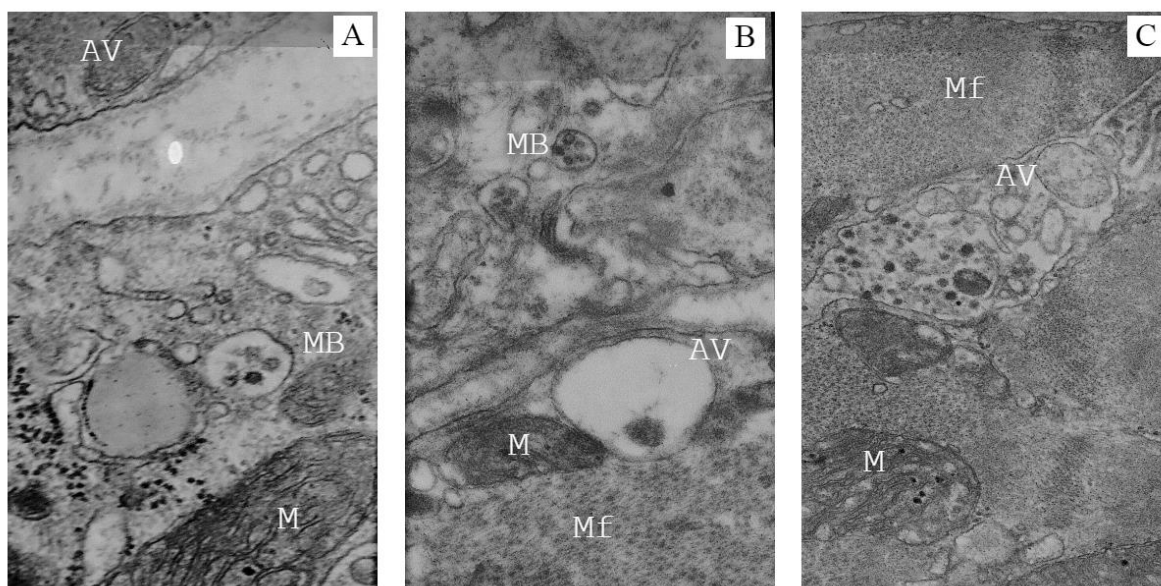


Рис. 6.6. Ультраструктура міокарду лівого шлуночка серця щурів групи SHR. Розширення ендоплазматичного ретикулума, везикуляція цитоплазми, накопичення мультівезикулярних тілець та аутофагічних вакуолей. А)  $\times 14000$ ; В)  $\times 14000$ ; С)  $\times 10000$ . *Mf* – міофіламенти, *M* – мітохондрії, *AV* – аутофагічні вакуолі, *MB* – мультівезикулярні тільця.

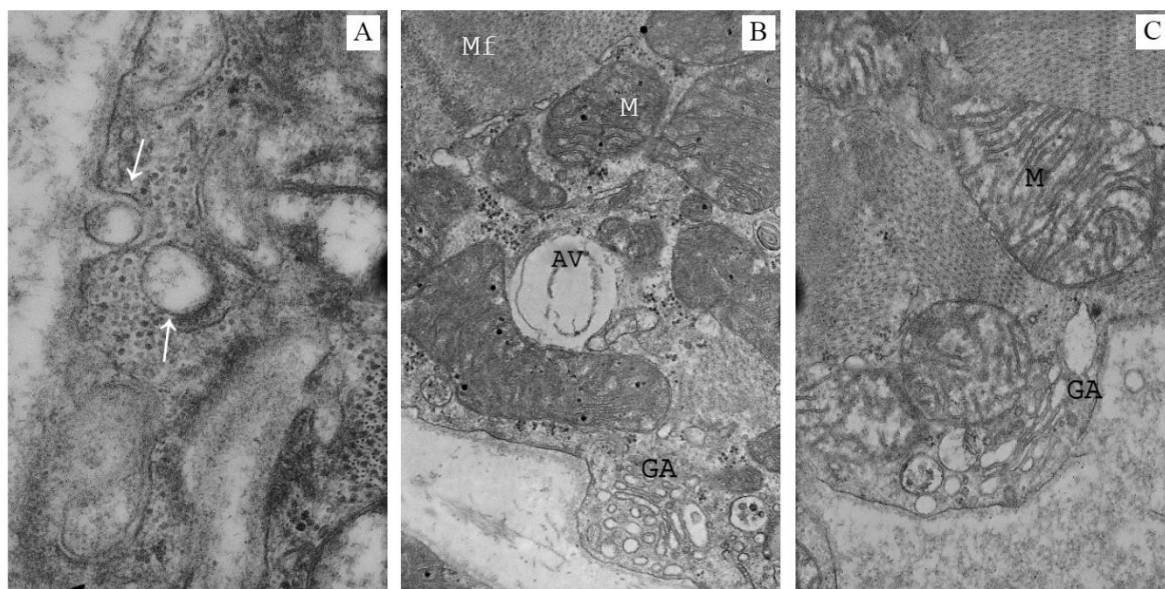


Рис. 6.7. Ультраструктура міокарду лівого шлуночка серця щурів групи SHR. Активний екзоцитоз (стрілки), апарат Гольджі, локалізований на

периферії кардіоміоцита в субсарколемальному просторі, мітохондрій різних розмірів з незначним набряком внутрішньомембранних структур. А)  $\times 20000$ ; В)  $\times 7200$ ; С)  $\times 1000$ . Мf- міофіламенти, М-мітохондрії, АВ – аутофагічні вакуолі, МВ –мультивезикулярні тільця, С-колаген, GA – апарат Гольджі.

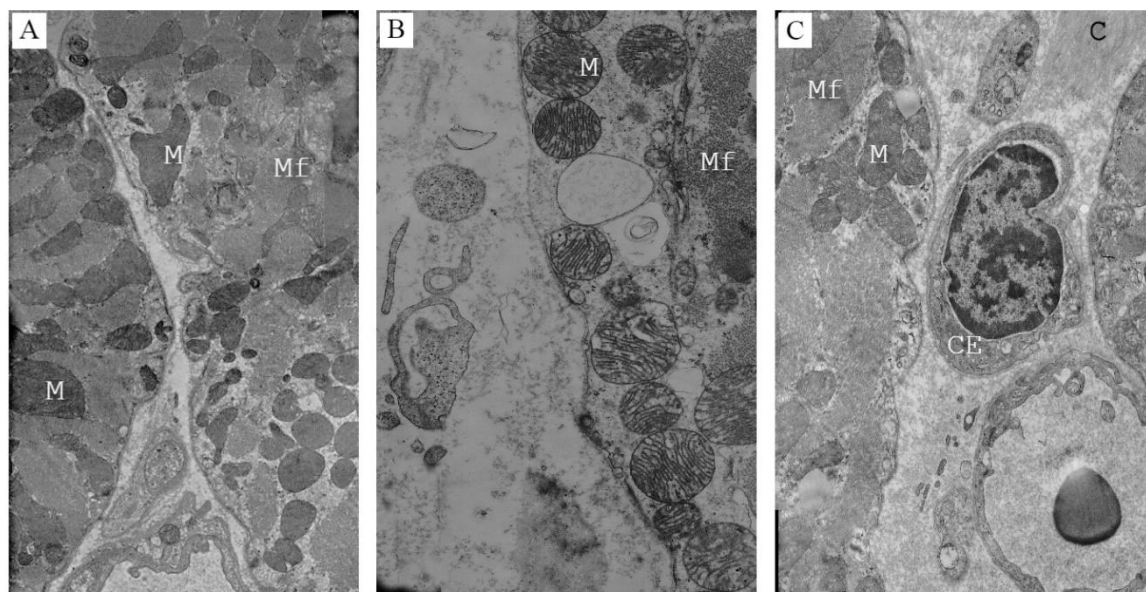


Рис. 6.8. Ультраструктура міокарду лівого шлуночка серця щурів групи SHR. Дезорганізація мітохондрій, які значною мірою відрізняються за розмірами та ступенем пошкодження, у розширеному заповненому колагеном міжклітинному просторі залишки клітин із цілісною цитоплазматичною мембраною невизначеного походження. А)  $\times 5000$ ; В)  $\times 7200$ ; С)  $\times 5000$ . Мf- міофіламенти, М-мітохондрії, СЕ - ендотелій капіляру.

Необхідно відмітити зміни мітохондріальної архітектоніки у міокарді спонтанногіпертензивних щурів. Їхня кількість дещо збільшувалась, проте у більшості клітин у міжміофібрилярних зонах не виявлялось утворення міжмітохондріальних зв'язків, характерних для норми. Водночас часто мітохондрії утворювали скупчення у навколоядерній або

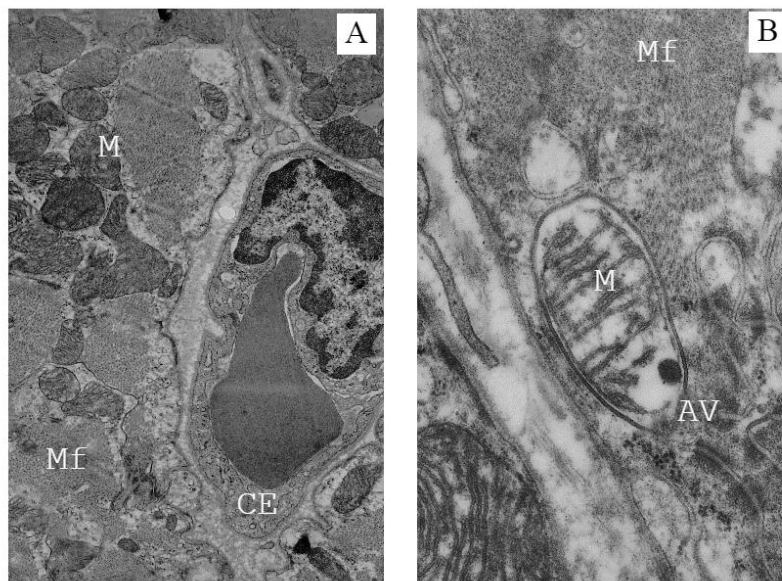
субсарколемальній ділянці кардіоміоцитів та характеризувалися різноманітністю розмірів. Кардіоміоцити одночасно містили мітохондрії, які значно перевищували розмірами основну популяцію мітохондрій (гігантські мітохондрії) та велику кількість дрібних органел. У основній масі мітохондрій спостерігалися просвітлення матриксу, набряк та ознаки руйнування внутрішньої мембрани (Рис. 6.6 (В, С) та 6.7 (С)).

У міокарді виявлялися вогнищеві периваскулярний та інтерстиціальний набряки з нехарактерними для контролю включеннями – часто зустрічалися залишки клітин, типовим для яких було збереження цілісності цитоплазматичної мембрани, наявність значної кількості зруйнованих мітохондрій, гранулярного ендоплазматичного ретикулуму з вираженим набряком цистерн та часто великої кількості аутофагічних вакуолей, що вказує на можливий розвиток аутофагічної клітинної смерті. Визначити походження цих клітин на даному етапі руйнування неможливо (Рис. 6.8 (В)).

Включення кверцетину в добовий раціон щурів значною мірою попереджувало виникнення вищезазначених змін – у кардіоміоцитах мітохондрії в основному зберігали свою структуру, значно зменшувалися прояви набряку внутрішніх мітохондріальних мембран. Зберігався високий рівень аутофагії, зокрема спостерігалась мітоаутофагія, спрямована на видалення мітохондрій із зниженим мембранним потенціалом, а відповідно з можливою загрозою відкриття мітохондріальної пори з вивільненням накопиченого кальцію і проапоптотичних факторів в цитоплазму клітини.



(Рис. 6.9 (В)). Це значною мірою могло вплинути на виживання клітин серця в умовах підвищеного тиску, що запобігало заміщенню втрачених кардіоміоцитів сполучною тканиною, що підтверджувалось на ультраструктурному рівні та гістологічними дослідженнями шляхом кількісної оцінки фіброзу в серці щурів (Рис. 6.3).



*Рис. 6.9. Ультраструктура міокарду лівого шлуночка серця щурів групи SHR, котрим вводили кверцетин. А) Відсутність набряку в екстрацелюлярному та периваскулярному просторі, відсутність надлишків колагену, x5200. В) Аутофагічна вакуоля з ушкодженою мітохондрією, x14000. Mf – міофіламенти, M – мітохондрії, AV – аутофагічні вакуолі, CE – ендотелій капіляра.*

**6.2. Визначення трипсино-, хімотрипсиноподібної та пептидилглютамін пептид-гідролазної активностей протеасоми у тканинах серця у щурів зі спонтанною гіпертензією та за умов експериментальної терапії**

У щурів лінії SHR було встановлено зниження у 1,6 рази трипсиноподібної і хімотрипсиноподібної активностей у тканинах серця, лише з тією різницею, що остання статистично вірогідно відрізнялась ( $P=0.02$ ) у порівнянні зі щурами Wistar. Каспазоподібна активність у тканинах серця вище перерахованих груп не відрізнялась.

Трипсиноподібна та каспазоподібна активності у тканинах серця щурів лінії SHR, що отримували Quercetin, були в 2,4 рази ( $P=0.04$ ) та в 9,3 рази ( $P=0.015$ ) нижчими відповідно. Хімотрипсиноподібна активність зростає на 40 % ( $P=0.049$ ) у тканинах серця щурів зі спонтанною гіпертензією, що отримували Quercetin у порівнянні зі спонтанногіпертензивними щурами, що харчувалися стандартно (Рис. 6.10).

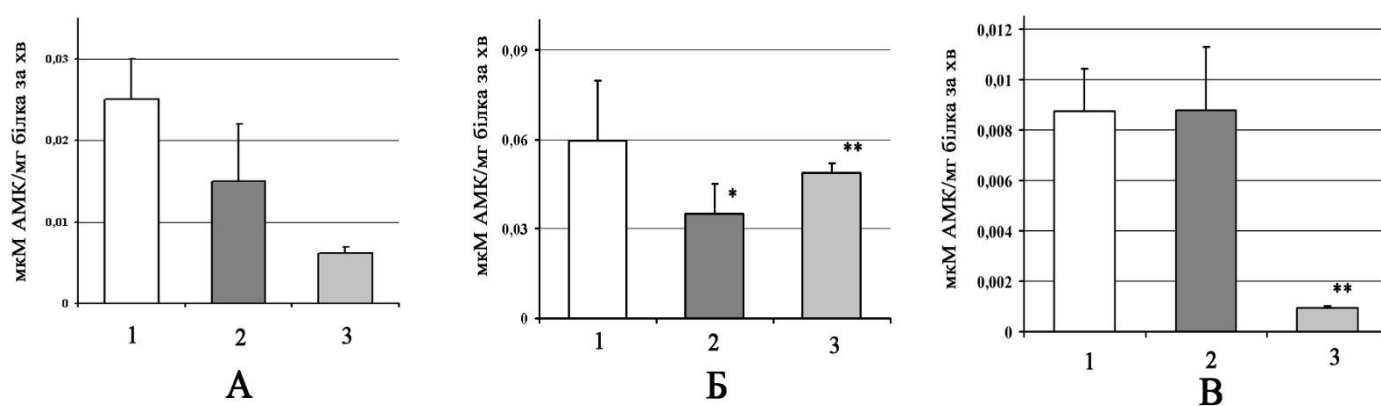


Рис. 6.10. Протеасомна активність у тканинах серця. А) Трипсиноподібна активність; Б) Хімотрипсиноподібна активність; В) Пептидилглутаміл пептид-гідролазна активність протеасом. \* –  $P<0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, \*\* –  $P<0.05$  при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR+кверцетин.

### **6.3. Експресії генів, що кодують різні субодиниці протеасоми в тканинах серця при артеріальній гіпертензії у щурів ліній Wistar та SHR**

#### ***6.3.1. Експресія генів, що кодують каталітичні конституційні (PSMB1 (LMP2), PSMB2, PSMB5 (LMP7)) та індукцйбельні субодиниці (PSMB8, PSMB9, PSMB10) протеасоми у тканинах серця у спонтанногіпертензивних щурів***

У тканинах серця спонтанногіпертензивних щурів значно більша експресія генів, що кодують субодиниці протеасом: *PSMB1* у 2,6 рази ( $P=0.01$ ), *PSMB2* у 2,1 рази ( $P=0.017$ ), *PSMB9* у 1,9 рази ( $P=0.03$ ), ніж у щурів Wistar. Водночас рівень експресії мРНК *PSMB10* і *PSMB8* у тканинах серця щурів SHR теж був вищий, але не статистично достовірно: у 1,7 та 1,6 рази відповідно. Проте рівень експресії гена *PSMB5* у SHR був нижче на 19,2 % у порівнянні з таким у щурів Wistar (Рис. 6.11).

Експериментальна терапія SHR за допомогою Quercetin достовірно знижувала рівні експресії мРНК всіх нижче перерахованих генів, а саме: *PSMB1* (у 35,5 разів,  $P=0.00002$ ), *PSMB2* (у 10,4 разів,  $P=0.00002$ ), *PSMB8* (у 85 разів,  $P=0.000001$ ), *PSMB9* (у 37,8 разів,  $P=0.001$ ), *PSMB10* (у 26,8 разів,  $P=0.026$ ). Водночас рівень експресії мРНК *PSMB5* був вищий у SHR Quercetin у 3,3 рази у порівнянні з Wistar ( $P=0.003$ ).

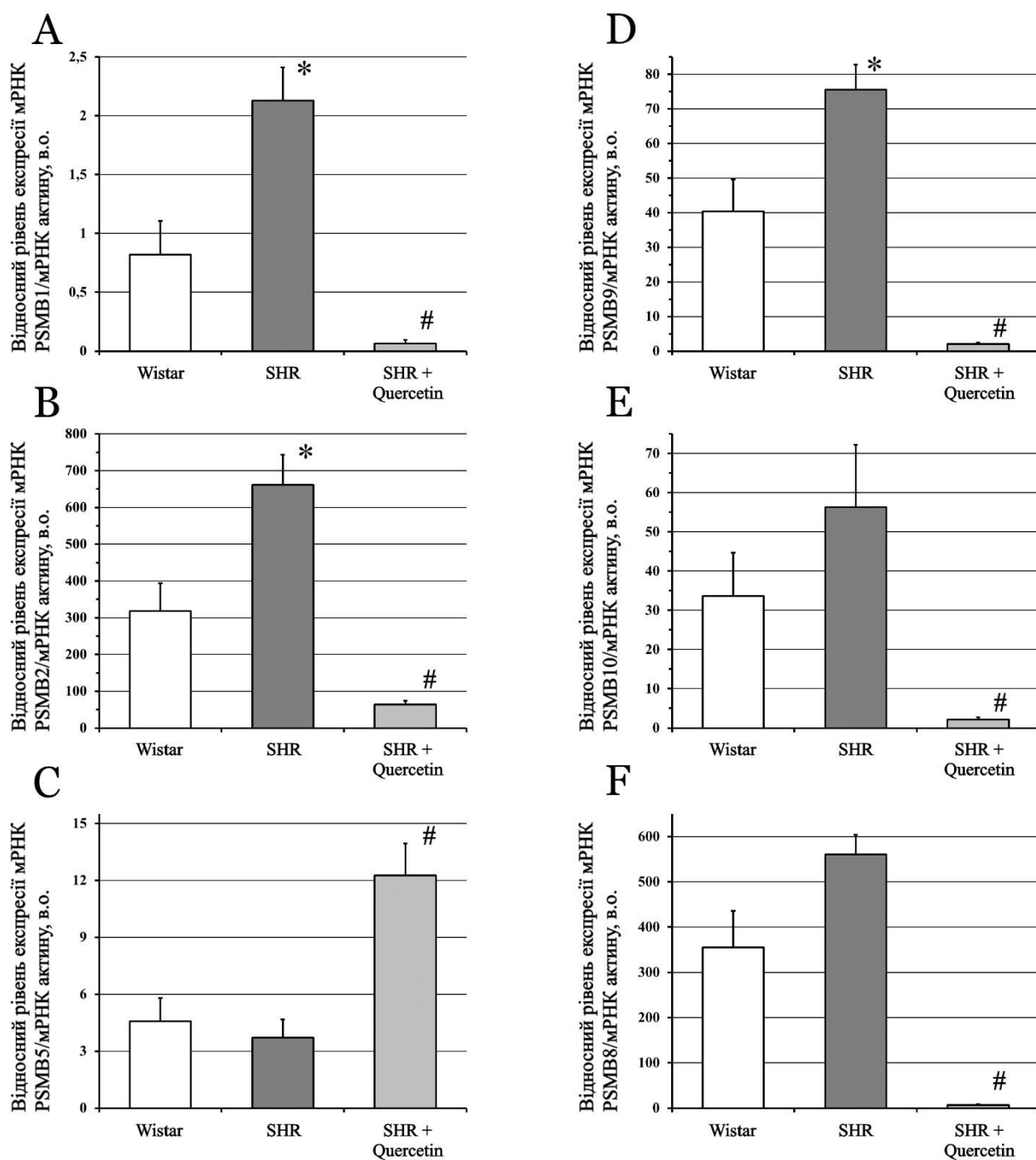


Рис. 6.11. Рівні експресії генів, що кодують конституційні субодиниці протеасом у тканинах серця щурів групи Wistar, SHR та SHR+кверцетин. А) Рівень експресії гену PSMB1; В) – гену PSMB2; С) – гену PSMB5. Рівень експресії генів, що кодують індукційні субодиниці протеасом: D) рівень експресії гену PSMB9; E) – гену PSMB10; F) – гену PSMB8. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній SHR з SHR+кверцетин.

**6.3.2. Експресія генів, що кодують регуляторні субодиниці (*PSME1* та *PSMC1*) протеасоми у тканинах серця у щурів лінії *SHR* та *Wistar***

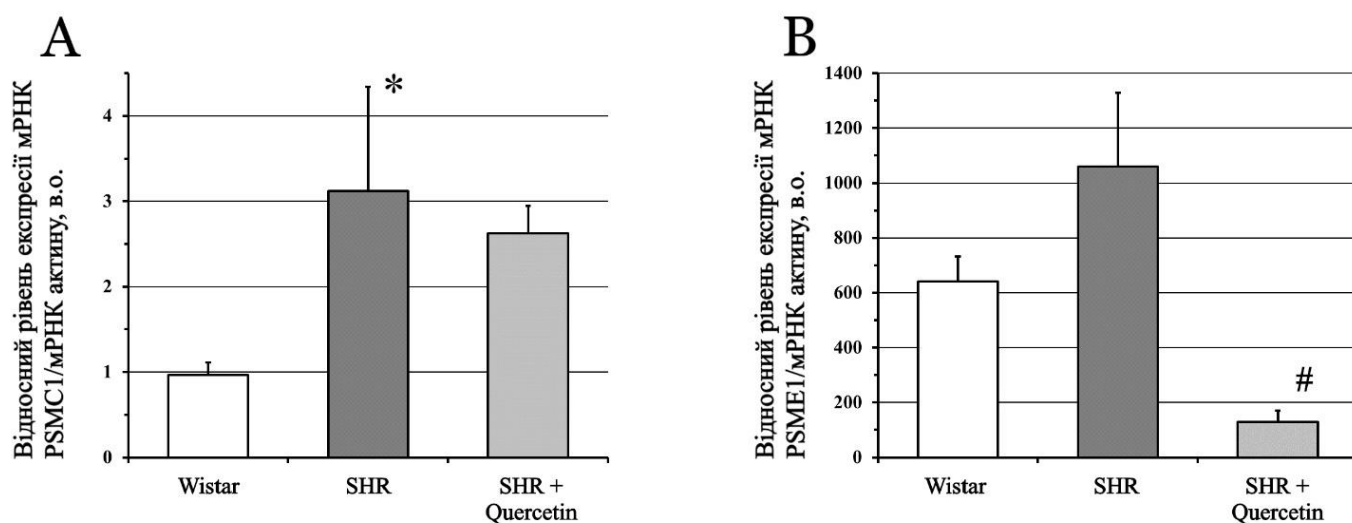


Рис. 6.12. Експресія генів, що кодують регуляторні субодиниці (А) *PSME1* та В) *PSMC1*) протеасоми у тканинах серця у щурів лінії *SHR* та *Wistar*. \* –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів ліній *Wistar* з *SHR*, # –  $P < 0.05$  при порівнянні груп щурів лінії *SHR* з *SHR*+кверцетин.

Рівень експресії мРНК гену *PSMC1* у щурів *SHR* був у 3,25 рази вищий, ніж у *Wistar*. Водночас вживання *Quercetin* незначно попереджало збільшення рівня експресії на 16 % (Рис. 6.12).

Рівень експресії мРНК гену *PSME1* у щурів *SHR* був у 1,65 разів вищим, ніж у *Wistar*, а експериментальне лікування *Quercetin* суттєво попереджало збільшення експресію цього рівня у 8,2 разів ( $P=0.001$ ).

## РОЗДІЛ 7. Аналіз та узагальнення результатів

Роль генетичних факторів у етіології АГ вважається безсумнівною. Результати багатьох повногеномних досліджень чітко вказують на значні відмінності у частоті варіантів різних генів хворих на АГ і практично здорових людей. Проте відповідних широкомасштабних досліджень АГ у дітей досі не проведено. При тому, що очевидно, що дебют будь-якого хронічного захворювання у дитячому віці передбачає великий внесок генетичних факторів, з огляду на це у фокус нашої уваги потрапила саме есенціальна АГ у дітей та підлітків, частота якої невпинно зростає у всіх цивілізованих країнах світу. Надзвичайно важливим моментом вивчення АГ як у дітей так і дорослих є виключення вторинної АГ, яка має чітко встановлені причини: патологія ендокринної системи, нирок, уражень головного мозку тощо. У нашому дослідженні за рахунок тісної співпраці з клініцистами було сформована велика група дітей саме з первинною (есенціальною) АГ, в якій за допомогою додаткових методів дослідження були виключені інші захворювання, що можуть сприяти підвищенню АТ як симптому. Ця вікова група, на нашу думку, є оптимальною для вивчення ролі генетичних факторів у АГ, бо у дітей йдеться про наявність монопатології – інших захворювань, коморбідності у цих дітей немає, а у дорослих, звісно, поряд з АГ є маса інших хронічних захворювань, що можуть мати свою генетичну схильність. В очікуванні повногеномних досліджень АГ у дітей ми вирішили визначати поліморфізми генів, що кодують різні субодиниці протеасоми – мультипротеїнового

протеолітичного комплексу. Ми перші припустили, що варіації генів у цій фундаментальній системі деградації 90 % внутрішньоклітинних білків, можуть бути вагомим фактором ініціації розвитку АГ. Аналогічних досліджень на людській популяції, з якими ми могли б порівняти наші результати, досі немає. Єдиним аналогом нашого дослідження є робота італійських авторів, що вивчали роль поліморфізму гену *PSMD9* (одна з регуляторних субодиниць протеасоми) у родовах людей з цукровим діабетом 2-го типу. Їм вдалося встановити, що поліморфізм у гені *PSMD9* асоційований з більш високим АГ [25, 22].

Не маючи підтримки у джерелах, що підтверджують роль протеасомного протеолізу у людей при АГ, ми звернули увагу на дослідження протеасомного протеолізу при експериментальній АГ у щурів, і знайшли достатню кількість робіт, що вказували на ключову роль порушень убіквітинзалежного протеасомного протеолізу у патогенезі цього захворювання [66, 56].

Наступним нашим питанням було обрання поліморфізмів у генах, що кодують протеасому для з'ясування їхньої частоти в українській популяції. Звісно, що в усіх генах субодиниць протеасоми встановлено сотні генетичних варіантів, але частота мінорних варіантів у європейській популяції лівової частки з них знаходиться на дуже низькому рівні MAF (minor allele frequency) менше 0,01. Застосування такого принципу дало змогу нам звузити пошук поліморфізмів генів, що кодують субодиниці протеасоми до 3-х генів: альфа 6 корова не протеолітична субодиниця

протеасоми (*PSMA6* (C<sup>-8</sup>→G), rs1048990), велика мультикаталітична протеаза 2 – каталітична субодиниця імунопротеасоми (*LMP2* (Arg<sub>60</sub>→His), rs17587) та велика мультикаталітична протеаза 7, що також є частиною каталітичної камери імунопротеасоми (*LMP7* (Lys<sub>49</sub>→Gln), rs2071543).

У нашому дослідженні поліморфізму гену *PSMA6* мінорні гомозиготи зустрічалися частіше у дітей з АГ G/G – 2,7 % ( $P=0.047$ ), ніж у дітей у контрольній групі. Результати дослідження поліморфізму гену *LMP2* теж виявилися відмінними у дітей з первинною АГ. Розподіл серед мажорних гомозигот і гетерозигот був майже однаковим, у той час частота мінорних гомозигот була вищою, ніж у контрольній групі (42,5 %, 46,4 %, 11,1 % та 63,9 %, 28,6 %, 7,5 % відповідно ( $P=0.001$ )). Встановили, що розподіл алельних варіантів гену *LMP7* не відрізнявся в практично здорових та хворих на АГ осіб. Важливо, що частота розподілу у контрольній групі поліморфізмів усіх 3-х генів відповідає частоті розподілу в європейській популяції. Тому збільшення частоти мінорних алелей українських дітей з АГ може бути екстрапольовано на частоту цих варіантів в інших європейських країнах як генетичний фактор ризику АГ. Звісно, це потребує проведення аналогічних генетичних досліджень у інших популяціях.

Пріоритетом виконаного дослідження є те, що ми перші звернули увагу на роль поліморфізмів генів імунопротеасоми у етіології серцево-судинних захворювань. Якщо на поліморфізм у *PSMA6* звернули увагу інші дослідники та провели відповідні роботи, то поліморфізми генів субодиниць



імунопротеасоми раніше пов'язувати з автоімунною патологією та системними захворюваннями сполучної тканини [52]. Це, звісно, логічно, зважаючи на визначальне значення імунопротеасоми на презентацію антигенів. Але роботи останніх років наводять переконливі докази, що імунопротеасома має величезне значення не лише у органах імунної системи, а залучена у деградацію внутрішньоклітинних білків не призначених для презентації у головному комплексі гістосумісності (МНС). Ці дослідження стосуються вивчення молекулярних механізмів функціонування, передусім, ЦНС, клітини якої експресують субодиниці імунопротеасоми на високому рівні [71]. Проте досліджень про роль імунопротеасоми у клітинах серцево-судинної системи дуже мало. Лише у 2020 році була опублікована блискуча робота китайських вчених, що доводить роль специфічного інгібітору імунопротеасоми у гіпертрофії серця при експериментальному відтворенні моделі з застосуванням ангіотензину II. Механізмом реалізації ефекту автори вважають попередження деградації білка, що зв'язується із цАМФ – чутливими елементами геному (CREB) [15, 16]. Це, безумовно, відкриває велике поле для подальших досліджень, бо особливості протеолізу внутрішньоклітинних пептидів у порівнянні з конституційною протеасомою та більша активність по відношенню до деградації певних білків у імунопротеасоми не можуть обмежуватися лише залученням її до презентації антигенів.

Отримавши переконливі дані про частотний розподіл поліморфізмів генів, що кодують субодиниці протеасоми у дітей з АГ, ми вирішили

детально вивчити зміни в експресії генів субодиниць протеасоми та активність цього мультикаталітичного комплексу у тканинах серця та аорти експериментальних тварин. Зрозуміло, що реалізувати таке дослідження із застосуванням тканин людини було неможливо. У пошуку експериментальної моделі АГ ми зупинилися на спадковій, генетично детермінованій АГ у лінійних спонтанногіпертензивних щурів. На нашу думку, саме ця модель є максимально наближеною до реальної клінічної ситуації у дітей з первинною АГ. Відомо, що у щурів лінії SHR на 5 місяці життя стійко підвищується АТ і розвивається гіпертрофія міокарда серця. Зрозуміло, що саме у експериментальних тварин є можливість випробування різних хімічних речовин для доведення ролі певної системи у патогенезі захворювань із подальшою фармакотерапевтичною перспективою. Отримані нами результати підтвердили більшість гіпотез, які ми висували на етапі планування. У щурів зі спонтанною гіпертензією у порівнянні зі щурами лінії Wistar, дійсно є значні відмінності в експресії мРНК генів субодиниць протеасоми у тканинах аорти: у 10,6 разів нижчий рівень мРНК гену *PSMB1* у порівнянні з рівнем у щурів лінії Wistar ( $P=0.0014$ ), а експресія мРНК гену *PSMB10* була нижчою на 44 % ( $P=0.003$ ). Ген першої каталітичної субодиниці протеасоми кодує білок першої субодиниці протеасоми, що описана як пептидилглютамін пептид-гідролазна активність. Вочевидь зменшення експресії цього гену має спричинювати зменшення активності конститутивної протеасоми, до складу якої і входить ця субодиниця. Відповідно, ми можемо припустити,

що протеоліз білків у клітинах аорти конститутивної протеасоми буде уповільнено. У тканинах серця SHR також значно вищий рівень експресії генів, що кодують субодиниці протеасом: *PSMB1* у 2,6 рази ( $P=0.01$ ), *PSMB2* у 2,1 рази ( $P=0.017$ ), *PSMB9* у 1,9 рази ( $P=0.03$ ), *PSMC1* у 3,2 рази ( $P=0.046$ ) та *PSME1* у 1,7 рази ( $P=0.001$ ). Отримані дані чітко показують, що у серці SHR значно більшою мірою, ніж у аорті змінена експресія генів, не тільки конститутивних та індукцибельних субодиниць, а і регуляторних білків протеасомного комплексу. Підвищений рівень експресії вказаних генів дає підстави думати про прискорену деградацію внутрішньоклітинних білків кардіоміоцитів, як конститутивною, так і імунопротеасомою, що цілком логічно, зважаючи на розвиток гіпертрофії серця. Отримані нами данні добре узгоджуються з результатами китайських вчених, що за допомогою вестерн блотингу показали як при АГ зростає експресія саме індукцибельних субодиниць протеасоми, а їх пригнічення інгібітором PR-957 $\beta$ 5i або Quercetin запобігає розвитку гіпертрофії серця та зменшує АТ [80, 81].

На наступному етапі дослідження нами були визначені усі три протеолітичні активності протеасоми, які є результатом експресії генів, посттрансляційного процесінгу, компартменталізації протеасоми та інших механізмів, що визначають біохімічну активність протеасом. На наше здивування усі три ензиматичні активності протеасоми у тканинах аорт були нижчі у SHR, однак вірогідних відмінностей встановити не вдалося. Ці результати певною мірою протирічать даним, що раніше були отримані японськими дослідниками, у яких при використанні інших моделей

артеріальної гіпертензії було показано суттєве збільшення хімотрипсиноподібної активності протеасоми [66, 67]. Можливо, це пов'язано з тим, що хронічне, упродовж всього життя, підвищення артеріального тиску у SHR вмикає певні компенсаторні механізми, що дають зберігати активність протеасоми на базовому рівні.

У тканинах серця, не зважаючи на значно вищий рівень мРНК генів, що кодують субодиниці протеасоми, каталітична активність цієї органели зменшувалася по відношенню до субстратів трипсину та хімотрипсину.

Водночас зміни в активності транскрипції генів субодиниць протеасоми підтверджують гіпотезу про те, що зміни у протеасомному протеолізі мають велике значення у патогенезі АГ. Ще більш доказовим у цьому аспекті є дані, які ми отримали при застосуванні препарату квертину (активний компонент - кверцетин, є потужним інгібітором протеасоми) у SHR. Транскрипція п'ятиох генів, субодиниць протеасоми (*PSMB1*, *PSMB2*, *PSMB8*, *PSMB9*, *PSME1*) суттєво змінювалась при використанні цього біофлавоноїду впродовж 2-х місяців у SHR. Трипсиноподібна та хімотрипсиноподібна активності протеасоми значно знижувалися під впливом кверцетину. Звертає на себе увагу той факт, що напрямок змін експресії генів конститутивних субодиниць, що кодують каталітичні субодиниці протеасоми не збігаються зі змінами протеолітичних активностей: так рівень експресії *PSMB1* збільшується, *PSMB5* майже не змінюється, а, як вказано вище, обидві активності (трипсино- та хімотрипсиноподібна відповідно) зменшуються. За цих обставин між

експресією мРНК індукцибельних субодиниць протеасоми, що також кодують каталітичні субодиниці імунопротеасоми, та активностями імунопротеасоми спостерігається чіткий взаємозв'язок: за впливу кверцетину зменшується експресія *PSMB9* та *PSMB8*, а рівень мРНК *PSMB10* залишається незмінним і відповідно до цих змін спостерігається зменшення трипсино- та хімотрипсиноподібної активностей, та не змінюється каспазоподібна активність протеасоми. Отже, можна припустити, що ефект кверцетину на активність протеасоми пов'язаний у першу чергу зі змінами експресії та пригнічення активності саме імунопротеасоми. Ці данні повністю узгоджуються з даними китайських дослідників, що опублікували свою роботу у 2020 році. Саме специфічний інгібітор імунопротеасоми проявляв виражений антигіпертрофічний ефект при ангіотензин 2 індукованій моделі АГ [80, 81]. На жаль, жодних літературних відомостей про активності чи експресії імунопротеасоми в аорті нам знайти не вдалося. Важливо підкреслити, що виражений вплив на експресію та активність протеасоми супроводжувався зменшенням артеріального тиску та уповільненням розвитку гіпертрофії серця у SHR. Порівняння показників гемодинаміки SHR та щурів Wistar вказує на значні відмінності у показниках насосної та скоротливої функцій серця, зокрема таких важливих показників як: мінімальний тиск, кінцево-сistolічний і кінцево-діастолічний тиски, ударний об'єм та артеріальна жорсткість. Корируючий ефект квертину проявляється у нормалізації усіх цих показників.

Морфометричні дослідження аорти (зменшення товщини стінки аорти, ширини шарів ГМК та товщини інтими) також підтверджують ефективність препарату кверцетину. Слід визнати, що ангіопротекторні та антиатерогенні властивості біофлавоноїдів описані у багатьох дослідженнях [27, 29]. Однак лише у наших роботах вказані протективні властивості біофлавоноїдів пояснюються впливом на протеасомний протеоліз [53, 54]. Механізми реалізації змін у протеасомному протеолізі у підвищенні артеріального тиску, потребують окремого аналізу. Вище ми навели дані, що свідчать про залучення протеасоми у функціонування багатьох молекулярних систем підтримання сталого артеріального тиску, однак реалізація певної частини ефектів передбачає активацію протеасомної деградації білків, а в інших випадках, навпаки, потребує уповільнення цього процесу.

Загалом аналіз цих даних призводить до висновків, що саме пригнічення протеасоми буде спричинювати антигіпертензивний ефект. Певною мірою це твердження може бути підкріплено даними, що вказують на роль запалення у патогенезі АГ [82, 73], підвищення прозапальних цитокінів у крові, що описано як синдром системної запальної відповіді (systemic inflammatory response) [77, 21, 8]. Крім того, за результатами низки досліджень показано, що активація протеасоми має значення в патогенезі системної запальної відповіді. У цьому аспекті найбільш перспективним, на нашу думку, є застосування препаратів природнього походження, зокрема біофлавоноїдів. Перевагами цих препаратів є низька токсичність завдяки

еволюційно налагодженим системам біотрансформації й токсикації, їхня здатність впливати на велику кількість біологічних мішеней (антиоксидантний ефект, пригнічення ліпоксигенази та низки протеїназ), а також їх невисока вартість.

## ВИСНОВКИ

У роботі продемонстроване істотне значення протеасомного протеолізу у розвитку артеріальної гіпертензії в аспектах генетичної схильності, зміни експресії відповідних генів та активності протеолітичного комплексу та запропоновано метод експериментальної терапії цієї патології з застосуванням інгібітору протеасомної активності.

1. Розподіл алельних варіантів генів PSMA6, LMP2 суттєво відрізняється у дітей та підлітків з есенціальною артеріальною гіпертензією від такого у практично здорових дітей, а зв'язку між поліморфізмом гена LMP7 та цим захворюванням – немає.

2. У щурів зі спонтанною гіпертензією низка кардіогемодинамічних параметрів істотно відрізняється від таких у нормотензивних щурів лінії Wistar: ударний об'єм у середньому менший у 3 рази ( $P < 0.0001$ ), фракція викиду менша у 2,14 рази ( $P < 0.0001$ ), ударна робота менша на 70 % ( $P < 0.0001$ ), а також менша середня частота серцевих скорочень (на 12 %,  $P = 0.006$ ). Показники діастолічної функції серця у щурів лінії SHR вищі: кінцево-діастолічний тиск у середньому у 6,5 разів ( $P < 0.005$ ),  $dp/dt \min$  – на 30 % ( $P < 0.0001$ ). Водночас, мінімальний тиск та кінцево-систолічний тиск у щурів лінії SHR були нижчими в 1,5 рази ( $P < 0.01$ ) та на 15 % ( $P < 0.004$ ) відповідно, а артеріальна жорсткість у щурів лінії SHR – вищою у 4,4 рази ( $P < 0.0001$ ).

3. У щурів SHR спостерігаються суттєві морфологічні зміни аорти: загальна ширина аорти у середньому більша на 36 %, ширина



гладеньком'язових прошарків – на 19 %, а ширина інтими – більша у 1,9 рази, ніж у контрольних нормотензивних щурів.

4. Рівні експресії мРНК генів, що кодують конститутивні, індукцйбельні та регуляторні субодиниці протеасом у тканинах аорти у SHR значно відрізняється від таких у щурів Wistar; експресія гену PSMB1 була нижчою у 10,6 разів, ніж у щурів лінії Wistar ( $P=0.0014$ ), а експресія мРНК гену PSMB10 – нижчою на 44 % ( $P=0.003$ ). У тканинах серця гіпертензивних щурів значно вищий рівень експресії таких генів: PSMB1 – у 2,6 рази ( $P=0.01$ ), PSMB2 – у 2,1 рази ( $P=0.017$ ), PSMB9 – у 1,9 рази ( $P=0.03$ ), PSMC1 – у 3,2 рази ( $P=0.046$ ) та PSME1 – у 1,7 рази ( $P=0.001$ ).

5. У щурів з артеріальною гіпертензією (SHR) трипсино-, хімотрипсиноподібна та пептидилглютамін пептидгідролазна активність протеасом у тканинах аорти істотно не відрізняється від таких у нормотензивних щурів лінії Wistar.

6. У спонтанно гіпертензивних щурів SHR хімотрипсиноподібна активність протеасом у тканинах серця вірогідно нижча (у 1,6 рази,  $P=0.02$ ), ніж у нормотензивних тварин.

7. Експериментальна терапія артеріальної гіпертензії з застосуванням інгібітору активності протеасом кверцетину досить ефективна. Така терапія попереджує розвиток ліпідозу у стінці аорти щурів SHR, зменшує інтенсивність фібротичних змін у лівому шлуночку серця (майже у 2,9 рази;  $P<0.05$ ), статистично вірогідно зменшує рівень експресії PSMB2 у тканинах аорти (у 28 разів,  $P=0.003$ ) та збільшує рівень мРНК гену PSMB1 (у 7,8

разів). Інтенсивність експресії генів PSMB8 та PSMB9 у тканинах аорти були статистично вірогідно меншими (у 5,5 разів,  $P=0.004$  та у 112 разів,  $P=0.005$ ), а PSME1 у 7,8 разів ( $P=0.00004$ ).

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Aviram M, Fuhrman B. Wine Flavonoids Protect against LDL Oxidation and Atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002;957:146–61. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb02913.x.
2. Bell CS, Samuel JP, Samuels JA. Prevalence of Hypertension in Children. *Hypertension* 2019;73:148–52. doi:10.1161/hypertensionaha.118.11673.
3. Birks EJ, Latif N, Enesa K, Folkvang T, Luong LA, Sarathchandra P, et al. Elevated p53 expression is associated with dysregulation of the ubiquitin-proteasome system in dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular Research* 2008;79:472–80. doi:10.1093/cvr/cvn083.
4. Brandenstein MGV, Abety AN, Depping R, Roth T, Koehler M, Dienes H-P, et al. A p38–p65 transcription complex induced by endothelin-1 mediates signal transduction in cancer cells. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2008;1783:1613–22. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.04.003.
5. Briones AM, Alonso MJ, Hernanz R, Miguel M, Salaices M. Alterations of the Nitric Oxide Pathway in Cerebral Arteries from Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2002;39:378–88. doi:10.1097/00005344-200203000-00009.
6. 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. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2005;289. doi:10.1152/ajpheart.00138.2005.

7. Cheng J-C, Cheng H-P, Tsai I-C, Jiang MJ. ROS-mediated downregulation of MYPT1 in smooth muscle cells: a potential mechanism for the aberrant contractility in atherosclerosis. *Laboratory Investigation* 2013;93:422–33. doi:10.1038/labinvest.2013.40.
8. Christman JW, Lancaster LH, Blackwell TS. Nuclear factor k B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. *Intensive Care Medicine* 1998;24:1131–8. doi:10.1007/s001340050735.
9. Deng GY, Muir A, Maclaren NK, She JX. Association of *LMP2* and *LMP7* genes within the major histocompatibility complex with insulin-dependent diabetes mellitus: population and family studies. *American Journal of Human Genetics* 1995;56:528–34.
10. Donaldson C, Eder S, Baker C, Aronovitz MJ, Weiss AD, Hall-Porter M, et al. Estrogen Attenuates Left Ventricular and Cardiomyocyte Hypertrophy by an Estrogen Receptor–Dependent Pathway That Increases Calcineurin Degradation. *Circulation Research* 2009;104:265–75. doi:10.1161/circresaha.108.190397.
11. Dosenko VY, Myhalchuk D, Zagorii VY, Parhomenko AN, Moibenko OO. The frequency of allelic polymorphism of genes encoding immunoproteasome catalytic subunits in acute coronary syndrome patients. *Cytology and Genetics* 2005;39:50–4.

12. Eble DM, Spragia ML, Ferguson AG, Samarel AM. Sarcomeric myosin heavy chain is degraded by the proteasome. *Cell & Tissue Research* 1999;296:541. doi:10.1007/s004410051315.
13. Endert PMV, Liblau RS, Patel SD, Fugger L, Lopez T, Pociot F, et al. Major histocompatibility complex-encoded antigen processing gene polymorphism in IDDM. *Diabetes* 1994;43:110–7. doi:10.2337/diabetes.43.1.110.
14. Gaczynska M, Goldberg AL, Tanaka K, Hendil KB, Rock KL. Proteasome Subunits X and Y Alter Peptidase Activities in Opposite Ways to the Interferon- $\gamma$ -induced Subunits *LMP2* and *LMP7*. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:17275–80. doi:10.1074/jbc.271.29.17275.
15. Garat CV, Crossno JT, Sullivan TM, Reusch JEB, Klemm DJ. Thiazolidinediones Prevent PDGF-BB-induced CREB Depletion in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells by Preventing Upregulation of Casein Kinase 2  $\alpha'$  Catalytic Subunit. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2010;55:469–80. doi:10.1097/fjc.0b013e3181d64dbe..
16. Garat CV, Fankell D, Erickson PF, Reusch JE-B, Bauer NN, Mcmurtry IF, et al. Platelet-Derived Growth Factor BB Induces Nuclear Export and Proteasomal Degradation of CREB via Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Molecular and Cellular Biology* 2006;26:4934–48. doi:10.1128/mcb.02477-05.
17. Gerstung M, Roth T, Dienes H-P, Licht C, Fries JW. Endothelin-1 Induces NF- $\kappa$ B via Two Independent Pathways in Human Renal Tubular Epithelial

- Cells. *American Journal of Nephrology* 2007;27:294–300. doi:10.1159/000101999.
18. Gildea JJ, Wang X, Jose PA, Felder RA. Differential D 1 and D 5 Receptor Regulation and Degradation of the Angiotensin Type 1 Receptor. *Hypertension* 2008;51:360–6. doi:10.1161/hypertensionaha.107.100099.
19. Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Molecular Immunology* 2002;39:147–64. doi:10.1016/s0161-5890(02)00098-6.
20. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 2003;426:895–9. doi:10.1038/nature02263.
21. Gonzalez MA, Selwyn AP. Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *The American Journal of Medicine* 2003;115:99–106. doi:10.1016/j.amjmed.2003.09.016.
22. Gragnoli C, Cronsell J. PSMD9 gene variants within NIDDM2 may rarely contribute to type 2 diabetes. *Journal of Cellular Physiology* 2007;212:568–71. doi:10.1002/jcp.21127.
23. Gragnoli C. Proteasome Modulator 9 SNPs are linked to hypertension in type 2 diabetes families. *Cardiovascular Diabetology* 2011;10:77. doi:10.1186/1475-2840-10-77.
24. Hamdani N, Franssen C, Lourenço A, Falcão-Pires I, Fontoura D, Leite S, et al. Myocardial Titin Hypophosphorylation Importantly Contributes to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in a Rat Metabolic Risk

- Model. Circulation: Heart Failure 2013;6:1239–49. doi:10.1161/circheartfailure.113.000539.
25. Hanis C, Boerwinkle E, Chakraborty R, Ellsworth D, Concannon P, Stirling B, et al. A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nature Genetics* 1996;13:161–6. doi:10.1038/ng0696-161.
26. Hedhli N, Lizano P, Hong C, Fritzky LF, Dhar SK, Liu H, et al. Proteasome inhibition decreases cardiac remodeling after initiation of pressure overload. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2008;295. doi:10.1152/ajpheart.00532.2008.
27. Hollman PCH, Katan MB. Bioavailability and Health Effects of Dietary Flavonols in Man. *Archives of Toxicology Diversification in Toxicology — Man and Environment* 1998:237–48. doi:10.1007/978-3-642-46856-8\_21.
28. Huang C-Y, Kuo W-W, Yeh Y-L, Ho T-J, Lin J-Y, Lin D-Y, et al. ANG II promotes IGF-IIR expression and cardiomyocyte apoptosis by inhibiting HSF1 via JNK activation and SIRT1 degradation. *Cell Death & Differentiation* 2014;21:1262–74. doi:10.1038/cdd.2014.46.
29. Ishizawa K, Yoshizumi M, Kawai Y, Terao J, Kihira Y, Ikeda Y, et al. Pharmacology in Health Food: Metabolism of Quercetin In Vivo and Its Protective Effect Against Arteriosclerosis. *Journal of Pharmacological Sciences* 2011;115:466–70. doi:10.1254/jphs.10r38fm.

30. Kawaguchi Y, Ikegami H, Fukuda M, Takekawa K, Fujioka Y, Fujisawa T, et al. Absence of association of TAP and LMP genes with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Life Sciences* 1994;54:2049–53. doi:10.1016/0024-3205(94)00713-6.
31. Kedar V, Mcdonough H, Arya R, Li H-H, Rockman HA, Patterson C. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004;101:18135–40. doi:10.1073/pnas.0404341102.
32. Kuzushita N, Sugimoto Y, Sasaki Y, Hayashi N. Involvement of TAP2 and *LMP7* gene polymorphisms in HCV infection. *Nippon Rinsho Japanese Journal of Clinical Medicine* 2001;59:1248–53.
33. Lambert GL, Barker S, Corder R. Comparison of the Regulation of Endothelin-2 and Endothelin-Converting Enzyme-1 $\beta$  by Forskolin and TNF- $\alpha$  in ACHN Cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1998;31. doi:10.1097/00005344-199800001-00016.
34. Li H, Armando I, Yu P, Escano C, Mueller SC, Asico L, et al. Dopamine 5 receptor mediates Ang II type 1 receptor degradation via a ubiquitin-proteasome pathway in mice and human cells. *Journal of Clinical Investigation* 2008. doi:10.1172/jci33637.
35. Li H-H, Du J, Fan Y-N, Zhang M-L, Liu D-P, Li L, et al. The Ubiquitin Ligase MuRF1 Protects Against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury by Its Proteasome-Dependent Degradation of Phospho-c-Jun. *The American*



- Journal of Pathology 2011;178:1043–58.  
doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.049.
36. Li N, Wang H-X, Han Q-Y, Li W-J, Zhang Y-L, Du J, et al. Activation of the cardiac proteasome promotes angiotension II-induced hypertrophy by down-regulation of ATRAP. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2015;79:303–14. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.12.007.
37. Li S, Wang X, Li Y, Kost CK, Martin DS. Bortezomib, a Proteasome Inhibitor, Attenuates Angiotensin II-Induced Hypertension and Aortic Remodeling in Rats. *PLoS ONE* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0078564.
38. Liu H, Yu S, Zhang H, Xu J. Identification of Nitric Oxide as an Endogenous Inhibitor of 26S Proteasomes in Vascular Endothelial Cells. *PLoS ONE* 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0098486.
39. Ludwig A, Fechner M, Wilck N, Meiners S, Grimbo N, Baumann G, et al. Potent anti-inflammatory effects of low-dose proteasome inhibition in the vascular system. *Journal of Molecular Medicine* 2009;87:793–802. doi:10.1007/s00109-009-0469-9.
40. Luo H, Wong J, Wong B. Protein degradation systems in viral myocarditis leading to dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular Research* 2009;85:347–56. doi:10.1093/cvr/cvp225.
41. Ma Y, Chen B, Liu D, Yang Y, Xiong Z, Zeng J, et al. MG132 treatment attenuates cardiac remodeling and dysfunction following aortic banding in

- rats via the NF- $\kappa$ B/TGF $\beta$ 1 pathway. *Biochemical Pharmacology* 2011;81:1228–36. doi:10.1016/j.bcp.2011.03.009.
42. Ma Y, Chen Y, Yang Y, Chen B, Liu D, Xiong Z, et al. Proteasome inhibition attenuates heart failure during the late stages of pressure overload through alterations in collagen expression. *Biochemical Pharmacology* 2013;85:223–33. doi:10.1016/j.bcp.2012.10.025.
43. Maksymowych WP, Tao S, Luang M, Suarez-Almazor M, Nelson R, Pazderka F, et al. Polymorphism in the *LMP2* and *LMP7* genes and adult rheumatoid arthritis: no relationship with disease susceptibility or outcome. *Tissue Antigens* 1995;46:136–9. doi:10.1111/j.1399-0039.1995.tb02491.x.
44. Maksymowych WP, Wessler A, Schmitt-Egenolf M, Suarez-Almazor M, Ritzel G, Von Borstel RC, et al. Polymorphism in an HLA linked proteasome gene influences phenotypic expression of disease in HLA-B27 positive individuals. *The Journal of Rheumatology* 1994;21:665–9.
45. Malik B, Schlanger L, Al-Khalili O, Bao H-F, Yue G, Price SR, et al. ENaC Degradation in A6 Cells by the Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:12903–10. doi:10.1074/jbc.m010626200.
46. Marfella R, Filippo CD, Portoghese M, Ferraraccio F, Crescenzi B, Siniscalchi M, et al. Proteasome Activity as a Target of Hormone Replacement Therapy–Dependent Plaque Stabilization in Postmenopausal Women. *Hypertension* 2008;51:1135–41. doi:10.1161/hypertensionaha.107.105239.

47. Moritz KE, McCormack NM, Abera MB, Viollet C, Yauger YJ, Sukumar G, et al. The role of the immunoproteasome in interferon- $\gamma$ -mediated microglial activation. *Scientific Reports* 2017;7. doi:10.1038/s41598-017-09715-y.
48. Nagata N, Oshida T, Yoshida NL, Yuyama N, Sugita Y, Tsujimoto G, et al. Analysis of Highly Expressed Genes in Monocytes from Atopic Dermatitis Patients. *International Archives of Allergy and Immunology* 2003;132:156–67. doi:10.1159/000073717.
49. Needham PG, Mikoluk K, Dhakarwal P, Khadem S, Snyder AC, Subramanya AR, et al. The Thiazide-sensitive NaCl Cotransporter Is Targeted for Chaperone-dependent Endoplasmic Reticulum-associated Degradation\*. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286:43611–21. doi:10.1074/jbc.m111.288928.
50. Okamoto H, Takaoka M, Ohkita M, Itoh M, Nishioka M, Matsumura Y. A proteasome inhibitor lessens the increased aortic endothelin-1 content in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology* 1998;350. doi:10.1016/s0014-2999(98)00327-6.
51. Ozaki K, Sato H, Iida A, Mizuno H, Nakamura T, Miyamoto Y, et al. A functional SNP in *PSMA6* confers risk of myocardial infarction in the Japanese population. *Nature Genetics* 2006;38:921–5. doi:10.1038/ng1846.
52. Paramonova N, Wu LS-S, Rumba-Rozenfelde I, Wang J-Y, Sjakste N, Sjakste T. Genetic variants in the *PSMA6*, *PSMC6* and *PSMA3* genes

- associated with childhood asthma in Latvian and Taiwanese populations. *Biopolymers and Cell* 2014;30:377–87. doi:10.7124/bc.0008b5.
53. Pashevin DA, Tumanovska LV, Dosenko VE, Nagibin VS, Gurianova VL, Moibenko AA. Antiatherogenic effect of quercetin is mediated by proteasome inhibition in the aorta and circulating leukocytes. *Pharmacological Reports* 2011;63:1009–18. doi:10.1016/s1734-1140(11)70617-x.
54. Pashevin DO, Dosenko VY, Byts VY, Moibenko OO. Antiatherogenic characteristics of korvutin: effect on proteasome activity of the aorta, heart, and blood cells. *Fiziologichnyi Zhurnal* 2009;55:50–7. doi:<https://doi.org/10.15407/fz55.04>.
55. Perez-Vizcaino F, Duarte J, Jimenez R, Santos-Buelga C, Osuna A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacological Reports* 2009;61:67–75. doi:10.1016/s1734-1140(09)70008-8.
56. Pfisterer L, Feldner A, Hecker M, Korff T. Hypertension impairs myocardin function: a novel mechanism facilitating arterial remodelling. *Cardiovascular Research* 2012;96:120–9. doi:10.1093/cvr/cvs247.
57. Pryhuber KG, Murray KJ, Donnelly P, Passo MH, Maksymowych WP, Glass DN, et al. Polymorphism in the *LMP2* gene influences disease susceptibility and severity in HLA-B27 associated juvenile rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 1996;23:747–52.
58. Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, et al. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB

- in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes* 2000;49:1561–70. doi:10.2337/diabetes.49.9.1561.
59. Sagawa K, Suga H, Shoukas AA, Bakalar KM. End-systolic pressure/volume ratio: A new index of ventricular contractility. *The American Journal of Cardiology* 1977;40:748–53. doi:10.1016/0002-9149(77)90192-8.
60. Sarshad AA, Corcoran M, Al-Muzzaini B, Borgonovo-Brandter L, Euler AV, Lamont D, et al. Glycogen Synthase Kinase (GSK) 3 $\beta$  Phosphorylates and Protects Nuclear Myosin 1c from Proteasome-Mediated Degradation to Activate rDNA Transcription in Early G1 Cells. *PLoS Genetics* 2014;10. doi:10.1371/journal.pgen.1004390.
61. Sharma S, Sun X, Kumar S, Rafikov R, Aramburo A, Kalkan G, et al. Preserving mitochondrial function prevents the proteasomal degradation of GTP cyclohydrolase I. *Free Radical Biology and Medicine* 2012;53:216–29. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.016.
62. Stansfield WE, Tang R-H, Moss NC, Baldwin AS, Willis MS, Selzman CH. Proteasome inhibition promotes regression of left ventricular hypertrophy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2008;294. doi:10.1152/ajpheart.00196.2007.
63. Sumida T, Naito AT, Nomura S, Nakagawa A, Higo T, Hashimoto A, et al. Complement C1q-induced activation of  $\beta$ -catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling. *Nature Communications* 2015;6. doi:10.1038/ncomms7241.

64. Swynghedauw B. Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling. *Physiological Reviews* 1999;79:215–62. doi:10.1152/physrev.1999.79.1.215.
65. Takano H, Hasegawa H, Nagai T, Komuro I. Implication of Cardiac Remodeling in Heart Failure: Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Internal Medicine* 2003;42:465–9. doi:10.2169/internalmedicine.42.465.
66. Takaoka M, Ohkita M, Itoh M, Kobayashi Y, Okamoto H, Matsumura Y. A Proteasome Inhibitor Prevents Vascular Hypertrophy In Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertensive Rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2001;28:466–8. doi:10.1046/j.1440-1681.2001.03461.x.
67. Takaoka M, Okamoto H, Ito M, Nishioka M, Kita S, Matsumura Y. Antihypertensive effect of a proteasome inhibitor in DOCA-salt hypertensive rats. *Life Sciences* 1998;63. doi:10.1016/s0024-3205(98)00276-8.
68. Takashima N, Shioji K, Kokubo Y, Okayama A, Goto Y, Nonogi H, et al. Validation of the Association Between the Gene Encoding Proteasome Subunit  $\alpha$  Type 6 and Myocardial Infarction in a Japanese Population. *Circulation Journal* 2007;71:495–8. doi:10.1253/circj.71.495.
69. Tang M, Li J, Huang W, Su H, Liang Q, Tian Z, et al. Proteasome functional insufficiency activates the calcineurin–NFAT pathway in cardiomyocytes and promotes maladaptive remodelling of stressed mouse hearts. *Cardiovascular Research* 2010;88:424–33. doi:10.1093/cvr/cvq217.

70. The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics* 2004;114:555–76. doi:10.1542/peds.114.2.s2.555.
71. Thibaudeau TA, Anderson RT, Smith DM. A common mechanism of proteasome impairment by neurodegenerative disease-associated oligomers. *Nature Communications* 2018;9. doi:10.1038/s41467-018-03509-0.
72. Vinasco J, Fraile A, Nieto A, Beraun Y, Pareja E, Mataran L, et al. Analysis of LMP and TAP polymorphisms by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1998;57:33–7. doi:10.1136/ard.57.1.33.
73. Waki H, Hendy EB, Hindmarch CC, Gouraud S, Toward M, Kasparov S, et al. Excessive Leukotriene B4 in Nucleus Tractus Solitarii Is Prohypertensive in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 2013;61:194–201. doi:10.1161/hypertensionaha.112.192252.
74. Warren SA, Briggs LE, Zeng H, Chuang J, Chang EI, Terada R, et al. Myosin Light Chain Phosphorylation Is Critical for Adaptation to Cardiac Stress. *Circulation* 2012;126:2575–88. doi:10.1161/circulationaha.112.116202.
75. Wiemuth D, Ke Y, Rohlf M, Mc Donald FJ. Epithelial sodium channel (ENaC) is multi-ubiquitinated at the cell surface. *Biochemical Journal* 2007;405:147–55. doi:10.1042/bj20060747.

76. Willis MS, Patterson C. Into the heart: The emerging role of the ubiquitin–proteasome system. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2006;41:567–79. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.07.015.
77. Wisse BE. The Inflammatory Syndrome: The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004;15:2792–800. doi:10.1097/01.asn.0000141966.69934.21.
78. Wu J, Liu X, Lai G, Yang X, Wang L, Zhao Y. Synergistical effect of 20-HETE and high salt on NKCC2 protein and blood pressure via ubiquitin–proteasome pathway. *Human Genetics* 2012;132:179–87. doi:10.1007/s00439-012-1238-3.
79. Xie P, Fan Y, Zhang H, Zhang Y, She M, Gu D, et al. CHIP Represses Myocardin-Induced Smooth Muscle Cell Differentiation via Ubiquitin-Mediated Proteasomal Degradation. *Molecular and Cellular Biology* 2009;29:2398–408. doi:10.1128/mcb.01737-08.
80. Xie X, Bi H-L, Lai S, Zhang Y-L, Li N, Cao H-J, et al. The immunoproteasome catalytic  $\beta 5i$  subunit regulates cardiac hypertrophy by targeting the autophagy protein ATG5 for degradation. *Science Advances* 2019;5. doi:10.1126/sciadv.aau0495.
81. Xie X, Wang H-X, Li N, Deng Y-W, Bi H-L, Zhang Y-L, et al. Selective Inhibition of the Immunoproteasome  $\beta 5i$  Prevents PTEN Degradation and Attenuates Cardiac Hypertrophy. *Frontiers in Pharmacology* 2020;11. doi:10.3389/fphar.2020.00885.



82. Xu H, Oliveira-Sales EB, McBride F, Liu B, Hewinson J, Toward M, et al. Upregulation of junctional adhesion molecule-A is a putative prognostic marker of hypertension. *Cardiovascular Research* 2012;96:552–60. doi:10.1093/cvr/cvs273.
83. Xu J, Wang S, Wu Y, Song P, Zou M-H. Tyrosine Nitration of PA700 Activates the 26S Proteasome to Induce Endothelial Dysfunction in Mice With Angiotensin II–Induced Hypertension. *Hypertension* 2009;54:625–32. doi:10.1161/hypertensionaha.109.133736.
84. Xu J, Wang S, Wu Y, Song P, Zou M-H. Tyrosine Nitration of PA700 Activates the 26S Proteasome to Induce Endothelial Dysfunction in Mice With Angiotensin II–Induced Hypertension. *Hypertension* 2009;54:625–32. doi:10.1161/hypertensionaha.109.133736.
85. Xu J, Wang S, Zhang M, Wang Q, Asfa S, Zou M-H. Tyrosine Nitration of PA700 Links Proteasome Activation to Endothelial Dysfunction in Mouse Models with Cardiovascular Risk Factors. *PLoS ONE* 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0029649.
86. Ying W-Z, Sanders PW. Accelerated ubiquitination and proteasome degradation of a genetic variant of inducible nitric oxide synthase. *Biochemical Journal* 2003;376:789–94. doi:10.1042/bj20031058.
87. Zolk O, Solbach TF, Eschenhagen T, Weidemann A, Fromm MF. Activation of negative regulators of the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in human end-stage heart failure. *Biochemical and Biophysical*

doi:10.1016/j.bbrc.2008.08.152.

88. Zungu M, Schisler JC, Essop MF, Mccudden C, Patterson C, Willis MS. Regulation of AMPK by the Ubiquitin Proteasome System. *The American Journal of Pathology* 2011;178:4–11. doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.030.
89. Досенко ВС. Роль алельного поліморфізму генів ендотеліальної NO – синтази та протеасоми в патогенезі серцево-судинних захворювань: молекулярно – генетичні аспекти. Дисертаційне Дослідження 2006.
90. Майданик ВГ, Хайтович ВМ, Місюра ЛІ, Кужель ОМ. Особливості артеріального тиску у дітей із надлишковою масою тіла (за даними добового моніторингу). *Международный Журнал Педиатрии, Акушерства и Гинекологии n.d.*;5:18–23.
91. Меерсон ФЗ. Адаптация сердца к большой нагрузке и сердечная недостаточность. Наука 1975.