

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

*на правах рукопису*

**Федічкіна Раїса Андріївна**

УДК 612.17 + 577.23

**РОЛЬ РІЗНИХ ШЛЯХІВ МЕТАБОЛІЗМУ L-ЦИСТЕЇНУ В РЕАКЦІЯХ  
СЕРЦЯ НА НАВАНТАЖЕННЯ**

03.00.13 – фізіологія людини та тварини

Дисертація на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:  
Член-кор. НАН України,  
доктор медичних наук  
Сагач Вадим Федорович

2020

## АНОТАЦІЯ

Федічкіна Р.А. Роль різних шляхів метаболізму L-цистеїну в реакціях серця на навантаження. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13. – фізіологія людини і тварин. – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню ролі двох шляхів метаболізму L-цистеїну в реалізації функції серця в умовах навантаження об'ємом та ішемії-реперфузії. Застосовували пропаргілгліцин (PAG) - інгібітор цитоплазматичної синтази сірководню (H<sub>2</sub>S), інгібітор синтезу глутатіону (бутіонінсульфоксимін, BSO) та попередник їх синтезу L-цистеїн. Показано, що інгібування синтезу H<sub>2</sub>S в комбінації з додаванням L-цистеїну значно підвищувало функціональні резерви серця. Потужний інотропний ефект комбінації PAG+L-цистеїн нівелювався додаванням BSO. Це свідчить, що стимуляція ендogenous синтезу глутатіону надзвичайно важлива для реалізації закону Франка-Старлінга та відповіді міокарда на навантаження.

Стимуляція синтезу глутатіону з L-цистеїну мала потужний кардіопротекторний ефект в моделі ішемії-реперфузії ізольованого серця щурів. Відновлення скоротливої функції серця в реперфузійних умовах з додаванням PAG+L-цистеїну сягало 95%, ефективність споживання кисню міокардом була значно вищою, ніж в контролі, і всі ці ефекти відмінялись попереднім введенням BSO. Біохімічні дослідження показали, що у групі із введенням PAG+L-цистеїн значно знижувалась швидкість генерації супероксидного, гідроксильного радикалів та пероксиду водню в тканинах серця за дії ішемії-реперфузії. Зниження рівнів малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів під дією комбінації PAG+L-цистеїн свідчить про менший ступінь перекисного окислення ліпідів, індукованого ішемією. Вміст відновленого та окисленого глутатіону збільшувався в два з половиною рази

під дією комбінації PAG+L-цистеїн і був значно вищий на фоні ішемії-реперфузії. Ці дані свідчать, що стимуляція ендогенного синтезу глутатіону шляхом перемикавання метаболізму L-цистеїну з утворення сірководню має потужний кардіопротекторний потенціал. За такого шляху активації антиоксидантних систем зберігалася цілісність мітохондрій і пригнічувалось утворення мітохондріальних пор транзиторної провідності (MPTP), про що свідчило менше вивільнення мітохондріального фактора у відтікаючий від ізольованого серця розчин після ішемії. Крім того показано, що постішемичне введення препарату відновленого глутатіону сприяє більш повному відновленню функції ізольованого серця, знижує кисневу вартість його роботи та зменшує утворення MPTP підчас реперфузії, що вказує на важливість високих рівнів глутатіону в реперфузійний період.

Таким чином, кардіопротекторний ефект модуляції метаболізму L-цистеїну має антиоксидантний, мембраностабілізуючий ефект, що може бути перспективним напрямком для корекції порушень функції серця за умов розвитку серцевої недостатності та станів, що супроводжуються ішемічно-реперфузійним пошкодженням.

**Ключові слова:** L-цистеїн, глутатіон, сірководень, закон Франка-Старлінга, ішемія-реперфузія, серце, окисний стрес, оксид азоту

## Summary

Fedichkina R.A. The role of L-cysteine different metabolic pathways in cardiac responses to loading. – Manuscript.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biological Sciences, specialty 03.00.13. - Human and animal physiology. - Bogomolets Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to research of the role of two ways of L-cysteine metabolism in the realization of cardiac function under volume load and reperfusion injury. The inhibitor of cytoplasmic hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) synthase propargylglycine (PAG) and the inhibitor of glutathione synthesis buthionine sulfoximine (BSO) were used together with their precursor L-cysteine. Inhibition of H<sub>2</sub>S synthesis in combination with the addition of L-cysteine has been shown to increase cardiac functional reserves and potent cardioprotective effect. The powerful inotropic effect of the combination of PAG + L-cysteine was abolished by the addition of BSO. This suggests that stimulating endogenous glutathione synthesis is extremely important in heterometric regulation of the heart function.

Stimulation of glutathione synthesis from L-cysteine had a potent cardioprotective effect in the model of ischemia-reperfusion of isolated rat heart. Restoration of cardiac function in reperfusion conditions with the addition of PAG + L-cysteine reached 95%, the efficiency of myocardial oxygen consumption was significantly higher than in the control, and all these effects were also reversed by previous administration of BSO. Biochemical studies have shown that in the group pretreated with PAG + L-cysteine significantly reduced the rate of generation of superoxide, hydroxyl radicals and hydrogen peroxide in the heart tissues under ischemia-reperfusion. Decreased levels of malonic dialdehyde and diene conjugates under the action of the combination of PAG + L-cysteine indicate a lower degree of lipid peroxidation induced by ischemia. The content of reduced and oxidized glutathione increased two and a half times in group with PAG + L-

cysteine and was significantly higher in reperfusion period. These data suggest that the stimulation of endogenous glutathione synthesis by switching L-cysteine metabolism from hydrogen sulfide formation has a powerful cardioprotective potential. Such activation of antioxidant systems preserved the integrity of mitochondrial membranes and inhibited the formation of mitochondrial permeability transition pores (MPTP), as evidenced by less release of mitochondrial factor into the effluent from isolated rat heart. In addition, post-conditioning with reduced glutathione has been shown to restore isolated heart function, reduce oxygen demand, and prevent MPTP formation during reperfusion, indicating the importance of high glutathione levels during the reperfusion period.

Thus, the cardioprotective effect of modulating L-cysteine metabolism has an antioxidant and membrane-stabilizing effects which may be a promising direction for the correction of heart failure and conditions accompanied by reperfusion injury.

Key words: L-cysteine, glutathione, hydrogen sulfide, Frank-Starling response, ischemia-reperfusion, cardiovascular system, oxidative stress, nitric oxide

За результатами дисертаційної роботи опубліковано 21 наукова праця, у тому числі 5 (3 опубліковані, 2 на розгляді) статей у фахових наукових журналах, рекомендованих ДАК України, 2 патенти на корисну модель, 13 тез доповідей конференцій.

#### **В яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. Sagach VF, Shimanskaya TV, Goshovska YV, **Dobrovolska RA** Effects of Stimulation and Blockade of Endogenous Hydrogen Sulfide Synthesis in Myocardial Ischemia-Reperfusion // International Journal of Physiology Pathophysiology – 2014. – v5. – I 3. – p. 221-230.

2. **Добровольська Р.А.**, Гошовська Ю.В., Шиманська Т.В., Сагач В.Ф. Вплив різних шляхів метаболізму L-цистеїну на резистентність міокарда до ішемії-реперфузії // Вісник ВНМУ.- 2014.- 18 , №2.- С. 372-375.
3. **Raisa A. Fedichkina**, Yulia V. Goshovska, Vadym F. Sagach Cardioprotective effect of H<sub>2</sub>S and glutathione synthesis modulation is mediated by inhibition mitochondrial permeability transition pore opening // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2020; 83:74–82. <https://doi.org/10.30970/vlubs.2020.83.09>
4. **Р.А. Федічкіна**, Ю.В. Гошовська, К.І. Войтко, В.Ф. Сагач Вплив екзогенного глутатіону на кардіодинаміку і відкриття мітохондріальної пори при ішемії-реперфузії серця щурів // Фізіол. журн. 2021; 67(1):3-12. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz67.01.003>
5. **Р.А. Федічкіна**, Ю.П. Коркач, І.Ю. Охай, Ю.В. Гошовська, В.Ф. Сагач Вплив модулювання синтезу сірководню та глутатіону на окисно-нітрозативний метаболізм міокарду в умовах ішемії реперфузії // Вісник Київського Національного університету ім.Т.Г.Шевченка. Біологія. 2021; 84(1):43-47. DOI 10.17721/1728\_2748.2021.84.43–47
6. Goshovska YV, **Fedichkina RA**, Balatskyi VV, Piven OO, Dobrzyn P, Sagach VF. Induction of Glutathione Synthesis Provides Cardioprotection Regulating NO, AMPK and PPARα Signaling in Ischemic Rat Hearts. *Life*. 2021; 11(7):631. <https://doi.org/10.3390/life11070631>

## Патенти

1. Патент на корисну модель №124585 від 10.04.2018. Федічкіна Р.А., Гошовська Ю.В., Куклін А.В., Сагач В.Ф. Спосіб збільшення вмісту глутатіону в міокарді та підсилення його кардіопротекторної дії за умов ішемії-реперфузії.

2. Патент на корисну модель № 129185 від 25.10.2018. «Спосіб запобігання розвитку окисного і нітрозативного стресу при ішемії-реперфузії міокарда» Федічкіна Р.А, Гошовська Ю.В., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф.

**Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

1. **Dobrovolska R.A.**, Goshovska YV, Shimanskaya TV Cardioprotective potencial of L-cysteine against cardiac ischemia-reperfusion Mat.of III Conf.of young scientists. Physiology: from molecules to organism” Kyiv.- 2013. – P. 56.
2. Шиманська Т.В., Гошовська Ю.В., **Добровольська Р.А.**, Сагач В.Ф. Вплив стимуляції та блокади синтезу ендogenous сірководню на реакції серця при навантаженні об’ємом З’їзд Українського Фізіологічного Товариства, 2014, Львів, Україна;
3. Y Goshovska, T Shymanska, **R Dobrovolska**, A Kotsuruba, V Sagach Inhibition of H<sub>2</sub>S synthesis form L-cysteine induces glutathione mediated cardioprotection against ischemia/reperfusion in rats Федічкіна Р.А. Conference for Young Scientists “CYS-2015”, 21-25 вересня, 2015, Київ, Україна;
4. Y. Goshovska, T. Shimanskaya, **R. Dobrovolska**, V. Sagach Glutathione as possible mediator of the paradoxical synergy between inhibition and stimulation of H<sub>2</sub>S synthesis in terms of cardioprotection 2016 (Florence)
5. **Fedichkina R**, Goshovska Y.V., Shymanska T.V. Sagach V.F. Role of H<sub>2</sub>S in Frank-Starling law realization in rat heart FEPS, Париж, Франція, 2016
6. **R Fedichkina**, Y Goshovska, V Sagach Directing L-cysteine to glutathione synthesis provides cardioprotection from ischemia-reperfusion injury: physiological and biochemical evidence. Young Researchers in Biosciences, Клуж-Напока, Румунія, 2016

7. **Федічкіна Р.А.** Гошовська Ю.В. Сагач В.Ф.Корекція ішемічних порушень міокарда шляхом впливу на систему сірководню. Збірник тез «Патофізіологія і фармація: Шляхи інтеграції». VII Національний конгрес патофізіологів України. 2016. ст. 238 Харків, Україна, 2016.
8. **Fedichkina R.**, Goshovska Y., Sagach V. Cardioprotective effect of PAG administration // Ukr. Biochem. J., 2017. – V. 89. – № 3. – P. 116.
9. **Fedichkina RA**, Goshovska YV, Sagach VF. Stimulation of endogenous glutathione synthesis prevent postreperfusion NOS uncoupling, oxidative nitrosative stress and cardiodynamic disturbances in rats. 2018 Відень, Австрія
10. Goshovska Y, **Fedichkina R**, Sagach V. Crosstalk between H<sub>2</sub>S and glutathione in cardioprotection against ischemia/reperfusion in rats Abstracts of the 52<sup>nd</sup> Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, Barcelona 2018
11. I Okhai, Y Goshovska, **R Fedichkina**, V Sagach Inhibition of CSE inhibits H<sup>+</sup>-leak in myocardial mitochondria induced by ischemia-reperfusion // 53d ESCI Meeting, 2019, Коїмбра, Португалія
12. **R Fedichkina**, Y Goshovska, V Sagach Effect of H<sub>2</sub>S synthesis modulators at I/R induced MPTP opening in rat heart // 53d ESCI Meeting, 2019, Коїмбра, Португалія
13. **Р.А. Федічкіна**, Ю.В. Гошовська, В.Ф.Сагач Вплив модуляції метаболізму L-цистеїну на реалізацію закону Франка-Старлінга XX З'їзд Українського Фізіологічного Товариства, Київ, Україна, 2019



## ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	1
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	11
ВСТУП	13
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	20
1.1 Сучасні уявлення про роль і метаболізм L-цистеїну в організмі	20
1.1.1 H <sub>2</sub> S як метаболіт L-цистеїну	24
1.1.2 GSH як результат перетворення L-цистеїну	26
1.2 Механізм функціонування міокарду за умов навантаження об'ємом	31
1.3 Механізм функціонування міокарду за умов ішемії-реперфузії	34
1.4 Роль H <sub>2</sub> S в забезпеченні роботи міокарда за нормальних і патологічних умов	36
1.5 Роль GSH в забезпеченні роботи міокарда за нормальних і патологічних умов	40
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	44
2.1 Методичні підходи	44
2.2. Експериментальні тварини	44
2.3. Протокол дослідження	45
2.4. Перфузія коронарних судин за методом Лангендорфа і реєстрація показників кардіодинаміки ізольованого серця	48
2.5. Метод кількісного визначення вмісту глутатіонів відновленого та окисленого в тканинах сердець	50
2.6. Визначення концентрації білка за методом Лоурі	51
2.7. Вивчення показників окисного метаболізму в тканинах серця	52
2.8. Оцінка показників, що характеризують систему синтезу оксиду азоту	53
2.9. Методи статистичного аналізу	54
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	55
3.1. Вплив L-цистеїну та модуляції його метаболізму на реакцію серця	

на навантаження	55
3.2. Вплив L-цистеїну та модуляції шляхів його метаболізму на відновлення функції серця та зміну кисневих показників міокарда без та в умовах ішемії-реперфузії	61
3.2.1. Вплив L-цистеїну та модуляції шляхів його метаболізму на функціональний стан міокарда.	61
3.2.2. Вплив L-цистеїну та модуляції шляхів його метаболізму на відновлення функції серця та зміну кисневих показників міокарда за умов ішемії-реперфузії	65
3.3. Вплив L-цистеїну та модуляції шляхів його метаболізму на функціональний стан мітохондрій	72
3.4. Вплив L-цистеїну та інгібування синтезу H <sub>2</sub> S на окисно-відновний стан тканин міокарда в нормі та за умов ішемії-реперфузії.	74
3.5. Вплив L-цистеїну та інгібування синтезу H <sub>2</sub> S на метаболізм NO в тканинах міокарда в нормі та за умов ішемії-реперфузії	77
3.6. Вплив L-цистеїну та модулювання шляхів його метаболізму на окисно-відновний стан тканин міокарда в нормі та за умов ішемії-реперфузії.	79
3.7. Вплив L-цистеїну та модулювання шляхів його метаболізму на метаболізм NO в тканинах міокарда в нормі та за умов ішемії-реперфузії	81
3.8. Зміни глутатіону відновленого та окисненого в умовах модуляції метаболізму L-цистеїну в нормі та за умов ішемії-реперфузії	88
3.9. Вплив введення екзогенного глутатіону в ранній реперфузійний період на функцію ізольованого серця	91
3.10. Вплив введення екзогенного глутатіону в ранній реперфузійний період на концентрацію глутатіонів відновленого та окисненого в тканинах серця.	

ЗАКЛЮЧНИЙ РОЗДІЛ	102
ВИСНОВКИ	111
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	113
ДОДАТОК 1. СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ	131

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТФ	аденозинтрифосфат
АФК	активні форми кисню
АФН	активні форми нітрогену
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ІСФ	інтенсивність скоротливої функції серця
$K_{\text{АТФ}}$ канали	калієві АТФ-залежні канали
КДТ	кінцево-діастолічний тиск
КП	коронарний потік
$T_{\text{лшл}}$	тиск, що розвиває лівий шлуночок
ЧСС	частота серцевих скорочень
$dP/dt_{\text{max}}$	максимальна швидкість скорочення міокарда
$dP/dt_{\text{min}}$	максимальна швидкість розслаблення міокарда
$\text{BH}_4$	тетрагідробіоптерин
BSO	бутатіонін сульфоксимін
CAT	цистеїн-аміно-трансфераза
CBS	цистатіон- $\beta$ -синтаза
ChaC	$\gamma$ -глутамілциклотрансфераз
eNOS	конститутивні синтази оксиду нітрогену
CSE	цистатіон- $\gamma$ -ліаза
MPTP	мітохондріальна пора

MPST	меркаптопіруват сульфуртрансфераза
GCL	глутаміл-цистеїн лігаза
GGT	γ-глутаміл трансфер аза
GS	глутатіон синтаза
GSH	відновлена форма глутатіону
GSSG	окиснена форма глутатіону
NAC	N-ацетил-цистеїн
NO	оксид азоту
NOS	синтаза оксиду азоту
PAG	пропаргілцистеїн
H <sub>2</sub> S	сірководень
SERCA	Ca <sup>2+</sup> АТФ-аза саркоплазматичного ретикулума
SOD	супероксиддисмутаза

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Дослідження молекулярних механізмів роботи серця в умовах навантаження не втрачає своєї актуальності. Впродовж життя серцево-судинна система підлягає навантаженням різного генезу. Ці стани вимагають пристосування та забезпечення адекватного кровообігу, доставки кисню і поживних речовин до всіх тканин і органів, а також виведення метаболітів. Від ефективності виконання серцем своєї основної функції – насосної – залежить якість життя людини, здатність опиратися стресу, виконувати фізичну роботу. Основний механізм роботи серця відомий як закон Франка-Старлінга [1]. Міокард відповідає збільшенням сили скорочення на збільшення кінцево-діастолічного об'єму шлуночків серця. Закон Франка-Старлінга є енергетично вигідним [2]. Однак, за деяких патологічних станів його реалізація значно погіршується, внаслідок чого послаблюється насосна функція серця, зокрема при гіпертонії та хворобі Паркінсона [3, 4]. Ймовірною причиною цього зниження є порушення продукції оксиду нітрогену, що опосередковує реалізацію механізму Франка-Старлінга [5]. Останніми роками встановлено зв'язок NO з іншим газовим трансмітером сірководнем ( $H_2S$ ).  $H_2S$  стимулює вироблення NO шляхом конститутивного синтезу. Відомо, що в серцево-судинній системі  $H_2S$  синтезується в основному ензимами цистатіон-гама-ліазою (CSE) та 3-меркаптопіруват-сульфур-трансферазою (MPST), яка працює в парі з цистеїн-аміно-трансферазою (CAT). Для обох як субстрат важливий L-цистеїн. Варто зазначити, що L-цистеїн є попередником синтезу не лише  $H_2S$ , а й глутатіону, низькомолекулярного тіолу, трипептиду глютамінової кислоти, цистеїну та гліцину. Він представлений в клітині у відновленій (GSH) та окисненій формах (GSSG), чия концентрація динамічно змінюється в залежності від метаболічних процесів та рівня окисного стресу. Основні

функції GSH – це підтримання окисно-відновного балансу клітин, чим він забезпечує ефективне функціонування білкових систем організму в тому числі ланцюга транспорту електронів, АТФ-ази, йонних каналів і транспортерів. Зважаючи на тісний зв'язок між глутатіоном та газоподібними посередниками, що беруть участь в реалізації закону Франка-Старлінга, дослідження механізмів регуляції скоротливої активності міокарда та участь в них глутатіону становить значний науковий інтерес.

Найпоширенішими серцево-судинними патологіями є інфаркт та ішемічна хвороба серця. За даними ВООЗ на ішемічну хвороба серця припадає більше половини всіх смертей в європейському регіоні [6]. Ішемічна хвороба призводить до кисневого голодування тканин, що може мати наслідком структурні порушення, аритмії, погіршення скоротливої функції серця, некроз кардіоміоцитів. Відсутність повноцінного кровообігу утруднює не лише постачання поживних речовин, а й виведення метаболітів з клітин. Часткова або повна ішемія тканин та органів зустрічається не лише під час патологій, але й в надзвичайних ситуаціях, при операціях з трансплантування тощо [7]. Реперфузія – відновлення кровопостачання і надходження кисню в ішемізовані тканини. Це часто призводить до різкого зростання утворення вільних радикалів, накопичення активних форм кисню (АФК) та ще більшого пошкодження клітин через активацію перекисного окиснення ліпідів, білків, ацидозу, пошкодження ДНК та мембран органел клітини, в першу чергу мітохондрій [8,9]. Швидка наробка АФК є результатом неефективного кисневого метаболізму, а пошкодження цілісності мембран мітохондрій призводить до масового відкриття мітохондріальних пор транзиторної проникності і активації апоптозу або некрозу. У відповідь на збільшення концентрації АФК активуються антиоксидантні системи, однак при тривалих ішемічних епізодах та інфаркті спостерігається знижена активність каталази, супероксиддисмутази, глутатіон редуктази та виснаження пулів відновленого глутатіона [10,11].

Тому пошук шляхів активації антиоксидантного захисту та інгібування відкриття мітохондріальних пор є важливим медико-біологічним завданням.

Відомо ряд клітинних механізмів, активація яких має кардіопротекторний ефект в умовах ішемії-реперфузії. Останні роки увагу дослідників привертає  $H_2S$ , його взаємодія з NO та іншими активними молекулами. Глутатіон здатен взаємодіяти з вільними радикалами напряму, що важливо підчас ішемії-реперфузії міокарда. Ранній період реперфузії має визначальне значення для динаміки відновлення функції серця, оскільки саме в цей час до ішемізованих тканин надходить кисень та поживні речовини. З літератури відомо, що введення донорів глутатіону має кардіопротекторний ефект. Введення препарату N-ацетил-L-цистеїну допомагає в відновленні тиску при гіпертензії [12], відновлює вміст GSH на фоні інфаркту міокарда та серцевої недостатності мишей [13,14]. Існують свідчення, що препарат комбінації попередників глутатіону «Елтацин» підвищує вміст GSH в крові, а Гепавал пригнічує запальний процес [15,16]. Препарат Гепавал містить відновлену форму глутатіону, а коригування зниженого вмісту GSH важливе впродовж початкового періоду реперфузії, що може забезпечити нормальне відновлення функції серця після ішемії.

Зважаючи на вищевикладене, в даній роботі ми вивчали різні шляхи метаболізму L-цистеїну в реакціях серця на навантаження та в умовах реперфузійного пошкодження функції серця, а також вплив модуляції його метаболізму на кисневий метаболізм тканин серця.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Роботу виконано в межах наукової тематики відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Вивчення ролі мітохондрій в реакціях серцево-судинної системи при різних функціональних станах організму» (2010-2013, № держ.реєстрації 0109U005359), «Дослідження ролі сигнальних сполук сірки в реакціях серцево-судинної системи щурів при різних станах організму» (2014-2018, № держ. реєстрації 0113U007276),



«Дослідження ролі систем сірководню і глутатіону в серцево-судинній реактивності в нормі і патології» (2019-2023, № держ. реєстрації 0118U007352).

**Мета і завдання дослідження:** дослідити роль модуляції метаболізму L-цистеїну в реакціях серця на навантаження об'ємом та при ішемії-реперфузії.

Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

1. Дослідити вплив L-цистеїну та модуляції шляхів його метаболізму шляхом введення інгібіторів синтезу сірководню та глутатіону на реакцію серця на навантаження об'ємом.
2. Дослідити вплив L-цистеїну та модуляції шляхів його метаболізму шляхом введення інгібіторів синтезу сірководню та глутатіону на відновлення функції серця та зміну кисневих показників міокарда в умовах ішемії-реперфузії.
3. Дослідити вплив L-цистеїну та модуляції шляхів його метаболізму шляхом введення інгібіторів синтезу сірководню та глутатіону на окисно-відновний стан тканин міокарда в нормі та за умов ішемії-реперфузії.
4. Визначити динаміку змін глутатіону відновленого та окисненого в умовах модуляції метаболізму L-цистеїну в нормі та за умов ішемії-реперфузії.
5. Дослідити вплив постішемічного введення екзогенного глутатіону на функцію ізольованого серця.

*Об'єкт дослідження:* дорослі щури лінії Wistar, ізольоване серце, гомогенати сердець.

*Предмет дослідження:* показники кардіодинаміки та кисневого метаболізму ізольованого серця. Біохімічні показники маркерів окисного стресу, нітрозативного стресу та глутатіону відновленого та окисненого.

*Методи дослідження:* перфузія коронарних судин ізольованого серця щурів за методом Лангендорфа та реєстрація скоротливої активності лівого

шлуночка в умовах навантаження серця об'ємом та моделювання ішемії-реперфузії; вимірювання парціального тиску кисню, розрахунок артеріо-венозної різниці, споживання кисню і кисневої вартості роботи серця; спектрофотометричне дослідження відтікаючих від ізольованого серця розчинів; спектрофотометричне визначення показників оксидативного та нітрозативного стресу, а також вмісту  $H_2S$  в тканинах серця; кількісне визначення вмісту глутатіонів відновленого та окисленого в тканинах серця за допомогою кінетичної реакції, статистичний аналіз результатів.

**Наукова новизна отриманих результатів** Вперше продемонстровано можливість стимуляції ендogenous синтезу глутатіону з амінокислоти L-цистеїну за умови інгібування пропаргілгліцином перетворення L-цистеїну на  $H_2S$ . Всі позитивні ефекти відміняються інгібітором синтезу глутатіону, що підтверджує наші висновки. Показано, що внутрішньоочеревинне введення комбінації PAG+L-цистеїну позитивно впливало на реалізацію закону Франка-Старлінга та підтримувало активність конститутивної синтази оксиду азоту, що означає збільшення функціональних резервів міокарда. Ці результати прояснюють важливість забезпечення біодоступності глутатіону за нормальних умов та за умов збільшення навантаження на міокард.

Крім того, комбінація PAG+L-цистеїну мала потужний кардіопротекторний ефект в умовах ішемії-реперфузії, що проявлялось в повному відновленні функції серця. Наші дані свідчать, що активація ендogenous синтезу глутатіону підвищує ефективність утилізації спожитого кисню та пригнічує утворення МРТР.

Ми показали, що введення препарату екзогенного глутатіону під час реперфузії зменшувало постішемичне порушення функції серця, а стимуляція ендogenous синтезу глутатіону шляхом модуляції метаболізму L-цистеїну можливе та має великий науковий та клінічний потенціал в умовах ішемічного пошкодження міокарду.

**Теоретичне та практичне значення отриманих результатів.** Отримані результати мають в першу чергу фундаментальне значення, оскільки додають нові дані до знань про механізми взаємодії цистеїну,  $H_2S$  та глутатіону в міокарді. Вказують на можливі механізми збільшення функціональних резервів міокарда та реалізації кардіопротекції з використанням модуляторів синтезу  $H_2S$  та глутатіону з амінокислоти L-цистеїну за умов ішемії-реперфузії. Можуть бути використані в подальших дослідженнях для розробки кардіопротекторних препаратів для клінічного застосування в умовах оперативного втручання на серці та інших органах та лікування ішемічних станів.

### **Особистий внесок здобувача.**

Головна ідея та завдання дослідження були сформульовані науковим керівником чл.-кор. НАН України, д.м.н., проф. В.Ф. Сагачем. Аналіз літературних даних по темі дослідження, проведення дослідження змін вмісту глутатіонів окисненого та відновленого в тканинах серця під дією модуляторів синтезу  $H_2S$  та глутатіону, первинний аналіз фізіологічних показників роботи серця, статистичний аналіз даних проводилися дисертанткою самостійно. Частина дослідження проведена у співпраці із співробітниками відділу фізіології кровообігу, зокрема вивчення роботи серця за методом Лангендорфа та аналіз експериментальних даних разом з с.н.с., к.б.н. Гошовської Ю.В., біохімічних показників окисного стресу – разом з н.с., к.б.н. Коркач Ю.П. та Охай І.Ю., у співавторстві з якими були опубліковані наукові праці. Автором особисто було представлено результати на наукових конференціях та з'їздах.

Автор висловлює щире подяку ст. н. сп. відділу фізіології кровообігу, к.б.н. Т.В. Шиманській за всебічну допомогу у аналізі та інтерпретації отриманих результатів.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення й результати дисертації були представлені на таких конференціях та форумах: “Conference

for Young Scientists. Physiology: from molecules to organism”, 2014, Київ, Україна; "Gasotransmitters; physiology and pathophysiology", 21-23 вересня, 2014, Казань, РФ; З'їзд Українського Фізіологічного Товариства, 2014, Львів, Україна; Conference for Young Scientists “CYS-2015”, 21-25 вересня, 2015, Київ, Україна; Young Research in Bioscience, Ключ-Напока, Румунія, 2016; VII Національний конгрес патофізіологів України, 2016. Харків, Україна; Joint Meeting of the FEPSs, 13-15 вересня, 2017, Відень, Австрія; 53d ESCI Meeting, 2019, Коїмбра, Португалія.

**Публікації.** За результатами дисертаційної роботи опубліковано 19 наукових праць, у тому числі 6 статей у фахових наукових журналах, рекомендованих ДАК України, 2 патенти на корисну модель, 13 тез доповідей конференцій.

**Структура і об'єм дисертації.** Дисертація складається зі списку скорочень, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень та їх обговорення, заключного розділу і списку використаної літератури з 141 найменування. Роботу викладено на 135 сторінках та ілюстровано 32 рисунками і 7 таблицями.

## Розділ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Сучасні уявлення про роль і метаболізм L-цистеїну в організмі

В організмі білки виконують найрізноманітніші функції – від структурних до метаболічних. Білкові молекули – це поліпептидні ланцюги, що складаються з амінокислот. Деякі поліпептиди здатні до утворення складніших, вторинних та третинних структур. Ця здатність зумовлюється властивостями амінокислотного складу поліпептидів. Однією з ключових амінокислот в цьому процесі є L-цистеїн – L ізомер аліфатичної амінокислоти цистеїн. Завдяки наявності SH-групи L-цистеїн здатен утворювати дисульфідні містки і сприяти формуванню третинної структури білків – просторово наближувати структурно далекі ділянки поліпептидного ланцюга. Крім того утворення зв'язку між атомами сірки (S-S зв'язок) дає можливість просторового наближення різних поліпептидних ланцюгів, що важливо, зокрема, для формування активних сайтів ензимів. Залежно від місця в поліпептидному ланцюгу, L-цистеїн може піддаватись низці посттрансляційних модифікацій, впливаючи на функціонування білків та реалізацію сигнальних каскадів. Крім того, L-цистеїн в організмі використовується для відновлення пулу метіоніну, синтезу таурину, бере участь в сигнальних шляхах, як донор  $H_2S$ , та в антиоксидантному захисті, як попередник синтезу глутатіону.

Цистеїн є умовно-незамінною амінокислотою, оскільки синтезується в організмі з незамінної амінокислоти метіоніну та замінної амінокислоти серину. В формі L-цистеїну амінокислота присутня переважно в клітинах, в позаклітинному просторі за нормального редокс-статусу цистеїн швидко окиснюється до L-цистину [17]. Існують системи транспорту L-цистеїну і L-

цистину в напрямках меншої концентрації мембран-асоційованими транспортерами. До них належить велика родина транспортерів амінокислот, яка має більшу афінність до глутамату [18], але може транспортувати і інші амінокислоти, зокрема цистеїн/цистин в сторону меншої концентрації. Наприклад, цистеїн в позамембранний простір переноситься глутаматним або аспартатним транспортерами, а цистин всередину клітин – цистин-глутаматним антипортером  $x^-$  в глії та  $x_c^-$  в очному яблуці [19]. Інші транспортери цієї родини теж задіяні в транспорті цистеїну або цистину, зокрема аланін-серин-цистеїновий [20]. В клітині рівень відновленого цистеїну підтримується щонайменше тіоредоксиною та глутатіоною системами. У випадку синтезу L-цистеїну de novo донором сірковмісної групи ( $-SH$ ) виступає метіонін, а серин стає вуглецевим скелетом цистеїну (Рис.1.1.).

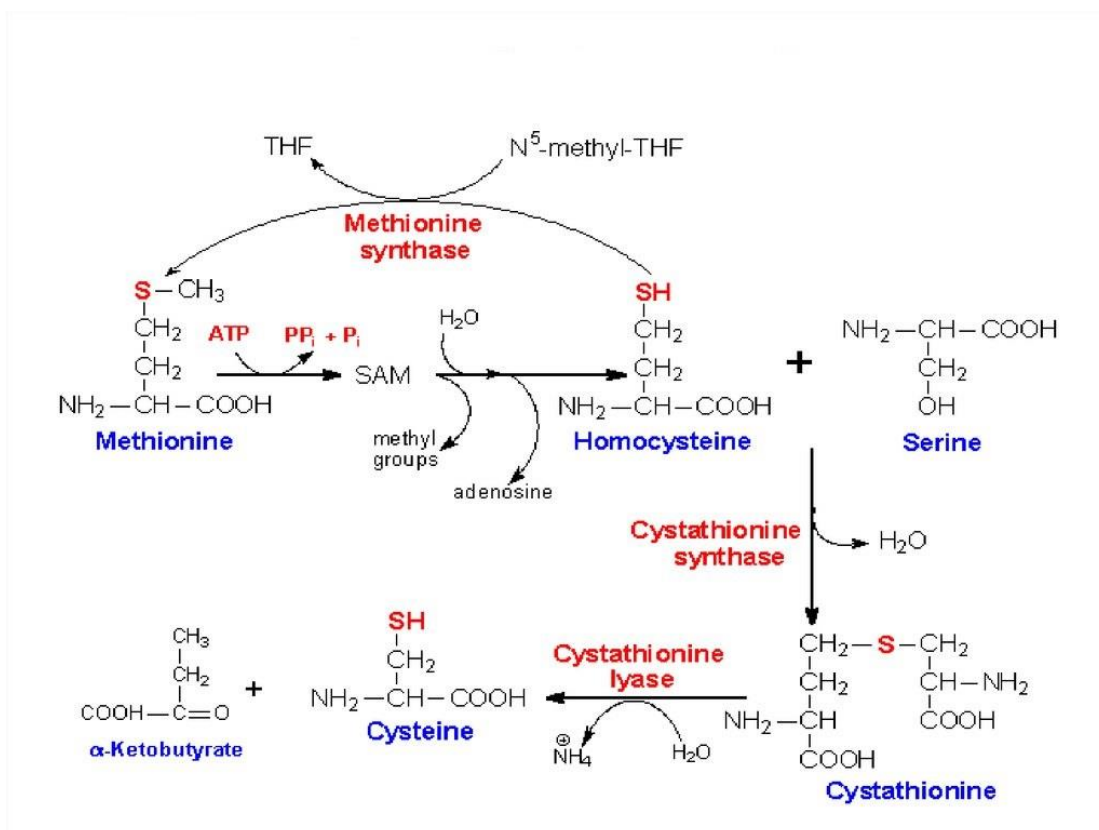


Рис 1.1. Схема синтезу L-цистеїну з метіоніну та серину

Метіонін-аденозилтрансфераза з використанням АТФ та однієї молекули води утворює S-аденозилметіонін, що є донором метильних груп в інших реакціях метаболізму. Після відщеплення метильної групи S-аденозилметіонін перетворюється на S-аденозилгомоцистеїн. Від нього аденозилгомоцистеїназа відщеплює аденозил перетворюючи на гомоцистеїн. Гомоцистеїн є ще однією з ключових амінокислот. Він може бути пулом для відновлення вмісту метіоніну так само як для синтезу цистеїну. Синтез цистеїну продовжується приєднанням серину до гомоцистеїну ензимом цистатіонін-синтазою з утворенням цистатіоніну. А вже цистатіонін за участі цистатіонін- $\gamma$ -ліази, піридоксаль-5-фосфат залежного ензима, утворює цистеїн.

Деградація цистеїну в організмі може йти декількома шляхами. Перший варіант – це за участі цистеїн-амінотрансфераз з утворенням 3-меркаптопірувату та глютамату. Ензим 3-меркаптопіруват-сульфуртрансфераза (MPST) з окисненням тіоредоксину з 3-меркаптопірувату утворює піруват і  $H_2S$  [21]. Цей шлях притаманний для мітохондрій. Другий шлях починається з цистеїн діоксигенази, що окислює цистеїн до 3-сульфо-L-аланіну, який трансамінується 3-сульфо-аланін-трансaminaзою до 3-сульфінопірувату, який спонтанно деградує до сульфїту і пірувату. Сульфїт потім окислюється сульфїтоксидазою до сульфату та виводиться з сечею, а піруват декарбоксілюється до ацетил-СоА і вступає в цикл Кребса. Однак перетворення 3-сульфоаланіну може піти і іншим шляхом. З нього може утворитись таурин через проміжну стадію з утворенням гіпотаурину.

З порушенням метаболізму L-цистеїну або зменшення його надходження в організм пов'язано безліч патологічних станів. Наприклад, кератин має великий відсоток вмісту цистеїну в своїй структурі. За дефіциту цистеїну порушується структура кератину, а отже страждають нігті та волосся [22]. Цистеїн важливий для функціонування нервової системи.

Показано, що при недостатності цистеїну страждає мієлінова оболонка дендритів та підвищується окисний стрес і пошкодження нейронів спричинене АФК, що сприяє розвитку нейродегенеративних захворювань [23,24]. Додавання цистеїну до перфузуючого розчину покращувало відновлення функції міокарду на моделі ізольованого за Лангендорфом серця щурів, сприяло відновленню коронарного потоку та зниженню рівню АФК після коронарної оклюзії [12]. В експериментах з перфузією серця розчином цистеїну показано збільшення включення амінокислоти в білок та збільшення вмісту коензиму А в серці [25]. В інших експериментах перфузія сердець L-цистеїном до та після ішемії зменшувала розмір інфаркту міокарда [26].

Доступність цистеїну є обов'язковою умовою для синтезу глутатіону. Виснаження запасів глутатіону призводить до підвищення рівня окисного стресу в клітині та її загибелі. За деяких патологічних станів, наприклад, ракових захворювань, цей механізм використовують як лікувальний, але за нормальних умов глутатіон необхідний для підтримання окисно-відновного балансу клітин [27]. За умов ішемії в ізольованих кардіоміоцитах посилюється поглинання цистеїну, зростає концентрація глутатіону та знижується окисний стрес [28]. Те саме відбувається в судинах. В умовах окисного стресу посилюється поглинання цистину (окисленого цистеїну), що призводить до підвищення рівня глутатіону в ендотелії та зниження окисного стресу [29].

Проблеми з синтезом цистеїну також негативно впливають на стан організму. Один з основних шляхів ресинтезу цистеїну – з метіоніну. В процесі утворюються гомоцистеїн та цистатіонін (Рис.1.1). Якщо синтез зупиняється на утворенні гомоцистеїну – може розвинути гіпергомоцистеїнемія, відома своїми негативними ефектами на серцево-судинну систему [30]. У мишей нокаутних по гену CSE (*CSE*<sup>-/-</sup>) на дієті зі зменшеним рівнем цистеїну розвивається нестача глутатіону, H<sub>2</sub>S, підвищення рівня гомоцистеїну в плазмі, а також затримка розвитку та



загибель в віці 12 тижнів [31]. Але збільшення цистеїну в дієті виправляло ситуацію. Миші виживали, відновлювали масу та вміст необхідних речовин в крові.

Отже, L-цистеїн виконує свої функції в організмі, входячи до складу білкових молекул – забезпечує їх фолдинг та активність. Бере участь в амінокислотному обміні. Є одним з складових антиоксиданту глутатіону та попередником синтезу H<sub>2</sub>S.

### 1.1.1. H<sub>2</sub>S як метаболіт L-цистеїну

З L-цистеїну може утворюватись H<sub>2</sub>S піридоксаль-5-фосфат залежними ензимами цистатіонін-гамма-ліазою (CSE) та цистатіон-бета-синтазою (CBS). CBS каталізує утворення H<sub>2</sub>S з цистеїну шляхом β-елімінації (L-цистеїн + L-гомоцистеїн → L-цістатіонін + H<sub>2</sub>S), β-заміщення (L-цистеїн + 2-меркаптоетанол → S-гідроксил-L-цистеїн + H<sub>2</sub>S) та/або реакції α,β-елімінування (L-цистеїн + H<sub>2</sub>O → піруват + H<sub>2</sub>S + NH<sub>3</sub>). Цей ензим використовує в якості ко-субстратів одночасно цистеїн та гомоцистеїн.

CSE, яка зазвичай каталізує реакції γ-елімінації, стимулює перетворення L-цістатіоніну в L-цистеїн, 2-оксобутират та NH<sub>3</sub>, і за рахунок додаткової активності, перетворює цистеїн на тіоцистеїн, піруват і амоній. Тоді як в β-дисульфідній реакції елімінування ензим метаболізує тіоцистеїн з цистеїном або іншими тіолами і може утворювати H<sub>2</sub>S і цистеїн.

Перший шлях катаболізму H<sub>2</sub>S – це його окислення. Дослідження з використанням моделей на основі перфузії органів показали, що H<sub>2</sub>S окислюється в мітохондріях, до тіосульфату (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>), сульфіту (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) і сульфату (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), а потім виводиться із сечею. Сульфат (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) є основним кінцевим продуктом метаболізму H<sub>2</sub>S [32]. Перший крок у шляху окислення тіосульфату швидше за все неензиматичний, в результаті цієї реакції H<sub>2</sub>S

метаболізується в тіосульфат. Подальше перетворення тіосульфату на сульфітосульфату на сульфат каталізується ціанідсульфуртрансферазою і сульфітоксидазою, відповідно [33]. Другий шлях метаболізму  $H_2S$  це тиол-S-метилтрансфераз-(TSMТ)-опосередковане метилювання  $H_2S$ , що спричинює перетворення монометилсульфідів на диметилсульфіді [34]. Третій шлях включає себе зв'язування  $H_2S$  з метгемоглобіном з утворенням сульфгемоглобіну. Крім того,  $H_2S$  може реагувати з оксидом азоту (NO) з утворенням проміжних сполук – нітрозотіолів [35].

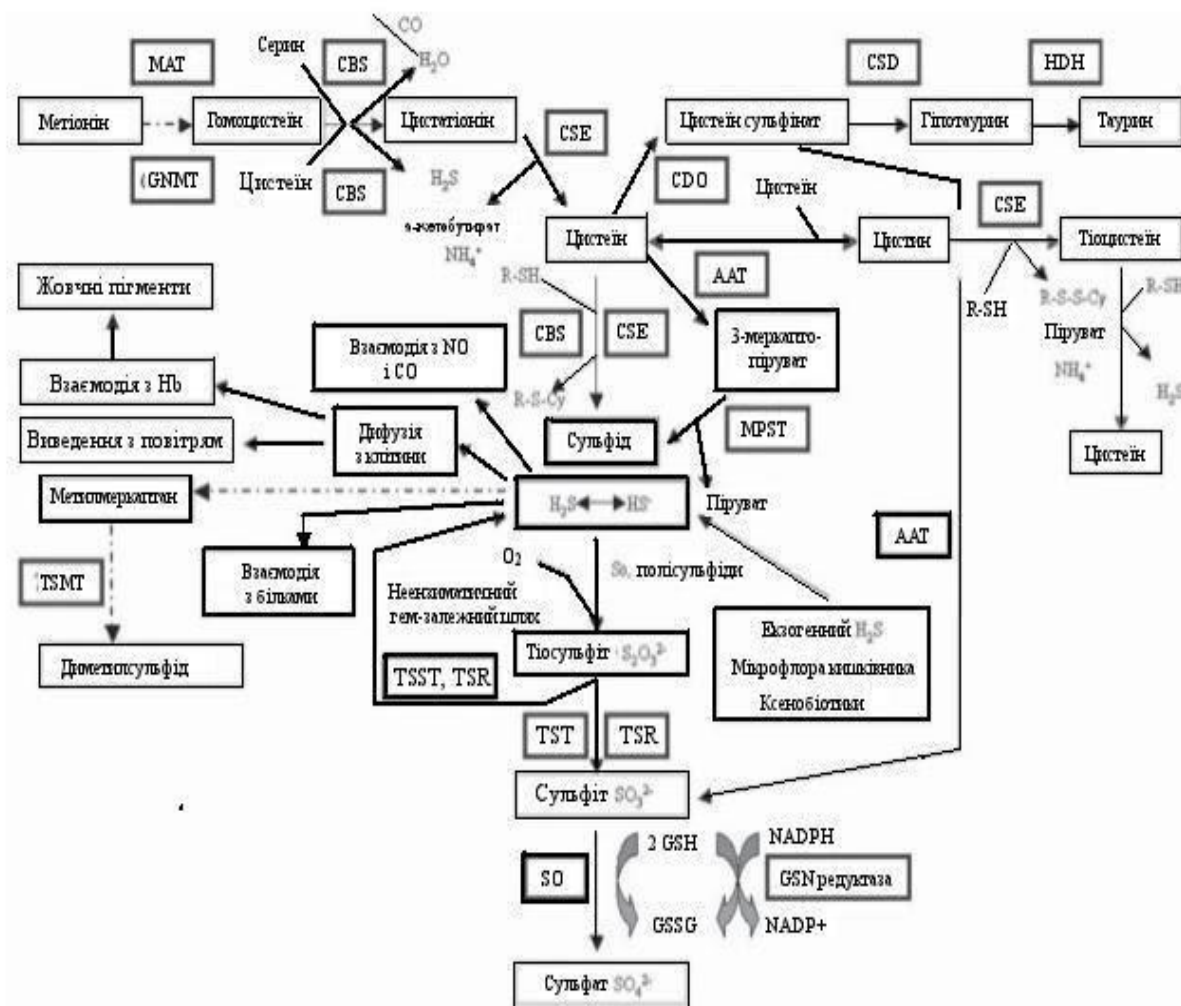


Рис 1.2. Адапована схема метаболізму  $H_2S$  [36].

H<sub>2</sub>S виконує в організмі функцію сигнальної молекули. Його ефекти є дозозалежними і можуть бути як пошкоджуючими, так і захисними. H<sub>2</sub>S є інгібітором цитохром оксидази С, але може виступати і субстратом для неї. З одного боку, інтоксикація сірководнем може призвести до повного інгібування оксидази, а з іншого – H<sub>2</sub>S конкурентно заміщує кисень в реакціях ензиму та значно знижує продукцію вільних радикалів [37]. В результаті зниження активності оксидази та зменшення продукції активних форм кисню, сприятиме запобіганню пошкодження мембран мітохондрій та їх енергопродукуючої функції [38].

Показана взаємодія H<sub>2</sub>S з калієвими АТФ-залежними каналами, вторинними посередниками, участь у Ca<sup>2+</sup>-сигналінгу тощо. Утворення вільних радикалів, взаємодія з іншими сигнальними молекулами, здатність здійснювати зворотню посттрансляційну модифікацію білків роблять H<sub>2</sub>S однією з ключових молекул організму.

### **1.1.2. GSH як результат перетворення L-цистеїну**

L-цистеїн включається в поліпептидний ланцюг в процесі синтезу білків і присутній у більшості білкових молекул організму. В тому числі L-цистеїн є попередником синтезу одного з найпоширеніших тіолів організму – глутатіону.

Синтез відновленої форми глутатіону (GSH) de novo відбувається в цитоплазмі і проходить в два АТФ-залежні етапи (Рис. 1.3.). Перша реакція є лімітуючою, ензим  $\gamma$ -глутамілцистеїнлігаза (GCL) формує зв'язок між аміногрупою L-цистеїну і карбоксильною групою глутамінової кислоти з утворенням речовини  $\gamma$ -глутамілцистеїну. Цей  $\gamma$ -глутамільний зв'язок є особливо стабільним, більшість клітинних пептидаз не можуть його зруйнувати і для деградації  $\gamma$ -глутамілцистеїну потрібні специфічні ензими. Другим етапом синтезу глутатіону є приєднання до  $\gamma$ -глутамілцистеїну

гліцину ензимом глутатіонсинтетазою (глутатіонсинтаза, GS), яка зв'язує аміногрупу гліцину і карбоксильну групу  $\gamma$ -глутамілцистеїну [39].

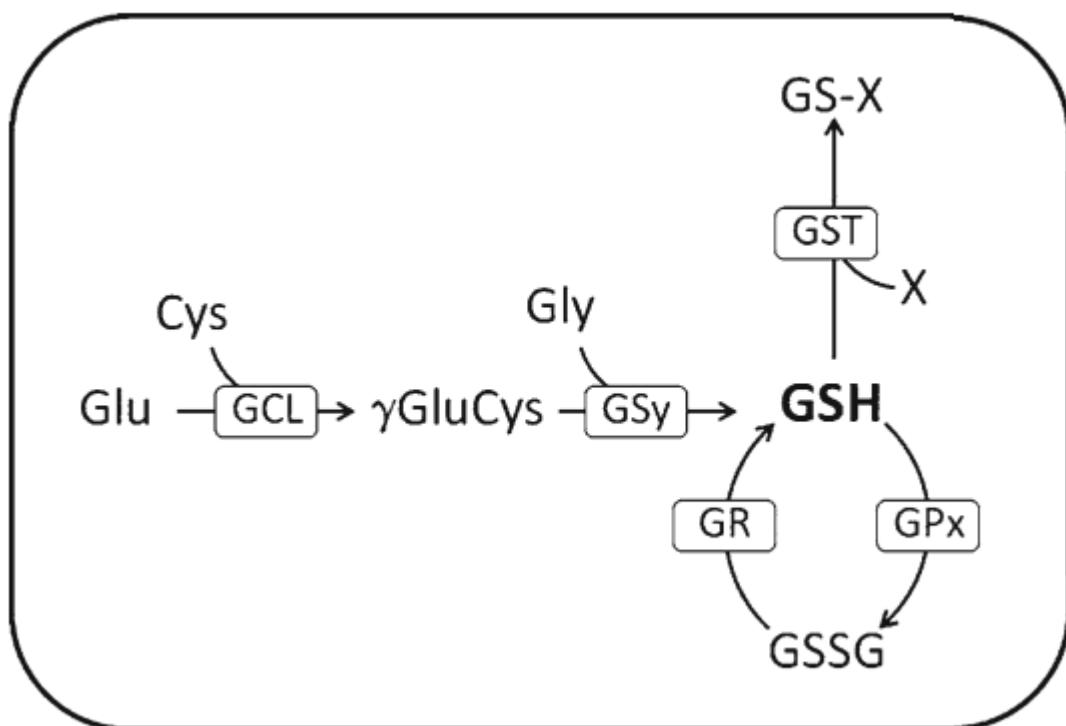


Рис. 1.3. Адаптована схема синтезу та ресинтезу відновленого глутатіону [40].

Cys – цистеїн, Glu – глутамат, GCL –  $\gamma$ -глутаматцистеїнлігаза, Gly – гліцин,  $\gamma$ GluCys – глутамілцистеїн, GSy – глутатіон синтаза, GR – глутатіон редуکتаса, GPx – глутатіон пероксидаза, GST – глутатіон трансфераза, GS-X – коньюгати глутатіону.

Глутатіон з цитоплазми транспортується назовні клітини та до всіх органел. В міжклітинний простір відновлений глутатіон переносять MRPs білки, асоційовані з стійкістю до ліків та, опосередковано, CFTR канали [41,42]. В мітохондрії глутатіон транспортується за допомогою дикарбоксилатного та оксиглутаратного транспортерів, ріанодинові рецептори беруть участь в переносі GSH до ендоплазматичного ретикулуму

[43]. Припускають, що є ще інші транспортери, зокрема ядерні, але поки не виділено, які саме [44].

Деградація глутатіону починається з розщеплення  $\gamma$ -глутамільного зв'язку. Як зазначалось вище, цей зв'язок здатні розщеплювати лише деякі транспептидази в клітині. Такими транспептидазами є асоційовані з цитоплазматичною мембраною білки родини гама-глутамілтрансфераз ( $\gamma$ -glutamyltransferase,  $\gamma$ -GT, GGT) та кілька білків з гама-глутамілциклотрансфераз – ChaC (Glutathione Specific Gamma-Glutamylcyclotransferase) [45]. З тринадцяти гомологів GGT активними є два – GGT5 невеликої активності та GGT1 як основний робочий ензим, здатний розщеплювати глутатіон (як відновлений так і окиснений) та лейкотрієн C4 [46]. GGT1 може виконувати дві функції: переносити  $\gamma$ -глутамільний зв'язок на іншу амінокислоту або гідролізувати цей зв'язок [47,48]. В першому випадку утворюється  $\gamma$ -глутамільована амінокислота, яка через низку перетворень гідролізується до глутамату, та дипептид цистеїн-гліцин, що розкладається дипептидазами. В другому варіанті одразу утворюється глутамат та цистеїн-гліциновий дипептид, який далі так само розкладається на складові дипептидазами. Потім вільні амінокислоти вступають в метаболічні процеси, наприклад, синтез глутатіону або інших білків. Важливо зазначити, що функціональні домени GGT знаходяться зовні клітин, тому ще одна їхня функція полягає в відновленні внутрішньоклітинного пулу попередників синтезу глутатіону [48].

З родини ChaC наразі відомі дві активні форми ChaC1 та ChaC2. В результаті їхньої активності утворюється 5-оксипролін та дипептид цистеїн-гліцин, що далі вступають у відповідні реакції. Ці два ензими на 60% подібні між собою, але ChaC2 в 10-20 разів менш активний щодо гідролізу глутатіону. Раніше ChaC1 був ще відомий як інгібітор сигнального шляху Notch і мав назву Botch [49]. Ензим ChaC1 може гідролізувати лише відновлену форму глутатіону [50]. Припускають, що ChaC2 відповідає за

базовий рівень метаболізму глутатіону, тоді як ChaC1 вмикається в стресових випадках [45].

Відновлена і окислена форми глутатіону в різних співвідношеннях присутні в усіх тканинах організму. Найбільшими є його частки в цитозолі, близько 80%, та мітохондрія – близько 10% [51]. Це може пояснюватись функцією (необхідність бути поблизу джерела продукції АФК) та локалізацією синтезуючих ензимів (в цитозолі). Найбільш активним продуцентом глутатіону в організмі вважають печінку [52]. Переважаючою формою в клітині є активна форма – відновлений глутатіон. Співвідношення GSH/GSSG є важливим показником окисно-відновного статусу [51,53]. При значному зниженні концентрації відновленого глутатіону в клітині можна говорити про негативний прогноз розвитку окисного стресу. Варто зазначити, що велика частка глутатіону існує в клітинах в зв'язаному з іншими молекулами вигляді, наприклад, з білками.

Є декілька механізмів участі глутатіону в захисті клітин від АФК та ксенобіотиків – неензиматичний та ензиматичний. Відновлений глутатіон може виступати скавенджером вільних радикалів. Цей процес може відбуватись неензиматично – трансфер атома водню до радикала. Показано, що такий переніс можливий переважно з атомів сірки та меншою мірою деяких карбонів карбонового скелету глутатіону. Швидкість взаємодії GSH з вільними радикалами падає в такому порядку: OH, OCH<sub>3</sub>, OOH, OOCCH<sub>3</sub>, OOSHCH<sub>2</sub>, OOSH<sub>3</sub> [54]. Ефективність же взаємодії з АФК у глутатіону вища ніж у каротинів, мелатоніну та кофеїну [55,56]. Крім того GSH бере участь в відновленні H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до води. В цьому процесі GSH виступає кофактором для ензимів глутатіонпероксидаз. Родина глутатіонпероксидаз налічує 7 ензимів і ділиться на групи в залежності від будови активного центру. В активному центрі може бути представлений селен або цистеїн, або обидва. За рахунок цих молекул ензим реакційноздатний. Представники глутатіонпероксидаз виявлені в цитозолі, ендоплазматичному ретикулумі,

ядрі та мітохондріях. Можуть бути тканино специфічними. Метаболізують безпосередньо пероксид водню або молекули, що піддаються пошкодженню АФК.

Ще одним варіантом дії глутатіону є процес пост-трансляційної модифікації білків – глутатіонілювання. Глутатіонілюваність білків впливає на їх активність, розвиток пошкоджень від окисного стресу та реалізацію багатьох сигнальних шляхів, залучений до процесів проліферації, апоптозу, катаболізму ксенобіотиків та є джерелом цистеїну. Глутатіонілювання може бути ензиматичним та неензиматичним [57]. Неензиматичний варіант глутатіонілювання рідко зустрічається в живих клітинах, для цього потрібні екстремальні умови виснаження відновленого глутатіону або зміни в рН клітин. Справедливим цей варіант є для білку C-Jun за зміни співвідношення в GSH/GSSG до 13 [58]. Дуже повільно GSH може взаємодіяти без посередництва ензимів з білками з залишками сульфенової кислоти (PSOH) утворюючи глутатіонілювані молекули. Тиїлові радикали та NO можуть сприяти утворенню глутатіонілюваної форми білку, однак конкретні умови подібного процесу досліджені не достатньо.

Значно більший внесок в метаболічні процеси клітин робить ензиматичний шлях глутатіонілювання. За цей процес відповідає родина ензимів під назвою глутатіон-S-трансферази. До родини належить 7 класів ензимів, серед яких  $\alpha$ ,  $\beta$  та  $\gamma$ -класи найбільш поширені серед савців. Крім того їх розподіляють на два класи: мікросомальні, мембран асоційовані та цитозольні [59]. Глутатіон-трансфераза каталізує приєднання GSH до білків та ксенобіотиків. Наприклад, коньюгація GSH з продуктами метаболізму цитохрому P450 сприяє їх подальшому метаболізму в печінці або виведенню з організму з жовчу [60]. Глутатіонілювання ж ензимів регулює їх активність і впливає на реалізацію їх функцій.

Отже, амінокислота L-цистеїн є важливим компонентом клітинних систем, як структурних так і метаболічних, сигнальних. Її метаболізм

пов'язаний з безліччю ланок організації функціонування клітини. L-цистеїн бере участь у формуванні білкових структур, пов'язаний з синтезом інших амінокислот, є попередником синтезу антиоксиданту глутатіону та сигнальної молекули  $H_2S$ .

## **1.2. Механізми функціонування міокарда за умов навантаження об'ємом**

Серцево-судинна система впродовж життя витримує навантаження різного генезу. Спосіб життя, оточення, робочі контакти, фізичне навантаження вносять свої корективи в ритм роботи серця, стан м'язів та стінок судин. Захворювання ж серцево-судинної системи стабільно входять в трійку лідерів причин смертності.

За збільшення навантаження на організм, навіть в межах норми, відбувається регуляція функцій серця та судин. Закон Франка-Старлінга описує один з таких механізмів – збільшення сили скорочення міокарду у відповідь на збільшення об'єму крові, що надходить в камери серця. Це дозволяє забезпечувати зростаючу потребу організму в більшій кількості кисню та поживних речовин.

Механізми реалізації закону Франка-Старлінга досліджуються з моменту його відкриття і досі достеменно невідомі. Є дані, що молекулярні каскади відповіді збільшенням сили скорочення починаються з активації системи ангіотензину II / ендотеліну 1. Це має безліч наслідків, включно з активацією НАДФ-оксидази NOX, підвищенням рівня АФК, активацією мінерал-кортикоїдних рецепторів (MR), участь  $Na/H^+$  обмінника та кальцієвих каналів, а також підвищення чутливості міофіламентів до йонів кальцію [61]. Показано, що окиснення протеїн кінази G1a є надзвичайно важливим для адекватного розслаблення міокарду і наповнення шлуночків кров'ю. Тоді як за відсутності окиснення протеїн кінази G1a спостерігалось зниження серцевого викиду у відповідь на навантаження об'ємом [62].



Реалізації закону також сприяє активація залежних від розтягнення каналів (SACs). Тромбоспоридин-4 належить до каналів групи SACs та забезпечує з'єднання кардіоміоцитів між собою. Можливо, також відповідальний і за передачу сигналу розтягнення, що призводить до відповіді сильнішим скороченням [63]. Проте напевно можна сказати, що реалізація закону Франка-Старлінга незалежна від змін транскрипції ДНК. Експерименти проведені з додаванням блокатору синтезу білків – циклогексаміду – не впливали на реакцію серцевого м'яза на його розтягнення [64].

Франк-Старлінг також є енергоефективним процесом, що означає – в тканинах серця зберігається стабільне співвідношення АТФ, АДФ, фосфату та креатинфосфату навіть якщо кількісний обіг цих молекул зростає більш як в 4 рази [65,66]. Метаболічний гомеостаз зберігається в межах фізіологічних навантажень. Якщо навантаження стають понаднормовими баланс концентрацій метаболітів порушується [67]. Через щільну компартменталізацію кардіоміоцитів постачання АТФ і кальцієм потребують злагодженої роботи транспортерів та забезпечуються контактами між органелами та міозином. В підтриманні рівнів АТФ, АДФ та неорганічного фосфату беруть участь креатин-кіназа, аденілат-циклаза, аденін-нуклеотидний транспортер. Роль креатин-кінази – підтримання доступності і сталої концентрації фосфокреатину, АДФ та АТФ в місцях компартменталізації, оскільки креатин кіназа представлена як вільними так і мембран-асоційованими ізоформами [68]. Що надзвичайно важливо для забезпечення АТФаз міозину та SERCA енергетичними молекулами.

Для підтримання концентрації кальцію, необхідної для реалізації скорочення, необхідна робота кальцієвих каналів, таких як SERCA та  $K_{ATP}$ -залежних каналів [69]. Літературні дані свідчать, що  $K_{ATP}$ -залежні канали відкриваючись зменшують потік кальцію в клітину, тим самим відіграючи роль метаболічного сенсора [70]. Дослідник Жером Пікєро з командою

наводить в своїй статті узагальнюючу схему енергетичного обміну в м'язах під час скорочення Рис. 1.4.

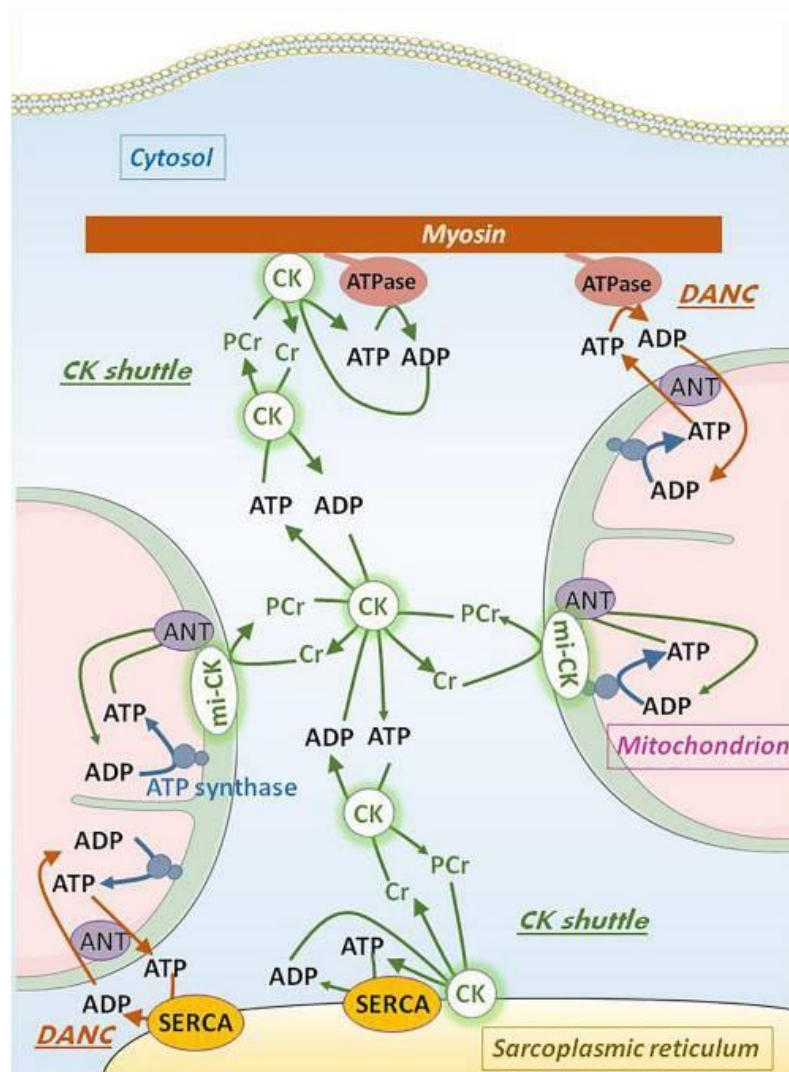


Рис. 1.4. Узагальнююча схема енергетичного обміну в м'язах під час скорочення [69]

Отже, для забезпечення енергоефективного збільшення сили скорочення у відповідь на зростання об'єму крові, що надходить в шлуночки серця, необхідна злагоджена робота всіх структур клітини. На канали, переносники та кінази впливають АФК, вторинні посередники та метаболіти і нашим завданням було дізнатись як саме змінюють ефективність реалізації закону Франка-Старлінга модифікації в шляхах перетворення цистеїну на глутатіон

та  $H_2S$ . Оскільки як глутатіон так і  $H_2S$  мають мішені, що беруть участь в зазначених процесах.

### **1.3. Механізми функціонування міокарду за умов ішемії-реперфузії**

В основі серцево-судинних захворювань часто лежить порушення окисно-відновного балансу. Ішемічно-реперфузійне пошкодження міокарда розвивається в випадку повного або часткового припинення кровотоку. Чим довший час ішемії, тим більший ступінь ураження тканин. Другу частину пошкодження завдає реперфузія – відновлення кровотоку в судинах [71]. Основним рушієм пошкодження клітин є АФК, вибухове утворення яких спричинює пошкодження білкових, ліпідних молекул, порушення клітинного метаболізму, продукції енергетичних молекул і провокує некроз [72].

Ішемічне пошкодження починається з браком кисню, роз'єднанням окисного фосфорилування та деполяризацією мембран мітохондрій [73]. Через відсутність кисню метаболізм клітин переходить з аеробного на анаеробний гліколіз, внаслідок чого накопичується лактат і знижується внутрішньоклітинний рН [74]. Для підтримання мембранного потенціалу мітохондрій АТФ-синтеза замість синтезу АТФ його використовує, внаслідок чого пул енергетичних молекул виснажується, а пул неорганічного фосфату зростає. Зниження рН сприяє активації іонного обміну  $Na^+/H^+$ - обмінником, що призводить до збільшення концентрації натрію в клітині [75]. Перевантаження натрієм запускає  $Na^+-Ca^{2+}$  обмінника в зворотній бік, що в результаті спричинює збільшення концентрації кальцію в клітині [76]. Збільшення концентрації кальцію в цитоплазмі впливає на міофібрили і збільшує кількість актин-міозинових містків, які, однак, не можуть роз'єднатись внаслідок низького рівня АТФ, що призводить до контрактури міокарда. Після відновлення кровотоку відновлюється надходження кисню в ішемізовану тканину. Це сприяє швидкому відновленню рН, поверненню до нормального напрямку роботи  $Na^+-Ca^{2+}$  обмінника. Однак збільшення кисню в тканинах призведе до вибухоподібного збільшення кількості АФК, що

спричинить пошкодження білків і ліпідів клітини, відкриття мітохондріальних пор транзиторної провідності (МРТР), порушення функції мітохондрій, пошкодження ДНК, м'язової контрактури [74].

Основними джерелами АФК в клітині наразі вважають нікотинамід (NADP), моноамін- та ксантинооксидази, ланцюг транспорту електронів в мітохондріях, неспряжену NOS [77]. Ксантинооксидаза в умовах нестачі кисню змінює свою активність на ксантинооксидоредуктазу. За відновлення надходження кисню знову використовує кисневий радикал як акцептор електронів. Цей процес додає в пул АФК супероксид та пероксид [78]. NADP-оксидази – це мультибілкові комплекси, що складаються з білків NOX та DUOX. В умовах ішемії підвищується експресія NOX і активність продукування ними супероксиду [79]. Під час ішемії HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor) стимулює їх експресію, збільшується кількість оксидаз в мембранах і зростає рівень продукованого ними супероксиду [79]. Активність NADP-оксидаз підвищують фосфоліпаза A2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  та ангіотензин II, що також активуються під час ішемії. Крім того, фосфоліпаза A, цитокіни та ангіотензин стимулюють розвиток запалення та ще більшу експресію NADP-оксидаз. Для продукції NO ферменти NOS повинні мати доступ до кофактора, тетрагідробіоптерину (BH<sub>4</sub>). Якщо доступність BH<sub>4</sub> знижується – NOS роз'єднується, і знижується продукція NO, зате зростає синтез супероксидного радикалу [80], а окислення BH<sub>4</sub> відбувається через збільшення концентрації АФК в клітині.

Таким чином, ефективність роботи систем антиоксидантного захисту, збереження цілісності органел клітини та продукції АТФ є основними завданнями в боротьбі з ішемічно-реперфузійним порушенням функції міокарду.

#### **1.4. Роль H<sub>2</sub>S в забезпеченні роботи міокарда за нормальних і патологічних умов**

Останнім часом активно досліджується сигнальна функція H<sub>2</sub>S як третього учасника родини газових трансмітерів разом з оксидом азоту та монооксидом карбону. Показано його дозозалежний вплив на організм – за малих концентрацій H<sub>2</sub>S проявляє нейромодуляторний [81], судино-розслаблюючий, цитопротекторний, протизапальний ефект, в більших концентраціях – є пошкоджуючим агентом. H<sub>2</sub>S впливає на метаболізм клітини як через участь у сигнальних шляхах, так і регулюючи її окисно-відновний стан. Він здатний взаємодіяти з активними формами NO, CO, впливати на пул глутатіонів, зміщуючи таким чином окисно-відновний баланс [82]. Взаємодіючи з нітропероксидами, продукт метаболізму H<sub>2</sub>S – персульфід здатний утворювати оксид азоту та проміжні сполуки. В той же час H<sub>2</sub>S впливає на активність ензимів антиоксидантного захисту, зокрема, на каталазу [83], супероксиддисмутазу [83], глутатіон редуктазу [84]. Персульфідация (сульфгідрилювання або S-сульфурування) посттрансляційна модифікація білків, що відбувається з вільними залишками сірки в активних центрах білкових молекул [85]. Сульфгідрильований залишок цистеїну в білковій молекулі перетворюється на більш реакційноздатну персульфідну [86].

Кожна з означених модифікацій може внести свій вклад як в фізіологічний процес, так і в розвиток патології. Так, сульфгідрилювання АТФ-синтази стимулює біоенергетичні процеси мітохондрій, а така модифікація Катф каналів та МЕК (mitogen activated protein kinase kinase) сприяє виживаності ракових клітин [87]. Хоча сульфгідрилювання МЕК має і позитивний ефект для здорових клітин – запускає процес відновлення пошкодженої ДНК. Показана здатність H<sub>2</sub>S інгібувати аутофагію [88]. H<sub>2</sub>S сприяє фосфорилуванню MAPK (mitogen-activated protein kinase), що в свою чергу інгібує mTOR, таким чином пригнічуючи процес аутофагії.

Для серцево-судинної системи важливими функціями  $H_2S$  є його взаємодія з системою NO, пероксидом, глутатіоновою системою і пов'язаними сигнальними і метаболічними шляхами. Показано, що  $H_2S$  сприяє розслабленню судин – аорти, ворітної вени та інших судин організму [89]. У спонтанногіпертензивних щурів нижча експресія та активність CSE і знижений вміст  $H_2S$  в плазмі [90]. У щурів з нокаутованим геном CSE розвивається гіпертонія, погіршується ангіогенез та загоєння ран. Це свідчить на користь припущення, що одним з факторів гіпертонії є нестача  $H_2S$  [91]. У мишей з делецією гена CSE показано розвиток гіпертонії та порушення ендотелій залежного розслаблення судин [91]. В тому ж дослідженні показано, що від присутності  $H_2S$  залежить місце фосфорилування eNOS і її активація чи інгібування. За нестачі  $H_2S$  активність eNOS знижувалась, знижуючи концентрації NO та сприяючи пошкодженню міокарда під час ішемії-реперфузії. Іншим дослідженням показано, що в присутності донора NO збільшується вироблення  $H_2S$  [92]. Однак, нітрозилування одного з ензимів утворення  $H_2S$ , CBS, навпаки, зменшує його активність [93]. CO теж діє на CBS інгібуюче, що призводить до зниження вмісту  $H_2S$  в тканинах [94]. Миші, нокаутні гомозиготи по гену CBS, живуть не довше 5 тижнів [95]. А недостатність по ензиму CSE може бути фактором розвитку гіпертонії. Показано, що в мишей з фенотипом  $CSE^{-/-}$  посилена проліферація гладенько-м'язових клітин в аорті [96]. Такі миші більш схильні до розвитку атеросклерозу, що коригувалось додаванням NaHS [97]. Показано, що сульфгідрилування eNOS запобігає її мономеризації, а отже, підтримує вироблення NO [98]. Підвищення рівнів NO стимулює активність розчинної гуанілатциклази і концентрацію цГМФ. Це в свою чергу активує протеїнкіназу G1, що приводить до розслаблення судин та ангіогенезу [99].  $H_2S$  інгібує фосфодіестеразу, що також стимулює збільшення концентрації цГМФ та цАМФ [100]. Це вкотре підкреслює важливість утворення  $H_2S$  для нормального функціонування судин.

$H_2S$  впливає на йонні канали, що призводить до зміни в функціонуванні серця. Регулювання насосної функції серця відбувається через пригнічення аденілатциклази, кальцієвих каналів L-типу, хлорних каналів, цитохром оксидази C, активацію Катф-залежних каналів, потенціал-залежних калієвих каналів тощо. І всі ці процеси взаємо пов'язані. Катф-залежні канали чутливі до впливу  $H_2S$  безпосередньо. Є свідчення, що молекула  $H_2S$  зв'язується як з Kir6.1, так і з SUR1 субодиницею  $K_{ATP}$ -залежних каналів [101]. Обидва варіанти призводять до гіперполяризації мембран і інгібування входження йонів кальцію в цитоплазму через  $Ca^{2+}$  канали L-типу [102], що призводить до зменшення сили скорочення і може бути одним з кардіопротекторних механізмів в умовах ішемії-реперфузії. Показано, що зниження концентрації  $H_2S$  знижує також і активність  $K_{ATP}$ -залежних каналів [103]. Можливо, саме через вищу експресію SUR субодиниці в аорті, вона більш здатна до розслаблення в відповідь на аплікацію  $H_2S$ . Так само інгібування хлорних каналів теж знижує тонус м'язів [104].  $H_2S$  також інгібує  $Na/H^+$  обмінник [105], що дозволяє уникнути перевантаження клітини кальцієм та порушення скоротливої функції.

Встановлено, що  $H_2S$  впливає на протеїнкіназу C, активує її і таким чином опосередковує зниження концентрації цитоплазматичного кальцію через активацію  $Ca^{2+}$ -уніпортера мітохондріальних мембран [106]. Присутність  $H_2S$  знижує фрагментованість ДНК шляхом зниження активності каспази-3. Зниження фосфорильовання p38, MAPK і JNK1/2, проапоптотичних білків та зниження транслокації цитохром оксидази C у цитозоль, підвищення фосфорильованості ERK1/2 і Akt сприяє блокуванню розвитку апоптозу [38,107]. Кінази ERK1/2 і Akt активують RISK шляхи, чиєю мішенню є в тому числі мітохондріальні пори транзиторної проникності (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) [108]. Їх відкриття призводить до викиду в цитоплазму метаболітів та цитохром оксидази C, що спричинює активацію апоптозу і швидку загибель клітини [109].

H<sub>2</sub>S активує ядерний транскрипційний фактор Nrf2, що приводить до утворення, серед інших, ензимів антиоксидантного захисту. [83] Це відбувається через модифікацію білка-інгібітора Keap1, що призводить до його убіквітинування. Убіквітинований Keap1 звільняє Nrf2, що транслокується до ядра, з'єднується з мотивом ARE (antioxidant responsive element), запускаючи транскрипцію генів, в яких цей мотив присутній. Такими генами є гени супероксиддисмутази, глутатіонредуктази [110], тіоредоксину [111] тощо, таким чином впливаючи на антиоксидантний захист організму. Крім того, H<sub>2</sub>S може бути субстратом для супероксиддисмутази (SOD), чим значно збільшує її дисмутазну активність [111]. SOD перетворює кисневий радикал на супероксид водню, який далі каталізують каталазою (CAT) або глутатіонпероксидазою.

Показано також, що синтез ендogenous H<sub>2</sub>S знижений у старих тварин [112], у яких також підвищена продукція АФК та АФН. Це супроводжується пошкодженням мембран клітин та зміною метаболізму і розвитку асоційованих з віком захворювань, в тому числі нейродегенеративних та серцево-судинних [113]. Окисні процеси в організмі призводять до накопичення окислених білків в вигляді включень, що спричинює певні захворювання. Наприклад накопичення білку ліпофусцину є маркером старіння [114]. АФК можуть спричинювати наробку дефектних або нестандартних білків, що не можуть адекватно метаболізуватись організмом, а тому накопичуються і ушкоджують структури, де це відбувається. Наприклад хвороба Альцгеймера спричинена накопиченням білка Аβ і призводить до розвитку нейродегенеративного процесу [113]. З розвитком окисного стресу також пов'язують такі нейродегенеративні захворювання як хвороба Хантінгтона, Паркінсона та синдром Дауна [115]. Всі ці стани намагаються коригувати за допомогою введення екзогенних та стимуляції ендogenous антиоксидантів, одним з яких виступає H<sub>2</sub>S.

Таким чином, H<sub>2</sub>S як газоподібний посередник та антиоксидант є



фактором кардіопротекції і надзвичайно важливою для організму молекулою. Його попередником є амінокислота L-цистеїн, а дія – дозозалежною та перетинається з іншими ключовими молекулами, такими як глутатіон чи оксид азоту.

### **1.5. Роль GSH в роботі міокарда за нормальних і патологічних умов**

Глутатіон може піддавати білкові молекули пост-трансляційній модифікації, впливати на метаболізм, фізіологічні та патологічні процеси. Глутатіон є кофактором для ряду ензимів, що реалізують антиоксидантний захист. Глутатіон пероксидази відновлюють пероксид водню до води і окислюють відновлений глутатіон до окисленого. Глутатіон трансферази використовують глутатіон для знешкодження ксенобіотиків та відновлення органічних гідропероксидів до спиртів. І все це завдяки активній -SH групі та стабільному гамма зв'язку у своїй структурі.

Показано, що в мишей з недостатністю глутатіонпероксидази відновлення функції серця після експериментального інфаркту відбувається значно гірше порівняно з контрольними тваринами [116]. При моделюванні серцевої недостатності також падала активність глутатіонпероксидаз [117]. Вміст GSH падає в тканинах серця на фоні інфаркту міокарда, що коригувалось введенням N-ацетил-цистеїну (NAC) [13]. NAC виступає прекурсором глутатіону, метаболізується до цистеїну і включається в синтез глутатіону. Показано, що введення NAC підвищує рівні глутатіону, збільшує співвідношення відновленого глутатіону до окисленого, знижує окисний стрес і покращує функцію серця в моделі серцевої недостатності мишей [13,14]. В мітохондріях сердець, підданих впливу ішемії-реперфузії, знижується вміст GSH, що може сприяти окисненню цитохром оксидази С і розвитку мітохондріальної дисфункції [118].

Глутатіонілюванню підлягають безліч молекул в клітинах. Ефект не завжди однаково спрямований. Глутатіонільована молекула може активуватись (SERCA2) або навпаки, виявитись заблокованою (UCP, АТФаза, піруватдегідрогеназа, альфа-кето-глутарат дегідрогеназа, аконітаза, сукциніл-СоА трансфераза). Відомо, що глутатіонілювання ендотеліальної NO-синтази призводить до її неспряження та перемикання ензиму з продукції NO на продукцію супероксиду [119]. Поки що не з'ясовано, яка роль такої модифікації. Припускають, що глутатіонілювання може не лише захищати ензим від окиснення, але й стимулювати продукцію АФК як сигнальних молекул. Проте поєднання глутатіону та пероксинітриту створює сполуку S-нітрозоглутатіон, що є донором оксиду азоту і значно підвищує доступність NO, коригуючи гіпертонію в старших людей [120]. Ця сполука виступає аналогічним до S-нітрозотіолу донором NO через посередництво супероксиддисмутази. GSH також є відновником активного сайту Cu-SOD, яка метаболізує нітрозоглутатіон з утворенням NO [121]. Таким чином підтримується здатність м'язів до розслаблення.

Показано, що вміст GSH знижується у людей з гіпертонією [120]. Припускають, що вміст GSH в еритроцитах може бути діагностичним показником в людей з нелікованою гіпертонією [122]. Активність ензимів глутатіонової системи – глутатіон редуктази та пероксидази – теж знижується в пацієнтів з артеріальною гіпертонією. Тобто в випадку гіпертонічної хвороби на фоні зростання АФК знижується активність антиоксидантного захисту, зростає окисне пошкодження компонентів клітини, і це може бути терапевтичною мішенню. Антигіпертензивна терапія в літніх людей підвищувала рівні глутатіону [123]. Це ще раз показує важливість антиоксидантних систем для забезпечення функціонування серцево-судинної системи.

Вміст відновленого глутатіону в нейронах знижується під час ішемії. H<sub>2</sub>S сприяє збереженню рівня глутатіону, захищаючи таким чином клітини

від пошкоджень. Механізм полягає у взаємодії з каналом  $X_{A,G^-}$ , що транспортує цистеїн в цитоплазму, роблячи доступним синтез глутатіону *de novo* та активації каналу транспорту глутатіону в мітохондрію [84]. Ці дані підтверджено в експериментах з дослідженням стріатума, гіпокампа та деяких інших структур мозку.  $H_2S$  також підвищує продукцію глутатіону, активуючи каталітичну субодиницю глутамат-цистеїн-лігази [124]. Введення S-аліл-L-цистеїну теж збільшувало концентрацію глутатіону в мітохондріях мозку [125].

Узагальнені дані з літературних джерел щодо ефектів глутатіону, що оглянуті в цьому розділі, представлені на Рис. 1.5.

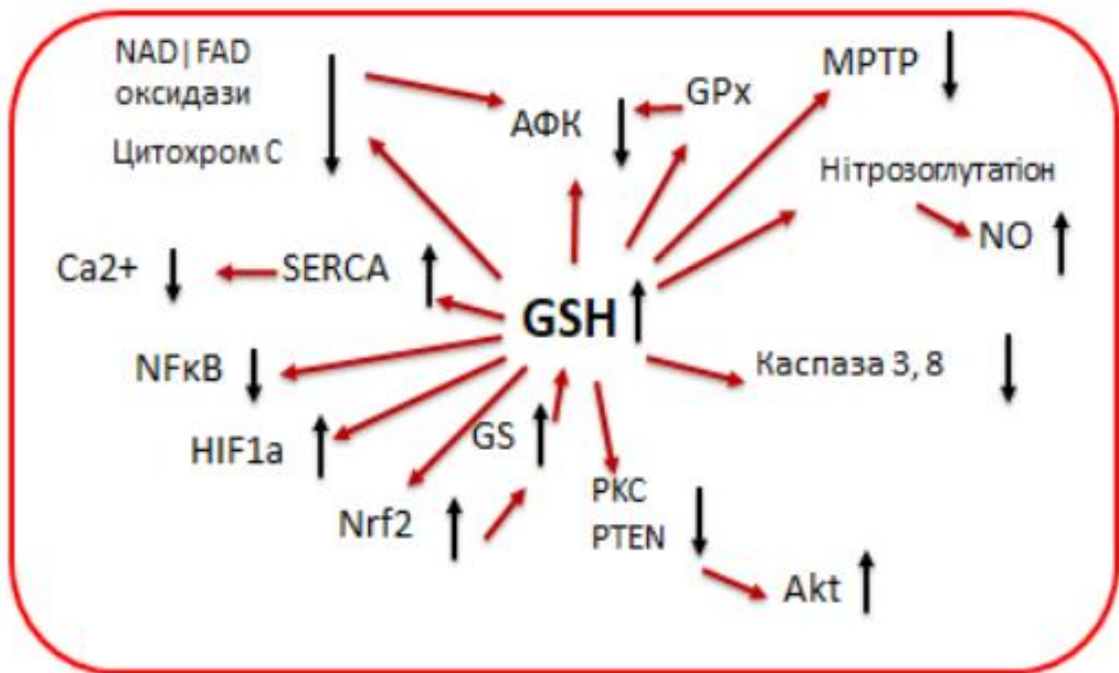


Рис.1.5. Узагальнена схема впливу глутатіону.

Вищенаведені дані свідчать, що робота серцево-судинної системи та її здатність витримувати навантаження залежить від злагодженої дії багатьох

компонентів. Одним з ключовим в відповіді на стрес є антиоксидантна система. Вагомий вклад в її функціонування вносить глутатіон. Він одним з перших реагує на розвиток окисного стресу, вступає в реакцію з окисними агентами та стає на захист білкових молекул. Тому дуже важливо розуміти, як можна стимулювати роботу глутатіонової системи. Попередником синтезу GSH є L-цистеїн, він має деякі кардіопротекторні впливи сам по собі, але як попередник синтезу GSH він значно цікавіший для подальших досліджень. Стимулювання ендогенного синтезу антиоксиданта GSH забезпечить більш стабільну його присутність в тканинах, кращу біодоступність GSH як кофактора для ензимів тощо. А отже ефективніше використання GSH організмом.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

**2.1. Методичні підходи.** В даній роботі було використано фізіологічні та біохімічні методи досліджень, що дозволило отримати інформацію про внесок різних шляхів метаболізму L-цистеїну як в реакціях серця на навантаження об'ємом, так і на відновлення функції серця в умовах ішемії-реперфузії. В роботі вивчалась залежність тиску від об'єму в лівому шлуночку ізольованого серця щура як модель функціонального навантаження, і робився висновок про реалізацію закону Франка-Старлінга. Крім того моделювали ішемію-реперфузію міокарда, яка характеризується посиленою генерацією АФК, порушенням реалізації скоротливої функції серця, пошкодженням цілісності мембран тощо. В таких умовах ми досліджували, як модуляція різних шляхів метаболізму L-цистеїну впливає на функцію серця, окисний стрес та синтез глутатіону.

**2.2. Експериментальні тварини.** Експерименти проводили у відповідності до Директиви 2010/63/EU Європейського парламенту про захист тварин, що використовуються для наукових цілей (22.09.2010) та Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (редакція від 13.02.20). Використовували дорослих (6 місяців) самців щурів лінії Wistar, які утримувались на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця із вільним доступом до питної води, не більше 5 тварин у клітці.

**2.3. Протокол дослідження.** Узагальнений протокол дослідження схематично представлено на рисунку 2.1.

На першому етапі дослідження ми вивчали вплив різних шляхів метаболізму L-цистеїну на реалізацію закону Франка-Старлінга. Для цього ми блокували синтезу  $H_2S$  блокатором цистатіонін-гама-ліази пропаргілгліцином (PAG, 11,3 мг/кг); вводили L-цистеїн (121 мг/кг) як попередник синтезу глутатіону та  $H_2S$ ; блокували синтез глутатіону *de novo* використовуючи бутатіонунсульфоксимін (BSO, 22,2 мг/кг), блокатор гама-глутамілцистеїнліази. Хімічні речовини вводились внутрішньочеревинно, розчинені в воді для ін'єкцій об'ємом 0,4 мл.

Дослідні групи були наступними:

- 1) контроль,
- 2) з введенням PAG за 40 хв до декапітації,
- 3) з введенням L-цистеїн за 30 хв до декапітації,
- 4) з введенням PAG+L-цистеїн за 40 та 30 хв до декапітації відповідно,
- 5) з введенням BSO за 40 хв до декапітації,
- 6) з введенням BSO+PAG+L-цистеїн за 41, 40 та 30 хв до декапітації відповідно.

В цих групах досліджувались показники скоротливої активності міокарда ізольованого серця за умови дозованого збільшення об'єму в лівому шлуночку.

На другому етапі досліджень вивчали різні шляхи метаболізму L-цистеїну на відновлення функції серця в реперфузійний період.

Дослідні групи були наступними:

- 1) контроль (n=7),

- 2) з введенням PAG за 40 хв до декапітації (n=4),
- 3) з введенням L-цистеїн за 30 хв до декапітації (n=6),
- 4) з введенням PAG+L-цистеїн за 40 та 30 хв до декапітації відповідно (n=5),
- 5) з введенням BSO+PAG+L-цистеїн за 41, 40 та 30 хв до декапітації відповідно (n=8).

В цих групах досліджувались показники скоротливої активності міокарда ізольованого серця та кисневого метаболізму тканин серця за умови тотальної ішемії 20 хвилин з наступною реперфузією 40 хвилин (Рис. 2.1).



Рис. 2.1. Схематичне зображення протоколу першого (моделювання навантаження серця об'ємом) та другого (моделювання ішемі-реперфузії) етапів дослідження.

На третьому етапі ми досліджували біохімічні показники тканин сердець в дослідних групах з виразним ефектом.

Такими групами стали:

- 1) контроль (n=7+8),
- 2) I/R<sub>10</sub> – 20 хвилин тотальної ішемії і 10 хвилин реперфузії (n=10+7),

- 3) з введенням PAG+L-цистеїн за 40 та 30 хв до декапітації відповідно, 20 хвилин перфузії (n=5),
- 4) з введенням PAG+L-цистеїн за 40 та 30 хв до декапітації відповідно, 20 хвилин перфузії (n=7),
- 5) з введенням BSO+PAG+L-цистеїн за 41, 40 та 30 хв до декапітації відповідно, 20 хвилин перфузії (n=6),
- 6) з введенням BSO+PAG+L-цистеїн за 41, 40 та 30 хв до декапітації відповідно, 40 хвилин ішемії і 10 хвилин реперфузії (n=6).

Тканини сердець тварин дослідних груп брались для біохімічних досліджень. Досліджували зміни рівнів супероксидного аніон-радикалу ( $O_2^{\cdot-}$ ),  $\cdot OH$ -радикалу, пероксиду водню ( $H_2O_2$ ) і малонового діальдегіду як маркерів окисного стресу. Визначали активність NO-системи за рівнем активності конститутивної та індукцйбельної NOS. Визначали активність аргінази та нітратредуктази для розуміння ефективності реутилізації NO. Також в гомогенатах сердець визначались концентрації відновленого та окисленого глутатіонів.



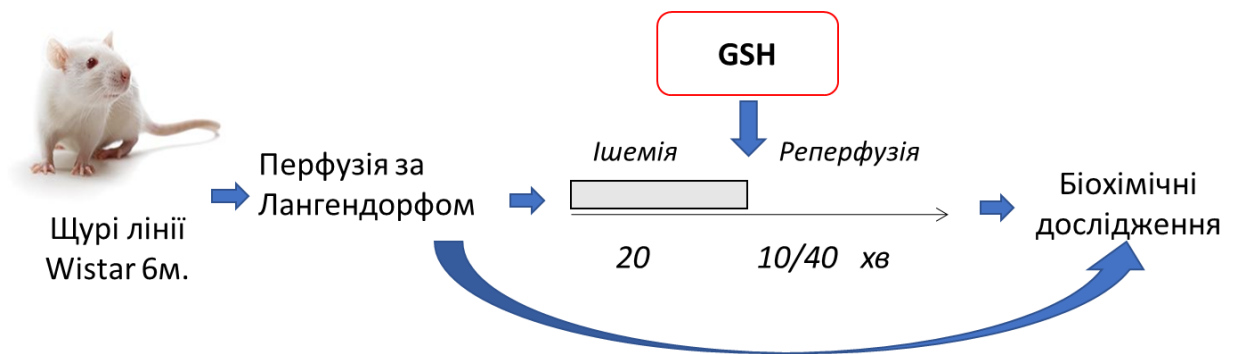


Рис. 2.2. Схематичне зображення протоколу третього етапу дослідження.

Четвертим етапом стало дослідження (Рис. 2.2.) впливу екзогенного глутатіону (Гепавал, Лаб. Італьяно Біокіміко Фарма Лісафарма С.П.А. для «Валартін Фарма», Італія/Україна) на відновлення функції серця в умовах ішемії реперфузії. Для цього екзогенний глутатіон 10 мг/л розчиняли в перфузуючому розчині і подавали в коронарні судини в період реперфузії. Для вивчення накопичення екзогенного глутатіону в тканинах серця, глутатіон в дозі 52 мг/кг вводили внутрішньоочеревинно за 10 хв та за 30 хв до декапітації.

**2.4. Перфузія коронарних судин за методом Лангендорфа і реєстрація показників кардіодинаміки ізольованого серця.** Після декапітації серця вилучали шляхом розтину грудної клітки і швидко поміщали в попередньо охолоджений до 4°C розчин Кребса-Хензеляйта. Серце за аорту підвішували до канюлі, діаметр якої відповідав діаметру аорти, препарували від перикарду, легень та сполучної тканини. Перфузію коронарних судин здійснювали ретроградно в умовах постійного тиску (75-80 мм рт.ст.) при температурі 37°C розчином наступного складу (у мМ): NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO<sub>4</sub> – 1,2; NaHCO<sub>3</sub> – 24; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; глюкоза – 10; CaCl<sub>2</sub> – 2,5. Перфузійний розчин безперервно аерували газовою сумішшю –

карбогеном (95% O<sub>2</sub> і 5% CO<sub>2</sub>). Тиск у порожнині лівого шлуночка (T<sub>лшл</sub>) та швидкість його зміни dP/dt<sub>max</sub> і dP/dt<sub>min</sub>, кінцевий діастолічний тиск (КДТ) вимірювали за допомогою латексного балончика, введеного в порожнину лівого шлуночка та з'єднаного з тензодатчиком 746 („Мінгограф-82”, Елема, Швеція).

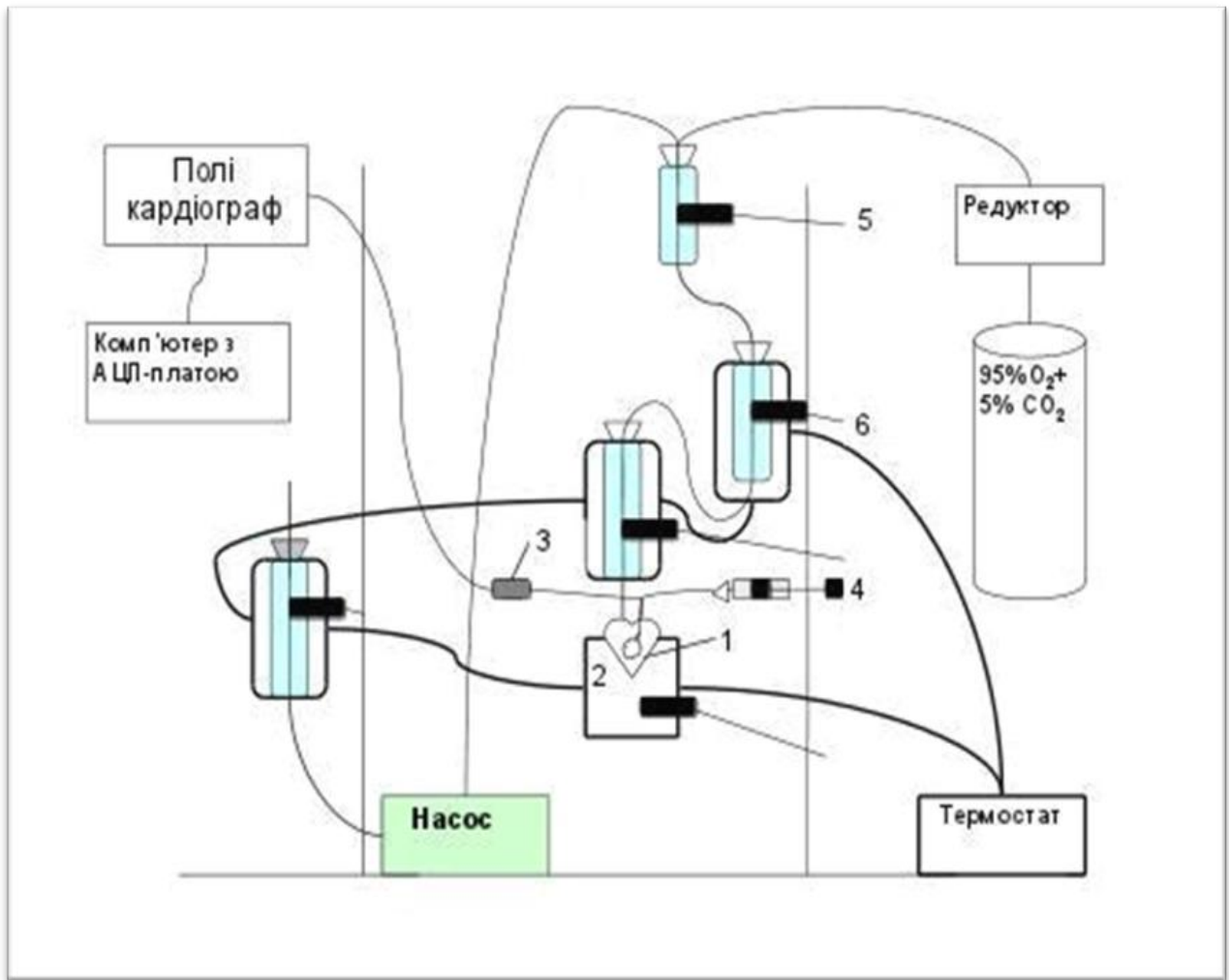


Рис. 2.3. Схема установки для перфузії ізолюваного серця за методом Лангендорфа: 1 – ізолюване серце; 2 – колба для обігріву серця; 3 – тензодатчик для вимірювання тиску; 4 – шприц, що регулює об'єм балончика в лівому шлуночку; 5 – колба, куди надходить газ; 6 – резервуар з перфузуючим розчином, насичений киснем.

Реєстрація даних параметрів на ПК здійснювалась за допомогою програмного забезпечення Global Lab, у вигляді кривих тиску в лівому шлуночку та його першої похідної, які використовувалися для оцінки скоротливої активності міокарда ізольованого серця (Рис.2.3.). В легеневий стовбур вставляли катетр і вимірювали коронарний потік (КП) за допомогою мірних пробірок: визначали об'єм перфузійного розчину, що проходив через серце за хвилину. Підраховували частоту серцевих скорочень за хвилину (ЧСС).

Для розрахунку артеріо-венозної різниці реєстрували напругу кисню у пробах розчину, що притікав і відтікав від серця, за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk-2 Radiometer, Copenhagen. Споживання кисню розраховували як добуток артеріо-венозної різниці і КП. Кисневу вартість роботи серця (КВ) вираховували за рівнянням Нілі [2], інтенсивність скоротливої функції серця (ІСФ) розраховували як добуток тиску у лівому шлуночку на ЧСС.

Залежність тиску в лівому шлуночку від об'єму оцінювали шляхом дозованого навантаження серця об'ємом, збільшуючи об'єм балончика у лівому шлуночку з кроком в 34 мкл за допомогою мікрогвинта. Будували криві залежності  $T_{\text{шлп}}$  і КДТ від об'єму.

Моделювання ішемії–реперфузії здійснювали шляхом повного припинення перфузії коронарних судин протягом 20 хвилин. Підчас ішемії температуру сердець підтримували шляхом занурення їх у перфузійний розчин ( $t=37^{\circ}\text{C}$ ). Зміни досліджуваних показників реєстрували протягом 40 хвилин подальшої реперфузії.

## **2.5. Метод кількісного визначення вмісту глутатіонів відновленого та окисленого в тканинах сердець.**

Вимірювання вмісту окисненого і відновленого глутатіонів проводили з використанням реактиву Еллмана за протоколом ензиматичного кількісного визначення вмісту глутатіонів [126]. Серця промивали в холодному (+4°C) 0,9% розчині KCl, очищували від сполучної тканини, зважували та гомогенізувались в буфері для виділення, який готували на 0,1 М калій-фосфатного буферу (KPE) з додаванням 5мМ ЕДТА при рН=7,5, 0.1% тритон X-100 та 0.6% сульфосаліцилової кислоти. Співвідношення буферу для виділення та тканини становило 1:9. Гомогенати центрифугували в ультрацентрифузі (Allegra X-22R, Beckman Coulter, США) за температури +2-4°C, 8000g 10 хвилин. Далі надосад розаліквочувався в чисті мікроцентрифужні пробірки. Аліквота, призначена для вимірювання вмісту відновленого глутатіону, негайно поміщалась в морозильну камеру. До аліквоти, призначеної для вимірювання вмісту окисненого глутатіону, додавали 2-вінілпіридин, перемішували, за годину додавали триетаноламін, перемішували та поміщали в морозильник. Вимірювання проводили з використанням мікропланшетного спектрофотометра Biosan HiPo MPP-96 (Литва) за довжини хвиль 405 нм. В комірку додавали зразок, глутатіонредуктазу, її кофактор β-НАДФН, дітіобіснітробензоєву кислоту. Вимірювання проводили протягом 2 хвилин кожні 30 секунд. Результат вираховували відносно калібрувальних кривих з використанням рівняння лінійної регресії, отриманого з калібрувальної кривої, побудованої по стандартах відновленого та окисненого глутатіонів. Дані представляли в мкМ на грам досліджуваної тканини.

## **2.6. Визначення концентрації білка за методом Лоурі**

Принцип метода базується на колориметричному визначенні продуктів відновлення фосфорномолібденового-фосфорновольфрамowego реагента Фоліна мідно-білковим комплексом. Готували наступні розчини:

Реактив I: 2%-ний розчин  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в 0,1N NaOH.

Реактив II: 0,5%-ний розчин  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 1%-ному розчині цитрату натрію.

Реактив III: суміш реактивів I і II у співвідношенні 9:1.

Досліджуваний зразок об'ємом 0,1 мл доводили бідистильованою водою до 1 мл, додавали 10 мл реактива III і залишали на 15 хв при кімнатній температурі. Потім додавали 1 мл реактиву Фоліна, ретельно перемішували і залишали на 30 хв. За допомогою фотоколориметра здійснювали вимірювання екстинції при  $\lambda=750$  нм. Концентрацію білку визначали по калібрувальній кривій.

## 2.7. Вивчення показників окисного метаболізму в тканинах серця.

Інтенсивність окисного метаболізму у гомогенатах сердець щурів оцінювали за зміною швидкості генерації нестабільних активних форм кисню – супероксидного аніон-радикалу ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) і  $\cdot\text{OH}$ -радикалу. А також за рівнем присутності пероксиду водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) і кінцевого продукту перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) – малонового діальдегіду.

*Швидкість генерації супероксид-аніону ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )* визначали за окисненням цитохром оксидази С. Для цього у тріс-НСІ буфері (10 мМ) при 37°C, рН=7,4, проби інкубували при 37°C, рН=7,4 протягом 30 хв при  $\lambda=550$  нм. Вміст  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , генерованого пробами підчас інкубації, визначали за коефіцієнтом молярної екстинції  $\lambda=21\ 000$  моль<sup>-1</sup>\*см<sup>-1</sup>. Екстинцію розчину вимірювали при 550 нм [94].

Для визначення *швидкості генерації гідроксильного радикалу ( $\cdot\text{OH}$ )* готували інкубаційну суміш у складі (у мМ): дезоксирибоза – 20;  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 1; натрій-фосфатний буфер – 20, рН=7,4. Вміст білка в пробі гомогенату тканини складав 100-250 мкг. Пробу інкубували при 37°C протягом 60 хв, додавали 0,5 мл 1% розчину тіобарбітурової кислоти в розчині NaOH (50мМ)

і 0,5 мл 2,8% розчину трихлороцтової кислоти. Отриману суміш витримували на водяній бані 20 хв, охолоджували та реєстрували величину екстинції при  $\lambda=532$  нм. Кількість  $\cdot\text{OH}$ -радикалу, що генерувалась при цьому виражали в умовних одиницях  $\Delta E \cdot 10^2$  за 60 хв на 1 мг білка проби.

Для визначення вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$  аліквоти проб в гомогенатах тканин (100-250 мкг білку) додавали в кварцеву кювету, що містила 2мл розчину KJ (1M), надлишок лактопероксидази (50 нМ) в фосфатному буфері (0,005M, pH=7,33). Фіксували швидкість зміни екстинції проб при  $\lambda=353$  нм. Вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$  виражали в пікомолях на 1 мг білка, використовуючи його коефіцієнт молярної екстинції  $\lambda=26\ 000$  моль $^{-1}$ \*см $^{-1}$ .

Вміст малонового діальдегіду (МДА) визначали так: до аліквот проб додавали 0,5 мл 1% розчину тіобарбітурової кислоти в 50 мМ NaOH і 0,5 мл 2,8% розчину трихлороцтової кислоти. Отриману суміш витримували 20 хв на киплячій водяній бані, охолоджували і визначали спектрофотометрично при величині екстинції 532 нм.

**2.8. Оцінка показників, що характеризують систему синтезу оксиду азоту.** Інтенсивність *de novo* генерації NO оцінювали, визначаючи активність різних ізоформ NO-синтаз: кальційнезалежної iNOS та кальційзалежної cNOS за утворенням цитруліну, вмісту нітрит-аніону ( $\text{NO}_2^-$ ) і нітрат-аніону ( $\text{NO}_3^-$ ). Активність сумарної NOS визначали за вмістом новоутвореного нітрит-аніону колориметричним методом. Інкубаційна суміш складалась з 50 мМ фосфатного буфера (pH 7,4), 1,25 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1мМ НАДФН, 1 мМ L-аргініну. Для визначення iNOS в інкубаційну суміш замість  $\text{CaCl}_2$  додавали 0,1 мМ ЕДТА. Розрахунок активності cNOS проводили шляхом віднімання від показника сумарної NOS показник активності iNOS.

Інтенсивність реутилізаційного синтезу NO оцінювали, визначаючи нітратредуктазну активність за змінами вмісту нітрат-аніону в інкубаційному

середовищі в присутності надлишку NADH. Аргіназну активність, що є конкурентною до NO-синтази визначали спектрофотометричним методом [13]. Цитрулін, що є продуктом різних NO-синтаз і утворюється одночасно з NO, тим самим виступаючи маркером генерації останнього, визначали чутливим спектрометричним методом.

## **2.9. Методи статистичного аналізу**

Статистичну обробку та візуалізацію отриманих експериментальних даних проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel. Всі дані виражалися у вигляді середнього  $\pm$  стандартна похибка (DS). Для перевірки нормальності розподілу даних використовували критерій Шапіро–Уїлка. У випадку нормального розподілу використовували критерій Стюдента, а для виявлення відмінностей між кількома незалежними групами даних – дисперсійний аналіз (ANOVA) з поправкою Тукі. У випадку непараметричного – використовували критерій Манна–Уїтні (U-тест) або критерій Крускала-Воліса. Вірогідними вважали зміни при  $P < 0,05$ .

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Вплив L-цистеїну та модуляції його метаболізму на реакцію серця на навантаження

Ми моделювали реалізацію закону Франка-Старлінга на ізольованих за методом Лангендорфа серцях. Результати цього тесту свідчать про витривалість серця до навантажень об'ємом, що ледь не щодня відбувається впродовж життя. Зважаючи на те, на який об'єм міокард може відповісти збільшенням сили скорочення без розвитку контрактури, можна сказати про функціональні резерви міокарду – на скільки серце велике здатне витримати навантаження.

Раніше було показано, що донор  $H_2S$   $NaHS$  значно покращує реалізацію закону Франка-Старлінга [127]. Ми припустили, що модуляція шляхів метаболізму L-цистеїну, як попередника синтезу  $H_2S$  і глутатіону, може стимулювати скоротливу активність міокарда ізольованого серця щурів за умов навантаження об'ємом. Для цього щурам вводили інгібітор CSE – PAG, L-цистеїн або їх комбінацію.

В контрольній групі  $T_{\text{шлп}}$  зростав до досягнення об'єму балончика в 100 мкл. Плато  $T_{\text{шлп}}$  в приблизно 133 мм.рт.ст трималось до досягнення об'єму в 175 мкл. В групі з введенням PAG  $T_{\text{шлп}}$  зростав починаючи з 135 мкл до 170 мкл об'єму балончика в лівому шлуночку серця, що було достовірно вище ніж в контрольній серії (усі  $P < 0,05$  порівняно з контролем) (Рис. 3.1). Подальше збільшення об'єму балончика не давало приросту сили скорочення. Група з попереднім введенням L-цистеїну продемонструвала поступове наростання  $T_{\text{шлп}}$ . Значне збільшення  $T_{\text{шлп}}$  спостерігалось при об'ємі балончика 170 мкл, 200 мкл і 235 мкл (усі  $P < 0,01$  порівняно з контролем).



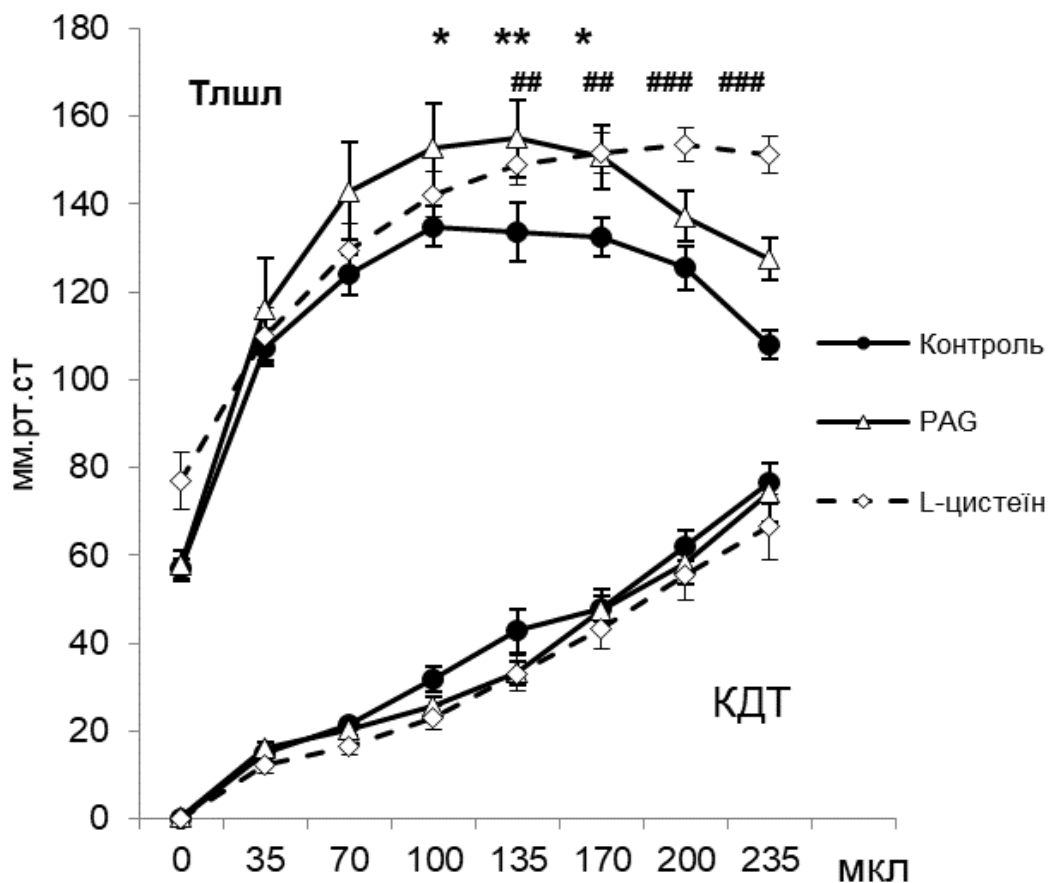


Рис. 3.1. Вплив навантаження об'ємом на тиск, що розвиває лівий шлуночок ( $T_{лшл}$ ) та кінцевий діастолічний тиск (КДТ) ізолюваного серця щурів під впливом попереднього введення PAG, L-цистеїну. Дані представлені як середні значення  $\pm$  DS. Порівняння між групами проводили за допомогою тесту Крускала-Воліса з подальшим використанням критерію Манна-Уїтні.

\* різниця порівняно з контролем, # різниця між L-цистеїном та контрольною групою.

Для виявлення ефекту L-цистеїну, незалежного від продукції  $H_2S$ , вивчали введення PAG у комбінації з L-цистеїном. PAG + L-цистеїн продемонстрував виражений інотропний ефект (Рис. 3.2.), суттєво збільшуючи  $T_{лшл}$ , починаючи з 70 мкл доданого об'єму. При об'ємі балончика в 135 мкл  $T_{лшл}$  становив  $154 \pm 5,2$  мм рт.ст. у групі PAG + L-

цистеїн ( $133,6 \pm 6,7$  мм рт.ст. у контролі,  $P < 0,01$ ) і залишався таким до 235 мкл ( $127 \pm 4,7$  мм рт.ст. у групі PAG,  $P < 0,05$ ;  $108 \pm 3,4$  мм рт.ст. у контролі,  $P < 0,001$ ). Істотних змін кривих КДТ між усіма групами не спостерігалось; однак серця з групи PAG + L-цистеїн демонстрували меншу жорсткість – найменший приріст КДТ під час навантаження об'ємом.

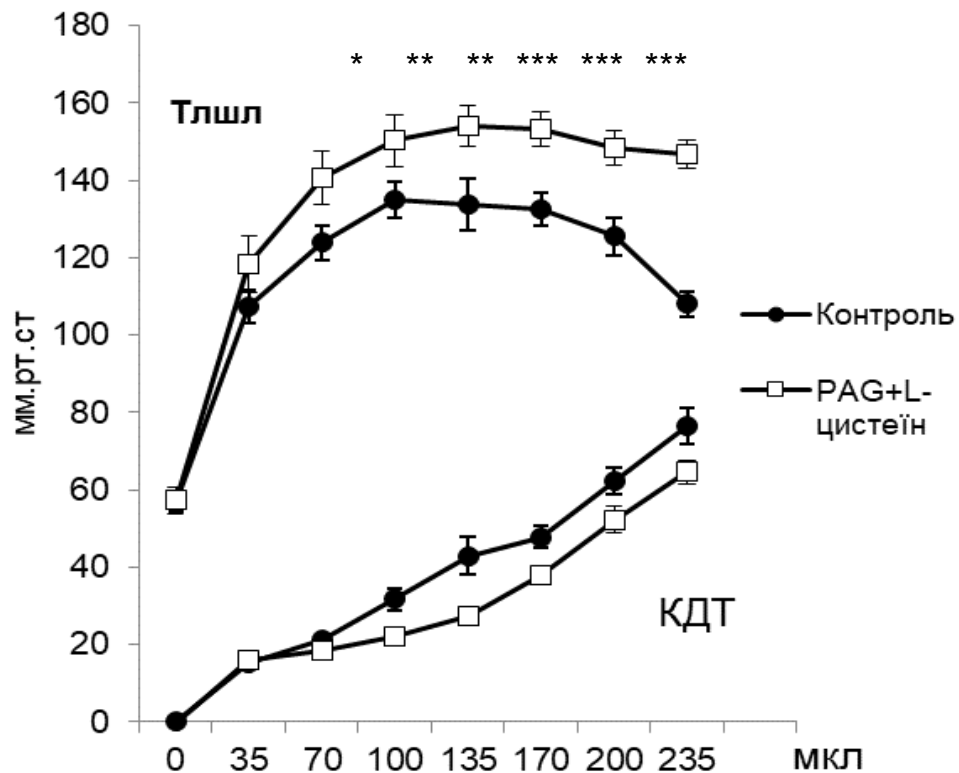


Рис. 3.2. Вплив навантаження об'ємом на тиск, що розвиває лівий шлуночок ( $T_{лшл}$ ) та кінцевий діастолічний тиск (КДТ) ізольованого серця щурів під впливом попереднього введення PAG + L-цистеїну. Дані представлені як середні значення  $\pm$  DS. Порівняння між групами проводили за допомогою тесту Крускала-Воліса з подальшим використанням критерію Манна-Уїтні. \* різниця порівняно з контролем, # різниця між L-цистеїном та контрольною групою.

Таким чином, комбінація PAG та L-цистеїну продемонструвала кумулятивний інотропний ефект обох сполук, збільшуючи приріст  $T_{\text{шлл}}$  на початку навантаження об'ємом лівого шлуночка та подовжуючи плато кривої  $T_{\text{шлл}}$ .

Механізмів реалізації позитивного інотропного ефекту введення PAG + L-цистеїну може бути декілька. Перший – при інгібуванні цитозольного ензиму синтезу сірководню PAG ця функція лягає на мітохондріальну синтазу. Експериментально показано, що другий цитозольний ензим – CBS – в серцево-судинній системі представлений в невисоких концентраціях, порівняно з CSE та MPST [128]. Тому ми припускаємо, що в нормальних умовах компенсацію синтезу сірководню під час фізіологічного навантаження забезпечує мітохондріальна синтаза сірководню MPST.

Другий можливий варіант – NO, як основний гравець в процесі реалізації закону Франка-Старлінга. З літератури відомо, що одним з основним вазорелаксантами є NO. Різні форми NO синтаз мають різну локалізацію і ефект на функцію серця в нормі та в патологічних умовах. Навантаження об'ємом є фізіологічним процесом, що в нормі не викликає патологічних змін в організмі. Синтез NO є необхідною умовою для реалізації розслаблення після скорочення. Показано, що в присутності донорів NO міофіламенти здатні збільшувати свою довжину в  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежний спосіб. NO активує  $\text{Ca}^{2+}$  накопичення ЕПР, що також знижує силу скорочення міофіламентів. Таким чином збільшується здатність до розслаблення кардіоміоцитів [129]. В нашому випадку, ми заінгібували цитозольний синтез  $\text{H}_2\text{S}$ , тому можливо, що зменшення концентрації  $\text{H}_2\text{S}$  компенсував NO.

Третій варіант, це участь глутатіону в регуляції реалізації закону Франка-Старлінга. Оскільки ми ввели інгібітор цитозольного синтезу  $\text{H}_2\text{S}$ , але додали L-цистеїн. Ця амінокислота виступає попередником синтезу

глутатіону. Тому заблокувавши синтазу сірководню CSE яка використовує L-цистеїн як субстрат, він став доступніший для синтезу глутатіону.

Для оцінки ролі глутатіону у відповіді серця на навантаження щурам вводили BSO, інгібітор першого і лімітуючого ензиму синтезу глутатіону [130].

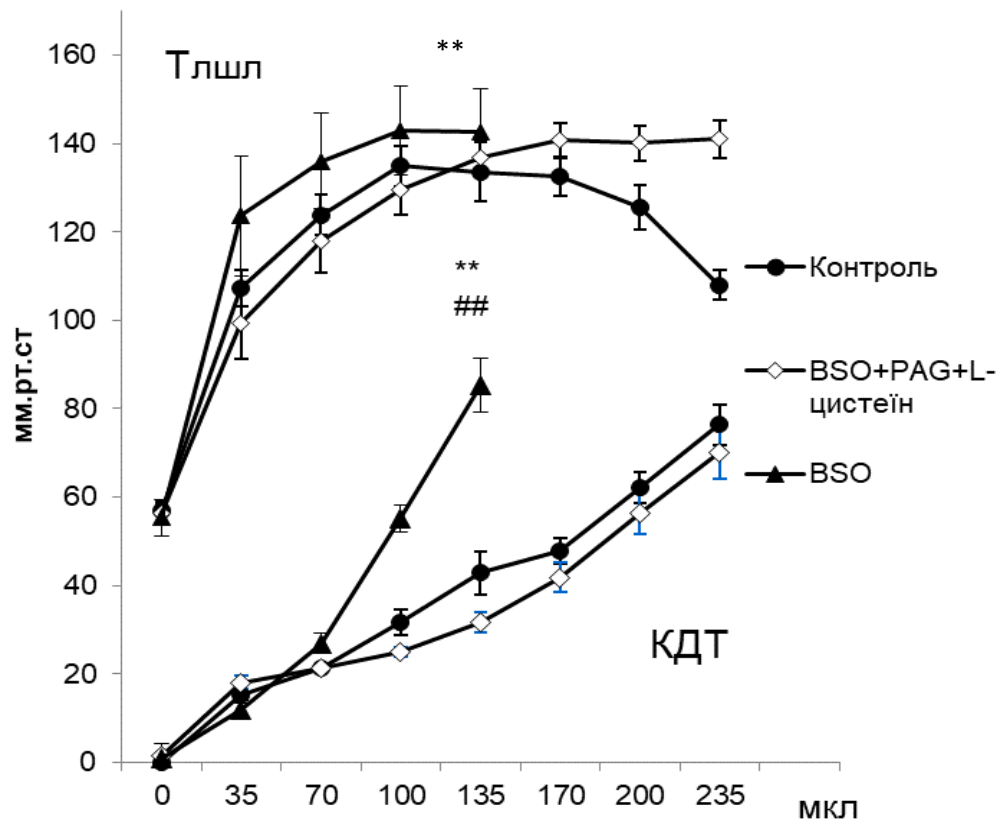


Рис. 3.3. Вплив навантаження об'ємом на тиск, що розвиває лівий шлуночок ( $T_{лшл}$ ) та кінцевий діастолічний тиск (КДТ) в ізольованому серці щурів. Значення виражаються як середні значення  $\pm$  DS. Порівняння між групами проводили за допомогою тесту Крускала-Воліса з подальшим використанням критерію Манна-Уїтні

( $n \geq 5$  в групі, \*\*  $P < 0,01$  порівняно з контролем, ##  $P < 0,01$  порівняно з групою з введенням комбінації BSO + PAG + L-цистеїн)

У групі, з попереднім введенням BSO,  $T_{\text{шл}}$  не суттєво відрізнявся від контрольних значень і становив в середньому  $142 \pm 10,0$  мм рт.ст. при 135 мкл доданого об'єму (Рис. 3.3). Однак крива КДТ різко зростала зі збільшенням навантаження серця об'ємом: при 135 мкл об'єму балончика КДТ в середньому становив  $85,4 \pm 6,0$  мм рт. Це свідчило про втрату еластичності міокардом в умовах інгібування синтезу глутатіону.

Введення PAG + L-цистеїну на тлі BSO показало значне покращення функції серця порівняно з групою BSO. Реєстрували не тільки подовження плато кривої  $T_{\text{шл}}$ , але й збереження сили розслаблення. Ці дані підтверджують припущення про участь глутатіону в покращенні еластичності міокарда після введення PAG + L-цистеїну. А також свідчать, що внесок мітохондріального  $H_2S$  може бути так само вагомим.

Ми виявили, що L-цистеїн в експериментах з навантаження об'ємом на моделі ізольованих за Лангендорфом сердець щурів стимулював скорочувальну активність міокарда. Це показано в серіях з введенням екзогенного L-цистеїну, так і за умови блокування його перетворення на  $H_2S$ , в групі з введенням PAG. Застосування PAG+L-цистеїну значно покращувало функціональні резерви міокарда. При цьому введення PAG окремо давало сильний, але короткий стимулюючий ефект, можливо, тому що власний пул L-цистеїну швидко вичерпувався на синтез глутатіону. Введення BSO скасовувало інотропний ефект попереднього введення PAG + L-цистеїну. Таким чином, наші дані дозволяють припустити, що індукція синтезу глутатіону покращує реакцію Франка-Старлінга, збільшує функціональні резерви міокарду та сприяє збільшенню об'єму на який серце здатне відповісти збільшенням сили скорочення, зберігаючи здатність до розслаблення. А отже, за введення PAG + L-цистеїну серце здатне витримувати більше навантаження.

### **3.2. Вплив L-цистеїну та модуляції шляхів його метаболізму на відновлення функції серця та зміну кисневих показників міокарда без та в умовах ішемії-реперфузії.**

Одним з рушіїв реперфузійного пошкодження є вибухоподібне зростання концентрації АФК в клітинах. Відомо, що і L-цистеїн [12], і тим паче  $H_2S$  та GSH мають антиоксидантні властивості. Тому для дослідження впливу модуляції метаболізму L-цистеїну на відновлення функції серця в умовах ішемії-реперфузії дорослим щурам внутрішньочеревинно вводили L-цистеїн, як попередник синтезу, та інгібітори цитоплазматичного синтезу  $H_2S$  та GSH.

#### **3.2.1. Вплив L-цистеїну та модуляції шляхів його метаболізму на функціональний стан міокарда.**

Серця щурів перфузували за методом Лангендорфа при стабільному перфузійному тиску. Через 15-20 хв періоду стабілізації серця досягли функціонального «плато» із повторюваним значенням  $T_{\text{шлп}}$  та коронарного потоку. На початку кожного експерименту значення КДТ було встановлено в межах 2,5–5 мм.рт.ст. Таким чином, різницю в початкових значеннях показників кардіодинаміки між експериментальними групами можна розглядати як ефект хімічних речовин, що вводились тваринам до декапітації (таблиця. 1).

Введення L-цистеїну призводило до активації скоротливої функції міокарда. Збільшення тиску у лівому шлуночку супроводжувалася достовірним зростанням максимальної швидкості наростання і спадання тиску ( $dP/dt$ ) на тлі зменшення коронарного потоку на 21% ( $P<0,05$ ). Аналогічна динаміка спостерігалась у групі тварин з попереднім введенням PAG, але зміни  $T_{\text{шлп}}$  та коронарного потоку були вагомішими. Порівняно з контролем в групі з введенням PAG  $T_{\text{шлп}}$  зріс на 22% ( $P<0,05$ ),  $dP/dt_{\text{max}}$  зріс на

23% ( $P < 0,05$ ) без змін в величині  $dP/dt_{min}$ . В цій групі також ще більше знизився коронарний потік – на 34% порівняно з контролем ( $P < 0,01$ ).

Таблиця 1

**Вплив внутрішньочеревинного введення L-цистеїну та його комбінацій з блокаторами синтезу сірководню і глутатіону на початкові показники функціонального стану ізольованого серця щурів**

	<b>Контроль (n=7)</b>	<b>L-цистеїн (n=6)</b>	<b>PAG (n=4)</b>	<b>PAG+L- цистеїн (n=5)</b>	<b>BSO+PAG + L- цистеїн (n=8)</b>
<b><math>T_{лшл}</math>, мм.рт.ст</b>	100±3,7	117,2±4,2	122±10,4*	123,8±7,7*	85,3±10,2#
<b><math>dP/dt_{max}</math> мм.рт.ст <math>c^{-1}</math></b>	1455 ±93	1829 ±73*	1795 ±112*	1875 ±85**	1226 ±150##
<b><math>dP/dt_{min}</math> мм.рт.ст <math>c^{-1}</math></b>	1157±75	1475±64*	1384±25	1405±20*	927±78###
<b>Коронарний потік мл <math>xv^{-1}</math></b>	13,3 ±0,63	10,4 ±0,96*	8,8 ±0,63**	6,8 ±0,84**	7,8 ±0,97
<b>ЧСС уд. хв.</b>	188±17	189±13	168±30	153±15	178±26

\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  порівняно з контролем

#  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  порівняно з групою з введенням PAG + L-цистеїну

Максимальне зростання показників скоротливої функції міокарда спостерігалось при комбінованому введенні PAG та L-цистеїну. Майже на 24% зріс  $T_{\text{шшл}}$  порівняно з контрольною групою ( $P < 0,05$ ), зростання  $dP/dt_{\text{min}}$  на 22% ( $P < 0,05$ ) та майже на 29% відмічено зростання  $dP/dt_{\text{max}}$  ( $P < 0,01$ ). Однак коронарний потік в групі PAG + L-цистеїн також зменшився вдвічі порівняно з контрольною групою ( $P < 0,01$ ). Додавання інгібітора синтезу глутатіону до комбінації PAG + L-цистеїну призвело до повернення показників кардіодинаміки на рівень порівняний з контрольним, окрім величини коронарного потоку. Цей показник в групі BSO+PAG+L-цистеїн лишався майже вдвічі нижчим за значення контрольної групи (на 42%).

Ефективність споживання кисню міокардом ілюструють такі показники як киснева вартість роботи серця (КВ) та споживання кисню міокардом. Споживання кисню міокардом не зазнало достовірних змін з введенням BSO, PAG, L-цистеїн окремо та в зазначених комбінаціях. КВ роботи серця зменшилась на 20% у групі L-цистеїну порівняно з контролем, що підкріплює зростання  $dP/dt_{\text{min}}$  та  $dP/dt_{\text{max}}$  (Таблиця 2.). У групі PAG порівняно з контролем КВ знизилась на 30%. Значення КВ в групі PAG+L-цистеїн знизилось на 40%, що свідчить про більш ефективне використання кисню міокардом порівняно з контрольною групою. Однак цей ефект не спостерігався, коли тваринам попередньо вводили BSO.



Таблиця 2.

**Вплив внутрішньочеревинного введення L-цистеїну та його комбінацій з блокаторами синтезу сірководню і глутатіону на початкові показники кисневого метаболізму ізольованими серцями щурів**

<b>Споживання кисню</b> <i>мМ 200<sup>-1</sup> з<sup>-1</sup></i>	1,198 ±0,135	1,178 ±0,115	0,879 ±0,093	0,722 ±0,096*	0,942 ±0,139
<b>Киснева вартість роботи серця</b> <b>*10<sup>-6</sup>,</b> <i>мМ O<sub>2</sub> уд<sup>-1</sup> хв<sup>-1</sup></i>	1,09 ±0,12	0,868 ±0,035	0,768 ±0,065	0,65 ±0,075*	1,15 ±0,142#

\* P<0,05, порівняно з контролем

# P< 0.05, порівняно з групою з введенням PAG + L-цистеїну

Таким чином, наші результати свідчать, що модуляція шляхів метаболізму L-цистеїну впливає вже на початкові показники кардіодинаміки та кисневого метаболізму міокарду. Найвиразніший ефект мало інгібування цитозольного синтезу H<sub>2</sub>S з допомогою PAG разом з введенням попередника синтезу H<sub>2</sub>S та GSH L-цистеїну. Введення інгібітора синтезу GSH разом з інгібуванням синтезу H<sub>2</sub>S та додаванням L-цистеїну знімало ефект PAG+L-цистеїну.

### **3.2.2. Вплив L-цистеїну та модуляції шляхів його метаболізму на відновлення функції серця та зміну кисневих показників міокарда за умов ішемії-реперфузії**

Моделювання ішемічно-реперфузійного пошкодження в умовах ізольованого за Лангендорфом серця дозволило оцінити вплив модулювання метаболізму L-цистеїну на відновлення функції серця в реперфузійний період. Ці дані дозволяють припустити можливості застосування нашого підходу для забезпечення кардіопротекції в реальних умовах.

На Рис. 3.4. представлені нативні криві з експериментів нашого дослідження. В контрольній серії дослідів 20 хв ішемія та наступна реперфузія спричинювали істотне пригнічення скоротливої функції серця та погіршення здатності міокарду до розслаблення (Рис. 3.4.А). Зокрема, на 15 хв ішемії відмічали початок зростанням КДТ з розвитком інтенсивної контрактури. В кінці ішемічного періоду КДТ становив в середньому 45 мм рт.ст. і більше. В реперфузійний період відновлення КДТ до початкового рівня не відбулось і становило близько 60 мм.рт.ст, що вказує на сильний пошкоджуючий ефект ішемії, ймовірно, через перевантаження  $Ca^{2+}$ . Група з введенням PAG+L-цистеїн демонструвала відсутність контрактури міокарду в ішемічний період, повне відновлення тиску, що розвивав лівий шлуночок і здатності до розслаблення в реперфузійний період (Рис.3.4.Б). Цей позитивний вплив повністю відмінявся попереднім введенням BSO, інгібітора синтезу глутатіону (Рис.3.4.В).

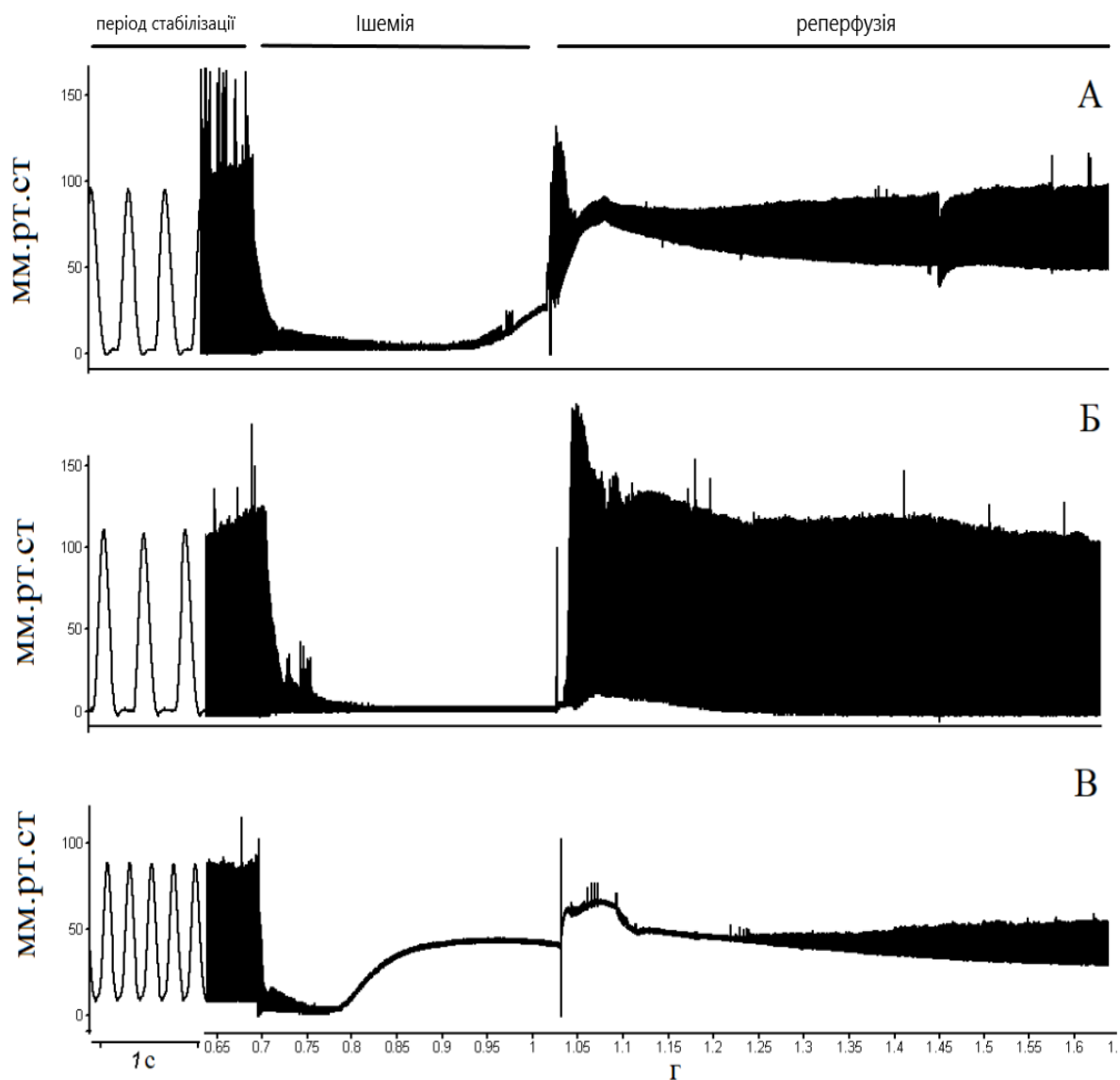


Рис. 3.4. Криві тиску в лівому шлуночку ізолюваного серця щурів. А – контрольний експеримент, Б – дослід з попереднім введенням PAG+L-цистеїн, В – дослід з попереднім введенням BSO+PAG+L-цистеїн.

Для оцінки ступеня відновлення функції серця під час реперфузії дані кардіодинаміки були перераховані у відсотках відносно ішемічного значення в кожному експерименті окремо і представлено на графіках .

В контрольній групі  $T_{\text{лшл}}$  відновлювався лише до 59% на 40-вій хв реперфузії відносно початкових значень (Рис. 3.5.).

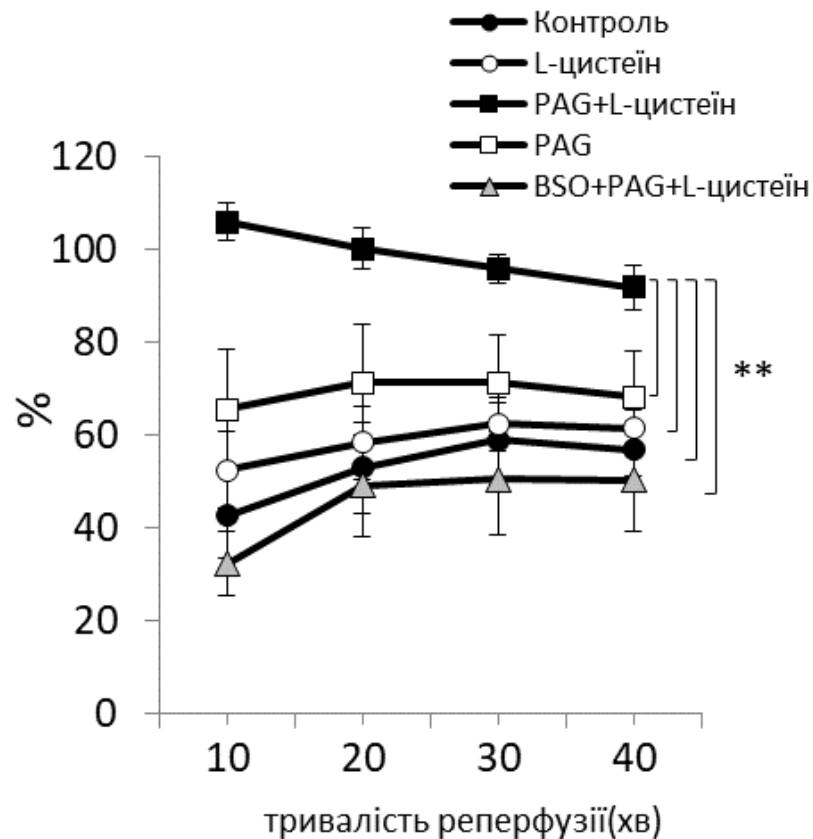


Рис. 3.5. Вплив модуляції шляхів метаболізму L-цистеїну на показники тиску, що розвивав лівий шлуночок. Значення виражаються як середні значення  $\pm$  DS. Порівняння між групами проводили за допомогою тесту Крускала-Воліса з наступним застосуванням критерію Манна-Уїтні ( $n \geq 5$  на групу).

\*\*  $P < 0,01$ , порівняно з контрольною групою.

В групах з введенням L-цистеїну та PAG окремо не спостерігалось достовірної різниці в відновлення  $T_{\text{лшл}}$  порівняно з контролем. Введення комбінації PAG та L-цистеїну послідовно мало яскравий та стабільний кардіопротекторний ефект. В цій групі  $T_{\text{лшл}}$  не постраждав від дії ішемії та відновився повністю вже з перших хвилин реперфузії до  $106\% \pm 3,8\%$  порівняно з  $42,7\% \pm 21,3\%$  у контрольній групі ( $P < 0,01$ ) (Рис. 3.5).

Додавання BSO до PAG та L-цистеїну повністю зняло кардіопротекторний ефект та повернуло ступінь відновлення скоротливої функції серця до рівня контрольної групи (Рис. 3.4.).

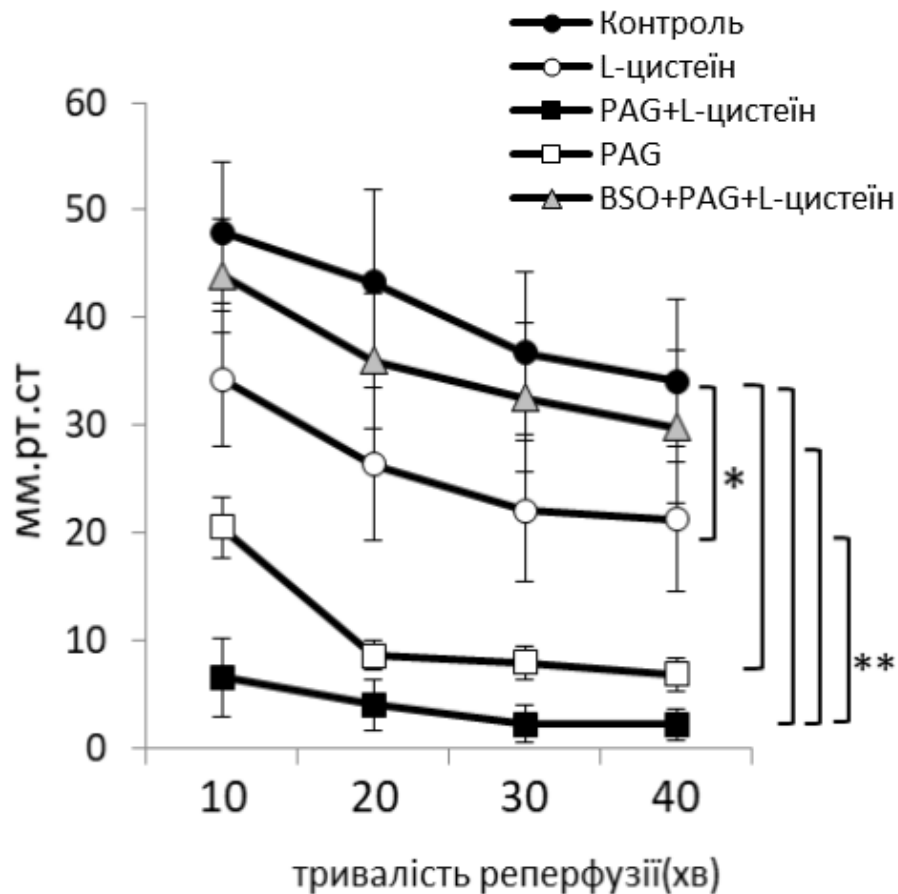


Рис. 3.6. Вплив модуляції шляхів метаболізму L-цистеїну на показники кінцево-діастолічного тиску лівого шлуночка. Значення виражаються як середні значення  $\pm$  DS. Порівняння між групами проводили за допомогою тесту Крускала-Воліса з наступним застосуванням критерію Манна-Уїтні ( $n \geq 5$  на групу).

\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , порівняно з контрольною групою.

Група з введенням L-цистеїну демонструвала майже на 20% краще відновлення КДТ порівняно з контролем ( $P < 0,05$ ) (Рис. 3.6.). В групі з

введенням PAG КДТ відновився на 80% ( $P < 0,01$ ), що свідчить про значно вищу здатність міокарду до розслаблення. Величина КДТ в групі з введенням комбінації PAG та L-цистеїну теж не постраждала від ішемічного епізоду і лишилась на початковому рівні, що свідчить про потужний захисний ефект. А введення BSO до PAG та L-цистеїну повернуло значення КДТ на контрольний рівень.

Аналогічну динаміку мали зміни в швидкості скорочення та розслаблення міокарду. Відновлення  $dP/dt$  в реперфузійний період в контрольній групі становило близько 40%. В групах з попереднім введенням L-цистеїну та PAG окремо не було зафіксовано достовірної різниці порівняно з контролем (Рис. 3.7.). Тоді як в групі з введенням PAG + L-цистеїн скоротлива активність міокарду була значно кращою, ніж в контролі протягом всього періоду реперфузії. На 10-й хв реперфузії  $dP/dt_{max}$  становив  $104,0\% \pm 3,0\%$ , а  $dP/dt_{min}$  -  $93,5\% \pm 4,0\%$  порівняно з  $42,8\% \pm 20,7\%$  та  $38,8\% \pm 24,2\%$  відповідно у контрольній групі ( $P < 0,01$ ). Ці зміни відмінялись додаванням BSO до комбінації PAG + L-цистеїн.

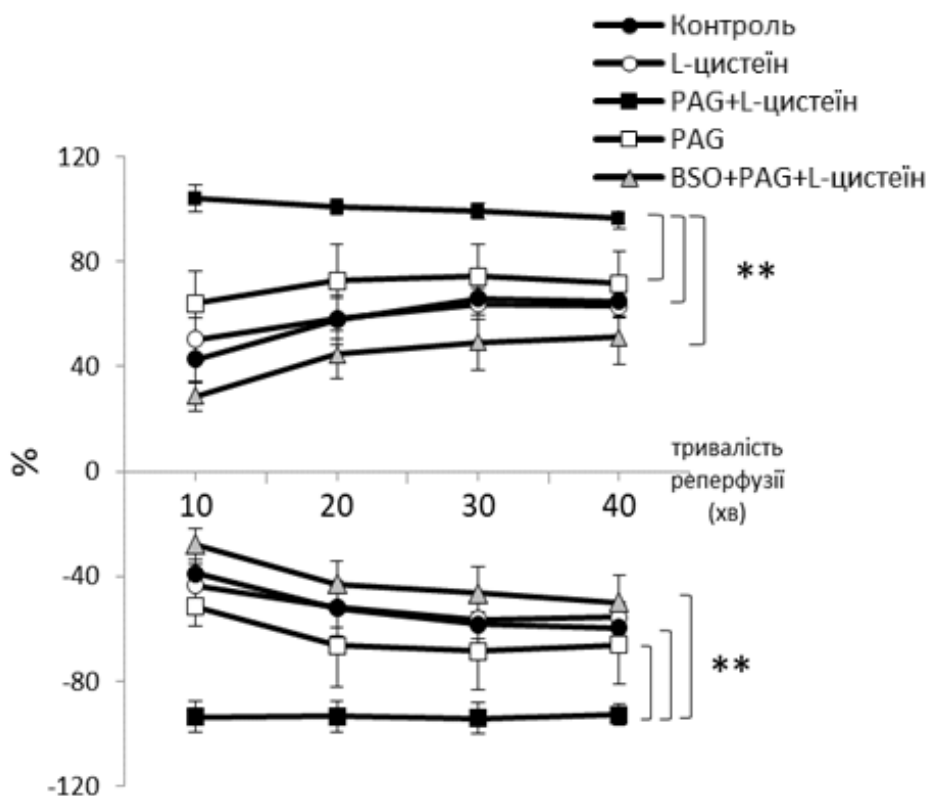


Рис. 3.7. Швидкість розслаблення та скорочення міокарду. Значення виражаються як середні значення  $\pm$  DS. Порівняння між групами проводили за допомогою тесту Крускала-Воліса з наступним застосуванням критерію Манна-Уїтні ( $n \geq 5$  на групу).

\*\*  $P < 0,01$ , порівняно з контрольною групою.

Постішемичні порушення функції серця супроводжувались змінами метаболізму кисню в тканинах міокарда. На 10-й хв реперфузії в контрольній серії КВ збільшилась більш ніж в два рази (рис. 3.8), що свідчить про неефективне використання кисню міокардом. На 40-й хв КВ впала, і становила у середньому 130% порівняно з доішемичним значенням. Подібна динаміка зафіксована в групах з введенням PAG та L-цистеїну окремо. Група з попереднім введенням комбінації PAG + L-цистеїну демонструвала значно ефективніше використання спожитого міокардом кисню порівняно з контрольною групою. КВ роботи серця була значно нижчою на 10-й хв

реперфузії, ніж у контрольній групі, і збільшилась лише на 34% ( $P < 0,03$ ) з подальшим зменшенням після реперфузії (рис.3.7.).

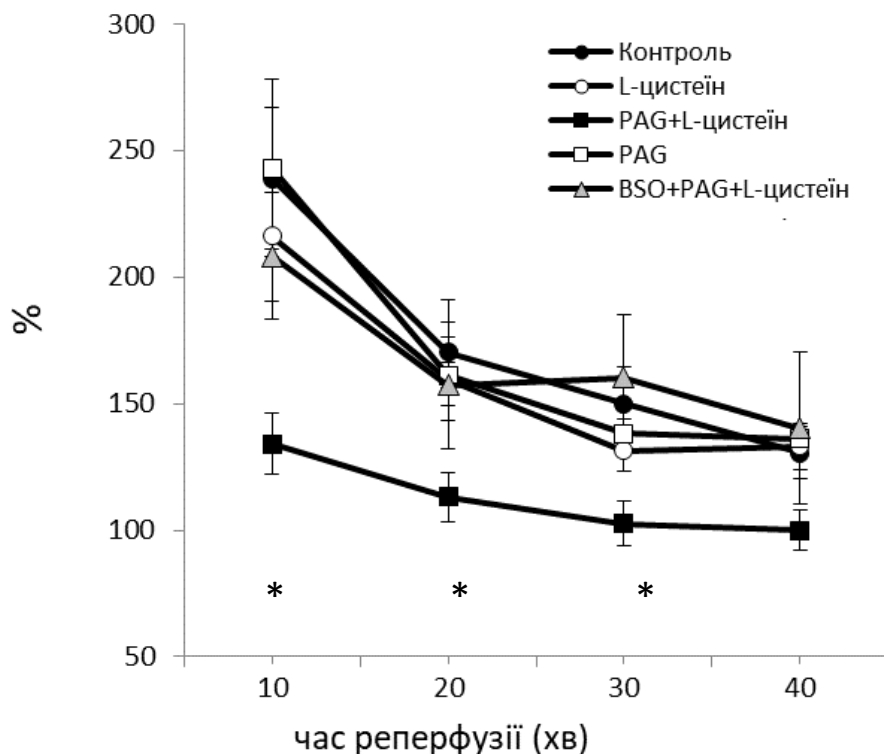


Рис. 3.8. Зміна величини кисневої вартості роботи серця під впливом модуляторів синтезу сірководню та глутатіону за умов моделювання ішемії-реперфузії. Значення виражаються як середні значення  $\pm$  DS. Порівняння між групами проводили за допомогою тесту Крускала-Воліса з наступним застосуванням критерію Манна-Уїтні ( $n \geq 5$  на групу)

\*  $P < 0,05$  порівняно з контролем

Відомо, що інгібітор CSE DL-пропаргілгліцин (PAG) пригнічує утворення  $H_2S$  з L-цистеїну [131], отже, ми припустили, що за таких умов весь L-цистеїн буде використовуватися для синтезу глутатіону. Ішемічна контрактура не спостерігалася в жодному з експериментів групи PAG + L-цистеїн (рис. 3.5., 3.6., 3.7). Введення цієї комбінації попереджало розвиток



реперфузійних порушень усіх параметрів:  $T_{\text{шл}}$ , КДТ,  $dP/dt_{\text{max}}$  та  $dP/dt_{\text{min}}$ . Зросла також ефективність використання кисню тканинами серця у випадку попереднього введення PAG +L-цистеїну порівняно з контрольною групою. Таким чином, застосування L-цистеїну на тлі інгібування синтезу сірководню за допомогою PAG перед ішемією чинило такий потужний кардіопротекторний вплив, що дозволяв серцю з легкістю справлятися з руйнівними наслідками реперфузії. Додавання BSO до PAG +L-цистеїну повністю знімало кардіопротекторний вплив введення PAG +L-цистеїну, що дозволяє припустити вагомий вплив GSH.

### **3.3. Вплив L-цистеїну та модуляції шляхів його метаболізму на функціональний стан мітохондрій тканин серця.**

Перевантаження мітохондріального  $Ca^{2+}$  є фактором, що викликає пошкодження серцево-судинної системи, з подальшим відкриття МРТР, набуханням мітохондрій, вивільненням цитохром оксидази С, апоптозом та некрозом кардіоміоцитів [132]. Раніше ми продемонстрували, що утворення мітохондріальних пор транзиторної проникності, в умовах моделювання ішемії-реперфузії ізольованого серця, супроводжується збільшенням оптичної щільності перфузуючого розчину, зібраного протягом першої хвилини реперфузії ізольованого серця, в ультрафіолетовій ділянці спектру [109]. Ця суміш речовин має мітохондріальне походження, оскільки їх вивільнення інгібується циклоспорином А, що блокує відкриття МРТР або ішемічним попереднім кондиціонуванням [109,133,134]. Вважається, що ця суміш містить продукти розпаду АТФ, тобто аденозин, інозин та ін. На Рис.3.9 показано, що оптична щільність розчину, зібраного протягом першої хвилини реперфузії, була максимальною при 250 нм у всіх групах.

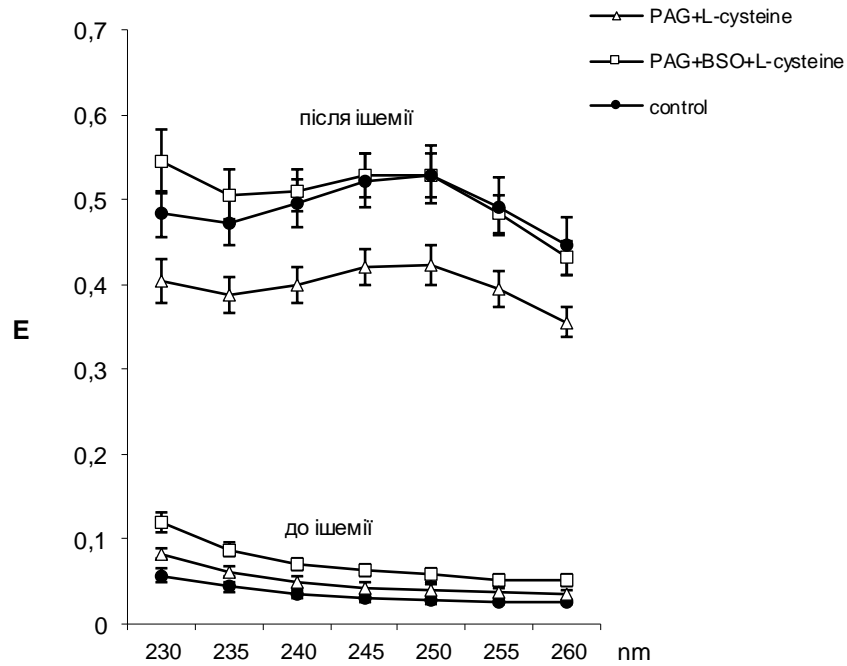


Рис.3.9. Вплив модуляції шляхів метаболізму L-цистеїну на зміну оптичної густини відтікаючих від серця перфузуючих розчинів.

Слід зазначити, що оптична щільність розчинів в групі з L-цистеїном, не відрізнялися від таких в контрольній групі ( $0,586 \pm 0,069$  ум. од.). PAG+L-цистеїном суттєво зменшила пік оптичної щільності ( $0,423 \pm 0,023$  ум. од. проти  $0,529 \pm 0,034$  ум. од. у групі в / в,  $P < 0,05$ ).

Зміна оптичної щільності в групі з попереднім введенням PAG повторювала динаміку групи з введенням PAG+L-цистеїну ( $0,448 \pm 0,056$  ум. од.). Однак цей ефект був відсутній у групі BSO+ PAG+L-цистеїн ( $0,528 \pm 0,026$  ум. од.).

Таким чином, PAG+L-цистеїн створює фармакологічну передумову кардіопротекції, інгібуючи відкривання МРТР. Можливим механізмом такого впливу є стимулювання роботи антиоксидантних систем, а саме глутатіонової системи. Ріст КДТ, падіння  $T_{\text{шл}}$ , підвищення оптичної щільності відтікаючих розчинів, що спостерігалось при введенні BSO, вказує

на порушення кальцієвого гомеостазу, розвиток окисного стресу та порушення цілісності мітохондрій.

### **3.4. Вплив L-цистеїну та інгібування синтезу H<sub>2</sub>S на окисно-відновний стан тканин міокарда в нормі та за умов ішемії-реперфузії.**

Оскільки попередній етап нашої роботи показав, що найвиразнішим ефект був від попереднього введення комбінації PAG та L-цистеїну, ми перевірили ефект на рівні метаболізму тканин в цій групі. Кардіопротекторна дія PAG + L-цистеїну була виявлена вже з раннього періоду реперфузії. Тому нами були проведені біохімічні дослідження тканин серця для визначення рівнів окисного та нітрозативного стресу, активності ензимів. Зразки збирались на 10-й хв реперфузії, коли показники роботи серця були максимальними.

Слід зазначити, що застосування PAG пригнічувало *de novo* синтез H<sub>2</sub>S, що узгоджується з літературними даними. В групі з введенням L-цистеїну на фоні інгібування синтезу H<sub>2</sub>S рівень вмісту H<sub>2</sub>S та активності ензимів, що його продукують, (CSE+CBS), не змінювався до моделювання ішемії-реперфузії. Рівні H<sub>2</sub>S та активності ензимів (CSE+CBS) в реперфузійний період були значно меншими ніж в аналогічних умовах в контрольній групі (Таблиця 3).

**Вплив L-цистеїну на фоні інгібування синтезу H<sub>2</sub>S на активність H<sub>2</sub>S-синтезуючих ензимів і на вміст H<sub>2</sub>S в тканинах серця в контрольних умовах та при ішемії-реперфузії**

	<b>Контроль (n=8)</b>	<b>I/R10 (n=10)</b>	<b>PAG+L- cysteine (n=5)</b>	<b>PAG+L- cysteine+I/R 10 (n=7)</b>
<b>H<sub>2</sub>S, пікомоль мг<sup>-1</sup></b>	17.56 ±1.26	96.80 ±7.90***	14.56±0.77	29.23±0.86###
<b>Активність (CSE+CBS), пікомоль H<sub>2</sub>S мг<sup>-1</sup> хв<sup>-1</sup></b>	8.80 ±0.22	30.15 ±2.95***	7.71 ±0.11**	16.48 ±0.81##

\*P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 порівняно з контролем

## P<0.01, ### p<0.001 порівняно з I/R

за результатами тесту ANOVA з поправкою Тукі.

Ішемія-реперфузія серця призводила до розвитку окисного стресу (Таблиця 4). Спостерігалось значне збільшення швидкості утворення гідроксильних (OH<sup>-</sup>) радикалів в 3,9 рази, супероксидних аніонів (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) в 3,4 рази та пероксиду водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в 2,8 рази порівняно з контрольними зразками. Таке зростання АФК призводить до розвитку окисного стресу в тканинах серця. Це підтверджує збільшення вмісту дієнових кон'югатів в 2,4 рази та малонового діальдигіду в 3,4 рази, що є маркерами посилення

перекисного окиснення ліпідів після моделювання ішемії, в період реперфузії.

Таблиця 4

**Вплив L-цистеїну на фоні інгібування синтезу H<sub>2</sub>S на присутність АФК та продуктів перекисного окиснення ліпідів в тканинах серця в контрольних умовах та при ішемії-реперфузії**

	<b>Контроль (n=8)</b>	<b>I/R<sub>10</sub> (n=10)</b>	<b>PAG+L- cysteine (n=5)</b>	<b>PAG+L- cysteine+I/R 10 (n=7)</b>
<b>·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, нмоль мс<sup>-1</sup> хв<sup>-1</sup></b>	2.63±0.08	8.72±0.57***	1.61±0.05***	2.37±0.11###
<b>·OH, ум.од.</b>	2.28±0.28	8.87±0.53***	2.02±0.02	3.76±0.12###
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, пікомоль мс<sup>-1</sup></b>	0.79±0.04	2.27±0.26***	0.69±0.02	1.15±0.11##
<b>Малоновий диальдигід, нг мс<sup>-1</sup></b>	3,65±0,51	12,48±2,55***	3,02±1,37	5,3±0,74##
<b>Дієнові кон'югати, нг мс<sup>-1</sup></b>	3.59±0.25	8.84±0.48***	0.92±0.12***	5.24±0.63###

\*\*\* P<0.001 порівняно з контролем

## P<0.01, ### p<0.001 порівняно з I/R

за результатами тесту ANOVA з поправкою Тукі.

Введення PAG + L-цистеїну вже в період до моделювання ішемії-реперфузії знизило утворення  $\cdot\text{O}_2^-$  в 1,6 рази,  $\text{OH}^-$  та  $\text{H}_2\text{O}_2$  змін не зазнали. Проте, навіть зниження  $\cdot\text{O}_2^-$  було достатнім, щоб утворення дієнових кон'югатів знизилось в 1,9 разів. Показники присутності АФК та маркер перекисного окиснення ліпідів в реперфузійний період в групі з введенням PAG + L-цистеїну достовірно зросли порівняно з групою PAG + L-цистеїну без моделювання ішемії. Утворення  $\cdot\text{O}_2^-$  зросло в 1,5 рази,  $\text{OH}^-$  в 1,9 рази та  $\text{H}_2\text{O}_2$  в 1,6 рази. Що позначилось на зростанні утворення дієнових кон'югатів – у 5,7 разів. Проте, порівняно з групою з моделювання ішемії-реперфузії без введення PAG + L-цистеїну утворення  $\cdot\text{O}_2^-$  було меншим в 3,7 разів,  $\text{OH}^-$  в 2,4 рази та  $\text{H}_2\text{O}_2$  в 2 рази. Відповідно концентрація дієнових кон'югатів була нижчою 1,7 рази, а МДА в 2,4 рази (Таблиця 4).

Отже, кардіопротекторний ефект PAG + L-цистеїну включав зниження активності утворення АФК та пошкодження мембран клітин.

### **3.5. Вплив L-цистеїну та інгібування синтезу $\text{H}_2\text{S}$ на метаболізм NO в тканинах міокарда в нормі та за умов ішемії-реперфузії.**

У системі NO також спостерігались негативні зміни в період реперфузії (Таблиця 5). Активність конститутивного синтезу NO, що відображує активність обох конститутивних синтаз нейрональної та ендотеліальної (cNOS = nNOS + eNOS), зменшилась у 5,5 разів. Як результат, зниження NO (рівні  $\text{NO}_2^-$ , Таблиця 5) супроводжувалося порушенням релаксації міокарда та спричинювало описане вище помітне підвищення КДТ під час реперфузії. Одночасне збільшення активності iNOS та швидкості утворення супероксидного аніона ( $\text{O}_2^-$ ) (Таблиця 4) призвело до подвійного збільшення кінцевого продукту розкладання пероксинітриту - нітратного аніона ( $\text{NO}_3^-$ ).

Попереднє введення PAG + L-цистеїну без моделювання ішемії-реперфузії не повпливало на активність cNOS, але призвело до зниження активності iNOS в 1,6 разів. Концентрація  $\text{NO}_2^-$  виросла в 1,2 рази, а концентрація  $\text{NO}_3^-$  знизилась в 2,1 рази порівняно з контрольною групою

(Таблиця 5). Це підкріплює дані про зниження окисного стресу, покращення здатності до розслаблення, продемонстровані ізольованими серцями в наших фізіологічних експериментах.

Таблиця 5

**Вплив L-цистеїну на фоні інгібування синтезу H<sub>2</sub>S на активність cNOS та iNOS і на вміст нітриту та нітрату в тканинах серця в контрольних умовах та при ішемії-реперфузії.**

	Контроль (n=8)	I/R <sub>10</sub> (n=10)	PAG+L- cysteine (n=5)	PAG+L- cysteine+I/R <sub>10</sub> (n=7)
Активність cNOS, <i>пікомоль мс<sup>-1</sup> хв<sup>-1</sup></i>	7.51 ±0.19	1.36 ±0.09***	8.57 ±0.30*	2.38 ±0.34###
Активність iNOS, <i>пікомоль мс<sup>-1</sup> хв<sup>-1</sup></i>	2.64±0.15	7.07 ±0.20***	1.68 ±0.04***	3.86 ±0.26###
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , <i>пікомоль мс<sup>-1</sup></i>	361.86 ±17.94	131.59 ±12.29***	440.19 ±5.28**	343.4 ±5.17###
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , <i>наномоль мс<sup>-1</sup></i>	10.92 ±0.21	22.27±0.88 ***	5.24 ±0.13***	9.95 ±0.40###

На 10-тій хвилині реперфузії в групі з введенням PAG + L-цистеїну активність cNOS впала вдвічі, а активність iNOS виросла вдвічі порівняно з аналогічними показниками в групі PAG + L-цистеїну без ішемії. Відповідно в 1,3 рази знизилась концентрація NO<sub>2</sub><sup>-</sup> та в 1,9 раз виросла концентрація NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Проте активність cNOS лишалась вищою в 1,8 раза, а активність iNOS нижчою в 1,8 рази порівняно з серією контрольних ішемій. Що

відображалось в значно вищій продукції  $\text{NO}_2^-$  – в 2,5 рази, та нижчій в 2,6 разів концентрації  $\text{NO}_3^-$  порівняно з групою I/R<sub>10</sub>.

Ці результати свідчать, що в умовах реперфузійного порушення функції серця навіть в групі з введенням PAG + L-цистеїну відбувається зміна метаболізму NO, проте вона все рівно не на стільки різюча, як без введення PAG + L-цистеїну. Отже, складовими кардіопротекторного ефекту є збереження функції синтаз NO та рівнів його метаболітів характерних для нормального функціонування міокарду.

### **3.6. Вплив L-цистеїну та модулювання шляхів його метаболізму на окисно-відновний стан тканин міокарда в нормі та за умов ішемії-реперфузії.**

Ми припустили, що в умовах інгібування синтезу  $\text{H}_2\text{S}$ , екзогенний L-цистеїн стає більш доступним для синтезу глутатіону. Завдяки цьому процесу співвідношення між окисленою та відновленою формою глутатіону повинно змінюватися, збільшуючи рівні відновленого глутатіону. Це може активувати антиоксидантний захист та сприяти спряженню cNOS [119].

Ми дослідили біохімічні показники тканин серця в групах з введенням BSO+PAG + L-цистеїну без моделювання ішемії-реперфузії та на 10 хвилині реперфузії. Наші результати показали, що додавання блокатора синтезу глутатіону BSO повністю або частково знімало протекторний вплив PAG + L-цистеїну. В групах BSO+PAG + L-цистеїн, однаково, як в групі до моделювання ішемії, так і в групі реперфузії, в 4,3 рази зростала продукція OH<sup>-</sup> та в 2,9 рази зростала продукція  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Таблиця 6). В середньому в 1,4 рази в групах I/R та BSO+PAG + L-цистеїн з та без моделювання ішемії-реперфузії зросло утворення малонового діальдегіду. Динаміка зміни концентрації дієнових кон'югатів в групі I/R порівняно з контролем, та в групах BSO+PAG+L-цистеїн з та без моделювання ішемії-реперфузії була аналогічною. В реперфузійний період незалежно від введення BSO+PAG+L-цистеїну кількість дієнових кон'югатів зростала в 1,5 рази.



**Вплив L-цистеїну на фоні інгібування синтезу GSH та H<sub>2</sub>S на присутність АФК та продуктів перекисного окиснення ліпідів в тканинах серця в контрольних умовах та при ішемії-реперфузії**

	<b>Контроль</b> (n=7)	<b>I/R10</b> (n=7)	<b>BSO+PAG</b> <b>+L-cysteine</b> (n=6)	<b>BSO+PAG</b> <b>+L-cysteine</b> <b>+I/R10</b> (n=6)
<b>·O<sub>2</sub></b> , <i>нмоль мс<sup>-1</sup> хв<sup>-1</sup></i>	1,897±0.26	3,517±0.46*	2,942±0.53	2,738±0.29
<b>·ОН</b> , <i>ум.од.</i>	0,609±0.05	2,581±0.13**	2,427±0.31**	2,270±0.11**
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> , <i>нікомоль мс<sup>-1</sup></i>	0,625±0.05	1,971 ±0.10**	1,154 ±0.09**	1,310 ±0.02##
<b>Малоновий</b> <b>диальдигід</b> , <i>нг мс<sup>-1</sup></i>	9,529±0.29	13,287 ±0.53**	14,338 ±0.75	10,490 ±0.74#
<b>Дієнові</b> <b>коньюгати</b> , <i>нг мс<sup>-1</sup></i>	3,474±0.29	5,436±0.42*	3,795±0.18	5,640±0.56*

\*P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 порівняно з контролем

## P<0.01, ### p<0.001 порівняно з групою I/R

за результатами тесту ANOVA з поправкою Тукі.

Таким чином, інгібування синтезу GSH разом з введенням комбінації PAG+L-цистеїну нівелювало захисні ефекти останньої, практично повертаючи генерацію АФК та перекисне окиснення ліпідів мембран до контрольного рівня. Що підтверджує припущення, що вагома частина вкладу

в кардіопротекторний ефект PAG+L-цистеїну належить відновленій формі глутатіону.

### **3.7. Вплив L-цистеїну та модулювання шляхів його метаболізму на метаболізм NO в тканинах міокарда в нормі та за умов ішемії-реперфузії.**

Інгібування синтезу GSH разом з введенням комбінації PAG+L-цистеїну впливало також і на систему оксиду азоту, а саме на активність як конститутивної так і індукцйбельної синтаз NO (Таблиця 7).

Рівень активності iNOS в групі з введенням BSO+PAG+L-цистеїну без моделювання ішемії-реперфузії був в 6,6 разів вищим за такий в контрольній групі. І навіть в 6,3 рази вищим ніж в групі I/R, що свідчить про стресовий стан тканин міокарду – вищий фон АФК навіть без моделювання ішемії-реперфузії. Це також підтверджується нашими результатами описаними вище. В групі ж BSO+PAG+L-цистеїн з моделюванням ішемії-реперфузії рівень активності iNOS зріс ще більше, в 7,4 рази порівняно з контролем і в 3,4 рази порівняно з групою I/R.

Активність cNOS навпаки виявилась пригніченою, що теж узгоджується з нашими даними про вищий рівень окисного стресу та вищий рівень порушення функції серця за умов введення BSO+PAG+L-цистеїну. ~~Конкретніше~~ Активність cNOS знизилась у 2,1 рази вже просто під дією BSO+PAG+L-цистеїну та в 2,9 рази в групі BSO+PAG+L-цистеїн + I/R.

**Вплив L-цистеїну на фоні інгібування синтезу GSH та H<sub>2</sub>S на активність NO синтаз в тканинах серця в контрольних умовах та при ішемії-реперфузії**

	<b>Контроль (n=7)</b>	<b>I/R10 (n=7)</b>	<b>BSO+PAG +L-cysteine (n=6)</b>	<b>BSO+PAG +L-cysteine +I/R10 (n=6)</b>
<b>Активність iNOS, пікомоль м<sup>г</sup><sup>-1</sup> хв<sup>-1</sup></b>	2,181±0.17	5,226 ±0.45*	13,822 ±1.25**	16,948 ±1.03**/##
<b>Активність eNOS, пікомоль м<sup>г</sup><sup>-1</sup> хв<sup>-1</sup></b>	9,899±1.22	2,237 ±0.24**	4,690 ±0.55**	3,388 ±0.37**
<b>Index, умовні одиниці</b>	5,780±1.05	0,714 ±0.13**	1.77 ±0.3**	1,249 ±0.1**

\*P<0.05, \*\* P<0.01 порівняно з контролем

## P<0.01, порівняно з групою I/R

за результатами тесту ANOVA з поправкою Тукі.

Ми розрахували показник спряження eNOS, що демонструє ефективність роботи ензиму. В спряженому стані eNOS генерує NO, тоді як в неспряженому – ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, представника родини АФК. Індекс спряження, розраховується як співвідношення активності eNOS до ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Величина індексу спряження падала в групі BSO+PAG+L-цистеїн в 3,2 рази та в 4,3 рази в

групі BSO+PAG+L-цистеїн + I/R. Що свідчить про перехід NO синтази на генерацію АФК замість NO.

Для наочності та кращої інтеграції даних ми перерахували нативні показники в відсотки відносно контрольної групи та адаптували їх для порівняння в одній системі координат і представили на графіках нижче.

Перш за все інгібування цитоплазматичного синтезу  $H_2S$  та введення L-цистеїну таки призвело до зниження концентрації сірководню в тканинах серця (Рис.3.10).

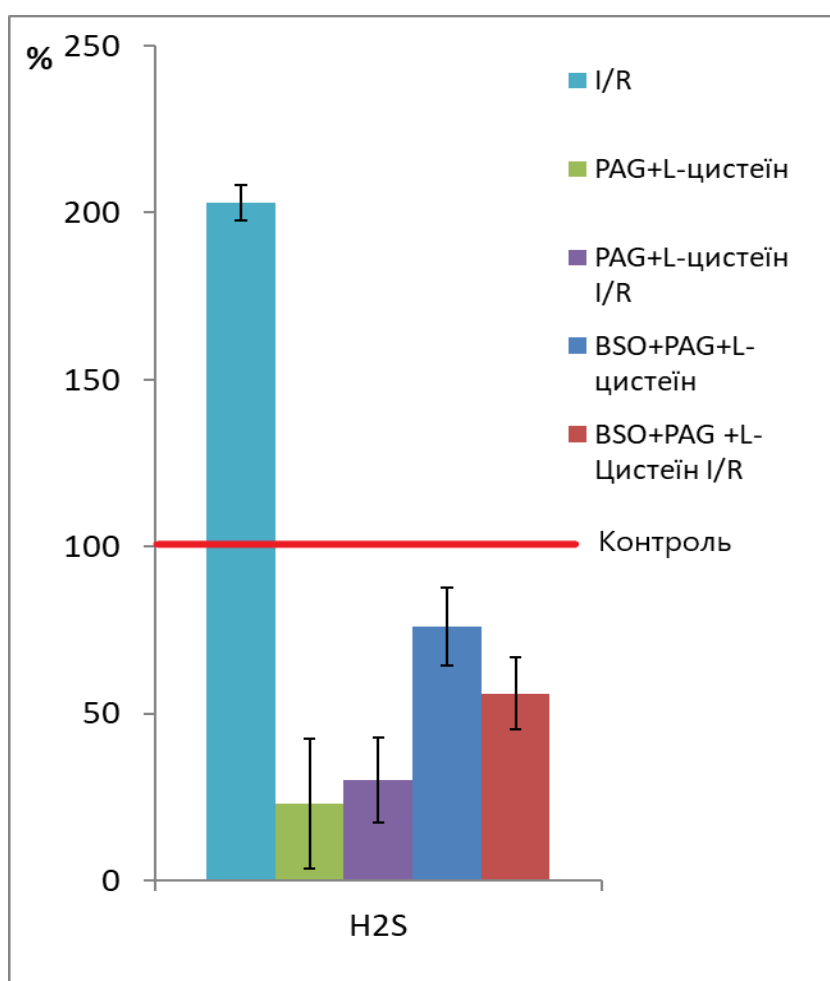


Рис. 3.10. Вплив модуляції метаболізму L-цистеїну на концентрацію  $H_2S$  в тканинах серця щурів до та після моделювання ішемії-реперфузії. Дані переведено в відсотки відносно показників у контрольній групі.

\*\* $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  порівняно з групою I/R, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , порівняно PAG+L-цистеїн+ I/R, за результатами тесту ANOVA з поправкою Тукі

Додавання BSO до комбінації PAG+L-цистеїн дещо збільшило присутність  $H_2S$ . Ми припускаємо, що цей ефект досягається завдяки мітохондріальній синтазі  $H_2S$ . Оскільки шлях утилізації L-цистеїну через синтез GSH виявилось заблоковано введенням BSO клітини знайшли альтернативу – комплекс ензимів, що включає в себе пару CAT/MPST та продукує в тому числі і  $H_2S$ . Проте, не достатньо для забезпечення базового рівня концентрації  $H_2S$  та його протекторних функцій, оскільки фізіологічний експеримент та решта даних біохімічних експериментів свідчать про значне погіршення відновлення функції серця за впливу комбінації BSO+PAG+L-цистеїн.

Ішемія-реперфузія при введенні L-цистеїну на фоні інгібування обох шляхів його метаболізму супроводжувалась розвитком окисного стресу на рівні з показниками контрольної ішемії-реперфузії міокарда. Дещо меншою була лише кількість пероксиду водню (Рис. 3.11.). Гідроксильний радикал та супероксидний аніон на фоні введення BSO+PAG+L-цистеїн досягли значень реперфузійного періоду контрольної групи.

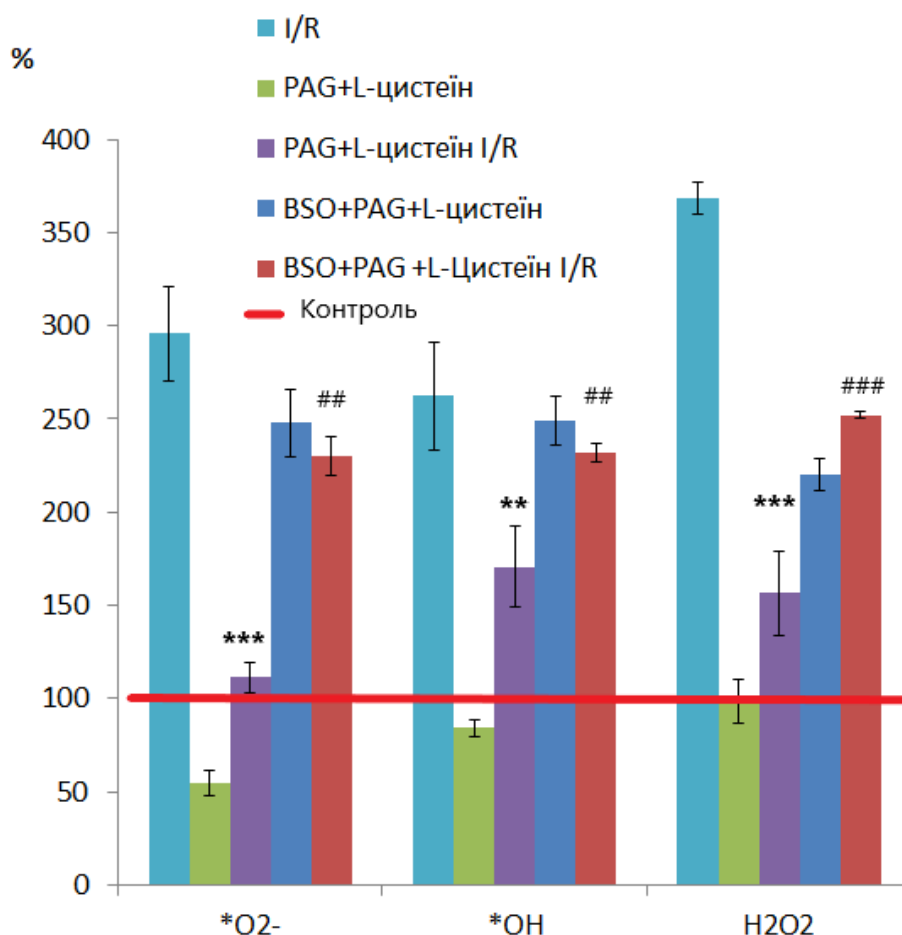


Рис. 3.11. Вплив модуляції метаболізму L-цистеїну на показники окисного стресу в тканинах серця щурів до та після моделювання ішемії-реперфузії. Дані переведено в відсотки відносно показників у контрольній групі.

\*\*P<0.01, \*\*\* P<0.001 порівняно з групою I/R

# P<0.05, ## P<0.01, порівняно PAG+L-цистеїн+ I/R

за результатами тесту ANOVA з поправкою Тукі

Вміст продуктів перекисного окислення ліпідів мембран клітин в тканинах серця має аналогічну динаміку. В результаті активізації утворення АФК зріс ступінь окиснення ліпідів в групі з моделюванням ішемії-реперфузії. Цей рівень суттєво знизився в групах PAG+L-цистеїн та PAG+L-цистеїн+I/R. І знову виріс до значень групи I/R у разі попереднього введення BSO до PAG+L-цистеїну (Рис.3.12).

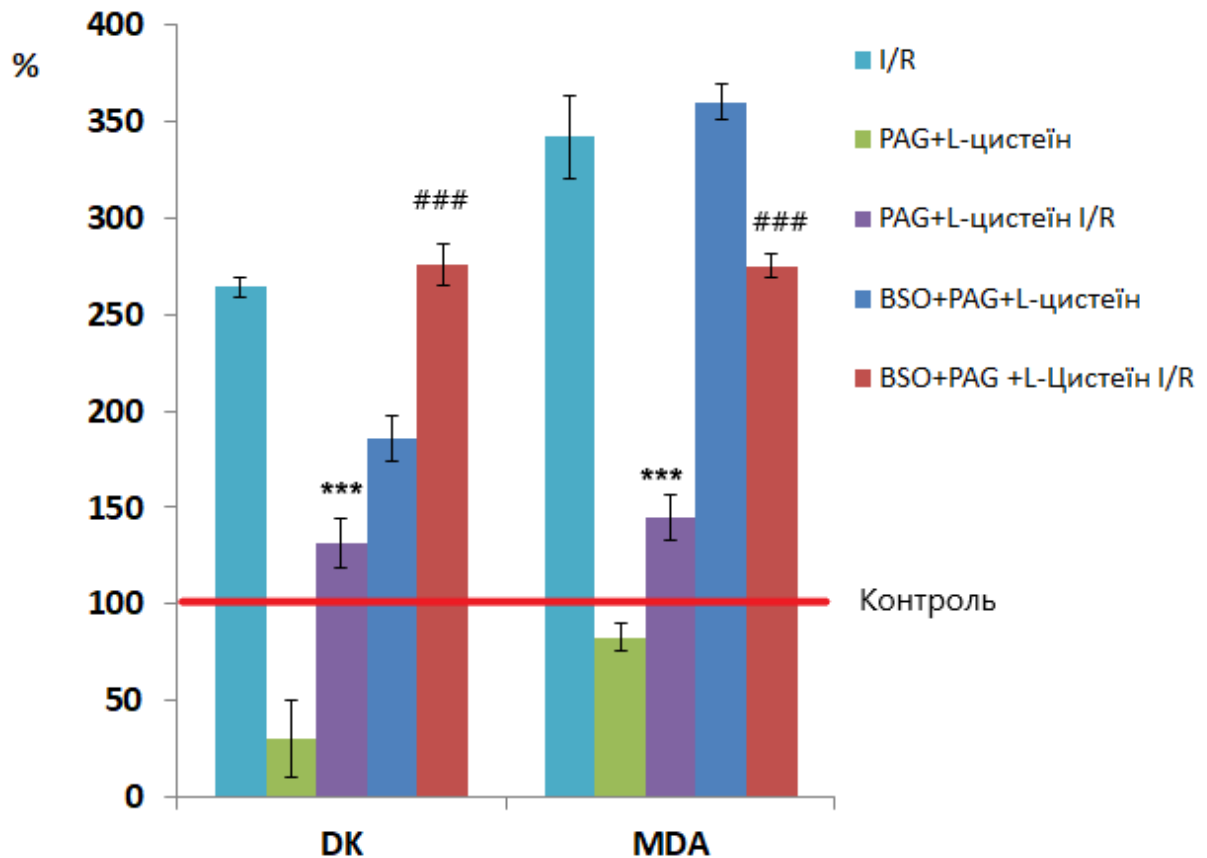


Рис. 3.12. Вплив модуляції метаболізму L-цистеїну на показники перекисного окиснення ліпідів в тканинах серця щурів до та після моделювання ішемії-реперфузії. Дані переведено в відсотки відносно показників у контрольній групі.

\*\*P<0.01, \*\*\* P<0.001 порівняно з групою I/R

# P<0.05, ## P<0.01, порівняно PAG+L-цистеїн+ I/R

Активність cNOS в групі з введенням BSO+PAG+L-цистеїн стала близькою до реперфузійного рівня контрольної групи, а рівень активності iNOS зріс в 2,5 і 3 рази до і після ішемії відповідно (Рис. 3.13.). Це свідчить про порушення в синтезі NO і може бути причиною розвитку реперфузійної контрактури міокарду.

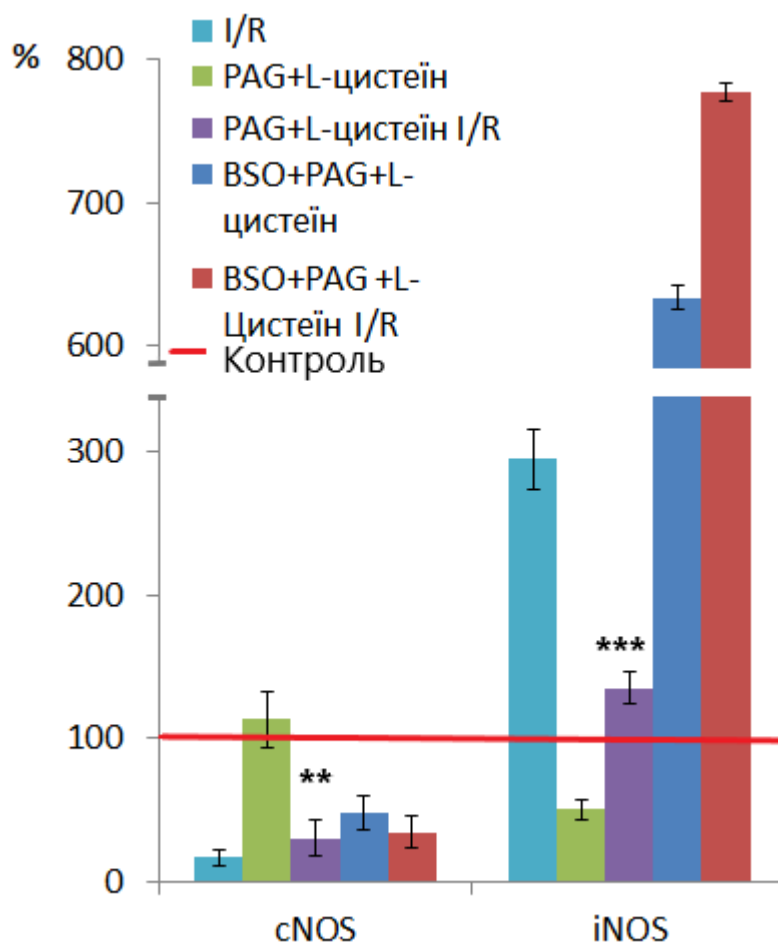


Рис. 3.13. Вплив інгібування синтезу  $H_2S$  та  $GSH$  з  $L$ -цистеїну на активність  $NO$  синтаз конститутивної та індукційної в тканинах серця. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$  порівняно з  $I/R$ . Дані перераховано у відсотках відносно контрольної групи.

Таким чином дані наших біохімічних досліджень свідчать, що кардіопротекторний ефект введення  $L$ -цистеїну на тлі блокаді синтезу  $H_2S$  супроводжувався попередженням розвитку окисного стресу і перекисного окиснення ліпідів, стимуляцією активності  $cNOS$  та інгібуванням  $iNOS$  в реперфузійний період.



### 3.8. Зміни глутатіону відновленого та окисненого в умовах модуляції метаболізму L-цистеїну в нормі та за умов ішемії-реперфузії.

Зважаючи на результати викладені вище ми вирішили перевірити припущення, що за умови блокування цитозольного  $H_2S$  та введення екзогенного L-цистеїну відбувається інтенсифікація синтезу GSH.

Ми показали, що моделювання ішемії-реперфузії спричинює зниження вмісту GSH в усіх порівнюваних варіантах дослідних комбінацій речовин. Введення PAG+L-цистеїну різко підвищувало вміст відновленого глутатіону в 2,5 рази відносно контрольних значень (Рис.3.14). В реперфузійний період в групі з введенням PAG+L-цистеїну вміст GSH знижувався в 2,3 рази. Проте це все рівно було достовірно вищим вмістом GSH в тканинах серця ніж в групі I/R та відповідало рівню GSH в контрольній групі.

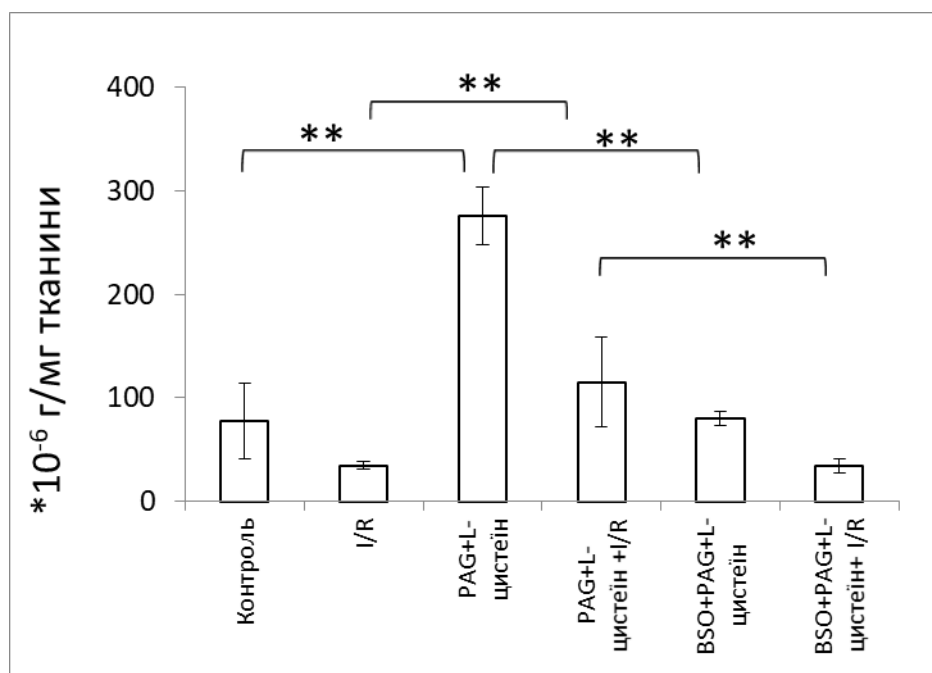


Рис. 3.14. Зміна рівнів відновленого глутатіону в тканинах серця за умов модуляції метаболізму L-цистеїну до та після ішемії.

\* $P < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Введення BSO разом з комбінацією PAG+L-цистеїну блокувало зростання концентрації GSH в тканинах серця, як до моделювання ішемії-

реперфузії, так і в реперфузійний період. Так, в групі BSO + PAG+L-цистеїн вміст GSH знизився в 3,2 рази порівняно з групою PAG+L-цистеїн. В групі BSO + PAG+L-цистеїн + I/R вміст GSH був в 2,5 рази нижчим ніж такий в групі PAG+L-цистеїн + I/R та на рівні з концентрацією GSH в групі I/R.

Вимірювання концентрації GSSG виявили подібну динаміку змін. Кількість GSSG в групі I/R була нижчою в 2,7 рази ніж в контрольній групі. В групі з введенням PAG+L-цистеїну концентрація GSSG зростала в 2,2 рази, та в групі з введенням BSO + PAG+L-цистеїн не мала достовірного зниження (Рис. 3.15).

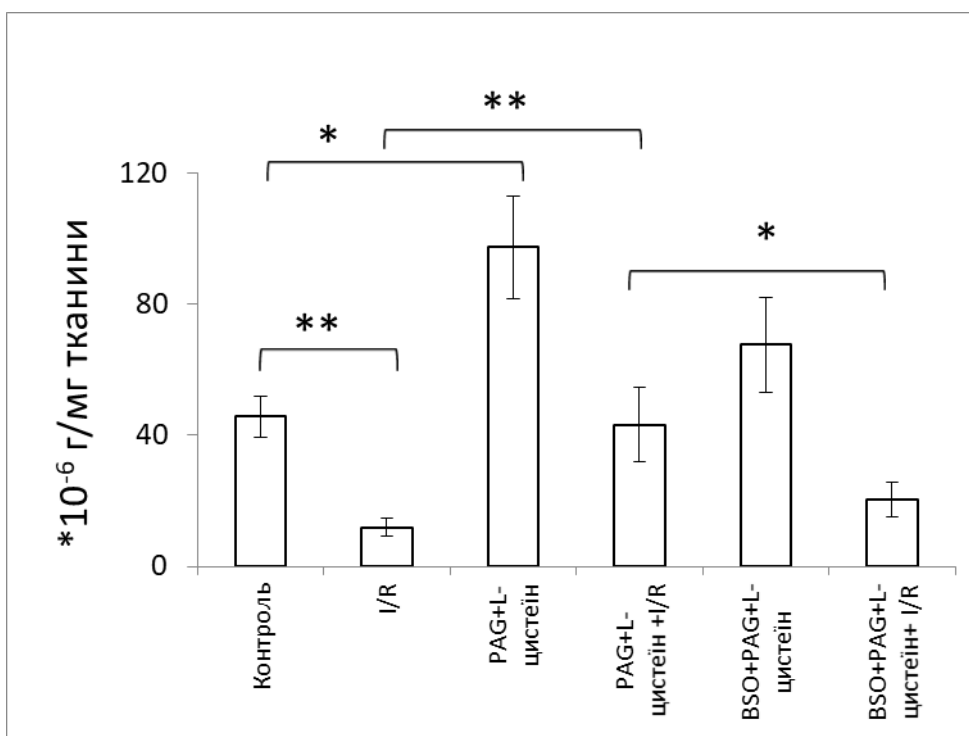


Рис. 3.15. Зміна рівнів окисленого глутатіону в тканинах серця за умов модуляції метаболізму L-цистеїну до та після ішемії. \*P<0.05, \*\*p<0.01.

В реперфузійний період в групі з введенням PAG+L-цистеїну вміст GSSG був в 2 рази вищим ніж в групі I/R, що робить концентрацію GSSG наближеною до рівня контрольної групи. В групі BSO+PAG+L-цистеїн + I/R вміст GSSG був достовірно нижчим за такий в групі з введенням PAG+L-цистеїну + I/R.

Наші результати свідчать, що в групі з введенням PAG + L-цистеїну значно зростали пули GSH та GSSG. Додавання BSO до цієї комбінації повертало концентрацію GSH до значень співставних з контрольними. Що цілком корелює з даними наших фізіологічних експериментів на моделі ізольованого за Лангендорфом серця та зниженням показників окисного стресу в тканинах серця. Одним з можливих механізмів такого ефекту може бути вплив глутатіонілювання на SERCA [135]. Показано, що ця модифікація підвищує активність транспорту  $Ca^{2+}$  з цитоплазми в саркоплазматичний ретикулум, таким чином запобігаючи перевантаженню кальцієм клітини. Якщо кількість глутатіонільованих каналів зменшується, результатом стане порушення здатності до розслаблення, швидкого зростання КДТ, що демонструють серця групи з введенням комбінації BSO + PAG + L-цистеїну.

Таким чином, ми показали, що саме стимуляція ендogenous синтезу GSH дає значний кардіопротекторний ефект в умовах моделювання ішемії-реперфузії. Ми вважаємо, що саме істотне збільшення пулу глутатіонів дозволило міокарду відновити свою роботу в період реперфузії повністю внаслідок відсутності розвитку окисного і нітрозотативного стресів.

### **3.9. Вплив введення екзогенного глутатіону в ранній реперфузійний період на функцію ізольованого серця**

Ранній період реперфузії має визначальне значення для динаміки відновлення функції серця, оскільки саме в цей час до ішемізованих тканин надходить кисень та поживні речовини. Саме тому введення потенційних кардіопротекторних засобів одночасно з початком реперфузії може бути експериментальним тестом, що наближений до реальних клінічних умов. З літератури відомо, що введення донорів глутатіону має кардіопротекторний ефект. Так, введення N-ацетил-L-цистеїну допомагає в відновленні тиску при гіпертензії [12], відновлює вміст GSH на фоні інфаркту міокарда та серцевої недостатності мишей [13,14]. В мітохондріях сердець підданих впливу ішемії-реперфузії знижується вміст GSH, що може сприяти окисненню цитохром оксидази С і розвитку мітохондріальної дисфункції [118]. Існують свідчення що препарат комбінації попередників глутатіону «Елтацин» підвищує вміст GSH в крові, а Гепавал пригнічує запальний процес [15,16]. Препарат Гепавал містить відновлену форму глутатіону, а коригування зниженого вмісту GSH важливе впродовж початкового періоду реперфузії, що може забезпечити нормальне відновлення функції серця після ішемії.

Наші дані показали, що введення екзогенного глутатіону в ранній реперфузійний період позитивно впливало на відновлення скоротливої функції ізольованого серця підчас реперфузії (Рис. 3.16 Б).

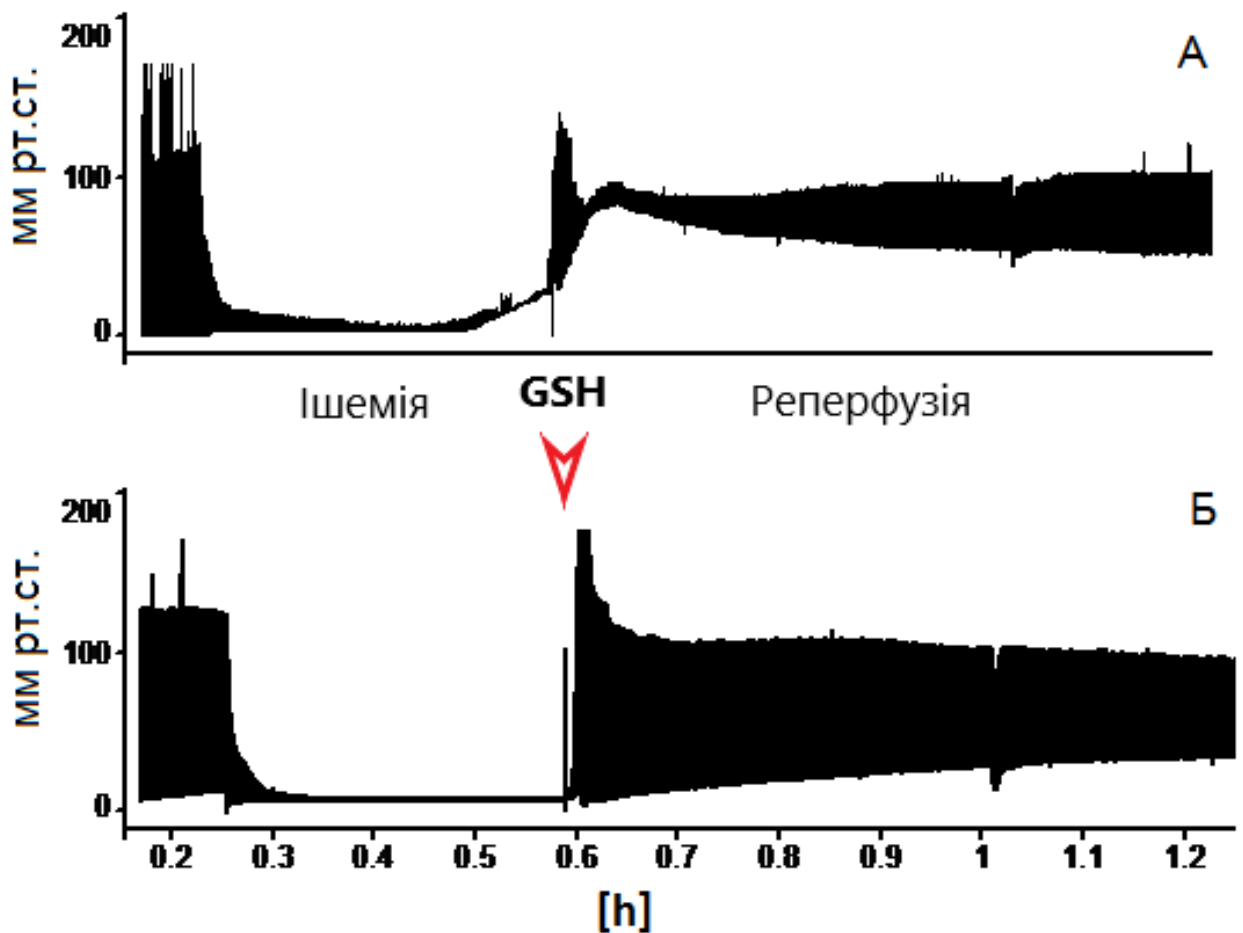


Рис. 3.16. Нативні криві тиску у лівому шлуночку за умов ішемії та 40 хв реперфузії.

А - контрольна серія,

Б – за умов реперфузії розчином відновленого глутатіону (Гепавал)

Це проявлялось в відсутності контрактури міокарду під час ішемії та значно менше зростання КДТ в реперфузійний період. Відновлення  $T_{\text{шлп}}$  також становило до 80% в реперфузійний період, що вказує на значний кардіопротекторний вплив GSH (Рис.3.16.).

В контрольній серії експериментів відновлення  $T_{\text{шлп}}$  на 5-й хвилині реперфузії становило 23,6% у порівнянні з вихідними показниками. Надалі, числові показники  $T_{\text{шлп}}$  у цій серії мали тенденцію до зростання, однак до кінця спостереження (40 хв) цей показник становив всього 30,9% (Рис.3.17).

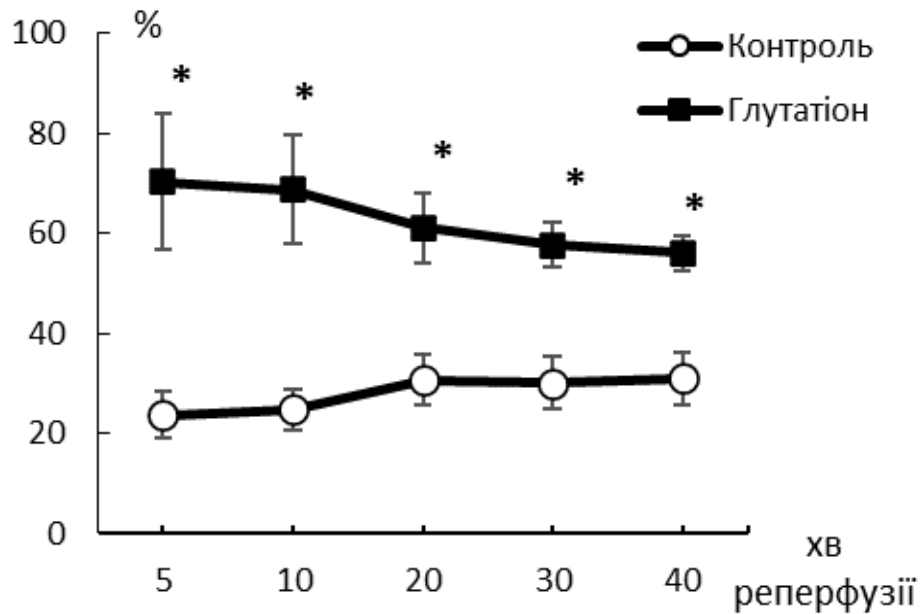


Рис.3.17. Вплив реперфузії ізолюваного серця розчином, що містить GSH на відновлення тиску, що розвивав лівий шлуночок.

Значення виражаються як середні значення  $\pm$  DS. Порівняння між групами проводили за допомогою тесту Крускала-Воліса з наступним застосуванням критерію Манна-Уїтні ( $n \geq 5$  на групу).

\*  $P < 0,05$ , порівняно з контрольною групою.

В групі із введенням глутатіону на 5-й хвилині реперфузії  $T_{\text{шлп}}$  відновлювався до 70,2% порівняно з вихідними показниками, а на 40 хвилині – складав 56%, що достовірно вище ніж, у контрольній групі ( $P < 0.05$  для обох) (Рис.3.17).

Відповідно,  $dP/dt_{\text{max}}$  і  $dP/dt_{\text{min}}$ , тобто швидкість наростання і спадання тиску були вищими у дослідній групі і на 5 хв реперфузії становили 68,8 і 62,3% проти 21 і 20 % в контрольній,  $P < 0.05$  для обох (Рис. 3.18). На 40 хв реперфузії  $dP/dt_{\text{max}}$  і  $dP/dt_{\text{min}}$  складала до 58 і 57% проти 31 і 32,2% в контрольній групі,  $P < 0.05$ .

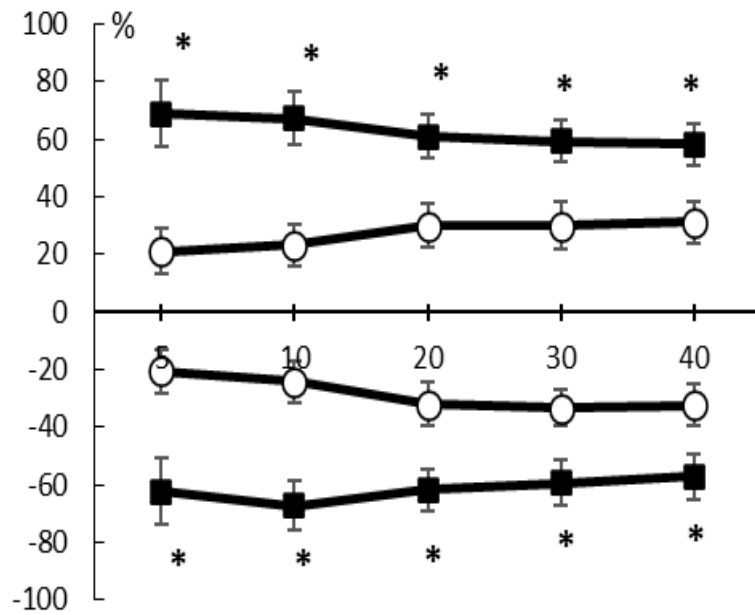


Рис.3.18. Вплив реперфузії ізольованого серця розчином, що містить GSH на зміну швидкості скорочення та розслаблення міокарду.

Значення виражаються як середні значення  $\pm$  DS. Порівняння між групами проводили за допомогою тесту Крускала-Воліса з наступним застосуванням критерію Манна-Уїтні ( $n \geq 5$  на групу).

\*  $P < 0,05$ , порівняно з контрольною групою.

Крім того КДТ був значно нижчий в групі із введенням глутатіону (Рис. 3.19) і на 5 хв реперфузії складав 18 мм рт. ст., що в 2,5 разів нижче, ніж у контрольній серії. До кінця реперфузії КДТ зростав неістотно порівняно з контрольною групою. Ці дані підтверджують внесок глутатіону у покращення процесів розслаблення і більш ефективну продукцію енергії в міокарді сердець, оскільки зростання КДТ і погіршення дилатації розвиваються внаслідок перевантаження кардіоміоцитів кальцієм і неможливістю відкачування його у внутрішньоклітинні депо через дефіцит АТФ.

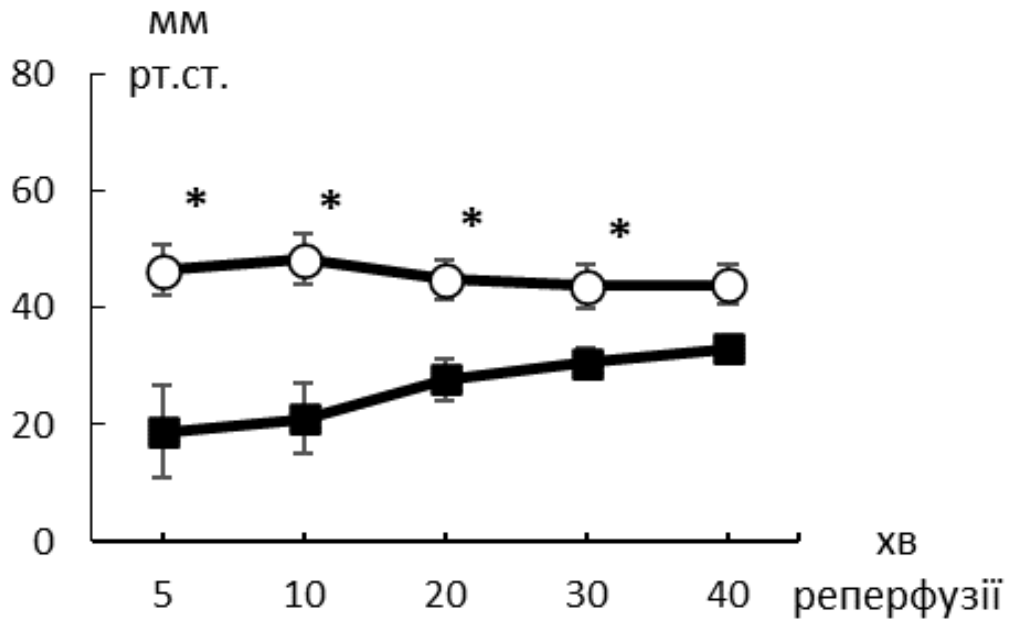


Рис.3.19. Вплив реперфузії ізолюваного серця розчином, що містить GSH на зміну величини кінцево-діастолічного тиску міокарду.

Значення виражаються як середні значення  $\pm$  DS. Порівняння між групами проводили за допомогою тесту Крускала-Воліса з наступним застосуванням критерію Манна-Уїтні ( $n \geq 5$  на групу).

\*  $P < 0,05$ , порівняно з контрольною групою.

Значення коронарного потоку було вищим у дослідній групі та в кінці реперфузії становило 61,4% від початкових значень проти 55,3% в контрольній серії (Рис. 3.20).



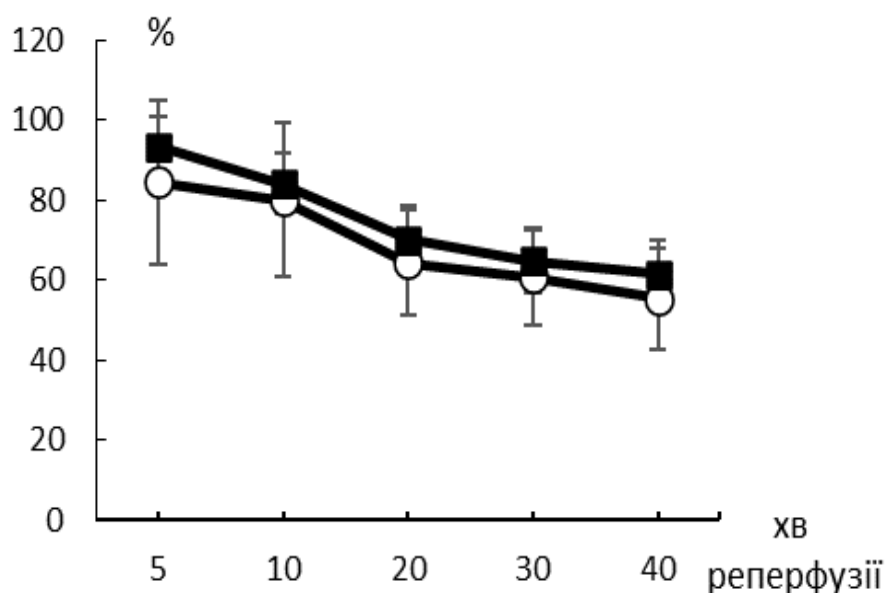


Рис.3.20. Вплив реперфузії ізолюваного серця розчином, що містить GSH на зміну коронарного потоку перфузуючої речовини.

Значення виражаються як середні значення  $\pm$  DS. Порівняння між групами проводили за допомогою тесту Крускала-Воліса з наступним застосуванням критерію Манна-Уїтні ( $n \geq 5$  на групу).

Така ж динаміка спостерігалась і при аналізі ЧСС: в дослідній групі значення ЧСС вже на 5-й хвилині реперфузії відновилось до вихідного рівня ( $252 \text{ уд хв.}^{-1}$ ) і до кінця спостереження складало  $217 \text{ уд хв.}^{-1}$ , проти  $192 \text{ уд хв.}^{-1}$  в контрольній групі. Разом з тим ІСФ на початку реперфузії становила  $70,6\%$  від початкових значень і до кінця реперфузії складала  $49\%$  проти  $25\%$  в контролі (Рис.3.21). Таке відновлення функції серця достовірно відрізняється від контрольної групи, і дає можливість стверджувати, що посткондиціювання глутатіоном нормалізує вихід міокарда з ішемії, полегшує його роботу, покращує дилатаційні властивості і зменшує постішемні порушення функції ізолюваного серця щурів.

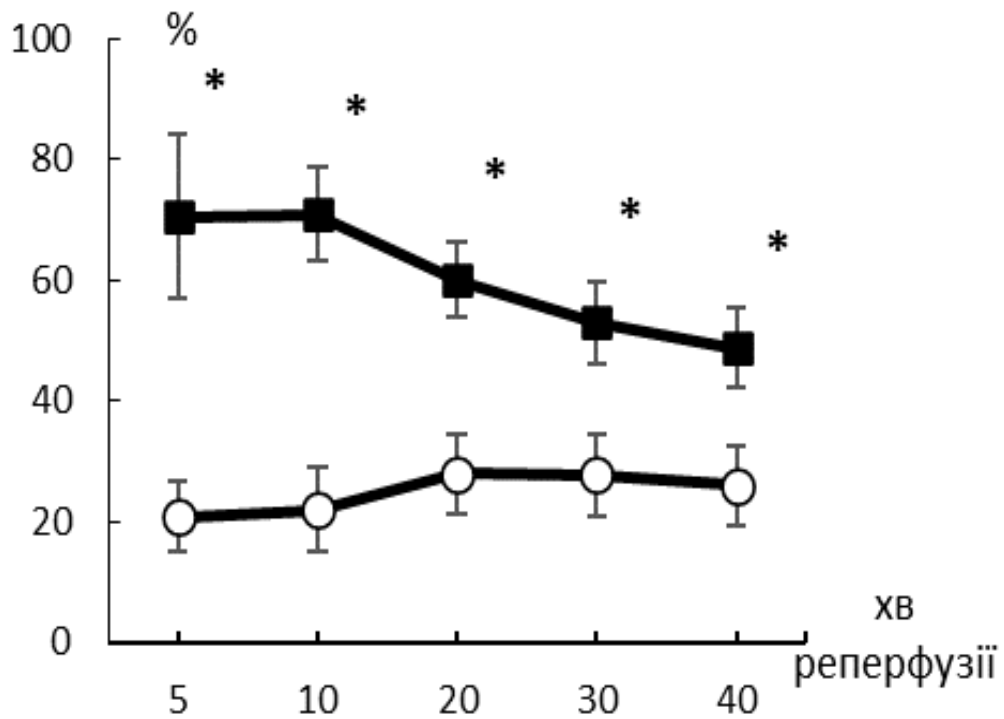


Рис.3.21. Вплив реперфузії ізольованого серця розчином, що містить GSH на зміну інтенсивності скоротливої функції міокарда.

Значення виражаються як середні значення  $\pm$  DS. Порівняння між групами проводили за допомогою тесту Крускала-Воліса з наступним застосуванням критерію Манна-Уїтні ( $n \geq 5$  на групу).

\*  $P < 0,05$ , порівняно з контрольною групою.

Відображенням ефективності використання кисню міокардом на моделі ізольованого серця є показник споживання кисню і киснева вартість роботи. У контрольній групі під час реперфузії споживання кисню змінювалося з 65,8% до 48,6% на 40 хв спостереження, в той час як у групі із введенням глутатіону – зі 100,8% на 5 хв реперфузії до 76,5% на 40 хв, що в півтори-два рази більше і може свідчити про більш повне забезпечення кисневих потреб ішемізованого міокарда. І дійсно, киснева вартість роботи міокарда в контрольній групі різко зросла і становила 413% в ранній період реперфузії, поступово знижуючись до 216%, в той час як посткондиціонування

глутатионом знижувало ці значення до 184% і 157% на початку і вкінці реперфузії відповідно (Рис. 3.22).

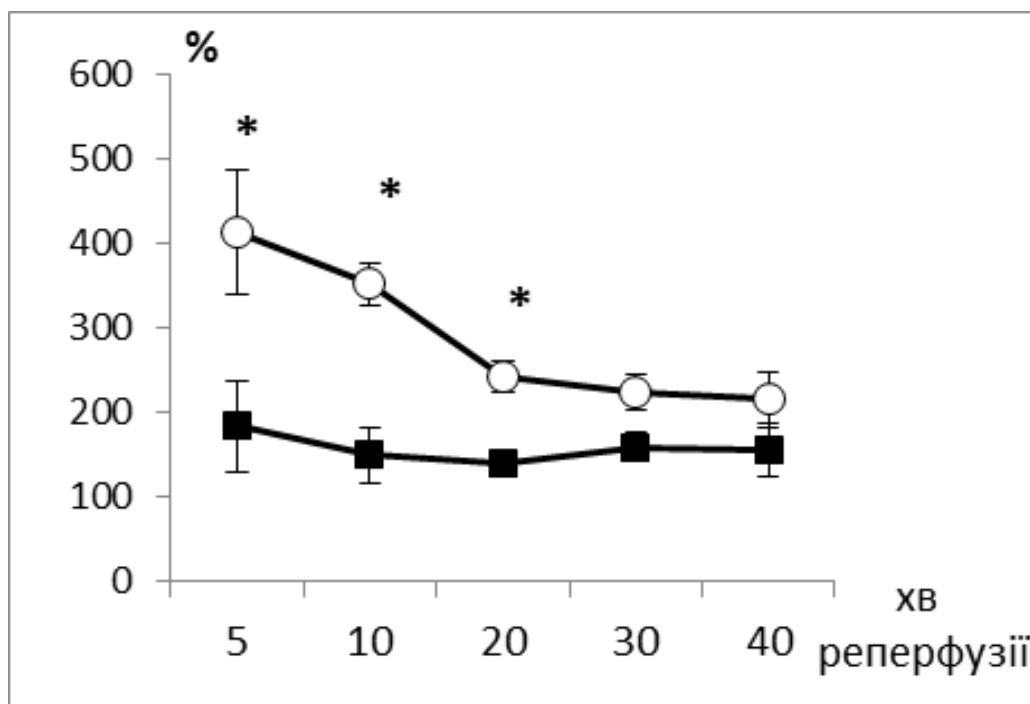


Рис.3.22. Вплив реперфузії ізолюваного серця розчином, що містить GSH на зміну кисневої вартості роботи міокарда.

Значення виражаються як середні значення  $\pm$  DS. Порівняння між групами проводили за допомогою тесту Крускала-Воліса з наступним застосуванням критерію Манна-Уїтні ( $n \geq 5$  на групу).

\*  $P < 0,05$ , порівняно з контрольною групою.

Такі дані вказують на покращення процесів спряження окислення і синтезу АТФ в ішемізованому міокарді щурів за дії екзогенного глутатиону, а також про реалізацію антиоксидантної дії препарату гепавал.

Додатковим підтвердженням позитивної дії препарату глутатиону було значне зниження вивільнення мітохондріального фактора від ішемізованого серця в цій групі (рис 3.23). Таким чином, одним із механізмів реалізації кардіопротекторної дії глутатиону може виступати інгібування утворення МПТП, адже це призводило до зменшення реперфузійних порушень функції

серця з одного боку та зниження вивільнення кількості мітохондріального фактора з іншого.

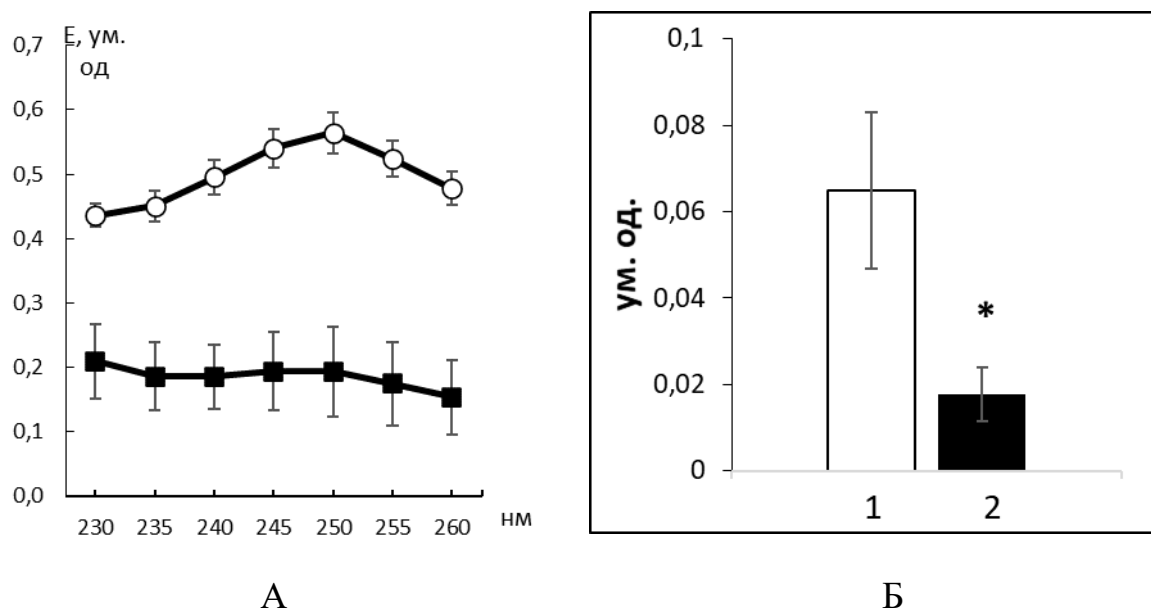


Рис.3.23. Оптична щільність розчинів (А), що відтікали від ізольованого серця та рівень мітохондріального фактора (Б) після ішемії в контрольній серії (1) та при постішемічному введенні глутатіону (2).

Значення виражаються як середні значення  $\pm$  DS. Порівняння між групами проводили за допомогою тесту Крускала-Воліса з наступним застосуванням критерію Манна-Уїтні ( $n \geq 5$  на групу).

\*  $P < 0,05$ , порівняно з контрольною групою.

Отже, введення екзогенного глутатіону мало кардіопротекторний вплив і попереджувало розвиток реперфузійного порушення скоротливої функції і кисневого метаболізму міокарда ізольованого серця щурів.

### 3.10. Вплив введення екзогенного глутатіону в ранній реперфузійний період на концентрацію глутатіонів відновленого та окисленого в тканинах серця.

Для реалізації своїх функцій в повній мірі глутатіон повинен з русла крові проникнути в клітини. Проте внутрішньочеревинний укол є значно простішим і доступнішим для пересічного громадянина способом ввести ліки. В мембранах клітин і органел є переносники, що транспортують амінокислоти, в тому числі і GSH, крізь мембрани [41,42]. З метою перевірки чи накопичується екзогенний глутатіон тканинами серця *in vivo* ми препарат глутатіону вводили в концентрації 52 мг/кг. Згідно з інструкцією виробника, концентрація препарату в крові зростає через 5-10 хв і поступово знижується, майже досягаючи вихідних значень приблизно через 60 хв після введення. В нашому досліді ні GSH, ні GSSG достовірно не змінювався в тканинах серця через 10 хв, однак рівень GSH достовірно зростав в 1,5 рази через 30 хвилин після введення препарату ( $p < 0,05$ ) (Рис.3.24). Це дає підстави вважати, що препарат із крові поглинається органами в тому числі і міокардом.

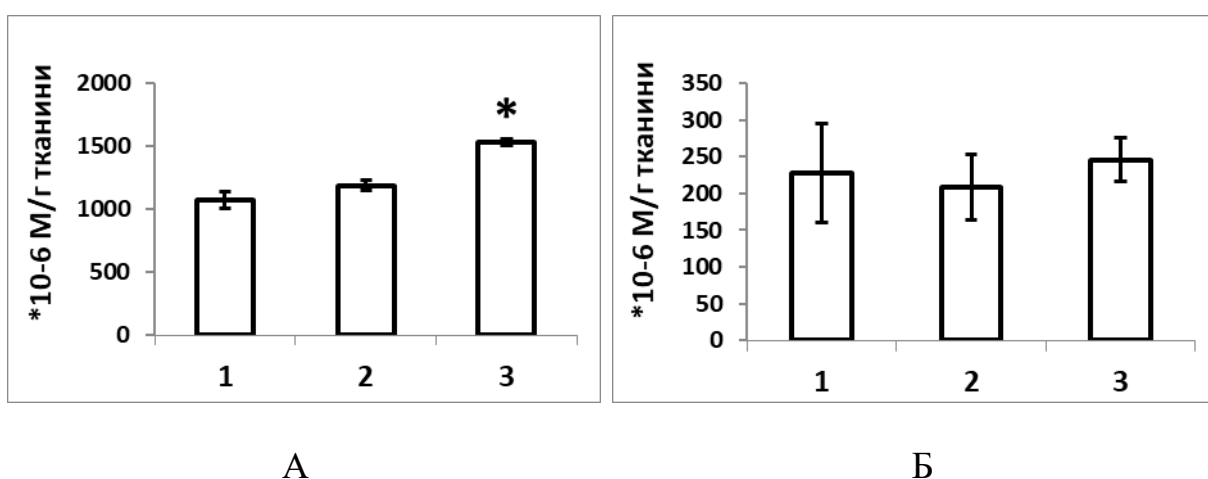


Рис. 3.24. Вміст відновленої (А) та окисленої (Б) форми глутатіону в тканинах серця контрольних щурів (1), після введення препарату глутатіону за 10 хвилин (2) та за 30 хвилин (3) до декапітації. \*  $p < 0,05$  проти контролю

Отримані нами дані вказують на те, що тканини серця здатні накопичувати глутатіон з русла крові при екзогенному його введенні, а посткондиціювання препаратом гепавал покращує відновлення скоротливої функції міокарда в реперфузійний період. Це робить глутатіон зручним і ефективним у використанні для корекції постішемичних порушень функції міокарда та ймовірно інших органів.

## ЗАКЛЮЧНИЙ РОЗДІЛ

Амінокислота L-цистеїн належить до умовно незамінних амінокислот і є надзвичайно важливою для організму. Вона входить до структури активних центрів ензимів, піддається посттрансляційним модифікаціям, таким чином регулюючи фолдинг та активність білків. Крім того L-цистеїн є попередником синтезу таких активних молекул як  $H_2S$  та GSH. Показано, що сірководень має дозозалежний вплив на серцево-судинну систему і впливає на систему оксиду азоту [92]. Під впливом щоденних навантажень різного генезу серцево-судинна система повинна адаптуватись до змін потреб тканин та органів в кисні та поживних речовинах. Фізіологічний механізм, що забезпечує таку адаптацію, описує закон Франка-Старлінга – на збільшення об'єму крові, що надходить в порожнини серця міокард відповідає збільшенням сили скорочення. Для реалізації скорочення потрібна достатня кількість енергетичних молекул і це ще одна характеристика закону Франка-Старлінга – енергоефективність процесу - в умовах фізіологічної норми вироблення та використання АТФ відбувається без надлишків, навіть якщо загальний обіг молекул збільшується в 4 рази [65,66]. Для цього в процес залучені не лише актин-міозинові та тітинові молекули, для власне скорочення, а й транспортери йонів та нуклеотидів. Через щільну компартменталізацію простору кардіоміоцитів утворюються місцеві концентрації АТФ та  $Ca^{2+}$  що забезпечують адекватне функціонування м'яза [69].

Відомо, що вагому роль в реалізації цього закону відіграє вторинний посередник NO, оскільки надзвичайно важливим є не лише забезпечення адекватного скорочення, але й розслаблення міокарду. Також показана, хоч і не до кінця вивчена, роль  $H_2S$ . Дефіцит  $H_2S$  у плазмі або аорті був виявлений

при старінні, гіпертонії та ішемічній хворобі [90,91,112]. Ці стани характеризуються порушенням реакції серця на збільшення об'єму крові, що надходить до шлуночків. Екзогенні донори  $H_2S$ , такі як  $NaHS$ , демонструють сприятливий вплив на серцево-судинну систему, включаючи поліпшення реакції Франка-Старлінга [127]. І ми припустили, що L-цистеїн як попередник синтезу  $H_2S$  може мати вплив на реалізацію закону Франка-Старлінга.

Наші результати показали, що введення лише L-цистеїну не мало значного впливу на P-V залежність ізольованого серця щурів. А комбіноване введення блокатора  $H_2S$ -синтезуючого ензиму CSE PAG та L-цистеїну значно збільшувало силу скорочення міокарда у відповідь на дозоване навантаження об'ємом. Ензим CSE є цитоплазматичним джерелом  $H_2S$  у клітині, але не єдиним. Іншим ензимом, що продукує  $H_2S$ , є MPST, який здебільшого знаходиться в мітохондріях і працює в парі з ензимом CAT. MPST виробляє  $H_2S$  з 3-меркаптопірувату, який продукується CAT з цистеїну та альфа-кетоглутарату. Ми припустили, що в наших експериментах PAG інгібував шлях CSE утилізації L-цистеїну та збільшував біодоступність L-цистеїну для CAT, що, в свою чергу, активувало MPST. Проте, наші біохімічні дослідження показали зниження концентрації  $H_2S$  в тканинах серця в групах з введенням PAG + L-цистеїну. Тому, якщо синтез  $H_2S$  шляхом CAT/MPST і активізувався, цього виявилось не достатньо. А отже є інший гравець.

Відомо, що ще одним вагомим шляхом метаболізму і утилізації L-цистеїну є синтез глутатіону. Надлишок вільного L-цистеїну є токсичним для організму, тому блокування одного зі шляхів мусить перенаправити амінокислоту на інші. І ми припустили, що інгібування CSE за допомогою PAG перенаправляє L-цистеїн на шлях виробництва GSH. Першим і лімітуючим кроком в цьому шляху є синтез гамма-глутамілцистеїну з L-глутамату та L-цистеїну за допомогою ензиму GCL. Інгібування цього ензиму шляхом введення BSO разом з PAG + L-цистеїном демонструвало



зниження об'єму на який серце відповідало збільшенням сили скорочення без втрати здатності до розслаблення. Таким чином ми показали, що збільшення функціональних резервів серця залежить від ефективності глутатіонової системи. Введення ж самого BSO призводило до драматичного зниження здатності серця до розслаблення. Цікаво, що на фоні введення BSO + PAG + L-цистеїну концентрація  $H_2S$  зростала. Значить, мітохондріальний синтез  $H_2S$  все ж активізується в разі інгібування цитоплазматичного. Проте все ще не достатньо для забезпечення реалізації функції серця адекватно відносно навантаження.

Отже, GSH має вагомий вплив на реалізацію базового механізму функціонування серця – реакцію серця на навантаження. GSH є кофактором для багатьох ензимів, здатен глутатіонілювати білки та сам по собі взаємодіяти з АФК. Біохімічні дослідження показали, що за введення PAG + L-цистеїну в тканинах серця збільшує концентрацію NO, знижуються кількість АФК та показники перекисного окиснення ліпідів. Стимулювання ендogenous синтезу GSH мало антиоксидантний ефект і в випадку навантаження об'ємом це також виявилось вагомим фактором. Навіть попри те, що однією з можливих ланок регуляції реалізації збільшення сили скорочення міокарду у відповідь на розтягнення є АФК [61]. Можливим механізмом такого впливу є як пряма здатність GSH до усунення АФК, так і глутатіонілювання кальцієвих каналів [69]. Наші дані свідчать, що активність конститутивної NO-синтази зростала, отже за нормальних умов не відбувалось її надмірного глутатіонілювання, тому вдалось уникнути роз'єднання ензиму і надмірної продукції АФК.

Іншим питанням є важливість відновлення функції серця за стресових умов, наприклад, за розвитку ішемічно-реперфузійного ураження. Воно починається з браком кисню, зміною рН клітин, виснаженням АТФ та йонним дисбалансом, а розвивається з початком реперфузії, відновленням постачання кисню та вибуховим зростанням кількості АФК. Це призводить

до пошкодження структур клітини, перекисного окиснення ліпідів, білків, порушення функції мітохондрій та врешті некротичної чи апоптотичної смерті клітини. В цьому випадку надзвичайно важливим є адекватне функціонування антиоксидантних систем, в тому числі глутатіонової. Крім того, що L-цистеїн є безпосереднім донором для синтезу  $H_2S$  та GSH, його доступність для GCL є одним з лімітуючих факторів для синтезу GSH *de novo* [25]. Зважаючи на наші результати викладені вище, щодо реалізації закону Франка-Старлінга, ключові ролі сірководню та глутатіону, а також вплив на систему NO, ми припустили, що модуляція метаболізму L-цистеїну може вплинути на здатність серця відновлювати свою функцію в умовах ішемії-реперфузії.

Ми показали, що PAG+L-цистеїн має кардіопротекторний ефект, сприяючи відновленню функції серця за умов моделювання ішемії-реперфузії. Цей ефект проявлявся в повному відновленні тиску, що розвивав лівий шлуночок починаючи з перших хвилин реперфузійного періоду і до закінчення експерименту. Під впливом внутрішньочеревинного введення PAG+L-цистеїну не спостерігалось контрактури міокарду та повністю відновлювалась здатність серця до розслаблення. Щоб бути впевненим, що спостережувана кардіопротекція була спричинена комбінацією PAG + L-цистеїн, ми проводили експерименти лише з введенням PAG. Ми показали, що PAG у вибраній дозі дещо покращив відновлення скорочувальної функції серця після ішемії-реперфузії. Літературні дані вказують на протекторний вплив PAG у гентаміцинової моделі нефротоксичності, що проявлялось в значному зменшенні запалення [11]. Подібним чином PAG зменшував тяжкість панкреатиту та супутнє пошкодження легенів в моделюванні гострого панкреатиту [3]. Крім того, Хуанг та співавт. продемонстрували кардіопротекторні властивості S-пропаргіл-цистеїну як нового модулятора ендогенного  $H_2S$  [136]. Вважається, що S-пропаргіл-цистеїн є субстратом для CSE, що збільшує  $H_2S$  і зменшує розмір інфаркту та покращує серцеву

функцію у моделі серцевої недостатності щурів [136,137]. Але в нашому випадку PAG хоч і є аналогічною молекулою, проте все ж заміна цистеїнового залишку на гліциновий виявляла інгібіторний ефект та призводила до зниження присутності  $H_2S$  в тканинах серця.

Лишається припущення про перенаправлення L-цистеїну на синтез глутатіону. Оскільки GSH є одним з найактивніших гравців антиоксидантного захисту, реалізація кардіопротекції шляхом стимулювання ендogenous синтезу глутатіону цілком логічне рішення в умовах ішемії-реперфузії. Серед механізмів реалізації своїх функцій GSH можна виділити пряму взаємодію з АФК, глутатіонілювання та знешкодження АФК глутатіонпероксидазами. Показано, що ефективність взаємодії з АФК у глутатіону вища ніж у каротинів, мелатоніну та кофеїну [54,55,56]. Ще одним можливим шляхом є глутатіонілювання. Цей процес в живих клітинах переважно ензиматичний та забезпечується глутатіонтрансферазами [57]. А за умов недостатності глутатіонпероксидаз в мишей відновлення функції серця після експериментального інфаркту відбувається значно гірше порівняно з контрольними тваринами [116]. При моделюванні серцевої недостатності також падала активність глутатіонпероксидаз [117]. В мітохондріях сердець, підданих впливу ішемії-реперфузії, знижується вміст GSH, що може сприяти окисненню цитохром оксидази C і розвитку мітохондріальної дисфункції [118].

Розробляються різні способи корекції дефіциту GSH. Наприклад, зниження вмісту GSH в тканинах серця на фоні інфаркту міокарда коригувалось введенням N-ацетил-цистеїну (NAC) [13]. NAC виступає прекурсором глутатіону, метаболізується до цистеїну і включається в синтез глутатіону. Показано, що введення NAC підвищує рівні глутатіону, збільшує співвідношення відновленого глутатіону до окисленого, знижує окисний стрес і покращує функцію серця в моделі серцевої недостатності мишей [13,14]. В нашому ж випадку ми вводили попередник синтезу глутатіону і

отримували кардіопротекцію. Ми стимулювали ендогенний синтез глутатіону тканинами серця.

Перевіряючи цей висновок, ми провели експерименти з інгібітором синтезу глутатіону *de novo* BSO і в експериментах з моделюванням ішемії-реперфузії. Механізм клітинного виснаження глутатіону через вплив BSO - це інгібування глутамат-цистеїн-лігази [138]. Наші результати показали, що кардіопротекторний ефект комбінації PAG+L-цистеїн повністю скасовувався додаванням BSO: збільшувалось утворення АФК, підвищувалась активність іNOS та знижувалась активність сNOS, не відбувалось збільшення вмісту GSH та GSSG. Спостерігалось лише 30% відновлення функції серця та розвиток контрактури міокарду. Фіксувалось виділення мітохондріального фактору, що опосередковано свідчить про відкриття MPTP, а отже порушення цілісності мембран мітохондрій.

З літератури відомо, що H<sub>2</sub>S посилює утворення NO [139]. Раніше Мись Л. з колегами показали, що стимуляція ендогенного синтезу H<sub>2</sub>S підвищує активність сNOS, зменшує нітрати та вазорелаксацію аортальних кілець у старих щурів [140]. Результати нашого дослідження показали, що активність сNOS під впливом комбінації PAG+L-цистеїн в тканинах серця також вища як доішемічний період, так і під час реперфузії. Активність іNOS відічі знизилась до та після ішемічний період. Це в результаті дало більшу продукцію NO і зберегло здатність серця до розслаблення. Таким чином, введення PAG+L-цистеїн регулює утворення NO в серці за допомогою синтезу *de novo* та ресинтезу, що покращують відновлення функції ізольованого серця щурів. Можливо також, що має місце глутатіонілювання SERCA, яке її активує стимулюючи таким чином відведення кальцію з цитоплазми та розслаблення міокарду [135].

Оскільки АФК є основним рушієм розвитку реперфузійного пошкодження, попередження їх наробки може бути ключовим в ефекті від введення комбінації PAG+L-цистеїну. Мітохондрії стають головною

мішенню для руйнівної дії АФК. Вибухоподібне утворення АФК у перші хвилини реперфузії після тривалої ішемії опосередковує незворотне відкриття МРТР і призводить до загибелі кардіоміоцитів та порушення функції серця [19, 20, 60]. Раніше ми виявили, що NaHS забезпечив значне відновлення скоротливості серця в моделі ішемії-реперфузії шляхом попередження набухання мітохондрій, спричиненого  $Ca^{2+}$ , через відкриття МРТР [44, 46]. Введення PAG+L-цистеїну супроводжувалось зменшенням генерації АФК. Встановлено, що попередник синтезу  $H_2S$ , L-цистеїн, зменшує зону інфаркту міокарда [26]. Подібним чином було продемонстровано, що S-аліл-L-цистеїн стимулює активність супероксиддисмутази і цим інгібує утворення АФК в ізольованому серці щурів в умовах моделювання ішемії-реперфузії [56]. Крім того, введення NaHS зменшувало розмір інфаркту міокарда, запобігало апоптозу кардіоміоцитів та збільшувало фосфорилування GSK-3beta (Ser9) з подальшим інгібуванням відкриття МРТР [33, 58]. Ми показали, що комбінація PAG+L-цистеїн інгібує МРТР, однак не  $H_2S$  є посередником цього ефекту.

Ми провели біохімічне дослідження зміни концентрації GSH та GSSG в тканинах серця в нормі та в реперфузійний період. Ми показали, що вміст обох форм глутатіону зростає в результаті введення комбінації PAG+L-цистеїн. Вміст GSH зростає майже втричі. Це свідчить, що зниження утворення АФК та інгібування МРТР опосередковане саме впливом глутатіону як антиоксиданта. Одними з основних джерел АФК в мітохондрії є NADH та FADH оксидази, глутатіонілювання активних центрів яких знижує їх активність [77,79]. Ці модифікації зворотні і при зростанні активності глутатіон пероксидази скасовуються. Таким чином ензими уникають окислення та не беруть участі в надмірному утворенні АФК. А отже зберігається цілісність мітохондрій та виживаність клітин.

Таким чином ми довели, що введення PAG+L-цистеїну призводить до зростання ендогенного утворення GSH, що в свою чергу має потужний кардіопротекторний ефект в умовах ішемії-реперфузії.

Іншим нашим завданням було дослідити чи можливо запобігти розвитку реперфузійного пошкодження функції серця в ранній реперфузійний період шляхом введення екзогенного глутатіону? Чи накопичується глутатіон тканинами серця після внутрішньочеревинного введення? В літературі існують суперечливі дані з приводу впливу екзогенного глутатіону в умовах ішемії-реперфузії. Показано, що внутрішньовенне введення 5-15 мг/кг GSSG щурам перед моделюванням коронарооклюзії супроводжувалось погіршенням відновлення електричної активності міокарду підчас реперфузії: спостерігався розвиток порушень ритму (тахікардія, екстрасистолія) з наступним перетіканням у фібриляцію та припинення життєдіяльності тварин [141]. Водночас, введення GSH в даній моделі супроводжувалось відновленням ритму вже на 4-й хвилині реперфузії, а важких порушень шлуночкового ритму не спостерігали. Ці дані вказують на кардіопротекторну дію GSH в умовах реперфузійного пошкодження.

Наше дослідження показало, що реперфузія сердець препаратом GSH призводить до покращення відновлення функції серця в реперфузійний період. Так, скоротлива активність відновились на 70% в перші 10 хвилин та на 56% до кінця реперфузійного періоду. Це значно краще, ніж без введення препарату відновленого глутатіону. Утилізація кисню ішемізованим міокардом також покращилась із введенням глутатіону. Ми також показали, що навіть при внутрішньочеревинному введенні розчину глутатіону його вміст в тканинах серця зростає вже через пів години після ін'єкції. Це свідчить про здатність екзогенного GSH накопичуватись в тканинах, зокрема в міокарді.

Ми вважаємо, що результати нашого дослідження мають вагомим фундаментальне та практичне значення. Прояснюють можливість ендогенної

стимуляції синтезу глутатіону та її вплив на функцію серця в нормі та в умовах ішемії реперфузії. Ці дані можуть бути використані для подальших досліджень функції серця та функціонування антиоксидантних систем, а також взаємодії глутатіонової системи та сигнальних шляхів газоподібних посередників. Наші дані мають прикладне значення для покращення відновлення функції серця в пацієнтів в післяопераційний період. Зокрема, для усунення реперфузійних пошкоджень при планових операціях, гострих ішемічних станах.

Узагальнена схема результатів нашої роботи представлена на Рис. 4.1.

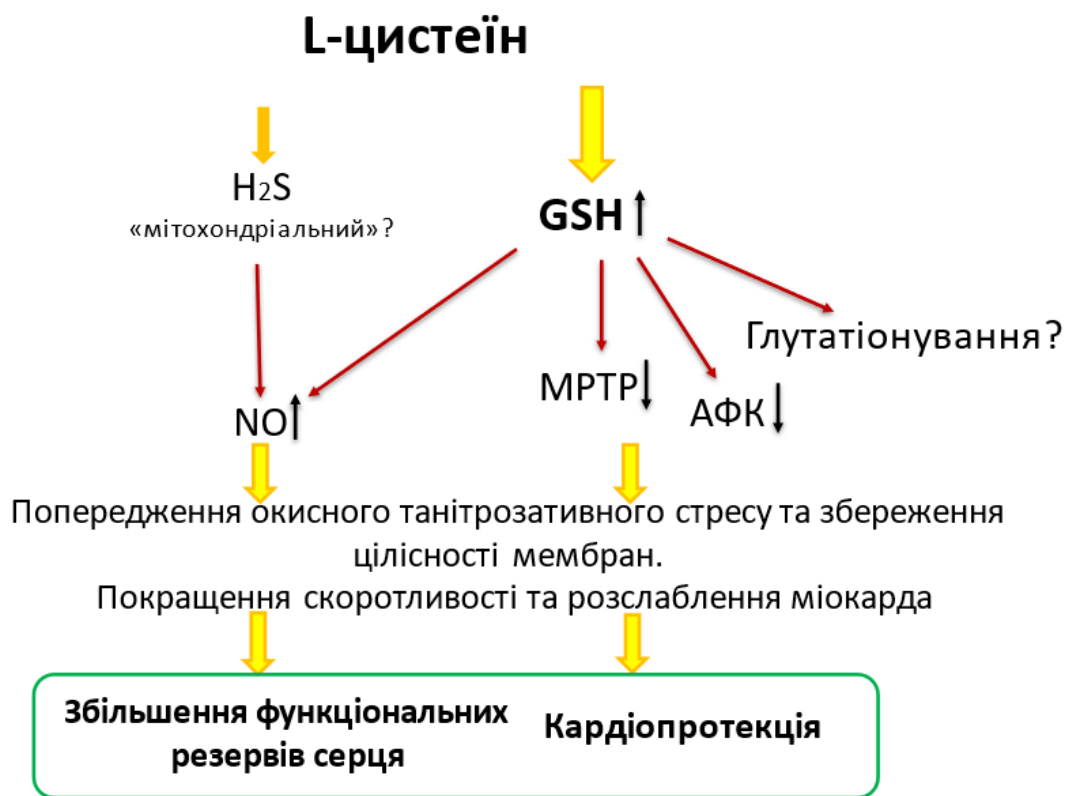


Рис. 4.1. Узагальнена схема результатів дисертаційної роботи.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено вплив модуляції метаболізму L-цистеїну на реакцію серця дорослих статевозрілих щурів на навантаження. Було досліджено вплив блокаторів перетворення L-цистеїну на  $H_2S$  та GSH окремо та разом на реалізацію закону Франка-Старлінга та на відновлення функції серця в умовах ішемії-реперфузії. Було проведено біохімічні дослідження для з'ясування змін в активності ензимів, вмісту АФК, GSH та GSSG.

1. Спрямовування перетворення L-цистеїну по шляху синтезу глутатіону за допомогою введення PAG блокатору  $H_2S$ -синтезуючого ензиму CSE в 2,5 рази збільшувало ендогенний синтез глутатіону. Це істотно збільшувало функціональні резерви міокарда в умовах навантаження серця об'ємом, що супроводжувалося потужним антиоксидантним ефектом, зумовленим підвищенням активності конститутивної NO-синтази на фоні пригнічення утворення АФК в тканинах серця.
2. Введення L-цистеїну на фоні блокади шляху його перетворення у сірководень за допомогою PAG, супроводжувалося потужним кардіопротекторним ефектом при ішемії-реперфузії, що проявлявся в повному відновленні скоротливої активності міокарда, збільшенні ефективності утилізації спожитого кисню, пригніченні утворення МРТР, яке зумовлювало збереження функції мітохондрій.
3. Перемикання метаболізму L-цистеїну на синтез глутатіону внаслідок блокади утворення сірководню запобігало розвитку окисного та



нітрозативного стресу, індукованого ішемією-реперфузією в тканинах серця.

4. Потужний кардіопротекторний ефект від інгібування синтезу сірководню на фоні введення L-цистеїну, що спостерігався за умов моделювання ішемії-реперфузії, був зумовлений посиленою продукцією глутатіону. Трикратне зростання його кількості в тканинах серця дозволяло запобігти розвитку окисного та нітрозативного стресу при ішемії-реперфузії та успішно зберегти функцію серця. Всі протективні ефекти нівелювались введенням блокатора синтезу глутатіону.
5. Перфузія ізольованого серця відновленою формою глутатіону в пост-ішемічний період значно зменшувала реперфузійне пошкодження функції серця.
6. Стимуляція ендogenous синтезу глутатіону істотно збільшувала функціональні резерви і резистентність міокарду до ішемії, що було обумовлено пригніченням утворення АФК в тканинах серця і збереженням функціонування системи оксиду азоту.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Fuchs F, Smith SH. Calcium, cross-bridges, and the Frank-Starling relationship. *News Physiol Sci Int J Physiol Prod Jointly Int Union Physiol Sci Am Physiol Soc.* Лютий 2001;16:5–10.
2. Neely JR, Denton RM, England PJ, Randle PJ. The effects of increased heart work on the tricarboxylate cycle and its interactions with glycolysis in the perfused rat heart. *Biochem J.* Червень 1972;128(1):147–59.
3. Dorofeieva NO, Kuz'menko MO, Shimans'ka TV, Sagach VF. [Cardiohemodynamics and efficiency Frank-Starling mechanism in spontaneously hypertensive rats]. *Fiziolohichniy Zhurnal Kiev Ukr* 1994. 2012;58(4):44–51.
4. Talanov SA, Kotsiuruba AV, Korkach IP, Sahach VF. [Oxidative stress in the cardiovascular system of rats with chronic deficiency of cerebral dopamine]. *Fiziolohichniy Zhurnal Kiev Ukr* 1994. 2009;55(4):32–40.
5. Angelone T, Quintieri AM, Pasqua T, Filice E, Cantafio P, Scavello F, et al. The NO stimulator, Catestatin, improves the Frank–Starling response in normotensive and hypertensive rat hearts. *Nitric Oxide.* 15, Листопад 2015;50:10–9.
6. Data and statistics [Інтернет]. [цит. за 12, Листопад 2020]. Доступний у: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cardiovascular-diseases/data-and-statistics>
7. Baehr A, Klymiuk N, Kupatt C. Evaluating Novel Targets of Ischemia Reperfusion Injury in Pig Models. *Int J Mol Sci* [Інтернет]. 25, Вересень 2019

- [цит. за 12, Листопад 2020];20(19). Доступний у:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6801853/>
8. Historical Perspective on the Pathology of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury | Circulation Research [Інтернет]. [цит. за 12, Листопад 2020]. Доступний у:  
<https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/circresaha.113.300987>
  9. Bolli R, Jeroudi M O, Patel B S, Aruoma O I, Halliwell B, Lai E K, et al. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial «stunning» is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res.* 01, Вересень 1989;65(3):607–22.
  10. Chandra M, Chandra N, Agrawal R, Kumar A, Ghatak A, Pandey VC. The free radical system in ischemic heart disease. *Int J Cardiol.* Лютий 1994;43(2):121–5.
  11. Ozer MK, Parlakpınar H, Cigremis Y, Ucar M, Vardi N, Acet A. Ischemia-reperfusion leads to depletion of glutathione content and augmentation of malondialdehyde production in the rat heart from overproduction of oxidants: Can caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protect the heart? *Mol Cell Biochem.* Травень 2005;273(1–2):169–75.
  12. Tang LD, Sun JZ, Wu K, Sun CP, Tang ZM. Beneficial effects of N-acetylcysteine and cysteine in stunned myocardium in perfused rat heart. *Br J Pharmacol.* Березень 1991;102(3):601–6.
  13. Adamy C, Mulder P, Khouzami L, Andrieu-abadie N, Defer N, Candiani G, et al. Neutral sphingomyelinase inhibition participates to the benefits of N-acetylcysteine treatment in post-myocardial infarction failing heart rats. *J Mol Cell Cardiol.* Вересень 2007;43(3):344–53.

14. Pol A van der, Gilst WH van, Voors AA, Meer P van der. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. *Eur J Heart Fail* [Интернет]. 2019 [цит. за 12, Листопад 2020];21(4). Доступный у: <https://www.readcube.com/articles/10.1002%2Fejhf.1320>
15. Неалкогольный стеатогепатит: механизмы развития и тактика лечения [Интернет]. [цит. за 17, Листопад 2020]. Доступный у: <https://health-ua.com/article/25006-nealkogolnyj-steatogepatit--mehanizmy-razvitiya--i-taktika-lecheniya>
16. Заславкая Р.М., Лилица Г.В., Калинина Е.В., Комиссарова И.А., Максимова Л.Н. Влияние метаболического препарата Элтацин на клинические, функциональные и биохимические показатели у больных хронической сердечной недостаточностью. Рациональная Фармакотерапия В Кардиологии [Интернет]. 2007 [цит. за 17, Листопад 2020];3(1). Доступный у: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-metabolicheskogo-preparata-eltatsin-na-klinicheskie-funktsionalnye-i-biohimicheskie-pokazateli-u-bolnyh-hronicheskoy>
17. Conrad M, Sato H. The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x (c) (-): cystine supplier and beyond. *Amino Acids*. Січень 2012;42(1):231–46.
18. Knickelbein RG, Seres T, Lam G, Johnston RB, Warshaw JB. Characterization of multiple cysteine and cystine transporters in rat alveolar type II cells. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 01, Грудень 1997;273(6):L1147–55.
19. Lewerenz J, Hewett SJ, Huang Y, Lambros M, Gout PW, Kalivas PW, et al. The Cystine/Glutamate Antiporter System xc<sup>-</sup> in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 10, Лютий 2013;18(5):522–55.

20. Christensen HN. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev.* Січень 1990;70(1):43–77.
21. Griffith OW. Mammalian sulfur amino acid metabolism: an overview. *Methods Enzymol.* 1987;143:366–76.
22. Miniaci MC, Irace C, Capuozzo A, Piccolo M, Di Pascale A, Russo A, et al. Cysteine Prevents the Reduction in Keratin Synthesis Induced by Iron Deficiency in Human Keratinocytes. *J Cell Biochem.* Лютий 2016;117(2):402–12.
23. Sato H, Shiiya A, Kimata M, Maebara K, Tamba M, Sakakura Y, et al. Redox imbalance in cystine/glutamate transporter-deficient mice. *J Biol Chem.* 11, Листопад 2005;280(45):37423–9.
24. Soria FN, Zabala A, Pampliega O, Palomino A, Miguelez C, Ugedo L, et al. Cystine/glutamate antiporter blockage induces myelin degeneration. *Glia.* 2016;64(8):1381–95.
25. Differential Effects of Cysteine on Protein and Coenzyme A Synthesis in Rat Heart - PubMed [Інтернет]. [цит. за 22, Травень 2020]. Доступний у: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6204541/>
26. Elsey DJ, Fowkes RC, Baxter GF. L-cysteine stimulates hydrogen sulfide synthesis in myocardium associated with attenuation of ischemia-reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* Березень 2010;15(1):53–9.
27. Cramer SL, Saha A, Liu J, Tadi S, Tiziani S, Yan W, et al. Systemic depletion of L-cyst(e)ine with cyst(e)inase increases reactive oxygen species and suppresses tumor growth. *Nat Med.* 2017;23(1):120–7.
28. King N, Lin H, Suleiman M-S. Oxidative stress increases SNAT1 expression and stimulates cysteine uptake in freshly isolated rat cardiomyocytes. *Amino Acids.* Лютий 2011;40(2):517–26.

29. Li H, Marshall ZM, Whorton AR. Stimulation of cystine uptake by nitric oxide: regulation of endothelial cell glutathione levels. *Am J Physiol.* 1999;276(4):C803-811.
30. Ueland PM, Refsum H. [Plasma homocysteine, a risk factor for premature vascular disease. Plasma levels in healthy persons; during pathologic conditions and drug therapy]. *Nord Med.* 1989;104(11):293–8.
31. Mani S, Yang G, Wang R. A critical life-supporting role for cystathionine  $\gamma$ -lyase in the absence of dietary cysteine supply. *Free Radic Biol Med.* 15, Травень 2011;50(10):1280–7.
32. Li L, Moore PK. Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air? *Trends Pharmacol Sci.* 01, Лютий 2008;29(2):84–90.
33. Picton R, Eggo MC, Merrill GA, Langman MJS, Singh S. Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese. *Gut.* Лютий 2002;50(2):201–5.
34. Furne J, Springfield J, Koenig T, DeMaster E, Levitt MD. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochem Pharmacol.* 15, Липень 2001;62(2):255–9.
35. Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu SH, Siau JL, Bhatia M, et al. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochem Biophys Res Commun.* 28, Квітень 2006;343(1):303–10.
36. Tanizawa K. Production of H<sub>2</sub>S by 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase. *J Biochem (Tokyo).* Квітень 2011;149(4):357–9.

37. Mancardi D, Penna C, Merlino A, Del Soldato P, Wink DA, Pagliaro P. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: hydrogen sulfide. *Biochim Biophys Acta*. Липень 2009;1787(7):864–72.
38. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci*. 25, Вересень 2007;104(39):15560–5.
39. Snoke JE. Isolation and properties of yeast glutathione synthetase. *J Biol Chem*. Квітень 1955;213(2):813–24.
40. Schmidt MM, Dringen R. Glutathione (GSH) Synthesis and Metabolism. В: Choi I-Y, Gruetter R, за ред. *Neural Metabolism In Vivo* [Інтернет]. Boston, MA: Springer US; 2012 [цит. за 24, Липень 2021]. с. 1029–50. (*Advances in Neurobiology*; вип. 4). Доступний у: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-1788-0\\_36](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-1788-0_36)
41. Gaucher C, Boudier A, Bonetti J, Clarot I, Leroy P, Parent M. Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants* [Інтернет]. 27, Квітень 2018 [цит. за 12, Листопад 2020];7(5). Доступний у: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5981248/>
42. Ballatori N, Krance SM, Marchan R, Hammond CL. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol Aspects Med*. Квітень 2009;30(1–2):13–28.
43. Bánhegyi G, Csala M, Nagy G, Sorrentino V, Fulceri R, Benedetti A. Evidence for the transport of glutathione through ryanodine receptor channel type 1. *Biochem J*. 15, Грудень 2003;376(Pt 3):807–12.
44. Deponte M. The Incomplete Glutathione Puzzle: Just Guessing at Numbers and Figures? *Antioxid Redox Signal*. 20, Листопад 2017;27(15):1130–61.

45. Bachhawat AK, Kaur A. Glutathione Degradation. *Antioxid Redox Signal*. 20, Листопад 2017;27(15):1200–16.
46. Wickham S, West MB, Cook PF, Hanigan MH. Gamma-Glutamyl Compounds: Substrate Specificity of Gamma-Glutamyl Transpeptidase Enzymes. *Anal Biochem*. 15, Липень 2011;414(2):208–14.
47. Inoue M. Glutathionists in the battlefield of gamma-glutamyl cycle. *Arch Biochem Biophys*. 01, Квітень 2016;595:61–3.
48. Tate SS, Meister A.  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. В: Najjar VA, за ред. *The Biological Effects of Glutamic Acid and Its Derivatives* [Інтернет]. Dordrecht: Springer Netherlands; 1981 [цит. за 12, Листопад 2020]. с. 357–68. (*Developments in Molecular and Cellular Biochemistry*). Доступний у: [https://doi.org/10.1007/978-94-009-8027-3\\_23](https://doi.org/10.1007/978-94-009-8027-3_23)
49. Chi Z, Zhang J, Tokunaga A, Harraz MM, Byrne ST, Dolinko A, et al. Botch promotes neurogenesis by antagonizing Notch. *Dev Cell*. 17, Квітень 2012;22(4):707–20.
50. Tsunoda S, Avezov E, Zyryanova A, Konno T, Mendes-Silva L, Pinho Melo E, et al. Intact protein folding in the glutathione-depleted endoplasmic reticulum implicates alternative protein thiol reductants. *eLife* [Інтернет]. 29, Липень 2014 [цит. за 12, Листопад 2020];3. Доступний у: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4109312/>
51. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:711–60.
52. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*. 01, Листопад 1999;27(9):916–21.



53. Circu ML, Aw TY. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 01, ЖОВТЕНЬ 2012;1823(10):1767–77.
54. Galano A, Alvarez-Idaboy JR. Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals. *RSC Adv.* 28, Листопад 2011;1(9):1763–71.
55. Galano A. On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals. *Phys Chem Chem Phys.* 29, Березень 2011;13(15):7178–88.
56. León-Carmona JR, Galano A. Is caffeine a good scavenger of oxygenated free radicals? *J Phys Chem B.* 21, Квітень 2011;115(15):4538–46.
57. Zhang J, Ye Z, Singh S, Townsend DM, Tew KD. An evolving understanding of the S-glutathionylation cycle in pathways of redox regulation. *Free Radic Biol Med.* Травень 2018;120:204–16.
58. Klatt P, Molina EP, De Lacoba MG, Padilla CA, Martinez-Galesteo E, Barcena JA, et al. Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* Вересень 1999;13(12):1481–90.
59. Tew KD, Manevich Y, Grek C, Xiong Y, Uys J, Townsend DM. The Role of Glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in Cancer. *Free Radic Biol Med.* 15, Липень 2011;51(2):299–313.
60. Singh RR, Reindl KM. Glutathione S-Transferases in Cancer. *Antioxidants.* 29, Квітень 2021;10(5):701.
61. Cingolani HE, Pérez NG, Cingolani OH, Ennis IL. The Anrep effect: 100 years later. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 15, Січень 2013;304(2):H175–82.

62. Scotcher J, Prysyzhna O, Boguslavskiy A, Kistamas K, Hadgraft N, Martin ED, et al. Disulfide-activated protein kinase G I $\alpha$  regulates cardiac diastolic relaxation and fine-tunes the Frank–Starling response. *Nat Commun.* 26, ЖОВТЕНЬ 2016;7:13187.
63. Cingolani OH, Kirk JA, Seo K, Koitabashi N, Lee D-I, Ramirez-Correa G, et al. Thrombospondin-4 is required for stretch-mediated contractility augmentation in cardiac muscle. *Circ Res.* 09, Грудень 2011;109(12):1410–4.
64. Caldiz CI, Díaz RG, Nolly MB, Chiappe de Cingolani GE, Ennis IL, Cingolani HE, et al. Mineralocorticoid receptor activation is crucial in the signalling pathway leading to the Anrep effect. *J Physiol.* 15, Грудень 2011;589(Pt 24):6051–61.
65. Balaban RS. Cardiac Energy Metabolism Homeostasis: Role of Cytosolic Calcium. *J Mol Cell Cardiol.* ЖОВТЕНЬ 2002;34(10):1259–71.
66. Balaban RS, Kantor HL, Katz LA, Briggs RW. Relation between work and phosphate metabolite in the in vivo paced mammalian heart. *Science.* 30, Травень 1986;232(4754):1121–3.
67. Mootha VK, Arai AE, Balaban RS. Maximum oxidative phosphorylation capacity of the mammalian heart. *Am J Physiol.* Лютий 1997;272(2 Pt 2):H769-775.
68. Ventura-Clapier R, Kuznetsov A, Veksler V, Boehm E, Anflous K. Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity. *Mol Cell Biochem.* Липень 1998;184(1–2):231–47.
69. Piquereau J, Veksler V, Novotova M, Ventura-Clapier R. Energetic Interactions Between Subcellular Organelles in Striated Muscles. *Front Cell Dev Biol.* 02, ЖОВТЕНЬ 2020;8:581045.

70. Saks V, Dzeja P, Schlattner U, Vendelin M, Terzic A, Wallimann T. Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *J Physiol*. 01, Березень 2006;571(Pt 2):253–73.
71. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 13, Вересень 2007;357(11):1121–35.
72. Del Re DP, Amgalan D, Linkermann A, Liu Q, Kitsis RN. Fundamental Mechanisms of Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease. *Physiol Rev*. 31, Липень 2019;99(4):1765–817.
73. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013;123(1):92–100.
74. Frank A, Bonney M, Bonney S, Weitzel L, Koeppen M, Eckle T. Myocardial ischemia reperfusion injury - from basic science to clinical bedside. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. Вересень 2012;16(3):123–32.
75. Avkiran M, Marber MS. Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol*. 06, Березень 2002;39(5):747–53.
76. Luongo TS, Lambert JP, Gross P, Nwokedi M, Lombardi AA, Shanmughapriya S, et al. The mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger is essential for Ca<sup>2+</sup> homeostasis and viability. *Nature*. 04, Травень 2017;545(7652):93–7.
77. Wu M-Y, Yiang G-T, Liao W-T, Tsai AP-Y, Cheng Y-L, Cheng P-W, et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1650–67.
78. Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Huh JI, Shim KH, et al. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age*. Липень 1997;20(3):127–40.

79. Miller AA, Dusting GJ, Roulston CL, Sobey CG. NADPH-oxidase activity is elevated in penumbral and non-ischemic cerebral arteries following stroke. *Brain Res.* 21, Вересень 2006;1111(1):111–6.
80. Alkaitis MS, Crabtree MJ. Recoupling the Cardiac Nitric Oxide Synthases: Tetrahydrobiopterin Synthesis and Recycling. *Curr Heart Fail Rep.* Вересень 2012;9(3):200–10.
81. Paul BD, Snyder SH. Modes of Physiologic H<sub>2</sub>S Signaling in the Brain and Peripheral Tissues. *Antioxid Redox Signal.* 10, Лютий 2015;22(5):411–23.
82. Aroca A, Gotor C, Bassham DC, Romero LC. Hydrogen Sulfide: From a Toxic Molecule to a Key Molecule of Cell Life. *Antioxidants* [Інтернет]. 15, Липень 2020 [цит. за 12, Жовтень 2020];9(7). Доступний у: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7402122/>
83. Xie Z-Z, Liu Y, Bian J-S. Hydrogen Sulfide and Cellular Redox Homeostasis. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1–12.
84. Kimura Y, Goto Y-I, Kimura H. Hydrogen Sulfide Increases Glutathione Production and Suppresses Oxidative Stress in Mitochondria. *Antioxid Redox Signal.* Січень 2010;12(1):1–13.
85. Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, et al. H<sub>2</sub>S Signals Through Protein S-Sulfhydration. *Sci Signal.* 10, Листопад 2009;2(96):ra72.
86. Paul BD, Snyder SH. H<sub>2</sub>S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Серпень 2012;13(8):499–507.
87. Zhao K, Ju Y, Li S, Altaany Z, Wang R, Yang G. S-sulfhydration of MEK1 leads to PARP-1 activation and DNA damage repair. *EMBO Rep.* Липень 2014;15(7):792–800.

88. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 25, КВІТЕНЬ 2008;30(2):214–26.
89. Li L, Rose P, Moore PK. Hydrogen Sulfide and Cell Signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011;51(1):169–87.
90. Yan H, Du J, Tang C. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 02, СІЧЕНЬ 2004;313(1):22–7.
91. Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, et al. H<sub>2</sub>S as a Physiologic Vasorelaxant: Hypertension in Mice with Deletion of Cystathionine  $\gamma$ -Lyase. *Science*. 24, ЖОВТЕНЬ 2008;322(5901):587–90.
92. Zanardo RCO, Brancalone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. ЖОВТЕНЬ 2006;20(12):2118–20.
93. Vicente JB, Colaço HG, Mendes MIS, Sarti P, Leandro P, Giuffrè A. NO\* binds human cystathionine  $\beta$ -synthase quickly and tightly. *J Biol Chem*. 21, Березень 2014;289(12):8579–87.
94. Morikawa T, Kajimura M, Nakamura T, Hishiki T, Nakanishi T, Yukutake Y, et al. Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24, СІЧЕНЬ 2012;109(4):1293–8.
95. Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR, et al. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28, Лютий 1995;92(5):1585–9.

96. Yang G, Wu L, Bryan S, Khaper N, Mani S, Wang R. Cystathionine gamma-lyase deficiency and overproliferation of smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 01, Червень 2010;86(3):487–95.
97. Mani Sarathi, Li Hongzhu, Untereiner Ashley, Wu Lingyun, Yang Guangdong, Austin Richard C., et al. Decreased Endogenous Production of Hydrogen Sulfide Accelerates Atherosclerosis. *Circulation.* 25, Червень 2013;127(25):2523–34.
98. Altaany Z, Yang G, Wang R. Crosstalk between hydrogen sulfide and nitric oxide in endothelial cells. *J Cell Mol Med.* Липень 2013;17(7):879–88.
99. Bibli S-I, Yang G, Zhou Z, Wang R, Topouzis S, Papapetropoulos A. Role of cGMP in hydrogen sulfide signaling. *Nitric Oxide.* Квітень 2015;46:7–13.
100. Bucci Mariarosaria, Papapetropoulos Andreas, Vellecco Valentina, Zhou Zongmin, Pyriochou Anastasia, Roussos Charis, et al. Hydrogen Sulfide Is an Endogenous Inhibitor of Phosphodiesterase Activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 01, Жовтень 2010;30(10):1998–2004.
101. Jiang B, Tang G, Cao K, Wu L, Wang R. Molecular mechanism for H<sub>2</sub>S-induced activation of K(ATP) channels. *Antioxid Redox Signal.* 15, Травень 2010;12(10):1167–78.
102. Sun Y-G, Cao Y-X, Wang W-W, Ma S-F, Yao T, Zhu Y-C. Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 01, Вересень 2008;79(4):632–41.
103. Tang G, Wu L, Liang W, Wang R. Direct stimulation of K(ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* Грудень 2005;68(6):1757–64.
104. Miller C. ClC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature.* Березень 2006;440(7083):484–9.

105. Hu L-F, Li Y, Neo KL, Yong QC, Lee SW, Tan BKH, et al. Hydrogen Sulfide Regulates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Activity via Stimulation of Phosphoinositide 3-Kinase/Akt and Protein Kinase G Pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 01, Листопад 2011;339(2):726–35.
106. Rybin V O, Steinberg S F. Protein kinase C isoform expression and regulation in the developing rat heart. *Circ Res.* 01, Лютий 1994;74(2):299–309.
107. Olson KR, Donald JA. Nervous control of circulation--the role of gasotransmitters, NO, CO, and H<sub>2</sub>S. *Acta Histochem.* 2009;111(3):244–56.
108. Entman ML, Michael L, Rossen RD, Dreyer WJ, Anderson DC, Taylor AA, et al. Inflammation in the course of early myocardial ischemia. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* Серпень 1991;5(11):2529–37.
109. Nadtochiy SM, Nauduri D, Shimanskaya TV, Sagach VF, Brookes PS. Purine release: a protective signaling mechanism of the mitochondrial permeability transition pore in ischemia. *Fiziolohichnyi Zhurnal Kiev Ukr* 1994. 2008;54(6):5–14.
110. Calvert JW, Jha S, Gundewar S, Elrod JW, Ramachandran A, Pattillo CB, et al. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ Res.* 14, Серпень 2009;105(4):365–74.
111. Karwi QG, Bice JS, Baxter GF. Pre- and postconditioning the heart with hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) against ischemia/reperfusion injury in vivo: a systematic review and meta-analysis. *Basic Res Cardiol.* 14, Грудень 2017;113(1):6.
112. Strutynska NA, Kotsiuruba AV, Budko AY, Mys LA, Sagach VF. MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN THE AGING HEART IS ACCOMPANIED BY CONSTITUTIVE NO-SYNTHASES UNCOUPLING

ON THE BACKGROUND OF OXIDATIVE AND NITROSATIVE STRESS.

Fiziolohichniy Zhurnal Kiev Ukr 1994. 2016;62(2):3–11.

113. Viña J, Borras C, Abdelaziz KM, Garcia-Valles R, Gomez-Cabrera MC. The Free Radical Theory of Aging Revisited: The Cell Signaling Disruption Theory of Aging. *Antioxid Redox Signal*. 10, Вересень 2013;19(8):779–87.
114. Ben-Porath I, Weinberg R. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;
115. Tabassum R, Jeong NY, Jung J. Therapeutic importance of hydrogen sulfide in age-associated neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*. 18, ЖОВТЕНЬ 2019;15(4):653–62.
116. Maulik N, Yoshida T, Das DK. Regulation of cardiomyocyte apoptosis in ischemic reperfused mouse heart by glutathione peroxidase. *Mol Cell Biochem*. Червень 1999;196(1–2):13–21.
117. Shiomi Tetsuya, Tsutsui Hiroyuki, Matsusaka Hidenori, Murakami Kimiyo, Hayashidani Shunji, Ikeuchi Masaki, et al. Overexpression of Glutathione Peroxidase Prevents Left Ventricular Remodeling and Failure After Myocardial Infarction in Mice. *Circulation*. 03, Лютий 2004;109(4):544–9.
118. Anderson MF, Sims NR. The effects of focal ischemia and reperfusion on the glutathione content of mitochondria from rat brain subregions. *J Neurochem*. Травень 2002;81(3):541–9.
119. Chen C-A, Wang T-Y, Varadharaj S, Reyes LA, Hemann C, Talukder MAH, et al. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature*. Грудень 2010;468(7327):1115–8.
120. Robaczewska J, Kedziora-Kornatowska K, Kozakiewicz M, Zary-Sikorska E, Pawluk H, Pawlitzak W, et al. Role of glutathione metabolism and



- glutathione-related antioxidant defense systems in hypertension. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc.* Червень 2016;67(3):331–7.
121. Jourd'heuil D, Laroux FS, Miles AM, Wink DA, Grisham MB. Effect of superoxide dismutase on the stability of S-nitrosothiols. *Arch Biochem Biophys.* 15, Січень 1999;361(2):323–30.
122. Muda P, Kampus P, Zilmer M, Zilmer K, Kairane C, Ristimäe T, et al. Homocysteine and red blood cell glutathione as indices for middle-aged untreated essential hypertension patients. *J Hypertens.* Грудень 2003;21(12):2329–33.
123. Rybka J, Kupczyk D, Kędziora-Kornatowska K, Motyl J, Czuczejko J, Szewczyk-Golec K, et al. Glutathione-Related Antioxidant Defense System in Elderly Patients Treated for Hypertension. *Cardiovasc Toxicol.* Березень 2011;11(1):1–9.
124. Chutkow WA, Lee RT. Thioredoxin Regulates Adipogenesis through Thioredoxin-interacting Protein (Txnip) Protein Stability♦. *J Biol Chem.* 19, Серпень 2011;286(33):29139–45.
125. Atif F, Yousuf S, Agrawal SK. S-allyl L-cysteine diminishes cerebral ischemia-induced mitochondrial dysfunctions in hippocampus. *Brain Res.* 10, Квітень 2009;1265:128–37.
126. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* Грудень 2006;1(6):3159–65.
127. Shymans'ka TV, Hoshovs'ka IV, Semenikhina OM, Sahach VF. [Effect of hydrogen sulfide on isolated rat heart reaction under volume load and ischemia-reperfusion]. *Fiziolohichniy Zhurnal Kiev Ukr* 1994. 2012;58(6):57–66.

128. Kimura H. Hydrogen Sulfide: From Brain to Gut. *Antioxid Redox Signal*. Травень 2010;12(9):1111–23.
129. Simon JN, Duglan D, Casadei B, Carnicer R. Nitric oxide synthase regulation of cardiac excitation–contraction coupling in health and disease. *J Mol Cell Cardiol*. Серпень 2014;73:80–91.
130. GRIFFITH OW. Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem*. 1982;257:13704–12.
131. Gadalla MM, Snyder SH. Hydrogen Sulfide as a Gasotransmitter. *J Neurochem*. Квітень 2010;113(1):14–26.
132. Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans*. Серпень 2010;38(4):841–60.
133. Hoshovs'ka IV, Shymans'ka TV, Rudyk OV, Korkach IP, Sahach VF. [Mitochondria permeability transition as a target for ischemic preconditioning]. *Fiziolohichniy Zhurnal Kiev Ukr* 1994. 2011;57(4):34–45.
134. Shimanskaia TV, Strutinskaia NA, Vavilova GL, Goshovskaia IV, Semenikhina EN, Sagach VF. [Cyclosporin A-sensitive mitochondrial pore as a target of cardioprotective action of hydrogen sulfide donor]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. Лютий 2013;99(2):261–72.
135. Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schöneich C, et al. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med*. Листопад 2004;10(11):1200–7.
136. Huang C, Kan J, Liu X, Ma F, Tran BH, Zou Y, et al. Cardioprotective Effects of a Novel Hydrogen Sulfide Agent–Controlled Release Formulation of S-Propargyl-Cysteine on Heart Failure Rats and Molecular Mechanisms. *PLOS ONE*. 2013;8(7):e69205.

137. Kan J, Guo W, Huang C, Bao G, Zhu Y, Zhu YZ. S-Propargyl-Cysteine, a Novel Water-Soluble Modulator of Endogenous Hydrogen Sulfide, Promotes Angiogenesis Through Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3. *Antioxid Redox Signal*. 20, Травень 2014;20(15):2303–16.
138. Masubuchi Y, Nakayama J, Watanabe Y. Sex difference in susceptibility to acetaminophen hepatotoxicity is reversed by buthionine sulfoximine. *Toxicology*. 05, Вересень 2011;287(1–3):54–60.
139. Bir SC, Kolluru GK, McCarthy P, Shen X, Pardue S, Pattillo CB, et al. Hydrogen sulfide stimulates ischemic vascular remodeling through nitric oxide synthase and nitrite reduction activity regulating hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis. *J Am Heart Assoc*. Жовтень 2012;1(5):e004093.
140. Mys LA, Strutynska NA, Goshovska YV, Sagach VF. Stimulation of the endogenous hydrogen sulfide synthesis suppresses oxidative-nitrosative stress and restores endothelial-dependent vasorelaxation in old rats. *Can J Physiol Pharmacol*. Травень 2020;98(5):275–81.
141. Полюхович ГС, Руткевич СА, Люзина КМ, Чумак АГ. Влияние глутатиона окисленного и восстановленного на формирование ритма сердца крысы. 2014 [цит. за 02, Серпень 2021]; Доступний у: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/109268>

## ДОДАТОК 1

### НАУКОВІ ПРАЦІ В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНО РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

#### В яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Sagach VF, Shimanskaya TV, Goshovska YV, **Dobrovol'ska RA** Effects of Stimulation and Blockade of Endogenous Hydrogen Sulfide Synthesis in Myocardial Ischemia-Reperfusion // International Journal of Physiology Pathophysiology – 2014. – v5. – I 3. – p. 221-230.
2. **Добровольська Р.А.**, Гошовська Ю.В., Шиманська Т.В., Сагач В.Ф. Вплив різних шляхів метаболізму L-цистеїну на резистентність міокарда до ішемії-реперфузії // Вісник ВНМУ.- 2014.- 18 , №2.- С. 372-375.
3. **Raisa A. Fedichkina**, Yulia V. Goshovska, Vadym F. Sagach Cardioprotective effect of H<sub>2</sub>S and glutathione synthesis modulation is mediated by inhibition mitochondrial permeability transition pore opening // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2020; 83:74–82. <https://doi.org/10.30970/vlubs.2020.83.09>
4. **Р.А. Федічкіна**, Ю.В. Гошовська, К.І. Войтко, В.Ф. Сагач Посткондиціонування глутатіоном зменшує реперфузійне пошкодження функції серця щурів через інгібування мітохондріальних пор транзиторної провідності // Фізіол. журн. 2021; 67(1):3-12. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz67.01.003>
5. **Р.А. Федічкіна**, Ю.П. Коркач, І.Ю. Охай, Ю.В. Гошовська, В.Ф. Сагач Вплив модулювання синтезу сірководню та глутатіону на окисно-нітрозативний метаболізм міокарду в умовах ішемії реперфузії // Вісник Київського Національного університету ім.Т.Г.Шевченка. Біологія. 2021; 84(1):43-47. DOI 10.17721/1728\_2748.2021.84.43–47

6. Goshovska YV, **Fedichkina RA**, Balatskyi VV, Piven OO, Dobrzyn P, Sagach VF. Induction of Glutathione Synthesis Provides Cardioprotection Regulating NO, AMPK and PPAR $\alpha$  Signaling in Ischemic Rat Hearts. *Life*. 2021; 11(7):631. <https://doi.org/10.3390/life11070631>

#### Патенти

7. Патент на корисну модель №124585 від 10.04.2018. Федічкіна Р.А., Гошовська Ю.В., Куклін А.В., Сагач В.Ф. Спосіб збільшення вмісту глутатіону в міокарді та підсилення його кардіопротекторної дії за умов ішемії-реперфузії.
8. Патент на корисну модель № 129185 від 25.10.2018. «Спосіб запобігання розвитку окисного і нітрозативного стресу при ішемії-реперфузії міокарда» Федічкіна Р.А., Гошовська Ю.В., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф.

## ДОДАТОК 2

### НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ:

9. **Dobrovolska R.A.**, Goshovska YV, Shimanskaya TV Cardioprotective potencial of L-cysteine against cardiac ischemia-reperfusion Mat.of III Conf.of young scientists. Physiology: from molecules to organism” Kyiv.- 2013. – P. 56.
10. Шиманська Т.В., Гошовська Ю.В., **Добровольська Р.А.**, Сагач В.Ф. Вплив стимуляції та блокади синтезу ендогенного сірководню на реакції серця при навантаженні об’ємом З’їзд Українського Фізіологічного Товариства, 2014, Львів, Україна;
11. Y Goshovska, T Shymanska, **R Dobrovolska**, A Kotsuruba, V Sagach Inhibition of H<sub>2</sub>S synthesis form L-cysteine induces glutathione mediated cardioprotection against ischemia/reperfusion in rats Федічкіна Р.А. Conference for Young Scientists “CYS-2015”, 21-25 вересня, 2015, Київ, Україна;
12. Y. Goshovska, T. Shimanskaya, **R. Dobrovolska**, V. Sagach Glutathione as possible mediator of the paradoxical synergy between inhibition and stimulation of H<sub>2</sub>S synthesis in terms of cardioprotection 2016 (Florence)
13. **Fedichkina R**, Goshovska Y.V., Shymanska T.V. Sagach V.F. Role of H<sub>2</sub>S in Frank-Starling law realization in rat heart FEPS, Париж, Франція, 2016
14. **R Fedichkina**, Y Goshovska, V Sagach Directing L-cysteine to glutathione synthesis provides cardioprotection from ischemia-reperfusion injury: physiological and biochemical evidence. Young Researchers in Biosciences, Клуж-Напока, Румунія, 2016
15. **Федічкіна Р.А.** Гошовська Ю.В. Сагач В.Ф. Корекція ішемічних порушень міокарда шляхом впливу на систему сірководню. Збірник тез

- «Патофізіологія і фармація: Шляхи інтеграції». VII Національний конгрес патофізіологів України. 2016. ст. 238 Харків, Україна, 2016.
16. **Fedichkina R.**, Goshovska Y., Sagach V. Cardioprotective effect of PAG administration // Ukr. Biochem. J., 2017. – V. 89. – № 3. – P. 116.
17. **Fedichkina RA**, Goshovska YV, Sagach VF. Stimulation of endogenous glutathione synthesis prevent postreperfusion NOS uncoupling, oxidative nitrosative stress and cardiodynamic disturbances in rats. 2018 Відень, Австрія
18. Goshovska Y, **Fedichkina R**, Sagach V. Crosstalk between H<sub>2</sub>S and glutathione in cardioprotection against ischemia/reperfusion in rats Abstracts of the 52<sup>nd</sup> Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, Barcelona 2018
19. I Okhai, Y Goshovska, **R Fedichkina**, V Sagach Inhibition of CSE inhibits H<sup>+</sup>-leak in myocardial mitochondria induced by ischemia-reperfusion // 53d ESCI Meeting, 2019, Коїмбра, Португалія
20. **R Fedichkina**, Y Goshovska, V Sagach Effect of H<sub>2</sub>S synthesis modulators at I/R induced MPTP opening in rat heart // 53d ESCI Meeting, 2019, Коїмбра, Португалія
21. **Р.А. Федічкіна**, Ю.В. Гошовська, В.Ф.Сагач Вплив модуляції метаболізму L-цистеїну на реалізацію закону Франка-Старлінга XX З'їзд Українського Фізіологічного Товариства, Київ, Україна, 2019