

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

---

*На правах рукопису*

**Драчук Костянтин Олегович**

УДК 543.272.55:616.13:616.12-008.1:612.67

**РОЛЬ СІРКОВОДНЮ В ПОРУШЕННІ ФУНКЦІЙ СЕРЦЯ І СУДИН  
ПРИ СТАРІННІ**

Спеціальність 14.03.04 – патологічна фізіологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Науковий керівник

**Сагач Вадим Федорович**

доктор медичних наук, професор

член-кор. НАН України

**Київ-2016**

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1 . ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	13
1.1. Загальна характеристика сірководню.....	13
1.2. Фізіологічна концентрація H <sub>2</sub> S.....	14
1.3. Ферменти синтезу H <sub>2</sub> S і регуляція їх активності .....	15
1.4. Метаболізм H <sub>2</sub> S.....	17
1.5. Фізіологічні і патофізіологічні ефекти H <sub>2</sub> S.....	17
1.6. Теорії старіння.....	25
1.7. Зміни функції судин при старінні.....	31
1.8. Зміни функції серця при старінні.....	34
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	39
2.1. Об'єкт дослідження.....	39
2.2. Методи дослідження.....	40
2.2.1. Реєстрація скорочувальної активності м'язових препаратів аорти.....	40
2.2.2. Дослідження показників кардіогемодинаміки у старих щурів <i>in vivo</i> .....	42
2.2.3. Метод виділення фракції мітохондрій із серця щурів.....	44
2.2.4. Визначення ендогенних пулів H <sub>2</sub> S і біохімічних показників, що характеризують інтенсивність окисного (оксидативного і нітрозативного) стресу і конститутивного синтезу NO.....	45
2.3. Обробка результатів.....	51
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	52
3.1. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СІРКОВОДНЮ НА ЕНДОТЕЛІЙЗАЛЕЖНЕ РОЗСЛАБЛЕННЯ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ АОРТИ У СТАРИХ ЩУРІВ.....	52
3.1.1. Дослідження зміни ендотелійзалежного розслаблення при старінні.....	52
3.1.2. Дослідження впливу донору сірководню NaHS на ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти старих щурів.....	53
3.1.3. Дослідження ролі ендотелію у реалізації впливу NaHS на ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти старих щурів.....	53

3.1.4. Дослідження впливу інгібітора CSE-залежного шляху утворення $H_2S$ , пропаргілгліцину (ПГ) на ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти старих щурів.....	54
3.1.5. Дослідження ролі ендотелію у реалізації впливу пропаргілгліцину (ПГ) на ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти старих щурів.....	55
3.2. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СІРКОВОДНЮ НА ПОКАЗНИКИ ОКСИДАТИВНОГО/НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСУ ТА КОНСТИТУТИВНОГО СИНТЕЗУ NO В ТКАНИНАХ АОРТИ СТАРИХ ЩУРІВ.....	56
3.2.1. Дослідження розвитку оксидативного стресу в тканинах аорти старих щурів.....	56
3.2.2. Дослідження розвитку нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в тканинах аорти старих щурів.....	59
3.2.3. Дослідження впливу NaHS на показники оксидативного стресу в тканинах аорти у старих щурів. ....	61
3.2.4. Дослідження впливу NaHS на показники нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в тканинах аорти у старих щурів.....	63
3.2.5. Дослідження впливу інгібітора CSE-залежного шляху утворення сірководню , пропаргілгліцину (ПГ) на показники оксидативного стресу в тканинах аорти у старих щурів.....	64
3.2.6. Дослідження впливу пропаргілгліцину (ПГ) на показники нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в тканинах аорти у старих щурів.....	66
3.3. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СІРКОВОДНЮ НА ПОКАЗНИКИ КАРДІОГЕМОДИНАМІКИ У СТАРИХ ЩУРІВ.....	68
3.3.1. Показники кардіогемодинаміки у старих щурів <i>in vivo</i> .....	69
3.3.2. Вплив донора NaHS на кардіогемодинаміку у старих тварин.....	73
3.3.3. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на кардіогемодинаміку у старих тварин.....	74
3.4. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СІРКОВОДНЮ НА ПОКАЗНИКИ ОКСИДАТИВНОГО/НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСУ ТА КОНСТИТУТИВНОГО СИНТЕЗУ NO В ПРЕПАРАТАХ МІТОХОНДРІЙ І ГОМОГЕНАТІ ТКАНИН СЕРЦЯ СТАРИХ ЩУРІВ.....	76

3.4.1. Дослідження розвитку оксидативного стресу в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів.....	77
3.4.2. Дослідження розвитку нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів.....	79
3.4.3. Визначення впливу донора сірководню, NaHS на показники оксидативного стресу в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів .....	83
3.4.4. Дослідження впливу NaHS на показники нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів .....	85
3.4.5. Визначення впливу пропаргілгліцину (ПГ) на показники оксидативного стресу в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів .....	88
3.4.6. Дослідження впливу пропаргілгліцину (ПГ) на показники нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів .....	90
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	93
ВИСНОВКИ.....	102
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	104

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФА – активні форми азоту

АФК – активні форми кисню

АХ – ацетилхолін

ГМ – гладенькі м'язи

ГЦ – гуанілатциклаза

ДК – дієнові кон'югати

КДЖ – кінцево-діастолічна жорсткість

КДТ – кінцево-діастолічний тиск

ЛШ – лівий шлуночок

МДА – малоновий діальдегід

МП – мітохондріальна пора

НА – норадреналін

НМНТ – низькомолекулярні нітрозотіоли

ПГ – пропаргілгліцин

цАМФ – циклічний аденозинмонофосфат

цГМФ – циклічний гуанозинмонофосфат

ЧСС – частота серцевих скорочень

ADMA – Асиметричний диметиларгінін

AMPK – AMP-стимулююча протеїнкіназа

Akt – протеїнкіназа В

ARE – антиоксидантний реагуючий елемент

ВН<sub>4</sub> – тетрагідробіоптерин

CAT – цистеїнамінотрансфераза

CBS – цистатіонін-β-синтаза

cNOS – конститутивна NO-синтаза

CO – монооксид вуглецю

CSE – цистатіонін-γ-ліаза

EDHF – ендотелійзалежний гіперполяризуючий фактор

eNOS – ендотеліальна NO-синтаза

ERK  $\frac{1}{2}$  – позаклітинно сигнал-регульована кіназа

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

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

GSH – глутатіон

GPx – глутатіонпероксидаза

GSR – глутатіонредуктаза

GSTs – глутатіонтрансфераза

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – гідрогену пероксид

H<sub>2</sub>S – сірководень

ICAM-1 – внутрішньоклітинна молекула адгезії-1

IK<sub>ca</sub> – Ca<sup>2+</sup>-залежні калієві канали середньої провідності

iNOS – індукцибельна NO-синтаза

K<sup>+</sup><sub>ATФ</sub> – АТФ-залежні калієві канали

K<sub>ir</sub> – вхідні калієві канали

L-NAME – та N-Нітро-L-аргінін метил естер гідрохлорид

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

3MST – 3-меркаптопіруват-сульфуртрансфераза

NF-κB – ядерний фактор транскрипції карра-В

NO – оксид азоту

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

•OH – гідроксильний радикал

ONOO<sup>-</sup> – пероксинітрит

p38 MAPK – p38 мітоген активована протеїнкіназа

PKC – протеїнкіназа C

SERCA –  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза саркоплазматичного ретикулуму

$\text{SK}_{\text{Ca}}$  –  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні калієві канали малої провідності

SOD – супероксиддисмутаза

$\text{Tau g}$  – константа активного розслаблення

$\text{TNF-}\alpha$  – фактор некрозу пухлин  $\alpha$

TNFR – рецептори загибелі клітин

$\text{TxB}_2$  – тромбоксан B2

VCAM-1 – молекула адгезії клітин судин

## **ВСТУП**

### **Актуальність теми**

Однією з найбільш значних соціальних тенденцій XXI сторіччя є старіння населення. За даними ВООЗ з 2000 до 2050 рр. частка населення світу віком понад 60 років збільшиться вдвічі (приблизно з 11 до 22%). Очікується, що абсолютна кількість таких людей зросте за цей період з 605 млн до більше ніж 1,5 млрд. Головним фактором, що погіршує якість життя людей похилого віку, є збільшення ризику захворювань серцево-судинної системи при старінні та ймовірності смерті в результаті стресу. Останнє обумовлене багатьма причинами, в т.ч. зниженням біодоступності оксиду азоту (NO), що розвивається, не в останню чергу, через окисний стрес, якому належить провідна роль в розвитку процесу старіння. NO крім вазодилататорного ефекту володіє багатьма іншими важливими властивостями: модулює вивільнення вазоактивних медіаторів, пригнічує адгезію лейкоцитів, експресію прозапальних генів, адгезію та агрегацію тромбоцитів, інгібує міграцію та проліферацію гладеньких м'язів (ГМ) [1-4].

З іншого боку, останнім часом з'являється все більше даних про кардіо- та васкулопротекторний вплив сірководню ( $H_2S$ ), який, разом з NO і CO належить до родини газових трансмітерів. Одним із ферментів синтезу  $H_2S$  в серцево-судинній системі є цистатіонін-γ-ліаза (CSE), інгібітором якої є пропаргілгліцин (ПГ) [5, 6]. Показано, що введення  $H_2S$  істотно попереджує пошкодження серця при ішемії-реперфузії, покращує показники скоротливої і діастолічної функції у щурів зі спонтанною гіпертензією [7]. Проте роль сірководню у розвитку порушення функції серця і судин, зокрема, ендотелійзалежного розслаблення, при старінні, не з'ясована, що робить дану тему дослідження цілком актуальною.

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

Роботу виконано в рамках наукової тематики відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Дослідження ролі сигнальних сполук сірки в реакціях серцево-судинної системи щурів при різних станах організму», 2014-2018рр. (№ держреєстрації 0113U007276) та «Вивчення



ролі мітохондрій в реакціях серцево-судинної системи при різних функціональних станах організму», 2010-2014рр. (№ держреєстрації 0109U005359).

### **Мета і завдання дослідження**

**Метою** даного дослідження було визначення ролі сірководню в порушенні функцій серця і судин при старінні в експериментах на лабораторних тваринах (щурах) різного віку.

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Визначити рівень ендogenous сірководню, а також показники оксидативного/нітрозативного стресу і конститутивного синтезу оксиду азоту в тканинах аорти, препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів.

2. З'ясувати вплив донора сірководню (NaHS) і блокатора цистатіонін-γ-ліази (пропаргілгліцину) на вміст сірководню, показники оксидативного/нітрозативного стресу, а також конститутивного синтезу оксиду азоту в тканинах аорти, препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів.

3. Дослідити вплив NaHS і пропаргілгліцину на ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти при старінні.

4. Проаналізувати зміни показників кардіогемодинаміки при старінні та дослідити вплив NaHS і пропаргілгліцину на ці показники.

### **Об'єкт дослідження**

Функції серця і судин при старінні та механізми їх порушень.

### **Предмет дослідження**

Показники кардіогемодинаміки, скоротлива активність гладенько-м'язових препаратів аорти, вміст сірководню, показники оксидативного/нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в тканинах серцево-судинної системи старих щурів та вплив на них донора сірководню і блокатора його синтезу.

## **Методи дослідження**

Реєстрація скорочувальної активності м'язових препаратів аорти методом тензометрії; вимірювання показників кардіогемодинаміки за допомогою мікрокатетера 2F (Millar); визначення вмісту  $H_2S$ , показників оксидативного/нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в тканинах аорти, препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця у щурів різного віку; статистичні методи.

## **Наукова новизна отриманих результатів**

Вперше проведено комплексне дослідження оксидативного/нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в тканинах серця і аорти при старінні. Отримані дані свідчать про участь як оксидативного, так і нітрозативного стресу у розвитку порушень ендотелійзалежного розслаблення ГМ і діастолічної функції серця при старінні. Встановлено, що розвиток оксидативного і нітрозативного стресу полегшується при зниженні синтезу сірководню, обумовленого зменшенням активності ферменту 3-меркаптопіруват-сульфуртрансфери.

Вперше показано, що донор сірководню NaHS і блокатор цистатіонін-γ-ліази пропаргілгліцин збільшують вміст сірководню в тканинах серця, що супроводжується послабленням явищ оксидативного/нітрозативного стресу та відновленням спряженого стану конститутивної NO-синтази, що призводить до суттєвого посилення порушеного ендотелійзалежного розслаблення ГМ судин та діастолічної функції серця у старих щурів.

Встановлено, що пропаргілгліцин збільшує вміст  $H_2S$  в тканинах серця старих щурів через компенсаторне збільшення активності іншого ферменту синтезу  $H_2S$  – 3-меркаптопіруват-сульфуртрансфери.

Запропоновано індекс для оцінки стану спряження конститутивної NO-синтази.

### **Практичне значення одержаних результатів**

Результати проведеного комплексного дослідження показників оксидативного/нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO поглиблюють розуміння біохімічних механізмів розвитку порушення ендотелійзалежного розслаблення судин та діастолічної дисфункції серця при старінні.

Практичне значення роботи полягає у встановленні протекторної дії донора сірководню (NaHS) і блокатора цистатіонін-γ-ліази (пропаргілгліцину) на ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти і діастолічну функцію серця старих щурів та розкритті механізмів їх дії. На підставі отриманих результатів NaHS і пропаргілгліцин можуть бути рекомендовані як профілактичні і лікувальні засоби при терапії серцево-судинних захворювань.

### **Особистий внесок здобувача**

Автором самостійно проведено пошук та обґрунтування доцільності наукового дослідження, проаналізовано літературні джерела з обраного напрямку, проведено фізіологічні і біохімічні дослідження, статистичну обробку результатів, проаналізовано та узагальнено отримані результати. Планування теми наукового дослідження, експерименту, інтерпретацію одержаних результатів та формулювання висновків проведено спільно з науковим керівником член - кор. НАН України д.м.н., проф. Сагачем В.Ф. Експериментальні дослідження виконано спільно зі співробітниками (Дорофєєва Н.О., Коцюруба А.В., Степаненко Л.Г.) відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, які є співавторами опублікованих праць.

### **Апробація результатів дисертації**

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

1. V міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених (Вінниця, 2014)

2. VIII міжнародній науково-практичній конференції «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования» (Вітебск, 2014)
3. III International Conference on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine (Kyoto, 2014)
4. Frontiers in Cardiovascular Biology (Barcelona, 2014)
5. Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасної патоморфології та патофізіології» (Запоріжжя, 2015)
6. XIX з'їзді українського фізіологічного товариства з міжнародною участю (Львів, 2015)
7. International student congress of (bio)medical sciences ISCOMS 2015 (Groningen, 2015)
8. Науково-практичній конференції «Ендотеліальна дисфункція при вік-залежній патології: діагностика, профілактика, лікування» (Київ, 2015)
9. Frontiers in Cardiovascular Biology (Florence, 2016)

### **Публікації**

За матеріалами дисертації опубліковано 20 наукових робіт, у тому числі 10 статей у рекомендованих ДАК України фахових журналах та 10 тез доповідей на конгресах, з'їздах, конференціях. Подана заявка на патент №11567 від 16.11.2016 р.

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису методів досліджень, 4 розділів результатів досліджень, аналізу й узагальнення результатів, висновків, списку використаних літературних джерел, що включає в себе 327 найменувань. Робота викладена на 138 сторінках машинописного тексту, містить 15 таблиць, проілюстрована 27 рисунками

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

При старінні відбувається прогресивне зниження функціональних резервів серцево-судинної системи, що підвищує ризик розвитку таких захворювань як атеросклероз, артеріальна гіпертензія, ішемічна хвороба серця, діабетична ангіопатія тощо і ризик смерті від них. На молекулярному рівні в основі більшості таких захворювань і порушень, що виникають з віком, є окисний стрес, який розвивається через дисбаланс між вільними радикалами та ендогенними антиоксидантами. З іншого боку, останнім часом з'являється все більше даних про кардіо- і васкулопротекторні властивості сірководню ( $\text{H}_2\text{S}$ ), які обумовлені, зокрема, його здатністю пригнічувати оксидативний стрес і розвиток апоптозу, а також викликати розслаблення ГМ судин [1 – 7]. Однак вплив  $\text{H}_2\text{S}$  на функціональний стан серця і судин при старінні залишається не з'ясованим.

#### 1.1. Загальна характеристика сірководню.

Сірководень є безбарвним, горючим газом із характерним запахом [8]. З моменту відкриття більшість досліджень були присвячені вивченню його токсичних властивостей. У 1989 – 1990 рр. три групи дослідників виявили відносно високий вміст сірководню у тканинах мозку людини, бика і щурів [9, 10]. Дещо пізніше було встановлено, що  $\text{H}_2\text{S}$  шляхом підвищення активності N-метил-D-аспартат (NMDA)-рецепторів сприяє тривалій потенціації, яка забезпечує синаптичний механізм пам'яті в гіпокампі [11]. Це стало початком вивченню сірководню у якості фізіологічного медіатора. Наразі сірководень відносять до групи газових трансмітерів, разом з NO та CO. Унікальність газових трансмітерів полягає в тому, що вони з легкістю проникають крізь клітинні мембрани, не зв'язуючись ні з якими рецепторами на мембранах клітини, взаємодіють безпосередньо з внутрішньоклітинними структурами. В останні роки з'являється все більше даних про кардіо- і васкулопротекторні властивості  $\text{H}_2\text{S}$ ,

зокрема, при ішемії-реперфузії, інфаркті міокарду, порушеннях ритму серця, гіпертрофії міокарду, атеросклерозі, артеріальній гіпертензії тощо [7].

$\text{H}_2\text{S}$  добре розчиняється у водних розчинах і дисоціює на гідросульфід аніон ( $\text{HS}^-$ ) та сульфід аніон ( $\text{S}_2^{2-}$ ), відповідно до реакції:



За фізіологічних умов при значеннях pH 7,4 і  $t$  37°C, які відповідають таким, що є в позаклітинному розчині і крові, близько 80%  $\text{H}_2\text{S}$  перебуває у вигляді  $\text{HS}^-$  і 20% – у недисоційованому стані. Оскільки значення pH в цитоплазмі 7,0-7,2, в апараті Гольджі 6,0-6,7, а в лізосомах 4,7, співвідношення  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  відрізняється в різних субклітинних структурах [12]. Високий вміст недисоційованого  $\text{H}_2\text{S}$  знаходиться саме в клітині, де значення pH нижче, ніж в позаклітинному середовищі. Припускають, що обидві молекули як  $\text{H}_2\text{S}$ , так і  $\text{HS}^-$  забезпечують фізіологічні ефекти гідроген сульфіду [13]. Сірководень розчиняється у багатьох розчинниках: воді, ацетоні, карбон дисульфіді, метанолі, етанолі та бензині, а також дуже легко проникає крізь мембрани клітин.

## 1.2. Фізіологічна концентрація $\text{H}_2\text{S}$

Відомі три форми  $\text{H}_2\text{S}$ : лабільна (кислото-нестійка), зв'язаний сульфан-сульфур та вільний  $\text{H}_2\text{S}$ .

Типовим прикладом лабільної форми є комплекс Fe – S ферментів дихального ланцюга мітохондрій. Вивільнення  $\text{H}_2\text{S}$  із даного комплексу відбувається у кислому середовищі, при значенні pH нижче 5,4. Оскільки середнє значення pH в мітохондріях 8,0, можна зробити висновок, що за фізіологічних умов дана форма не має суттєвого значення [14].

Терміном “зв'язаний сульфан сульфур” позначають з'єднанні з білками молекули полі- та персульфідів, які здатні вивільнювати  $\text{H}_2\text{S}$  в лужному середовищі. Екзогенно введений  $\text{H}_2\text{S}$  після окиснення включається до складу полі- чи персульфідів, зв'язаних з білками. Ендогенний  $\text{H}_2\text{S}$ , утворений в клітині, також може входити до складу даних сполук, про це свідчить той факт, що в

тканинах з високим вмістом зв'язаного сульфан сульфору одночасно має місце підвищена експресія ферментів синтезу газу [15, 16].

У ранніх роботах повідомлялось, що концентрація вільного  $\text{H}_2\text{S}$  в плазмі і тканинах мозку знаходиться на рівня десятків мікомоль. Пізніше було встановлено, що ці показники є завищеними, через використання в методиці сильних кислот, які знижували рН до рівня, при якому реєструвався не вільний  $\text{H}_2\text{S}$ , а загальний, у тому числі вивільнений із кислото-лабільної форми. Сучасні полярографічні методи аналізу і метод газової хроматографії, які визначають лише вільний  $\text{H}_2\text{S}$  при фізіологічному рН, встановили концентрацію газу в тканинах мозку і плазмі на рівні близькому до 14 нМ і 7 нМ відповідно [17, 18].

### **1.3. Ферменти синтезу $\text{H}_2\text{S}$ і регуляція їх активності**

$\text{H}_2\text{S}$  синтезується в тканинах людини і тварин за участю трьох ферментів: цистатіонін- $\beta$ -синтази (CBS), цистатіонін- $\gamma$ -ліази (CSE) і 3-меркаптопіруват-сульфуртрансфери (3MST) [16, 19].

CBS і CSE є піридоксаль-5 фосфат-залежними ензимами, які у якості субстрату синтезу використовують цистеїн, або цистеїн разом з гомоцистеїном [16, 19]. Обидва ферменти розташовані в цитозолі, але мають специфічну тканинну локалізацію. Так, CBS переважно експресується в центральній нервовій системі, а також, в печінці, нирках, повздожній кишці, матці, плаценті та підшлунковій залозі. CSE є найбільш значущим ферментом синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  в серцево-судинній системі. Спочатку вважали, що в судинах даний ензим експресується як в ГМ [20] так і в ендотелії [21]. Пізніше встановили, що CSE локалізована лише в ГМ, а в ендотелії відсутній [20, 22]. Це було підтверджено тим фактом, що додавання до лізату ендотелію цистеїну, субстрату CSE, не викликало утворення  $\text{H}_2\text{S}$ . Натомість, продукція газу мала місце після додавання цистеїну у комплексі з  $\alpha$ -кетоглутаратом, субстратом 3MST [22]. Останні дослідження показали наявність CSE також в адвентиції судин [23]. Крім серця і судин, CSE і CBS експресуються в тканинах печінки, нирок, матки, товстого кишечника, плаценти. Основними регуляторами активності CBS на

транскрипційному рівні є S-аденозил-L-метіонін, глюкокортикоїди, фактор некрозу пухлин  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), піридоксаль-5-фосфат та тестостерон. На посттранскрипційному рівні активність ферменту регулюється глутатіонуванням. Так, глутатіонування цистеїну<sup>346</sup> збільшує активність CBS втричі [24]. Натомість, приєднання NO чи CO до гемової групи аміно-терміналі CBS пригнічує активність ферменту і цим самим регулює мікроциркуляцію в мозку. Так, при гіпоксії зменшується утворення CO гемоксигеназою-2 в нейронах, а отже, зменшується інгібувальний вплив даного газу на активність CBS, локалізовану в астроцитах, що розташовані навколо капілярів. Синтезований  $H_2S$  через вазорелаксацію збільшує кровотік і компенсує цим самим недостатнє надходження кисню [25, 26]. Активність CSE інгібується пропаргілгліцином,  $\beta$ -цианоаланіном, L-аміноетоксівінілгліцином, амінооксиоцтовою кислотою, тріфлуороаланіном і гідроксиламіном. Останні три речовини є також неселективними блокаторами CBS. Селективні блокатори цього ферменту поки не відомі [5, 6, 27-29]. Основними регуляторами активності CSE є NO, бактеріальний ендотоксин та тестостерон [29]. NO збільшує CSE-залежний синтез  $H_2S$  в судинах двома шляхами: 1) прямий вплив на білкову молекулу CSE через нітрозилювання одного із 12 цистеїнових залишків; 2) опосередкований вплив через активацію циклічна гуанозинмонофосфат(цГМФ)-залежної протеїнкінази, яка в подальшому підвищує експресію і активність CSE [29].

Третій фермент синтезу сірководню – 3MST функціонує в тандемі з цистеїн амінотрансферазою (CAT). На першому етапі CAT каталізує реакцію взаємодії між L-цистеїном і  $\alpha$ -кутоглутаратом з утворенням 3-меркаптопірувату. На наступному етапі 3MST забезпечує десульфуризацію 3-меркаптопірувату із утворенням  $H_2S$ . CAT є піридоксаль-5 фосфат-залежним, а 3MST – цинк-залежним ферментами. Обидва ензими локалізовані в мітохондріях. Висока експресія 3MST спостерігається в тканинах мозку, ендотелії, серці, печінці, нирках [30, 31]. Дані про регуляцію роботи 3MST і CAT суттєво обмежені, однак останні дослідження показали, що для ефективної роботи ферменти потребують наявності ендогенних відновлюючих кофакторів (reducing cofactors): тіоредоксину



та дигідроліпоєвої кислоти [32]. У якості інгібіторів активності 3MST використовується 3-меркаптопропіонова і 2-меркаптопропіонова кислоти [33], а також 3  $\alpha$ -кето кислоти:  $\alpha$ -кетобутират,  $\alpha$ -кетоглутарат і піруват [34].

Нещодавно стало відомо про четвертий шлях утворення  $H_2S$ , із субстрату D-цистеїну за участі D-аміно-оксидази та 3MST, переважно представлений в мозочку і нирках [30]. Під дією локалізованої в пероксисомах D-аміно-оксидази відбувається перетворення D-цистеїну на 3-меркаптопіруват, який в мітохондріях за участі 3MST метаболізується до  $H_2S$  [16, 35, 36]. Головні відмінності “D-цистеїнового” шляху утворення  $H_2S$  від “L-цистеїнового” полягають в тому, що перший реалізується при pH 7,4 і є піридоксаль-5 фосфат-незалежним [36].

#### 1.4. Метаболізм $H_2S$

Відомі три основних шляхи метаболізму  $H_2S$ : мітохондріальне окиснення, цитоплазматичне метилювання та зв’язування метгемоглобіном [29, 37].

В мітохондріях  $H_2S$  спочатку неферментативно окиснюється до тіосульфату ( $S_2O_3^-$ ), який під дією роданази – тіосульфат цианід сульфуртрансферази перетворюється на сульфід ( $SO_3^-$ ) та сульфат ( $SO_4^-$ ). Останній є головним кінцевим продуктом метаболізму сірководню [38-40]. Іншим шляхом метаболізму  $H_2S$  в клітині є його метилювання ферментом S-метилтрансферазою з утворенням спочатку метан тіолу ( $CH_3-SH$ ), а потім диметилсульфіду ( $CH_3-SCH_3$ ). Останній шлях є менш ефективним, адже процес метилювання відбувається у 10000 разів повільніше за окиснення [29]. Також показано, що  $H_2S$  може зв’язуватись з метгемоглобіном із утворенням сульфгемоглобіну [29].

Важливо зазначити, що концентрація  $H_2S$  залежить від співвідношення трьох чинників: 1) швидкості його утворення; 2) швидкості метаболізму; 3) зберігання у складі зв’язаного сульфат сульфуру [37].

#### 1.5. Фізіологічні і патофізіологічні ефекти $H_2S$

Сірководень спричинює багато фізіологічних ефектів та приймає активну участь у різноманітних патофізіологічних процесах, серед яких особливу увагу

заслуговує його вплив на тонус ГМ судин, ангиогенез, антиоксидантна дія, регуляція апоптозу, участь в запальних процесах, антиагрегантні та фібринолітичні властивості.

*Вплив  $H_2S$  на регуляцію тонусу ГМ судин.* Сірководень здатен знижувати тонус гладеньких м'язів судин через три механізми (рис. 1.1). Перший пов'язаний із прямим активуючим впливом  $H_2S$  на АТФ-залежні калієві канали ( $K^+_{ATP}$ ) ГМ, подальшою гіперполяризацією і, як наслідок, розслабленням клітин [1]. Другий полягає у його взаємодії із системою оксиду азота, основного ендотелійзалежного вазодилатора. Останній, утворившись в результаті конститутивного синтезу під дією ендотеліальної NO-синтази (eNOS), дифундує в ГМ, активує гуанілатциклазу (ГЦ), збільшує утворення цГМФ, в результаті, активується цГМФ-залежна протеїнкіназа, яка стимулює відтік внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$ , наслідком чого є розслаблення ГМ [41]. Активність eNOS регулюється системою  $Ca^{2+}$ -кальмодулін та фосфорилюванням амінокислоти серину в положенні 1177 (Ser<sup>1177</sup>). Останній процес, в свою чергу, каталізується декількома протеїнкіназами: протеїнкіназою В (Akt), АМР-стимулюючою протеїнкіназою (AMPK) та p38 мітоген активованою протеїнкіназою (p38 MAPK) [42].

Згідно з останніми даними введення донорів  $H_2S$ , NaHS і  $Na_2S$  стимулює утворення NO в культурі ендотеліальних клітин, як через мобілізацію  $Ca^{2+}$  із ендоплазматичного ретикулуму, активацію системи  $Ca^{2+}$ -кальмодулін із подальшою стимуляцією eNOS [43], так і внаслідок Akt- та p38 MAPK-залежного фосфорилювання Ser<sup>1177</sup> молекули eNOS [44]. Деякі дослідження наводять дані, що зростання утворення NO має місце через Akt-незалежне фосфорилювання Ser<sup>1177</sup>, пов'язане із попередньою активацією системи  $Ca^{2+}$ -кальмодулін [43]. Крім стимуляції синтезу NO,  $H_2S$  пролонгує його дію, завдяки пригніченню активності фосфодієстерази, фермента, що викликає розщеплення NO [45]. Третій механізм вазорелаксації  $H_2S$  полягає у його здатності виступати у ролі ендотелійзалежного гіперполяризуючого фактора (EDHF). Згідно літературних даних на роль EDHF претендують багато речовин: гідрогену пероксид ( $H_2O_2$ ), монооксид вуглецю (CO), метаболіти арахідонової кислоти тощо [46]. Всі вони утворюються в

ендотеліальних клітинах і шляхом гіперполяризації ГМ судин індукують розслаблення останніх. Дослідження останніх років показують, що  $\text{H}_2\text{S}$ , синтезований саме в ендотелії, активує в них  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні калієві канали малої ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ) і середньої провідності ( $\text{IK}_{\text{Ca}}$ ). Наслідком цього є вихід  $\text{K}^+$  назовні, що призводить до гіперполяризації ендотеліальних клітин. Останні сполучаються із ГМ клітинами через щільні міоендотеліальні контакти, які забезпечують розповсюдження гіперполяризації із ендотеліальних клітин на ГМ. Крім того, підвищення концентрації  $\text{K}^+$  в міжклітинному просторі ініціює відкриття в ГМ клітинах вхідних калієвих каналів ( $\text{K}_{\text{ir}}$ ) та активує  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазу, що також завершується гіперполяризацією ГМ, закриттям потенціалзалежних  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів, зменшенням входу  $\text{Ca}^{2+}$  і розслабленням клітин [47-50].

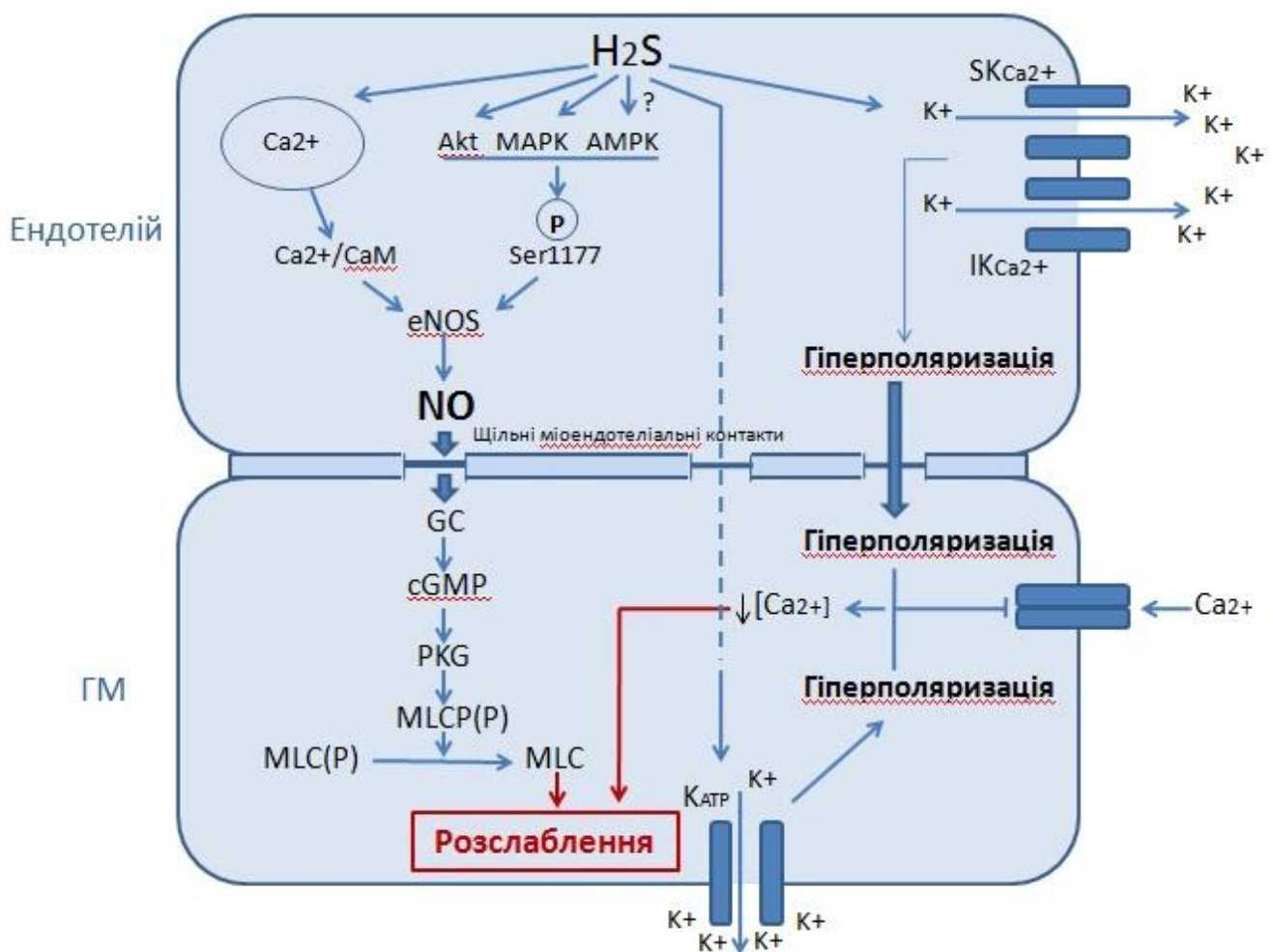


Рис. 1. 1. Вплив сірководню ( $\text{H}_2\text{S}$ ) на тонус ГМ судин.

*Вплив  $H_2S$  на ангиогенез.* Встановлено, що  $H_2S$  модулює процес ангиогенезу. Так, в експериментах *in vitro* з використанням донорів NaHS і  $Na_2S$  показано їх стимулюючий вплив на проліферацію і міграцію ендотеліальних клітин [2, 3, 51]. Даний ефект найбільше виражений в умовах гіпоксії. В його основі є стимуляція Akt, MAPK та активація  $K^+_{ATP}$  в ендотелії [2, 51].

*Вплив  $H_2S$  на проліферацію ГМ клітин судин.* Як ендогенний CSE-залежний так і екзогенний  $H_2S$  володіють здатністю пригнічувати проліферацію ГМ судин. Наслідком даного ефекту є зменшення загального периферичного опору і зниження артеріального тиску. Показано, що в основі антипроліферативного впливу газу знаходяться епігенетичні механізми [3]. Так,  $H_2S$  пригнічує експресію і транскрипцію Brg 1, центральної каталітичної субодиниці АТФ-залежного білкового комплексу ремоделювання хроматину SWI/SNF. Наслідком цього є інгібування генів-індукторів проліферації (proliferation-related genes): *Pcna*, *Ntf3* та *Pdgfa* [3].

*Антиоксидантні властивості сірководню.* Оксидативний стрес є важливою патогенетичною ланкою багатьох захворювань серцево-судинної системи. Порушення балансу між про- і антиоксидантами призводить до оксидного пошкодження клітинних макромолекул: ліпідів, білків, нуклеїнових кислот. Антиоксидантні властивості сірководню ґрунтуються на його здатності пригнічувати утворення активних форм кисню (АФК) і азоту (АФА), очищувати від них внутрішньоклітинне середовище – виступати у якості “скавенджера” та збільшувати активність ендогенних антиоксидантних ферментів.

*Сірководень і ендогенні антиоксиданти.* Встановлено, що  $H_2S$  підвищує активність ендогенних антиоксидантів: супероксиддисмутази (SOD), глутатіонредуктази (GSR) та глутатіонпероксидази (GPx) в тканинах легень і міокарда при алергічному ураженні і в умовах ішемії-реперфузії відповідно [52, 53]. Сірководень посилює транспорт цистину і цистеїну в клітини через збільшення активності цистін-глутамат антипорту і цим самим збільшує концентрацію субстрату синтезу глутатіону (GSH). Крім того,  $H_2S$  збільшує активність  $\gamma$ -глутамілцистеїнсинтази, ферменту синтезу GSH. Дані ефекти

призводять до збільшення рівня GSH в клітині, особливо при оксидативному стресі [54]. GSH відновлює дисульфідний зв'язок між цистеїнами цитозольних білків і захищає клітину від токсичного пошкодження її структур вільним радикалами. При цьому відновлена форма глутатіону (GSH) перетворюється в окиснену (GSSH). Відновлюється окиснений глутатіон під дією фермента GSR. Існують переконливі докази, що  $H_2S$  посилює антиоксидантний захист клітин через регуляцію Nrf 2, фактора транскрипції, який передає стимулюючі сигнали на компонент антиоксидантного реагуючого елемента (ARE). Останній контролює експресію більш ніж 200 генів, залучених у антиоксидантний і протизапальний захист, серед них, гени гемоксигенази-1, тіоредоксину, тіоредоксинредуктази, GSR, GPx та каталази [55]. За фізіологічних умов активність Nrf 2 інгібована Kelch-подібним ECH-зв'язаним білком, KEAP 1.  $H_2S$  інактивує KEAP 1, індукує Nrf 2, ініціює транслокацію останнього до ядра та активує Nrf 2/ARE сигнальний шлях [56-61].

*Сірководень і утворення АФК і АФА.* Показано, що  $H_2S$  зменшує продукцію супероксидного радикалу ( $O_2^{\bullet-}$ ) в ГМ судин через пригнічення активності NADPH-оксидази. Даний ефект опосередкований активацією сигнального механізму аденілатциклаза/циклічна аденозинмонофосфат(АМФ)/протеїнкіназа G [62]. У щурів із цукровим діабетом введення  $H_2S$  також пригнічує утворення  $O_2^{\bullet-}$  в мітохондріях кардіоміоцитів, наслідком чого є покращення серцевої діяльності [63]. Як відомо, другим основним джерелом утворення  $O_2^{\bullet-}$  є комплекси I і III дихального ланцюга мітохондрій в умовах роз'єднання (не спряження) окисного фосфорилювання.  $H_2S$  здатен зменшувати продукцію  $O_2^{\bullet-}$  за рахунок відновлення спряження окисного фосфорилювання і пригнічення експресії NADPH-оксидази. Одночасно має місце активація ендогенних антиоксидантів: SOD і гемоксигенази-1 [64]. При гомоцистеїн-індукованому оксидативному стресі введення низьких доз NaHS (30 та 50 мкМ) зменшувало утворення  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  та пероксинітриду ( $ONOO^-$ ) [65]. На іншій моделі, при метіонін-індукованому оксидативному стресі,  $H_2S$  пригнічує генерацію гідроксильного радикала ( $\bullet OH$ ),  $H_2O_2$  та  $ONOO^-$  в ендотеліоцитах завдяки відновленню пригніченої активності SOD і каталази [66].

Встановлено, що в основі кардіопротекторного ефекту  $\text{H}_2\text{S}$  в умовах ішемії-реперфузії міокарду є зменшення утворення і вмісту  $\text{O}_2^{\bullet-}$  в кардіоміоцитах, завдяки пригніченню активності комплексу IV дихального ланцюга мітохондрій і підвищенню активності SOD [53].

*Сірководень як скавенджер АФК і АФА.* Маркером NO-залежного оксидативного стресу є нітротирозин, що утворюється в результаті взаємодії токсичного  $\text{ONOO}^-$  із амінокислотою тирозином. Рівень нітротирозину корелює із поширеністю серцево-судинних і нейродегенеративних захворювань [67, 68].  $\text{NaHS}$  в експериментах *in vivo*, в концентрації 30 мкМ інгібує  $\text{ONOO}^-$ -індуковане нітрування тирозину через пряму взаємодію з  $\text{ONOO}^-$  і нейтралізацію останнього [67]. Останні дослідження вказують на те, що  $\text{H}_2\text{S}$  не лише пригнічує утворення  $\text{O}_2^{\bullet-}$  через інгібування, зокрема, NADPH-оксидази, але й шляхом прямої взаємодії з  $\text{O}_2^{\bullet-}$  здійснює свій васкулопротекторний вплив [69]. Також,  $\text{H}_2\text{S}$  здатен у ролі «скавенджера» вступати в реакції з  $\text{H}_2\text{O}_2$ , гіпохлорною кислотою та ліпопероксидами [70-72].

*$\text{H}_2\text{S}$  у регуляції апоптозу.* Два основні шляхи передачі сигналу апоптозу існують в клітині: рецептор-залежний за участю рецепторів загибелі клітин (TNFR) і мітохондріальний. Ключовою ланкою мітохондріального шляху є підвищення проникності зовнішньої мембрани мітохондрій – відкриття мітохондріальної пори (МП), наслідком чого є вихід в цитозоль проапоптичних білків: цитохром С, прокаспаз -2, -3, -9 та фактора індукції апоптозу, АІФ. Цитохром С і прокаспаза-9 приймають участь в активації ефекторної каспази-3, яка руйнує клітинні структури і призводить до загибелі клітини [73, 74].

Останні дослідження встановили, що  $\text{H}_2\text{S}$  пригнічує відкриття МП шляхом індукції/реалізації двох сигнальних механізмів [75]. В першому,  $\text{H}_2\text{S}$  активує мітохондріальні  $\text{K}^+_{\text{АТФ}}$ -канали. В результаті цього відбувається фосфорилування протеїнкінази С (РКС), яка активує  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азу саркоплазматичного ретикулуму (SERCA). Подальше зменшення цитоплазматичної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , індуктора відкриття МП, чинить мембраностабілізуючу дію на мітохондрії [75, 76]. В другому,  $\text{H}_2\text{S}$  фосфорилує кіназу глікоген-синтази-3, інгібітора відкриття МП [75,

77, 78]. Фосфорилування кінази глікоген-синтази-3 опосередковане активацією двох сигнальних шляхів: 1) за участі фосфоінозитид-3-кінази/протеїнкінази B; 2) за участі позаклітинно сигнал-регульованої кінази (ERK  $\frac{1}{2}$ ) [75, 79, 80].

Вагому роль у регуляції проникності МП відіграють білки родини Bcl-2. Проапоптичні Bcl-2 білки – Bax і Bak підвищують проникність МП. Їх функціональна активність регулюється іншими представниками даної родини білків, а саме індукторами – Bid і Bim, а також, супресорами – Bcl-2, Bcl-xL і Bcl-W [81, 82]. При ішемії-реперфузії донор  $H_2S$ , GYY4137 збільшує експресію Bcl-2 і, одночасно, зменшує експресію Bax і активність каспази-3, що призводить до пригнічення апоптозу і захисту кардіоміоцитів від реперфузійних пошкоджень [83].

Рецептор-залежний сигнальний шлях апоптозу починається із активації TNFR рецепторів, найбільш вивченими серед яких є CD95, TNFR 1 і Aro 3. В подальшому відбувається каскадний процес активації ініціюючих і ефекторних каспаз. Останні забезпечують пряме і опосередковане руйнування клітин [84, 85]. Відомо, що  $H_2S$  активує ядерний фактор транскрипції (NF- $\kappa$ B) [86]. Останній, індукуючи синтез інгібіторів білків апоптозу, IAPs, блокує TNF- і Aro 3L-залежну активацію каспази-8, в результаті чого пригнічується опосередкований рецепторами апоптоз [87].

*Участь  $H_2S$  у процесі запалення.* Здатність  $H_2S$  пригнічувати запалення продемонстрована на різних моделях тварин. При каолін/каррагіном індукованому моноартриті шурів донор  $Na_2S$  пригнічує адгезію та інфільтрацію лейкоцитів в судинах мікроциркуляторного русла. Даний ефект опосередкований активацією  $K^+_{ATP}$  каналів [88]. Введення NaHS шурам із тютюн-індукованим ураженням легень зменшує опір повітряноних шляхів та знижує в легеневій тканині концентрацію прозапальних цитокінів: IL-8, TNF- $\alpha$  [89]. TNF- $\alpha$  діє як коstimулятор Т-кіллерів, В- і Т- лімфоцитів, підсилює патоген-смірмовану цитотоксичність моноцитів, нейтрофілів і еозинофілів [90]. Введення NaHS в культуру ендотеліоцитів, оброблених TNF- $\alpha$ , зменшує в них експресію двох потужних молекул адгезії: внутрішньо-клітинної молекули адгезії-1 (ICAM-1) і

молекули адгезії клітин судин (VCAM-1). Даний ефект опосередкований інгібуванням TNF- $\alpha$ -індукованого фосфорилування p38 MAPK [4]. В астроцитах, мікроглії та макрофагах екзогенний і ендогенний H<sub>2</sub>S, інгібуючи ліпополісахарид-індуковане фосфорилування p38 MAPK, зменшує експресію індукцибельної NO-синтази (iNOS), утворення NO і TNF- $\alpha$  [91, 92]. Однак, H<sub>2</sub>S здатен викликати і прозапальні ефекти при деяких патологічних станах: гострому панкреатиті, септичному, ендотоксичному та геморагічному шоці. Так, церулеїн-індукований гострий панкреатит у мишей супроводжується зростанням рівня H<sub>2</sub>S у плазмі. Блокатор CSE пропаргілгліцин (ПГ) пригнічує *ex vivo* синтез H<sub>2</sub>S, знижує плазматичну концентрацію амілази, пригнічує активність мієлопероксидази (маркер нейтрофільної інфільтрації) та зменшує некротичні зміни в тканинах підшлункової залози [93]. Ліпополісахарид-індукований ендотоксичний шок також супроводжується підвищенням рівня H<sub>2</sub>S в плазмі, експресії CSE і активності мієлопероксидази в тканинах печінки і нирок. Аналогічні зміни спостерігаються у здорових тварин, яким попередньо вводять NaHS [94].

*Антиагрегантні властивості H<sub>2</sub>S.* В експериментах *in vitro* витяжка з часнику пригнічує агрегацію тромбоцитів шляхом інгібування активності циклооксигенази і, як наслідок, утворення тромбоксану A<sub>2</sub>, зменшення концентрації Ca<sup>2+</sup> і підвищення вмісту цАМФ і цГМФ в середині тромбоцитів. Також спостерігається інактивація глікопротеїну Пб/ІІІа, що погіршує взаємодію тромбоцитів із фібриногеном [95, 96]. У кролів, яким завчасно вводять колаген разом з арахідоновою кислотою, вживання витяжки часнику зменшує плазматичну концентрацію тромбоксану B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>), продукту метаболізму арахідонової кислоти. Як відомо, TxB<sub>2</sub> активує тромбоцити і приймає участь в їх агрегації [97]. Дослідження з використанням блокаторів H<sub>2</sub>S і NO (ПГ і L-NAME, відповідно) показали, що кардіопротекторні властивості витяжки часнику опосередковані дією саме цих двох газів [98]. Встановлено, що людські еритроцити здатні перетворювати органічні полісульфіди, наявні в часнику, в H<sub>2</sub>S [99].



*Влив  $H_2S$  на фібриноліз.* Зниження фібринолітичної активності крові призводить до порушення її реологічних властивостей наслідком чого може стати підвищення відкладання фібрину і тромбоутворення. Додавання часнику до раціону кроликів з експериментальним атеросклерозом супроводжувалось значним зростанням фібринолітичної активності плазми крові [100, 101]. В експериментах на людині, як короткочасне так і тривале вживання часникової олії супроводжується підвищенням фібринолітичної активності і часу згортання крові [102].

### 1.6. Теорії старіння

Серед більш ніж 300 теорій старіння більша частина не відповідає критеріям дійсно теорій старіння, а може лише претендувати на роль гіпотез. А найбільш обґрунтованими теоріями є висунута у 1954 році Д. Харманом вільнорадикальна теорія [103, 104], теорія клітинного (реплікативного) старіння Л. Хейфліка [105, 106], теломерна теорія А.М. Оловнікова [107], елеваційна теорія старіння В.М. Ділмана [108, 109] та теорія одноразової соми Кірквуда [110-112].

*Вільнорадикальна теорія старіння.* Згідно з даною теорією утворені в клітинах вільні радикали пошкоджують її макромолекули: ДНК, білки, ліпіди. Старіння і асоційовані з ним захворювання обумовлені накопиченням пошкоджень клітинних макромолекул [103, 104]. Вільні радикали є частинками (атомами чи молекулами) з неспареним електроном на зовнішній орбіталі. Вільні радикали можна поділити на АФК, до яких належить,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ , синглетний кисень і АФА, основним представником яких є  $ONOO^{\cdot-}$ . Основними джерелами утворення  $O_2^{\cdot-}$ , ініціатора оксидативного стресу є комплекси I і III дихального ланцюга мітохондрій, NADPH-оксидаза, ксантинооксидаза, не спряжена (uncoupling) конститутивна (ендотеліальна) NO-синтаза (cNOS), цикло- і ліпооксигеназа [113, 114]. Утворений  $O_2^{\cdot-}$  під дією SOD дисмутує в  $H_2O_2$ , який метаболізується двома шляхами: нетоксичним за участі каталази із утворенням  $H_2O$  і  $O_2$  і токсичним в реакції Фентона із утворенням  $\cdot OH$  [115, 116]. Останній

ініціює перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), первинними продуктами якого є дієнові кон'югати (ДК) і малоновий діальдегід (МДА) [117]. В умовах одночасного надмірного утворення  $O_2^{\bullet-}$  і NO, що має місце, зокрема, при неспряженій cNOS та збільшенні індукцйбельного NO-синтезу, вони взаємодіють між собою із утворенням високотоксичного  $ONOO^-$  [118-120]. Маркером пероксинітрит-індукованого пошкодження клітинних макромолекул є нітротирозин [121-123].

Антиоксиданти є речовинами ферментативної чи неферментативної природи, які через зменшення утворення або нейтралізації вільних радикалів попереджують або відновлюють окисні пошкодження макромолекул. До ендогенних неферментативних антиоксидантів відносяться:  $\alpha$ -токоферол, аскорбінова кислота, естрогени, сечова кислота, білірубін, тіоли (глутатіон,  $\alpha$ -ліпоєва кислота, тіоредоксин, мелатонін, альбумін. До ферментативних – SOD, каталаза, GSR, GPx і глутатіонтрансфераза (GSTs) [124, 125].

Доказова база вільнорадикальної теорії базується на спробах показати, що асоційовані зі старінням зміни функціонування органів і систем спричинені окисними пошкодженнями, а посилення антиоксидантного захисту збільшує тривалість життя [126-128].

Двостулкові молюски є природною моделлю старіння. Ця група безхребетних включає види із найдовшою тривалістю життя (507 років) і найкоротшою (1 рік) [129, 130]. У мітохондріях довгоживучих молюсків *Arctica islandica* суттєво знижене утворення  $H_2O_2$  у порівнянні із короткоживучими молюсками *Mya arenaria* і *Spisula solidissima*. Це обумовлено зниженням активності комплексів I і III дихального ланцюга мітохондрій у першого виду [131]. Інші дослідження вказують на те, що в тканинах серця *Arctica islandica* спостерігається знижена продукція  $O_2^{\bullet-}$  і  $H_2O_2$ , менш виражені окисні пошкодження клітинних макромолекул, підвищена резистентність до трет-Бутілгідропероксид-індукованого оксидативного стресу у порівнянні з короткоживучими *Mercanaria mercanaria* [132]. В експериментах на двокрилих мухах показано, що тривалість життя зворотно корелює зі швидкістю утворення  $O_2^{\bullet-}$ ,

$\text{H}_2\text{O}_2$  в мітохондріях і вмістом карбонільованих протеїнів, маркерів оксидативного стресу [133]. У різних видів ссавців із максимальною тривалістю життя від 3,5 до 30 років (миші, хом'яки, щури, морські свинки, кролики, свині та велика рогата худоба) тривалість життя також зворотно корелює із мітохондріальним цитохром-С-оксидаза-залежним і незалежним утворенням  $\text{O}_2^{\cdot-}$  і  $\text{H}_2\text{O}_2$  [134, 135]. Довгоживучі теплокровні хребетні мають нижчу продукцію АФК в мітохондріях і менше виражені окисні пошкодження мітохондріальної ДНК у порівнянні з короткоживучими. Зменшена генерація АФК пов'язана з нижчою активністю комплексу І дихального ланцюга мітохондрій у довго живучих організмів [136, 137]. Порівнюючи продукцію АФК і антиоксидантний захист голубів і щурів, Ку Н.Н. et Sohal R.S. прийшли до висновку, що більша тривалість життя перших може бути обумовлена меншою продукцією  $\text{O}_2^{\cdot-}$  і  $\text{H}_2\text{O}_2$ , нижчим рівнем глутатіону та підвищеною активністю SOD і GPx [138].

Показано, що при старінні підвищується рівень окисних пошкоджень біомолекул. Так, в тканинах і мітохондріях мозку людей з віком зростає вміст 8-гідрокси-2-деоксигуанозину, маркера окисного пошкодження ядерної і мітохондріальної ДНК [139]. При старінні пошкодження ДНК часто супроводжується її посиленими мутаціями і критичним зниженням біоенергетичної функції клітин [140-142]. При старінні в тканинах нервової системи людини і щурів підвищується вміст протеїнових карбонільних груп і 3-нітротирозину, які є продуктами окиснення білків і маркерами пошкодження фізіологічних функцій, зокрема, когнітивної [143-147]. Доведено наявність зворотнього кореляційного зв'язку між тривалістю життя і рівнем окисного пошкодження ДНК і протеїнів [133, 148].

Дані щодо активності антиоксидантних ферментів при старінні є неоднозначними. Показано, що у старих щурів в тканинах головного мозку і печінки знижена активність Cu/Zn- і Mn-залежної SOD та GPx, а в скелетних м'язах – каталази і GPx [149, 150]. В інших дослідженнях показано, що між старими і молодими щурами відсутня різниця в активності SOD, GPx, рівні GSH в тканинах головного мозку, печінки і крові [151, 152]. Крім того, встановлено, що

у старих щурів в певних ділянках головного мозку активність SOD, каталази і GPx зростає, а в інших знижується у порівнянні з молодими тваринами [153]. В експериментах на фібробластах шкіри людини продемонстровано підвищену активність GPx в клітинах старих донорів, натомість активність Cu/Zn- і Mn-залежної SOD та каталази не відрізнялись від рівня дорослих донорів [154]. На думку Kotlover V.K. et Goncharov N.D. неоднозначність даних щодо зміни активності антиоксидантних ферментів при старінні обумовлена тим, що при відсутності патології асоційованої з віком їх активність може знижуватись лише в похилому віці і відображає зниження інтенсивності окисного метаболізму. Однак, при наявності такої патології активність антиоксидантних ферментів не знижується і навіть може зростати [155, 156]. Дані щодо кореляції антиоксидативної активності і тривалості життя також є контроверсійними. Встановлено, що як ферментативні так і неферментативні ендogenous антиоксиданти, включаючи SOD, каталазу, GPx, GPR, GSH, аскорбінову кислоту, у більшості досліджень мають негативний кореляційний зв'язок із тривалістю життя, а в деяких дослідженнях – позитивний, або взагалі відсутній [157-161]. Згідно з одними порівняльними дослідженнями довгоживучі види тварин мають вищу активність антиоксидантного захисту, згідно з іншими – таку саму, або нижчу ніж короткоживучі види [159]. До того ж, у довгоживучих голих землекопів (*Heterocephalus glaber*) із тривалістю життя понад 28 років, активність GPx значно нижча, Cu/Zn SOD – вища, а каталази – не змінена у порівнянні із коротко живучими мишами [158]. Тлумачення негативного кореляційного зв'язку між активністю антиоксидантного захисту і тривалістю життя полягає в тому, що низька активність антиоксидантних ферментів у довгоживучих тварин свідчить про низьку швидкість продукції вільних радикалів і про низький рівень оксидативного стресу [160].

Підвищення рівня ендogenous антиоксидантів шляхом введення внутрішніх ін'єкцій, зміни дієтичного раціону, використання фармакологічних засобів супроводжується підвищенням середньої тривалості життя. Даний ефект зустрічається в експериментах із субоптимальними умовами існування і може

бути обумовлений зменшенням випадків ранніх смертей, пов'язаних із захворюваннями [136, 163, 164]. В той же час, вплив на максимальну тривалість життя відсутній, або є незначним (збільшує на 4 або 12%) [136, 165, 166]. Таким чином, антиоксиданти захищають від оксидативного стресу, попереджаючи розвиток деяких захворювань і настання ранньої смерті, але не уповільнюють швидкість процесу старіння та не збільшують тривалість життя.

Генетичні дослідження на трансгенних лініях *D.melanogaster* із підвищеною експресією генів SOD і каталази вказують на підвищення на 20 – 37% максимальної тривалості життя. Однак, при гіперекспресії одного фермента вплив на максимальну тривалість життя відсутній [167, 168]. Інші дослідження вказують на те, що гіперекспресія SOD може бути шкідливою і збільшувати окисне пошкодження [169]. Дослідження на мишах мають суперечливі результати. Так, у трансгенних мишей із надлишковою експресією каталази можуть спостерігатися: 1) істотне збільшення тривалості життя [127, 170]; 2) відсутність впливу на тривалість життя [171, 172]; 3) підвищена чутливість до окисного пошкодження [161, 171]. Згідно з деякими дослідженнями надлишкова експресія Cu/Zn SOD не впливає на тривалість життя [173, 174]. Крім того, нокаутовані за геном Mn SOD миші, хоч і мали зменшену антиоксидантну активність і підвищений рівень окисного пошкодження деяких органів, проте тривалість їх життя не зменшувалась [175]. Підсумовуючи можна зробити висновок, що антиоксиданти не контролюють процес старіння і не визначають тривалість життя, однак, через зменшення інтенсивності оксидативного стресу та захист організму від спричинених ним пошкоджень, вони попереджують розвиток певних захворювань і зменшують ймовірність передчасної/ранньої смерті.

*Теорія клітинного (реплікативного) старіння.* Вважається, що більшість соматичних клітин мають обмежений проліферативний потенціал *in vitro*. Після обмеженого числа клітинних поділів (40 – 60 для ембріональних фібробластів людини) нормальні соматичні клітини переходять у нереплікативний стан, названий клітинним старінням або фазою III [105, 176]. Перехід у нереплікативний стан забезпечується двома сигнальними шляхами, пов'язаними

із активацією білків-супресорів пухлин: p53/p21 p16<sup>INK4a</sup>/pRB. Індукторами цих шляхів є пошкодження ДНК, дисфункція теломерази, онкогени і оксидативний стрес [177]. При старінні активується β-галактозίδαза і збільшується експресія анти-онкогену p16<sup>INK4a</sup>, які є маркерами клітинного старіння [178]. Також існує негативний кореляційний зв'язок між максимальною реплікативною здатністю клітин і віком донора [179-182].

*Теломерна теорія старіння.* Щоразу коли клітина ділиться, вона втрачає частину теломери, ділянки ДНК з великим числом повторів нуклеотидів, яка розташована на кінці лінійної хромосоми. Вкорочення теломери є фактором, що обмежує число поділів клітини в культурі і обумовлює клітинне (реплікативне) старіння [107, 109]. Довжина теломери негативно корелює з віком донора [183-185] і позитивно – із тривалістю життя [186]. Прискорене вкорочення теломер супроводжується раннім розвитком вік-асоційованих захворювань: серцевої недостатності [187], ішемічної хвороби серця [188, 189], цукрового діабету [190] і остеопорозу [185, 191]. Стовбурові і статеві клітини володіють теломеразою, ферментом, що добудовує певні повторювані фрагменти ДНК до теломери, відновлюючи її довжину [192]. Соматичні клітини еукаріотів позбавлені теломеразної активності. Трансгенетична індукція теломеразної активності у соматичних людських клітинах подовжує їх теломери, зменшує вміст β-галактозίδαзи, збільшує проліферативний потенціал і тривалість життя клітин в культурі [193]. Однак, існують дані, що більшість ракових клітин мають підвищену теломеразну активність, яка пов'язана із їх диференціюванням і проліферацією [194-197]. Інше дослідження вказує на те, що застосування індукції теломеразної активності для збільшення проліферативного потенціалу і імортилізації клітин *in vivo* є небезпечним через малігнізацію даних клітин [198].

*Нейроендокринна теорія старіння.* За нейроендокринною теорією, причиною старіння є зниження чутливості гіпоталамусу до негативного зворотнього зв'язку, який лежить в основі регуляції секреторної активності залоз внутрішньої секреції і підтримання гомеостазу [127, 199, 200]. Причиною цього є :

- 1) зменшення рівнів гіпоталамічних нейротрансмітерів;
- 2) зменшення кількості

рецепторів на нейронах гіпоталамусу; 3) зменшення секреції мелатоніну шишкоподібною залозою; 4) зменшення засвоєння глюкози; 5) накопичення нейронних пошкоджень, викликаних хронічним підвищенням рівня кортизолу при тривалому стресі; 6) накопичення холестеролу в плазматичних мембранах нейронів [199, 201]. Існують три гомеостатичні системи: адаптивна (гіпоталамо-гіпофізарно-адреналова), репродуктивна (гіпоталамо-гіпофізарно-гонадна) і енергетична (гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдна). Пошкодження цих систем викликає метаболічні зміни, характерні для процесу старіння, зокрема, порушується толерантність до глюкози, виникає гіперінсулінемія і гіперліпідемія [200, 202, 203].

*Теорія одноразової соми.* Дана теорія розглядає питання компромісного розподілу організмом своїх обмежених ресурсів між підтримкою, ремонтом соми та іншими функціями, необхідними для виживання. Згідно з нею, у видів і популяцій які мають більшу кількість зовнішніх загроз, швидше вичерпується запас ресурсів для підтримання соми, в результаті у них швидше настає старіння [110]. Так, популяція опосумів, що позбавлена природних хижаків, має більшу середню і максимальну тривалість життя, ніж опосуми, що переслідуються пумами, лисицями чи рисями [204].

### **1.7. Зміни функції судин при старінні**

Ендотеліальна функція забезпечує регуляцію судинного тонуусу і його адаптацію до зміни факторів зовнішнього середовища. Основними змінами, що спостерігаються в судинах при старінні, є збільшення артеріальної жорсткості, потовщення і дилатація артерій еластичного типу та ендотеліальна дисфункція [205]. Проявом останньої є описане в експериментах *in vivo* та *in vitro* на судинах різних басейнів людини і тварини знижене ендотелійзалежне розслаблення [114, 206-215]. При цьому ендотелійнезалежне розслаблення судин при старінні не зазнає змін, що свідчить про збережену функцію їх ГМ [206].

В основі ендотеліальної дисфункції лежить зменшення біодоступності основного ендогенного вазорелаксанта – NO – через зниження синтезу і, навпаки, підвищення його деградації за умов старіння [205]. Основним шляхом утворення NO в судинах за фізіологічних умов є окисний метаболізм L-аргініну за участі NO-синтаз. В організмі наявні три NO-синтази: конститутивні ендотеліальна (eNOS)(далі cNOS) і нейрональна (nNOS), що синтезують невелику кількість NO, який виконує регуляторну і сигнальну функції, і індукцйбельна (iNOS), що забезпечує масивний викид NO у відповідь на дію прозапальних, окисних факторів. Зниження утворення NO спостерігається при: 1) зменшенні біодоступності субстрата чи кофактора для NOS; 2) наявності ендогенних інгібіторів NOS; 3) пригніченні експресії/активності cNOS. Підвищена деградація NO спостерігається, головним чином, при посиленій генерації  $O_2^{\bullet -}$  [114].

Причиною зменшеної біодоступності субстрату NOS, L-аргініну є посилена при старінні експресія та активність аргінази, фермента, що розщеплює L-аргінін [216]. Пригнічення аргіназної активності, при цьому, покращує NO-залежне розслаблення судин при старінні [217].

Тетрагідробіоптерин ( $BH_4$ ) є кофактором необхідним для активності NOS. При старінні рівень  $BH_4$  знижується. Натомість, введення  $BH_4$  супроводжується збільшенням синтезу NO і покращенням ендотелійзалежного розслаблення [218].

Асиметричний диметиларгінін (ADMA) – ендогенний конкурентний інгібітор cNOS, надмірна продукція якого в організмі розглядається у якості фактора ризику серцево-судинних захворювань [219]. Вміст ADMA в плазмі позитивно корелює із віком людини [220]. Крім того, ADMA прискорює старіння ендотеліальних клітин, ймовірно, через посилення утворення АФК і пригнічення синтезу NO [221].

Дані щодо зміни експресії cNOS при старінні є суперечливими. Так, показано, що в аорті старих щурів експресія cNOS може бути як підвищена [222, 223] так і знижена [224]. Її рівень в плечовій і в брижовій артеріях похилих людей не відрізняється від контрольної групи [225, 226]. При старінні спостерігається порушення Akt-залежного фосфорилування cNOS і зменшення активності



останньої [227-229]. За даних умов, підвищена експресія може призводити до неспряження (uncoupling) cNOS, синтезу  $O_2^{\bullet-}$  замість NO [230].

При старінні збільшується утворення  $O_2^{\bullet-}$  в тканинах серцево-судинної системи [231]. Причиною цього є підвищена активність основних джерел  $O_2^{\bullet-}$  в клітині: NADPH-оксидази [226, 232, 233], неспряження cNOS [215, 232, 234], ксантиоксидази [235] та дихального ланцюга мітохондрій [236]. Наслідком взаємодії  $O_2^{\bullet-}$  з NO є зменшення біодоступності останнього і утворення високотоксичного  $ONOO^-$ . При старінні підвищується як утворення  $ONOO^-$  [237], так і спричинене ним нітрування тирозину. Маркером останнього є підвищений рівень нітротирозину, зокрема, в ендотеліоцитах плечової артерії похилих людей [238].

Цікаво, що в основі зниження ендотелійзалежного розслаблення при старінні знаходиться не просто зменшення біодоступності NO, а порушення рівноваги між ендотеліальними вазодилаторами і вазоконстрикторами [225, 226, 239, 240]. Фермент циклооксигеназа відіграє важливу роль в регуляції судинного тону, завдяки синтезу кількох вазоактивних речовин, як вазодилаторів (простациклін), так і вазоконстрикторів (тромбоксан A<sub>2</sub>). Продукція даних речовин в нормальних фізіологічних умовах є збалансованою. При старінні відбувається зсув у бік збільшення рівня вазоконстрикторів, що призводить до підвищення тону ГМ судин. В експериментах *in vivo* та *in vitro* на різних судинах людей похилого віку показано зниження простациклін-залежної вазодилатації і збільшення утворення тромбоксану A<sub>2</sub> [226, 241, 242]. Той факт, що введення антагоністів тромбоксанових рецепторів покращує ендотелійзалежне розслаблення при старінні свідчить про залучення циклооксигеназа-залежного механізму у його порушення [226]. Дані щодо конкретних ізоформ циклооксигенази, відповідальних за посилене утворення тромбоксану A<sub>2</sub> при старінні, потребують подальшого уточнення. До кінця не з'ясованим залишається питання щодо причини надмірного утворення вазоконстрикторів. Показано, що експресія циклооксигенази-1, -2 у брижових мікросудинах не змінюється при

старінні [226]. Однак, відомо, що в регуляцію активності даного ферменту можуть бути залучені посттрансляційні фактори, зокрема, за участі NO і ONOO<sup>-</sup> [243].

Ще одним потужним судинозвужуючим фактором, що утворюється в ендотелії, є ендотелін. Останній здійснює свій вплив через взаємодію з двома типами специфічних рецепторів: ET<sub>A</sub>, локалізованих на поверхні ГМ клітин і ET<sub>B</sub> на ГМ і ендотеліоцитах [244]. Обидва типи рецепторів пов'язані із фосфоліпазою C і збільшенням внутрішньоклітинної концентрації Ca<sup>2+</sup>, наслідком чого є фосфорилювання легких ланцюгів міозину і розвиток скорочувальних реакцій ГМ судин [245, 246]. Активація ET<sub>B</sub> рецепторів ендотеліоцитів призводить до активації cNOS і вазодилатації [247]. Відомо, що при старінні збільшується концентрація ET-1 в плазмі [248], підвищується чутливість ГМ клітин до дії даного вазоконстриктора [249], а рівень його експресії негативно корелює із величиною ендотеліозалежного розслаблення [248]. Вживання антагоністів ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> збільшує кровотік у судинах нижніх кінцівок людей похилого віку, що підтверджує залучення підвищеною концентрації ендотеліну у розвиток вазоконстрикторних реакцій при старінні [250].

При старінні зростає швидкість поширення пульсової хвилі, показника, який характеризує жорсткість судин [251]. Причиною цього є як структурні зміни стінки судин, в першу чергу, збільшення відкладання колагену, посилення кальцифікації і зменшення відкладання еластину, так і функціональні – підвищення тонуусу ГМ клітин в результаті ендотеліальної дисфункції [252]. Наслідком підвищення жорсткості великих артерій є зростання центрального систолічного, пульсового і зменшення діастолічного тиску [253]. Підвищені систолічний і пульсовий тиск є незалежними факторами ризику подальшого розвитку патології серцево-судинної системи: стенозу сонних артерій, гіпертрофії лівого шлуночка (ЛШ), інфаркту міокарда, застійної серцевої недостатності [252, 254].

### 1.8. Зміни функції серця при старінні

Клінічні дослідження з використання методу стрес-ехокардіографії, тобто ехокардіографії при проведенні черезстравохідної передсердної електростимуляції встановили, що у стані спокою показники інтракардіальної гемодинаміки та систолічної функції ЛШ у осіб похилого (60-75 років) і молодого (20-35 років) достовірно не відрізняються. У осіб похилого віку при нав'язуванні частоти серцевих скорочень (ЧСС) спостерігається порушення хроноінотропної залежності, про що свідчить менший приріст швидкісних показників скорочення ЛШ у відповідь на збільшення ЧСС. Наслідком цього є обмеження у здорових осіб похилого віку міокардіального резерву при збереженні коронарного резерву [255]. Згідно цього ж дослідження змінам систолічної функції ЛШ при старінні передують порушення діастолічної функції. Про це свідчить перебудова у стані спокою структури діастолічного наповнення, компенсаторне збільшення внеску фази систоли передсердь і зниження нормалізованої об'ємної швидкості наповнення. При нав'язуванні ЧСС зменшується приріст всіх швидкісних показників наповнення ЛШ. Структурною причиною вказаних змін у обстежуваних осіб є гіпертрофія ЛШ, яка з одного боку підтримує систолічну функцію, а з іншого, погіршує діастолічне розслаблення та підвищує жорсткість стінок міокарда [255].

Клінічні дослідження з використанням навантажувальних проб встановили, що у стані спокою фракція викиду, основний показник систолічної функції серця, не змінюється з віком у здорових осіб. При фізичному навантаженні у осіб похилого віку спостерігається менший приріст фракції викиду, ніж у молодих [256]. Причиною цього може бути зниження ефективності механізму Франка-Старлінга, адже значне підвищення кінцево-діастолічного об'єму не супроводжується адекватним зростанням ударного об'єму [257]. Також спостерігається менший приріст ЧСС при виконанні ортостатичної проби та при виконанні фізичного навантаження. Як вважає автор це є причиною зменшення резерву серцевого викиду при виконанні фізичного навантаження [256]. До

зменшення міокардіального резерву при старінні може призводити погіршення модулюючого впливу симпатичної нервової системи. Зокрема, через зменшення кількості і чутливості міокардіальних  $\beta$ -адренорецепторів [258].

Клінічні дослідження з використанням радіонуклідної вентрикулографії показали, що з віком прогресивно знижується швидкість раннього діастолічного наповнення ЛШ. Можливою причиною є структурні зміни, розвиток фіброзу, міокарду і залишкова  $\text{Ca}^{2+}$ -активація міофіламентів після попередньої систоли [259].

Дослідження з використанням магнітно-резонансного методу оцінки функції серця виявили, що у стані спокою показники систолічної функції серця (фракція викиду, хвилинний об'єм крові, ударний об'єм, ЧСС) не відрізняються в різних вікових групах осіб (20-40, 40-60 і >60 років). В той же час, у осіб похилого віку прогресивно знижується діастолічна функція, про що свідчить збільшення часу ізоволюмічного розслаблення ( $\tau$ ) і зменшення швидкості раннього діастолічного наповнення [260].

В експериментах *in vivo* з використанням ультрамініатюрного катетера (Millar) показано, що систолічні параметри (систолічний тиск в ЛШ і максимальна швидкість наростання тиску в ЛШ) не відрізняються у старих (26 міс) і дорослих (6 міс) щурів. При цьому у даних груп щурів відрізняються показники діастолічної функції. Так, у старих щурів знижена максимальна швидкість падіння тиску в ЛШ ( $dP/dt_{\min}$ ), підвищений діастолічний тиск і значно пролонгований час ізоволюмічного розслаблення ( $\tau$ ) [261].

В інших дослідженнях на мишах з використанням методу доплер-ехокардіографії показано, що у старих тварин порушується діастолічна функція серця, про що свідчить зменшення співвідношення між піковими швидкостями кровотоку через атріовентрикулярний отвір під час фази ранньої (Ea) і пізньої (Aa) діастоли (Ea/Aa), і збільшення часу ізоволюмічного розслаблення [262, 263].

В експериментах на перфузованих за Лангендорфом серцях встановлено, що серця старих щурів скорочуються з меншою частотою, розвивають більший тиск і меншу швидкість зниження тиску в ЛШ. Одночасно, інтенсивність скоротливої

функції міокарда, яка розраховується як добуток ЧСС на тиск, що розвиває ЛШ, не змінюється, а споживання кисню міокардом зростає на 30%. Це вказує на збільшену потребу тканин серця старих тварин у кисні або неефективне його використання [264].

Таким чином при старінні розвитку систолічної дисфункції передують порушення діастолічної функції серця. Причиною останнього є пошкодження механізмів, які забезпечують адекватне заповнення шлуночків кров'ю. Надходження крові у шлуночки відбувається в дві фази – в фазу швидкого (активного) наповнення в ранню діастолу і фазу повільного (пасивного) наповнення в пізню діастолу, що закінчується систолою передсердь. Рання діастола залежить від швидкості розслаблення міокарда шлуночків. Процес розслаблення визначається швидкістю актин-міозинової дисоціації (активна, енергозалежна частина релаксації) і розтягненням еластичних структур міокарда, стиснутих під час систоли (пасивна, енергонезалежна частина релаксації). Швидкість дисоціації залежить від інтенсивності енергозалежного процесу транспорту іонів  $\text{Ca}^{2+}$  із міоплазми в СПР та позаклітинне середовище за участі двох насосів –  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази СПР (SERCA) і  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани, відповідно [265]. Під час своєї роботи SERCA використовує 15% всієї виробленої в міокарді енергії [266]. Згідно з різними дослідженнями, у старих тварин з діастолічною дисфункцією суттєво порушується транспорт іонів  $\text{Ca}^{2+}$  (знижується на 20–30%) із міоплазми до СПР, через зменшення (на 20–52%) вмісту протеїнів SERCA [261, 262, 267]. В тканинах міокарда старих щурів одночасно зі зменшенням вмісту SERCA зростає ступінь окисного пошкодження мітохондрій, основного джерела АТФ в клітині [262]. Окисне пошкодження мітохондрій з віком супроводжується порушенням окисного фосфорилування і зниженням утворення АТФ [268-272]. У старих щурів з гіперекспресією мітохондріальної каталази спостерігається зменшення окисного пошкодження мітохондрій, збереження вмісту і активності SERCA та нормальна діастолічна функція [262]. Друга основна причина вік-асоційованої діастолічної функції – розвиток кардіофіброзу, в результаті посиленого відкладання колагену в

міжклітинному матриксі. Наслідком цього є збільшення жорсткості стінок міокарда [256, 273]. Рівень колагену в міокарді залежить від співвідношення двох процесів: його синтезу фібробластами і деградації металопротеїназами. При старінні посилена генерація в міокарді АФК призводить до активації TGF $\beta$  сигнального шляху, наслідком чого є активація і проліферація серцевих фібробластів і посилений синтез ними колагену [274-276]. Одночасно при старінні має місце зниження деградації колагену, через зменшення експресії і активності інтерстиціальних металопротеїназ, позаклітинних ендопептидаз, що забезпечують руйнування білків всіх типів в позаклітинному матриксі [276, 277].

Таким чином комплексне вивчення механізмів порушення функцій серця і судин при старінні і встановлення ролі сірководню в них є перспективним напрямком дослідження як з точки зору розуміння фундаментальних процесів, що розвиваються в серцево-судинній системі з віком, так і розробки профілактичних засобів, спрямованих на зниження захворюваності серцево-судинної системи при старінні.

## Розділ 2. МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Характеристика експериментального матеріалу

Метою даного дослідження було визначення ролі сірководню в порушенні функцій серця і судин при старінні в експериментах на лабораторних тваринах (щурах) різного віку.

Для вирішення поставленого завдання проведені експерименти на 140 статевозрілих білих щурах-самцях лінії Вістар масою 230-370 г, що утримувались на стандартному раціоні та в стандартних умовах віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (рис. 2.1.).

Серед досліджуваних тварин 45 щурів були дорослими молодими (6-8 міс) і 95 – старими (22-24 міс). Дослідження проведені з урахуванням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986). Кількість тварин, використаних у кожній експериментальній серії, вказана в дужках після підписів під відповідними рисунками.

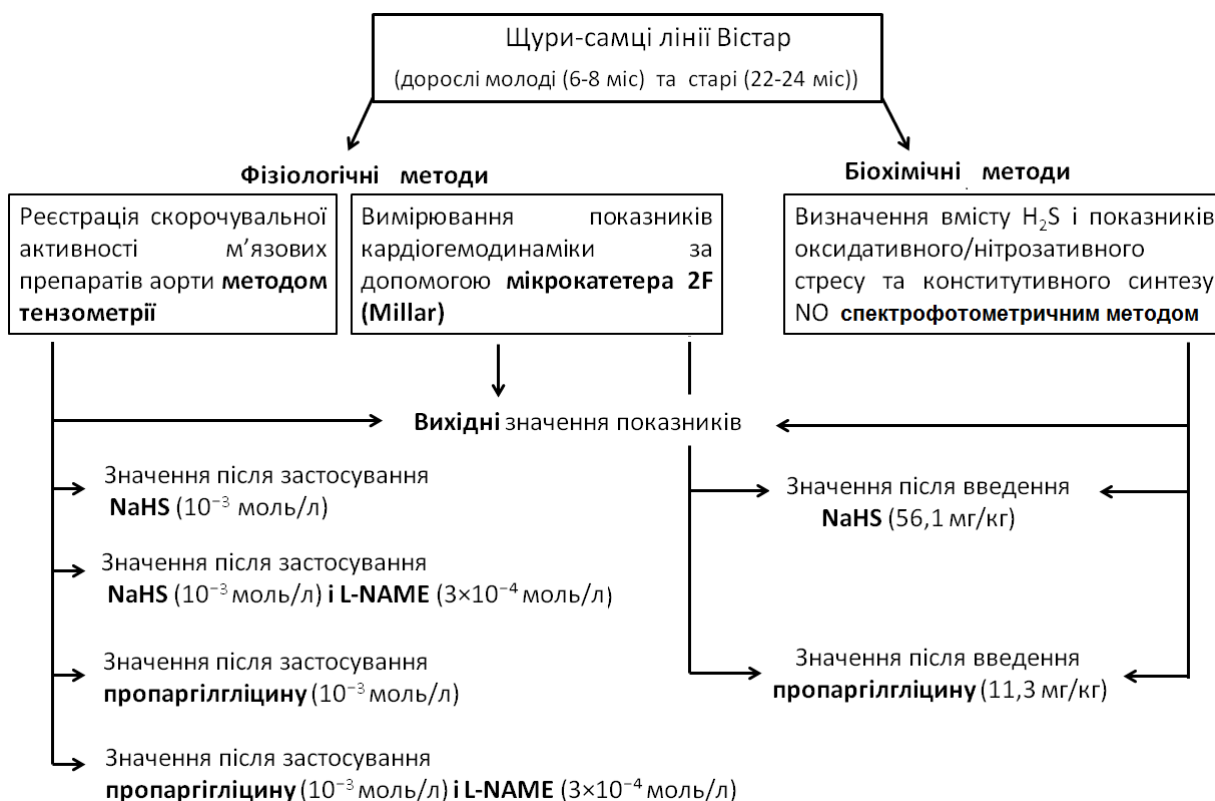


Рис. 2.1. Загальна схема проведених експериментів

Експериментальні дослідження проводилися як *in vivo* на щурах, так и *in vitro* на судинних препаратах ГМ аорти, суспензії мітохондрій серця і гомогенаті тканин серця і тканин аорти дорослих молодих і старих щурів.

Для вивчення ролі сірководню у розвитку порушень функції серця і судин при старінні використовували його донор, NaHS і блокатор одного із двох ферментів синтезу  $H_2S$  в серцево-судинній системі (CSE), пропаргілгліцин (ПГ).

## 2.2 Методи дослідження

### 2.2.1. Реєстрація скорочувальної активності м'язових препаратів аорти

Реєстрацію скорочувальної активності інтактних м'язових препаратів грудного відділу аорти проводили методом тензометрії. Для цього використовували спеціальну камеру, яка включає в себе перфузійну комірку, механоелектричний перетворювач 6MX1C, температурний датчик, нагрівальні елементи, розподільні крани, воронки для подачі перфузійних розчинів (рис. 2.2.). Для стабільної підтримки температури розчину в камері з похибкою не більше 0,2 °C і в діапазоні від 34 до 37 °C, в процесі виконання роботи використовували систему автоматичного контролю температури перфузійного розчину. Електричний сигнал з виходу механоелектричного перетворювача реєстрували за допомогою реєструючого пристрою КСП-4. На початку роботи, після декапітації проводили розтин грудної порожнини і виділяли сегмент грудної аорти довжиною 3-4 см. Сегмент ретельно очищували від сполучної тканини і розрізали на кільцеві препарати товщиною 1,5 – 2 мм з урахуванням циркуляційної орієнтації гладеньком'язового шару (під кутом приблизно 45° від повздовжньої вісі судини). Далі м'язовий препарат поміщали у перфузійну комірку об'ємом 1,5 мл, виготовлену з хімічно неактивного плексигласу. В комірці препарат кріпився в горизонтальному положенні за допомогою двох гачків, від яких відходили лігатури, що з'єднували один гачок з механоелектричним перетворювачем, а другий кріпився через блок до вантажу, за допомогою якого розтягувалась смужка. Препарат аорти розтягували з силою 7-8



мН і залишали для стабілізації режиму роботи на 25-30 хв, перфузуючи його розчином Кребса, який за своїм складом та концентрацією речовин є близьким до складу плазми крові і складався з (ммоль/л):  $\text{NaCl}$  – 133,0;  $\text{NaHCO}_3$  – 16,3;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 1,38;  $\text{KCl}$  – 4,7;  $\text{MgCl}_2$  – 1,05; глюкози – 7,8;  $\text{CaCl}_2$  – 2,5; рН 7,4. Для запобігання витікання розчину з камери лігатури проходили через фторопластові втулки.

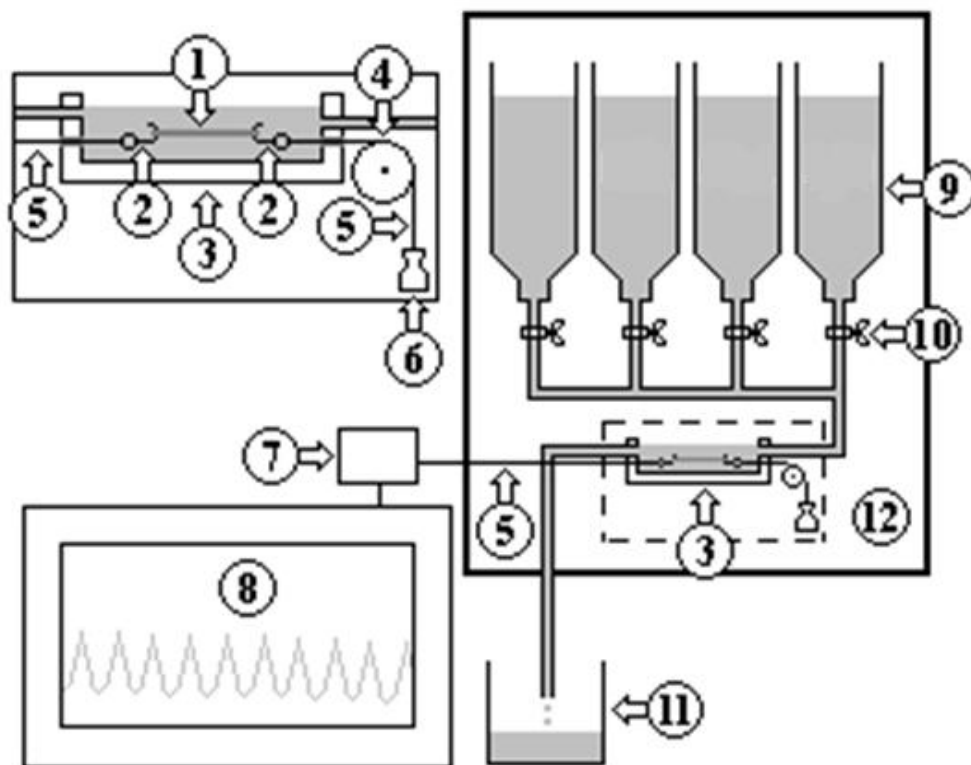


Рис. 2.2. Схема установки для реєстрації скорочувальної активності ізольованих судинних препаратів: 1 – судинна смужка; 2 – гачок; 3 – перфузійна камера; 4 – блок; 5 – нитка; 6 – вантажик; 7 – тензодатчик; 8 – самописець; 9 – ємкості з розчином Кребса; 10 – кран; 11 – ємкість з відпрацьованим розчином Кребса; 12 – термостатована камера. Зверху зліва у збільшеному розмірі показаний фрагмент, що відокремлений пунктирною лінією. Сірим кольором відмічено розчин Кребса.

Для активації ГМ аорти до перфузуючого розчину додавали норадреналін (НА,  $10^{-5}$  моль/л, “Sigma”, США). Стійкий рівень НА-залежного скорочення

(«плато») приймали за 100%. Від нього проводили розрахунки зміни амплітуди ендотелійзалежних скоротливих реакцій ГМ аорти на ацетилхолін (АХ,  $10^{-5}$  моль/л, "Sigma", США). Вплив донора сірководню вивчали за допомогою NaHS ( $10^{-3}$  моль/л, "Sigma", США), у якому інкубували кільцеві препаратів аорти (30 хв), а також його додавали в перфузійні розчини. Вибір концентрації обумовлений раніше проведеними дослідженнями нашого відділу [278] і літературними даними [279, 280] у яких максимальне розслаблення ГМ при прямому на них впливі NaHS досягався при концентрації останнього  $10^{-3}$  моль/л. Активність ферментів CSE та NOS пригнічували за допомогою пропаргілгліцину (ПГ,  $10^{-3}$  моль/л, "Sigma", США) та N-Нітро-L-аргінін метилестергідрохлориду (L-NAME,  $3 \times 10^{-4}$  моль/л, "Sigma", США) відповідно, шляхом інкубації препаратів аорти впродовж 30 хв і додавання блокаторів в перфузійні розчини.

### 2.2.2. Дослідження показників кардіогемодинаміки у старих щурів *in vivo*

Вимірювання показників кардіодинаміки у щурів *in vivo* проводилася за допомогою мікрокатетера 2F (Millar Instruments, США) і Millar Pressure-Volume System. Щурів наркотизували за допомогою уретану (1,25 г/кг, внутрішньоочеревинно), фіксували і препарували праву сонну артерію. Ультрамніатюрний катетер 2F вводили через праву сонну артерію ретроградно у ЛШ, що дозволяло одночасно реєструвати сигнали тиску і об'єму ЛШ з візуалізацією кривих залежності цих величин протягом серцевого циклу [281, 282].

Після 20-хвилинного встановлення рівноваги параметрів, запис показників кардіогемодинаміки було здійснено у трьох режимах: 1) у вихідному стані, 2) в умовах тимчасового (протягом 7-10с) перетиснення черевної порожнистої вени, 3) після навантаження об'ємом (внутрішньовенне введення 5% від об'єму циркулюючої крові 0,9% NaCl).

У дорослих і старих щурів вивчались наступні показники кардіогемодинаміки: кінцево-систолічний тиск, кінцево-діастолічний тиск (КДТ),

максимальна швидкість наростання тиску, максимальна швидкість зниження тиску ( $dP/dt_{\min}$ ), кінцево-сistolічний об'єм ЛШ, кінцево-діастолічний об'єм ЛШ, ударний об'єм, хвилинний об'єм крові, ЧСС, хвилинний об'єм крові, кінцево-сistolічне співвідношення тиску і об'єму, кінцево-сistolічна жорсткість міокарда, максимальна жорсткість міокарда, кінцево-діастолічне співвідношення тиску і об'єму, кінцево-діастолічна жорсткість міокарда (КДЖ), ефективна артеріальна жорсткість, константа активного розслаблення ( $\tau$  g).

ЛШ серця можна розглядати у якості моделі, що характеризується змінною у часі жорсткістю [283, 284]. Протягом серцевого циклу ЛШ розвиває відповідний об'єму тиск, що описується кривими залежності тиску і об'єму. В кожній точці серцевого циклу еластичні властивості ЛШ можуть бути оцінені через показник жорсткості міокарда, який зростає при переході серця із діастолі у систолу. У межах даної концепції [283, 284] при тимчасовій оклюзії аорти визначають наступні параметри: кінцево-сistolічне співвідношення тиску і об'єму, кут нахилу якого є індексом кінцево-сistolічної жорсткості міокарда, максимальне значення жорсткості міокарда, кінцево-діастолічне співвідношення тиску і об'єму, кут нахилу якого відображує здатність міокарда до розтягнення, або його (КДЖ) [281]. Вказаний підхід дає можливість оцінити максимальний резерв скоротливої активності (максимальна жорсткість та кінцево-сistolічна жорсткість), із подальшою побудовою кривої, аналогічної кінцево-сistolічному співвідношення тиску і об'єму. Індeksi максимальної жорсткості та кінцево-сistolічної жорсткості використовуються для оцінки скоротливості міокарда [282]. Дані показники є відносно незалежними від переднавантаження та постнавантаження і вказують на ступінь максимального або кінцево-сistolічного стискання міокарда ЛШ, нормалізованого до об'єму шлуночка.

Для отримання даних стосовно скоротливої здатності міокарда – кінцево-сistolічної жорсткості та максимальної жорсткості, а також здатності міокарда до розтягнення – КДЖ – здійснювали невеликий розріз нижче мечоподібного відростку і проводили реєстрацію параметрів під час оклюзії черевної порожнистої вени в умовах зниженого притоку крові до серця [281, 282].

Розраховували споживання кисню міокардом як відношення ударної роботи і ефективності роботи серця [285]. Артеріальну жорсткість розраховували як відношення значення кінцево-систоличного тиску, отриманого з кривих залежності тиску і об'єму у вихідному стані, до ударного об'єму. Даний показник містить в собі такі основні елементи судинного навантаження: загальний периферичний опір судин, податливість судин, показник імпедансу, тривалість систоли та діастолі.

Ефективність механізму Франка–Старлінга розраховували як відношення Дударного об'єму до  $\Delta$ кінцево-діастолічного об'єму при навантаженні об'ємом.

Співвідношення тиску і об'єму ЛШ аналізували за допомогою програми PVAN 3.6 (Millar Instruments) з конвертацією відносних одиниць об'єму (RVU) в абсолютні одиниці об'єму (мкл) за допомогою формули ( $\text{slope } 20,25 \cdot \text{RVU} - \text{intercept } 29,05$ ). Для цього катетер калібрували за об'ємом, шляхом занурення катетера у калібрувальну кювету, яка складає ряд циліндричних отворів відомого діаметру та об'єму, наповнених стабілізованою гепарином кров'ю щура.

Вплив донора сірководню вивчали за допомогою NaHS ("Sigma", США), який вводили внутрішньоочеревинно в концентрації 56,1 мг/кг. Вплив блокування CSE-залежного шляху утворення  $\text{H}_2\text{S}$  вивчали за допомогою ПГ ("Sigma", США), який вводили внутрішньоочеревинно в концентрації 11,3 мг/кг. Вказані дози препаратів дозволяли за нашими розрахунками досягти в плазмі крові концентрації NaHS і ПГ  $10^{-3}$  моль/л, які відповідали тим, що використовувались у дослідженнях на препаратах ГМ аорти (див. вище).

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

Фракцію мітохондрій отримували із серця щурів за методом диференційного центрифугування [286]. Видалені серця промивали охолодженим 0,9% розчином KCl. Далі тканину подрібнювали ножицями та гомогенізували у середовищі виділення в співвідношенні 1:9, що містило (ммоль/л): сахарозу – 250, ЕДТА – 1, тріс-HCl – 25, рН 7,4. Для осадження ядер і грубої клітинної фракції гомогенат центрифугували при 700 g протягом 8 хв (4°C). Отриманий

супернатант центрифугували при 11000 g протягом 15 хв (4°C) для осадження мітохондрій. Отриманий мітохондріальний осад ресуспендували в середовищі виділення, що містив (ммоль/л): сахароза – 250, тріс – HCl – 25 (pH 7,2 при 23 °C) та одразу використовували в експерименті. Вміст білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі [287].

#### **2.2.4. Визначення ендogenous пулів H<sub>2</sub>S і біохімічних показників, що характеризують інтенсивність окисного (як оксидативного, так і нітрозативного) стресу і конститутивного синтезу NO**

Дослідження проведено на препаратах мітохондрій серця, гомогенатах тканин серця і аорти щурів-самців лінії Вістар, у яких визначали ендogenous стаціонарні пули H<sub>2</sub>S одночасно із біохімічними показниками, що характеризують інтенсивність окисного (неодмінно як оксидативного, так і нітрозативного) стресу і конститутивного синтезу NO. Крім стаціонарних пулів, визначали також скоординовані зміни даних показників за штучного змінення ендogenous рівнів H<sub>2</sub>S шляхом введення старим щурам як донору H<sub>2</sub>S (NaHS), так і інгібітора одного із шляхів його синтезу *de novo* (пропаргілгліцин, ПГ). Враховуючи останні дані стосовно можливої взаємодії між собою сигнальних систем H<sub>2</sub>S і NO, ми також дослідили вплив NaHS і ПГ на активність різних шляхів *de novo* і реутилізаційного синтезу молекул H<sub>2</sub>S і NO. Крім взаємозв'язків між сигнальними системами сірки і азоту в органах серцево-судинної системи, нас цікавив також важливий взаємозв'язок між сигнальними системами сірки і кисню, так званими вільними радикалами останнього, що також є регуляторами серцево-судинної системи. Більше того, згідно теорії гормезису не лише самі по собі вільні радикали, або, як їх ще називають, АФК, але й деякі продукти глибокого вільнорадикального ПОЛ, як і продукти взаємодії АФК і АФА, наприклад ONOO<sup>-</sup>, можуть викликати адекватні усталеним газоподібним сигнальним молекулам (H<sub>2</sub>S, NO) кардіо- і вазопротекторні ефекти. Враховуючи останнє, нас цікавили не лише особливості генерації АФК (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, <sup>•</sup>OH), в т.ч. пули стабільних метаболітів (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) і маркери різних метаболічних генераторів, як-то:

ліпідних – ліпоксигенази (лейкотрієн C<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>) і циклооксигенази (тромбоксан B<sub>2</sub>, TxB<sub>2</sub>) і потужного нуклеотидного – ксантиноксидази (сечова кислота), а також ми безпосередньо визначали стаціонарні і змодельовані введенням донора або інгібітора одного із *de novo* шляхів синтезу H<sub>2</sub>S пули продуктів ПОЛ – ДК і МДА.

NaHS і ПГ вводили внутрішньоочеревинно дозою 56,1 мг/кг і 11,3 мг/кг, відповідно, за 30 хв до декапітації тварин.

*Визначення базальної активності ферментів синтезу оксиду азоту de novo.* Для визначення активності NO-синтаз (Ca<sup>2+</sup>-залежної та Ca<sup>2+</sup>-незалежної) використовували комбінацію класичного метода та сучасну його модифікацію, пристосовану до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції– L-цитруліну [288, 289]. З цією метою у 10 разів збільшили об'єм субстратної суміші і визначення активності ферменту проводили з мінімальною кількістю кофакторів для наближення активності NO-синтаз, що визначалися, до існуючого (базального) рівня активності. L-аргінін добавляли з надлишком, враховуючи його можливу утилізацію в аргіназній реакції.

*Визначення активності сумарної NO-синтази (cNOS+iNOS).* Аліквоти проб, що містили 500-1000 мкг білка, інкубували в загальному об'ємі 1 мл субстратної суміші наступного складу (мкмоль/мл): KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> (ч.д.а.) – 50, MgCl<sub>2</sub>(ч.д.а.) – 1, СаCl<sub>2</sub>(ч.д.а.) – 2, НАДФН (“Sigma”, США) -1, L-аргінін (ч.д.а.) -2, рН 7,0 протягом 60 хв при 37°C. Реакцію зупиняли, додаючи 0,3 мл 2 N НСlO<sub>4</sub>.(ч.д.а.) Контролем були проби, що містили повну субстратну суміш і попередньо денатурований 2 N НСlO<sub>4</sub> білок. Суміш центрифугували при 3500об./хв протягом 10 хв і в надосадковій безбілковій суміші визначали вміст L-цитруліну високоспецифічним спектрофотометричним методом за кольоровою реакцією з антипірином. Чутливість метода – 0,2 мкг L-цитруліну у 1 мл, завдяки чому він може використовуватися для дослідження активності NO-синтаз, замінюючи загальновживаний радіоактивний метод з використанням радіоактивного L-аргініну.

*Визначення активності iNOS.* Методика визначення аналогічна попередній за деякими відмінностями: для визначення активності  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної NOS в інкубаційну суміш замість  $\text{CaCl}_2$  добавляли 2 мкмоль ЕДТА.

*Розрахунок активності cNOS.* Сумарну активність cNOS (eNOS+nNOS) вираховували, віднімаючи від сумарної активності NOS активність iNOS.

Активність ферментів виражали в пікомолях новоутвореного L-цитруліну за 1 хв в розрахунку на 1 мг загального білка в пробі.

*Розрахунок індексу спряження cNOS.* Індекс спряження (coupling) cNOS розраховували як відношення активності cNOS до швидкості генерації  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Цей індекс характеризує наявність субстратів (L-аргінін,  $\text{O}_2$ ) і кофактора тетрагідробіоптерину ( $\text{BH}_4$ ) для утворення NO, а не  $\text{O}_2^{\bullet-}$  – при окисному метаболізмі L-аргініну. Вважається, що будь-яке підвищення генерації  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (мітохондріями, ксантиноксидазою чи NADPH-оксидазою) спричиняє неспряження (uncoupling) cNOS. Більше того, неспряжена cNOS не лише сама стає потужним генератором  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , але одночасно активує інші згадані джерела його утворення, тим самим утворюючи свого роду замкнуте коло взаємопідсилення оксидативного стресу і неспряження cNOS.

*Визначення вмісту  $\text{NO}_2^-$ .* Кількість нітрит-аніону ( $\text{NO}_2^-$ ) визначали в безбілкових аліквотах гомогенатів тканин серця, аорти та мітохондріях серця в колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна [290] в нашій модифікації. Реактив Гріса готували, змішуючи рівні частини 0,1% водного розчину нафтилетилендіаміндігідрохлориду (“Sigma”, США) з 1% розчином сульфаніламіну (“Sigma”, США) в 5 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ (ч.д.а.) безпосередньо перед визначенням. Кількість  $\text{NO}_2^-$  визначали за допомогою калібрувальної кривої, побудованої з використанням  $\text{NaNO}_2$  (х.ч.).

*Визначення вмісту нітрозотіолів.* Вміст низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ) визначали за методом, суть якого полягає у визначенні вмісту додаткового нітрит-аніону після гідролізу S – NO зв’язку катіонами двовалентної ртуті. Вміст НМНТ розраховували як різницю між вмістом  $\text{NO}_2^-$  в безбілковому розчині після гідролізу і кількість  $\text{NO}_2^-$  в безбілковому розчині без гідролізу.

Гідроліз білкових розчинів проб здійснювали протягом ночі в присутності іонів  $\text{Hg}^{2+}$  (нітрат ртуті, ч.д.а., Україна), після чого в гідролізат додавали рівний об'єм 1 N  $\text{HClO}_4$  для осадження білку, витримували на холоді для повного осадження білку, центрифугували для отримання безбілкових розчинів, в яких визначали вміст  $\text{NO}_2^-$  (RSNO).

*Визначення вмісту  $\text{NO}_3^-$ .* Кількість нітрат-аніону ( $\text{NO}_3^-$ ) визначали бруциновим методом в безбілкових аліквотах проб спектрофотометричним методом [291]. Аліквоти проб інкубували при  $100^\circ\text{C}$  протягом 10 хв після чого охолоджували і визначали величину екстинції при 405 нм. Бруциновий реактив готували шляхом розчинення 60 мг бруцину ("Sigma", США) у 100 мл 50 % сірчаної кислоти (х.ч.). Кількість  $\text{NO}_3^-$  визначали за допомогою калібрувальної кривої, побудованої з використанням  $\text{NaNO}_3$  (х.ч.).

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

*Визначення нітратредуктазної активності.* Визначення нітратредуктазної активності проводили в умовах концентрації насичення субстрату –  $\text{NO}_3^-$  в присутності надлишку NADH.

*Визначення вмісту цитруліну.* Цитрулін визначали високочутливим колориметричним методом [292]. Безбілкові аліквоти проб змішували з 2 мл реагента (1 мл 59мМ диацетилмонооксиму ("Sigma", США), 1 мл 32 мМ антипірину ("Sigma", США) і 55 мкМ сульфату заліза (II) в 6 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), кип'ятили протягом 15 хв на водяній бані, після охолодження визначали величину екстинції при 465 нм. Кількість цитруліну визначали за допомогою калібрувального графіку з використанням L-цитруліну (х.ч.).

*Визначення вмісту сечової кислоти.* Вміст сечової кислоти визначали колориметричним методом в аліквотах проб за допомогою добірки реактивів



фірми «Філіст-Діагностика» (м. Дніпро, Україна). До аліквот додавали розчин карбонату натрію та фосфорновольфрамowego реактиву зі стандартного набору. Інкубували суміш 30 хв при кімнатній температурі, потім визначали величину екстинції при 650 нм. Кількість сечової кислоти в пробах розраховували за екстинцією стандартного розчину сечової кислоти.

*Визначення швидкості утворення  $O_2^{\cdot -}$ .* Швидкість утворення супероксиду визначали за відновленням цитохрому С [293, 294]. Відновлення цитохрому С реєстрували спектрофотометрично за ростом поглинання при довжині хвилі 550 нм. Для підвищення специфічності вимірювання супероксиду (цитохром С здатні відновлювати також аскорбінова кислота, глутатіон, клітинні редуктази) цитохром С частково ацетилювали, що зменшувало швидкість його відновлення мітохондріальними і мікросомальними редуктазами і швидкість окиснення цитохром С-оксидазой, при цьому здатність цитохрому С відновлюватись супероксидом зберігалась.

*Визначення вмісту  $H_2O_2$ .* Безбілкові аліквоти гомогенатів та плазми крові (100-250 мкг білку) додавали в кварцеву кювету (1 см), що містила 2 мл 0,1 М розчину KJ (ч.д.а.), надлишку лактопероксидази (50 нМ) (“Sigma”, США) в 0,05М фосфатному буфері pH = 7,33 [295]. Фіксували швидкі зміни екстинції проб при 353 нм. Кількість  $H_2O_2$  виражали в пмоль на мг білку проби, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції  $\epsilon = 26000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

*Визначення швидкості утворення  $\cdot OH$ -радикалу.* До аліквот проб додавали суміш, яка містить 20 мМ дезоксирибози (ч.д.а.), 1мМ  $H_2O_2$  (“Sigma”, США), 20 мМ фосфату калію і 20 нг цинку у загальному об’ємі 0,6 мл. Після інкубації протягом 1 год при температурі 37°C додавали 0,5 мл 1% розчину тіобірбітуратової кислоти (ч.д.а.) з 50 мМ NaOH (ч.д.а.) і 0,5 мл 2,8% розчину трихлороцтової кислоти (ч.д.а.). Отриману суміш нагрівали при 100°C протягом 20 хв. Швидкість утворення  $\cdot OH$ -радикалу визначали за ростом поглинання при довжині хвилі 532 нм [296].

*Визначення вмісту тромбоксану B2 та лейкотрієну C4.* Вміст ейкозаноїдів – LTC4 та TxB2 визначали в спиртових екстрактах гомогенатів-

серця, аорти та мітохондріях серця. Спиртові екстракти висушували при 40°C у повітряному термостаті, зберігали при -20°C і визначали вміст ейкозаноїдів в них за допомогою радіоімунного методу [297], користуючись стандартними добірками реактивів фірми «Amersham», Англія. Радіоактивність проб визначали на лічильнику фірми «Beckman», Німеччина.

*Визначення вмісту дієнових кон'югатів (ДК).* Вміст ДК визначали спектрофотометрично за поглинанням при 232 нм гептанових екстрактів проб по методу [298].

*Визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА).* До аліквот проб додавали 0,5 мл 1% розчину тіобарбітурової кислоти в 50 мМ NaOH і 0,5 мл 2,8% розчину трихлороцтової кислоти. Отриману суміш витримували 20 хв на киплячій водяній бані, охолоджували і визначали величину екстинції при 532 нм [299].

*Визначення вмісту загального білка.* Загальний білок в пробах визначали методом Бредфорд з використанням барвника Cumassi G-250 ("Ferak", Німеччина) [300].

*Визначення вмісту  $H_2S$ .* До аліквот проб додавали 0,5 мл 1% розчину ацетата цинку, інкубували при 37,5°C протягом 10 хв., далі додавали 0,5 мл 20 мМ розчину N,N-диметилпарафеніл-ендіаміном та 0,5 мл 30 мМ розчину  $FeCl_3$ . Після 10 хв. інкубації в темноті на холоді визначали оптичну густину при 670 нм [301].

*Визначення активності ферментів синтезу CSE і 3MST.* Активність CSE визначали за приростом сульфід-аніону в інкубаційному середовищі у якому до аліквот проб додавали субстрат, L-цистеїн 6,0 мМ і кофактор, піридоксальфосфат 1,34 мМ. Після закінчення інкубації і зупинки реакції до пробірок додали 1% розчин ацетату цинку для зв'язування утвореного  $H_2S$ . Вміст сульфід-аніону в пробі розраховували за калібрувальним графіком [302]. Активність 3MST визначали за приростом сульфід-аніону, аналогічно попередній методиці, з додатковим внесенням в інкубаційне середовище субстрату,  $\alpha$ -кутоглутарату [302].

### 2.3. Обробка результатів

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excel (MS Office XP) та Origin 8.5 (Microcall Inc., США). Різницю між показниками визначали за допомогою t-критерію Ст'юдента (різниця вважалась достовірною при  $P < 0,05$ ), також використовували тест ANOVA. Нормальність розподілу була перевірена за критеріями Колмогорова-Смірнова. Кількість тварин для кожного дослідження вказували в дужках ( $n =$  ).

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 3.1. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СІРКОВОДНЮ НА ЕНДОТЕЛІЙЗАЛЕЖНЕ РОЗСЛАБЛЕННЯ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ АОРТИ У СТАРИХ ЩУРІВ

Відомо, що ендотелійзалежне розслаблення забезпечує розвиток фундаментальних судинних реакцій, а його порушення знаходиться в основі багатьох асоційованих зі старінням серцево-судинних захворювань: артеріальної гіпертензії, атеросклерозу, ішемічної хвороби серця, діабетичної ангіопатії тощо. З іншого боку, останнім часом в літературі з'являється все більше даних про кардіо- та васкулопротекторний вплив сірководню [7]. Одним із ферментів синтезу  $H_2S$  *de novo* в серцево-судинній системі є CSE, який в значній мірі інгібується пропаргілгліцином (ПГ) [5, 6]. Показано, що  $H_2S$  володіє здатністю пригнічувати оксидативний стрес, активність ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, взаємодіяти з системою NO, викликати розслаблення ГМ тощо [1, 43, 52, 53]. Проте, його вплив на ендотелійзалежне розслаблення судин при старінні не з'ясовано.

Метою даного етапу роботи було дослідити дію донора сірководню, NaHS та блокатора одного із трьох ферментів його синтезу (CSE) ПГ на ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти старих щурів і з'ясувати основні механізми цього впливу.

**3.1.1. Дослідження зміни ендотелійзалежного розслаблення при старінні.** АХ є відомим вазодилататором, який викликає розслаблення судин, індукуючи при цьому вироблення ендотеліальними клітинами NO. Досліди на м'язових препаратах грудної аорти показали, що додавання АХ ( $10^{-5}$  моль/л) до буферного розчину Кребса завжди викликало типове розслаблення преактивованих норадреналіном ГМ грудної аорти дорослих молодих щурів. Середнє значення амплітуди становило  $64,9\% \pm 3,5\%$  ( $n=10$ ). У старих щурів амплітуда АХ-індукованого розслаблення була суттєво нижчою. Середнє її значення становило  $7,5\% \pm 1,4\%$  ( $P<0,05$ ;  $n=10$ ) (рис. 3. 1.) у групі тварин, у яких

в подальшому досліджували вплив NaHS, і  $7,5\% \pm 1,8\%$  ( $P < 0,05$ ;  $n=10$ ) (рис. 3. 2.), у тварин з подальшим визначенням впливу ПГ. В обох групах старих щурів результати між собою достовірно не відрізнялись.

Отримані результати свідчить про те, що у щурів віком 22-24 міс порушується ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти. В той же час, відомо, що реакції ГМ аорти на агоністи, незалежні від ендотелію, наприклад нітропрусид натрію, з віком не втрачаються і відтворюються майже без змін. Отже порушується саме ендотелійзалежний компонент їх релаксації [206].

### **3.1.2. Дослідження впливу донору сірководню NaHS на ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти старих щурів.**

Результати попереднього етапу дослідження показали суттєве порушення ендотелійзалежного розслаблення ГМ аорти у старих щурів. Додавання до буферного розчину NaHS ( $10^{-3}$  моль/л) і інкубація в ньому препарату ГМ аорти старих щурів впродовж 30 хв суттєво збільшувало амплітуду розслаблення на АХ більш ніж у 6 разів. Середнє її значення становило  $48,8\% \pm 1,9\%$  ( $P < 0,05$ ;  $n=10$ ) порівняно з  $7,5\% \pm 1,4\%$  у старих тварин до застосування NaHS (рис. 3. 1.). Таким чином, екзогенний сірководень майже повністю відновлював пригнічене у старих тварин ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти.

### **3.1.3. Дослідження ролі ендотелію у реалізації впливу NaHS на ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти старих щурів.**

Ми припустили, що NaHS відновлював АХ-індуковане розслаблення ГМ аорти старих щурів за рахунок збільшення секреції ендотеліальними клітинами NO. Для підтвердження цього у наступній серії дослідів NaHS додавався одночасно із блокатором синтезу NO – L-NAME. На фоні NaHS та L-NAME спостерігалось значне зменшення амплітуди розслаблення ГМ аорти старих щурів у відповідь на АХ. Середнє значення його амплітуди було  $2,5\% \pm 1,4\%$  ( $P < 0,05$ ;  $n=10$ ) порівняно з  $48,8\% \pm 1,9\%$  у старих тварин при дії лише NaHS (рис. 3. 1.).

Таким чином, введення NaHS в перфузійний розчин *in vitro* посилювало ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти старих щурів, яке обмежувалося при

додаванні в перфузійний розчин інгібітора конститутивного синтезу NO – L-NAME.

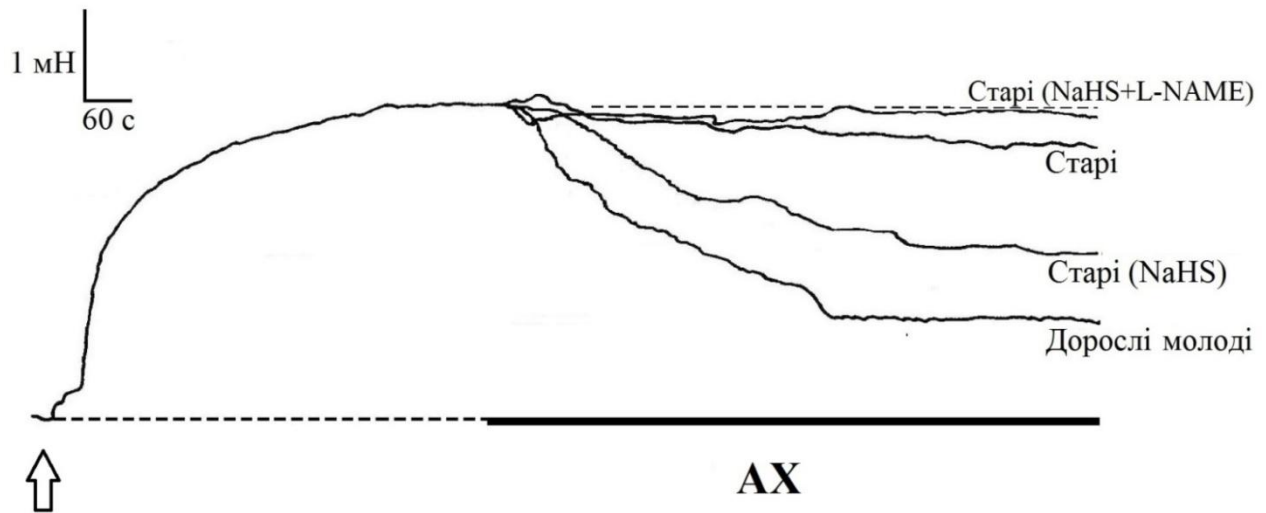


Рис. 3. 1. Нативні криві впливу NaHS на ацетилхолін(AX-) індуковане розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти старих щурів. Абсциса – час; ордината – напруження розвинуте препаратом, мН. Темна лінія під кривими – тривалість дії AX ( $10^{-5}$  моль/л), переривчаста – вихідний рівень (внизу) тонічного напруження ГМ і заданий рівень (зверху) їх активації після введення норадреналіну, що приймається за 100%. Стрілкою позначено початок активації ГМ.

**3.1.4. Дослідження впливу інгібітора CSE-залежного шляху утворення  $H_2S$ , пропаргілгліцину (ПГ) на ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти старих щурів.**  $H_2S$  синтезується в серцево-судинній системі участі двох ферментів: CSE і 3MST. Останні дослідження наводять докази того, що як кардіо- так і васкулопротекторні властивості обумовлені сірководнем, синтезованим саме CSE-залежним шляхом [303, 304]. Одночасно з цим, встановлено, що деякі патофізіологічні ефекти  $H_2S$ , а саме, індукція і здатність підтримувати запалення обумовлені також CSE-синтезованим сірководнем [93]. Враховуючи результати попереднього етапу дослідження і неоднозначність ролі CSE-синтезованого  $H_2S$ , ми вирішили з'ясувати вплив ПГ, інгібітора активності

CSE-залежного шляху утворення сірководню, на ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти у старих щурів.

Додавання до буферного розчину ПГ ( $10^{-3}$  моль/л) і інкубація в ньому препарату ГМ аорти старих щурів впродовж 30 хв призводило до збільшення амплітуди розслаблення на АХ (майже у 6 разів), а не до протилежного, як очікувалось, ефекту. Середнє її значення становило  $44,5\% \pm 3,2\%$  порівняно з  $7,5\% \pm 1,8\%$  у старих тварин до застосування ПГ ( $P < 0,05$ ;  $n=10$ ) (рис. 3. 2.).

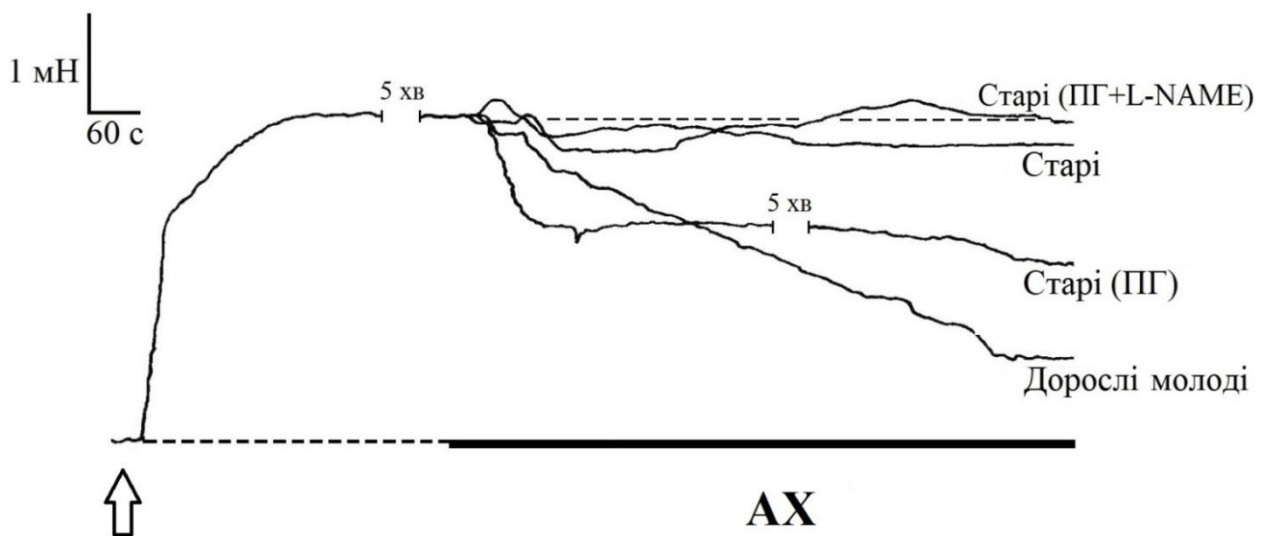


Рис. 3. 2. Нативні криві впливу пропаргілгліцину (ПГ) на ацетилхолін(АХ-) індуковане розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти старих щурів. Абсциса – час; ордината – напруження розвинуте препаратом, мН. Темна лінія під кривими – тривалість дії АХ ( $10^{-5}$  моль/л), переривчаста – вихідний рівень (внизу) тонічного напруження ГМ і заданий рівень (зверху) їх активації після введення норадреналіну, що приймається за 100%. Стрілкою позначено початок активації ГМ.

**3.1.5. Дослідження ролі ендотелію у реалізації впливу пропаргілгліцину (ПГ) на ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти старих щурів.** Ми зробили припущення, що ПГ покращує ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти старих щурів за рахунок збільшення секреції

ендотеліальними клітинами NO. Для підтвердження цього ми провели наступну серію дослідів з одночасним додаванням до буферного розчину ПГ і L-NAME. На фоні ПГ та L-NAME спостерігали значне зменшення амплітуди розслаблення ГМ аорти старих щурів у відповідь на АХ. Середнє значення його амплітуди було  $4,0\% \pm 1,6\%$  ( $P < 0,05$ ;  $n=10$ ) порівняно з  $44,5\% \pm 3,2\%$  у старих тварин при дії лише ПГ (рис. 3. 2.).

Таким чином, як NaHS, так і ПГ суттєво відновлювали ендотелійзалежне розслаблення, реалізуючи свій вплив через NO.

### **3.2. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СІРКОВОДНЮ НА ПОКАЗНИКИ ОКСИДАТИВНОГО/НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСУ ТА КОНСТИТУТИВНОГО СИНТЕЗУ NO В ТКАНИНАХ АОРТИ СТАРИХ ЩУРІВ**

Згідно з вільно-радикальною теорією старіння, в основі порушення функції органів і систем з віком лежить накопичення окисних пошкоджень клітинних біомолекул: ДНК, білків, ліпідів. З іншого боку, з літературних даних відомо, що сірководень володіє антиоксидантними властивостями, які полягають у його здатності пригнічувати утворення АФК і АФА, виступати у якості “скавенджера” та збільшувати активність ендогенних антиоксидантних ферментів [52, 53, 62, 63, 65, 70]. А результати попереднього етапу дослідження продемонстрували, що як донор так і блокатор CSE-залежного шляху синтезу  $H_2S$  покращують порушене у старих тварин ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти. Для встановлення конкретних механізмів впливу NaHS і ПГ ми провели серію біохімічних дослідів, метою яких було визначити вплив даних речовин на показники оксидативного/нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в тканинах аорти у старих щурів.

**3.2.1. Дослідження розвитку оксидативного стресу в тканинах аорти старих щурів.** Як видно з табл. 3. 1, в тканинах аорти старих щурів розвивається оксидативний стрес. Так, сумарна швидкість генерації  $O_2^{\bullet-}$ , ініціатора



оксидативного стресу, перевищувала контрольні (у дорослих молодих) значення в 5,8 разів. Дисмутація нестабільного радикала  $O_2^{\bullet-}$  в стабільний  $H_2O_2$  була більшою в 4,3 рази. Швидкість продукції найбільш активного радикалу кисню  $\cdot OH$ , який утворюється із  $H_2O_2$  в реакції Фентона, була вищою майже в 12 разів. Як відомо,  $\cdot OH$ -радикал ініціює ПОЛ, в процесі якого утворюються нестійкі гідроперекиси ліпідів, розпад яких призводить до появи ряду вторинних і кінцевих високотоксичних продуктів: ДК і МДА, відповідно [117]. Останні не просто чинять негативний вплив на мембрани, а через індукцію відкриття МП активують мітохондріальний шлях апоптозу. Більший вміст пулів ДК (у 4,4 рази) і пулів МДА (у 6,5 разів) вказував на високу інтенсивність ПОЛ в тканинах аорти старих тварин (табл. 3. 1).

Ми визначили також інтенсивність декількох основних шляхів утворення  $O_2^{\bullet-}$  в цільних гомогенатах аорти щурів досліджуваних експериментальних груп. Відомо, що важливими джерелами генерації  $O_2^{\bullet-}$  в клітині є дихальний ланцюг мітохондрій, діяльність ксантиноксидази, циклооксигенази, ліпооксигенази, неспряженої cNOS [113, 114]. У процесі деградації пуринових нуклеотидів за участі ксантиноксидази відбувається одночасне утворення  $O_2^{\bullet-}$  і сечової кислоти. При цьому, остання реакція активується в умовах гіпоксії. Таким чином, сечова кислота є одночасно маркером активності ксантиноксигеназного шляху продукції  $\cdot O_2^-$ , інтенсивності розпаду пуринових нуклеотидів, зокрема, АТФ і гіпоксії. Показано, що в тканинах аорти старих щурів пули сечової кислоти перевищували значення дорослих молодих тварин у 8,3 рази (табл. 3. 2).

Оксидативний стрес і ПОЛ є основними активаторами фосфоліпази  $A_2$ , під дією якої із фосфоліпідів клітинних мембран відщеплюється арахідонова кислота [305-307]. Вільна арахідонова кислота за участю циклооксигенази та ліпооксигенази може перетворюватися на  $TxB_2$  і  $LTC_4$ , відповідно. Обидві реакції супроводжуються також утворенням  $O_2^{\bullet-}$  [308, 309]. У нашій роботі пули  $LTC_4$ , маркера ліпооксигеназного генератора  $O_2^{\bullet-}$ , перевищували контрольні значення у 2,7 рази, а пули  $TxB_2$ , маркера циклооксигеназного шляху генерації супероксиду, не відрізнялися від значення у дорослих молодих тварин (табл. 3. 2).

Таблиця 3. 1.

**Швидкість генерації  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ -радикалів і пули стабільного  $H_2O_2$  та маркерів перекисного окиснення ліпідів в тканинах аорти старих щурів за дії NaHS і пропаргілглїцину (ПГ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Показник	Швидкість генерації $O_2^{\cdot-}$ , ум.од.	Пули $H_2O_2$ нмоль/мг білка	Швидкість генерації $\cdot OH$ , ум. од.	Дієнові кон'югати, нг/мг білка	Малоновий діальдегід, нмоль/мг білка
Дорослі молоді	4,58±0,77	3,2±0,6	0,33±0,03	7,42±0,94	1,74±0,06
Старі	26,67±3,01*	13,7±1,6*	3,92±0,51*	32,64±4,61*	11,24±2,05*
Старі+NaHS	3,5±0,86 <sup>#</sup>	2,47±0,22 <sup>#</sup>	0,42±0,02 <sup>#</sup>	7,95±0,51 <sup>#</sup>	3,69±0,38 <sup>#,*</sup>
Старі+ПГ	6,36±0,65 <sup>#</sup>	4,23±0,63 <sup>#</sup>	1,22±0,18 <sup>#,*</sup>	21,57±2,84*	9,24±0,24*

В табл. 3.1 – 3.15: \* – різниця достовірна ( $P < 0.05$ ) по відношенню до значення у дорослих молодих, # – по відношенню до значення у старих щурів.

Таблиця 3. 2.

**Зміни пулів маркерів ферментативного утворення  $O_2^{\cdot-}$  в тканинах аорти старих щурів за дії NaHS і пропаргілглїцину (ПГ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Показник	Тромбоксан В2, нмоль/мг білка	Лейкотрієн С4, нмоль/мг білка	Сечова кислота, нмоль/мг білка
Дорослі молоді	1,88±0,32	0,65±0,05	5,16±0,83
Старі	2,26±0,27	1,78±0,28*	42,7±5,75*
Старі+NaHS	0,41±0,02 <sup>#,*</sup>	0,36±0,02 <sup>#,*</sup>	7,2±2,1 <sup>#</sup>
Старі+ПГ	1,28±0,13	1,04±0,12	19,5±2,7 <sup>#,*</sup>

Отримані результати свідчать про те, що в тканинах аорти старих щурів мав місце оксидативний стрес, переважно викликаний посиленням утворенням  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  і  $\cdot OH$ . Надмірна продукція останнього радикалу могла бути причиною високої інтенсивності ПОЛ у досліджуваних тварин.

**3.2.2. Дослідження розвитку нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в тканинах аорти старих щурів.** Одночасно з розвитком оксидативного стресу і ПОЛ, в аорті старих щурів мав місце і нітрозативний стрес (табл. 3. 3). Про це свідчило значне підвищення надлишкового синтезованого *de novo* NO – підвищення активності iNOS в 3,8 разів, і його реутилізаційного синтезу – підвищення активності нітратредуктази (забезпечує відновлення метаболітів NO –  $\text{NO}_3^-$  і  $\text{NO}_2^-$ ) в 9,8 разів. Одночасне надмірне утворення NO і  $\text{O}_2^{\bullet-}$  створює умови для їх взаємодії між собою із утворенням високотоксичного  $\text{ONOO}^-$ , продуктом нерадикального розпаду якого є  $\text{NO}_3^-$  [310], пули якого в аорті старих тварин були вищими у 5,6 разів (табл. 3. 4).

Одночасно із розвитком нітрозативного стресу в тканинах аорти старих щурів мало місце зниження конститутивного синтезу NO і зменшення вмісту його вазорелаксуючої фракції. Про це свідчило зниження активності cNOS (в 3 рази) і зменшення пулів  $\text{NO}_2^-$  (в 1,7 разів) (табл. 3. 3, 3. 4). Останній є окисним метаболітом NO і використовується у якості маркера оксигенації [311] і конститутивного синтезу оксиду азоту, так як 70% всього  $\text{NO}_2^-$  є продуктом конститутивного синтезу NO [312]. Причиною порушення конститутивного синтезу NO міг бути неспряжений стан cNOS (синтез ним в більшій мірі  $\text{O}_2^{\bullet-}$  замість NO), на що вказувало зниження майже у 20 разів величини розрахованого нами індексу спряження cNOS (табл. 3. 5). Неспряження cNOS могло розвинутиись через зменшення вмісту L-аргініну [313] – субстрату *de novo* синтезу NO, на що вказувало збільшення аргіназної активності (у 3,4 рази), або зниження пулів кофактора cNOS —  $\text{BH}_4$ , в результаті його окиснення радикалами  $\text{O}_2^{\bullet-}$  або  $\text{ONOO}^-$  [314]. Надмірне утворення обох вказаних радикалів було встановлене нами раніше. За умов зниження конститутивного синтезу NO, підвищення декомпозиції НМНТ (зниження їх пулів у 2,2 рази) могло бути компенсаторною реакцією. Окремо слід відмітити меншу величину ендогенних пулів  $\text{H}_2\text{S}$  (в 1,6 разів) (табл. 3.4), регулятора спряженого-неспряженого стану cNOS, тобто конститутивного синтезу дилататорного NO і потужного кардіо- і васкулопротектора.

Таблиця 3. 3.

**Активність ферментів синтезу NO і аргінази в тканинах аорти старих щурів за дії NaHS і пропаргілгліцину (ПГ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Показник	cNOS, <i>пмоль/хв. мг білка</i>	iNOS, <i>пмоль/хв. мг білка</i>	Нітратредуктаза, <i>пмоль/хв. мг білка</i>	Аргіназа, <i>пмоль/хв. мг білка</i>
Дорослі молоді	53,12±6,66	8,98±0,64	0,58±0,07	2,73±0,43
Старі	17,43±1,29*	34,18±2,35*	5,66±1,44*	9,38±1,98*
Старі+NaHS	40,87±11,52 <sup>#</sup>	3,71±0,82 <sup>#,*</sup>	0,44±0,03 <sup>#</sup>	0,66±0,03 <sup>#,*</sup>
Старі+ПГ	22,53±5,01*	9,1±1,95 <sup>#</sup>	1,03±0,03 <sup>#,*</sup>	1,54±0,05 <sup>#</sup>

Таблиця 3. 4.

**Пули стабільних метаболітів NO, низькомолекулярних нітрозотіолів та H<sub>2</sub>S в тканинах аорти старих щурів за дії NaHS і пропаргілгліцину (ПГ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Показник	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , <i>пмоль/мг білка</i>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , <i>пмоль/мг білка</i>	Низькомолекулярні нітрозотіолі, <i>пмоль/мг білка</i>	H <sub>2</sub> S, <i>пмоль/мг білка</i>
Дорослі молоді	522,4±60,9	29,57±5,45	1499,66±188,2	22,1±2,93
Старі	307,75±17,99*	165,5±23,71*	681,93±92,45*	13,53±1,47*
Старі+NaHS	1604,5±366,03 <sup>#,*</sup>	43,88±4,34 <sup>#</sup>	1646,37±357,76 <sup>#</sup>	26,33±2,67 <sup>#</sup>
Старі+ПГ	904,43±165,1 <sup>#</sup>	106,69±19,3*	1413,93±132,9 <sup>#</sup>	14,1±1,56*

Таблиця 3. 5.

**Величина індексу спряження cNOS і пов'язані з ним показники в тканинах аорти старих щурів за дії NaHS і пропаргілглїцину (ПГ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Показник	cNOS, <i>пмоль/хв. мг білка</i>	Швидкість генерації $O_2^{\bullet-}$ , <i>ум.од.</i>	Індекс спряження cNOS, <i>ум. од.</i>
Дорослі молоді	53,12±6,66	4,58±0,77	12,15±2,54
Старі	17,43±1,29*	26,67±3,01*	0,63±0,15*
Старі+NaHS	40,87±11,52 <sup>#</sup>	3,5±0,86 <sup>#</sup>	15,08±2,5 <sup>#</sup>
Старі+ПГ	22,53±5,01*	6,36±0,65 <sup>#</sup>	5,34±1,1 <sup>#,*</sup>

Таким чином, в тканинах аорти старих тварин знижувався рівень  $H_2S$ , розвивався оксидативний/нітрозативний стрес і неспряжений стан cNOS. Наслідком цього було пригнічення конститутивного синтезу дилататорного NO і глибоке порушення ендотелійзалежного розслаблення ГМ аорти.

**3.2.3. Дослідження впливу NaHS на показники оксидативного стресу в тканинах аорти у старих щурів.** Введення старим тваринам *in vivo* NaHS (56,1 мг/кг) значно збільшувало в тканинах аорти пули  $H_2S$  (рис. 3.3.).

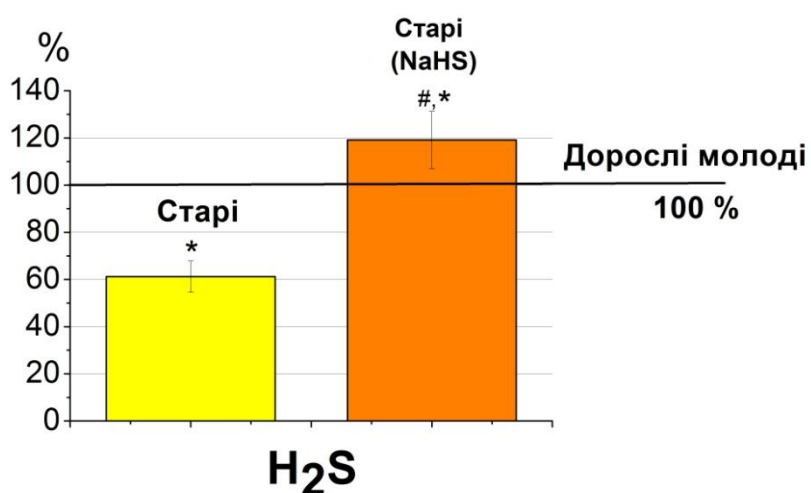


Рис. 3. 3. Вплив NaHS на нормовані величини (%) пулів  $H_2S$  в тканинах аорти старих щурів. \* $P < 0,05$  відносно дорослих молодих (контроль), рівень яких прийнято за 100%,  $\#P < 0,05$  відносно старих щурів.

Це супроводжувалось повною нормалізацією швидкості утворення  $O_2^{\bullet-}$  в тканинах аорти старих щурів (рис. 3. 4.). Середнє її значення зменшилось майже в

6 разів. Причиною послаблення утворення  $O_2^{\bullet-}$  було зменшення активності циклооксигеназного (пули ТхВ2 зменшились в 5,5 разів), ліпооксигеназного (пули LTC4 зменшились в 5 разів) і ксантиноксидазного (вміст сечової кислоти зменшився майже в 6 разів) шляхів генерації даного радикалу. Субстратом для перших двох шляхів є вільна арахідонова кислота, вміст якої зменшився в 2 рази. Також за дії донора знижувались швидкість утворення  $\cdot OH$ -радикалу (у 9,3 разів) і пули  $H_2O_2$  (у 5,5 разів).

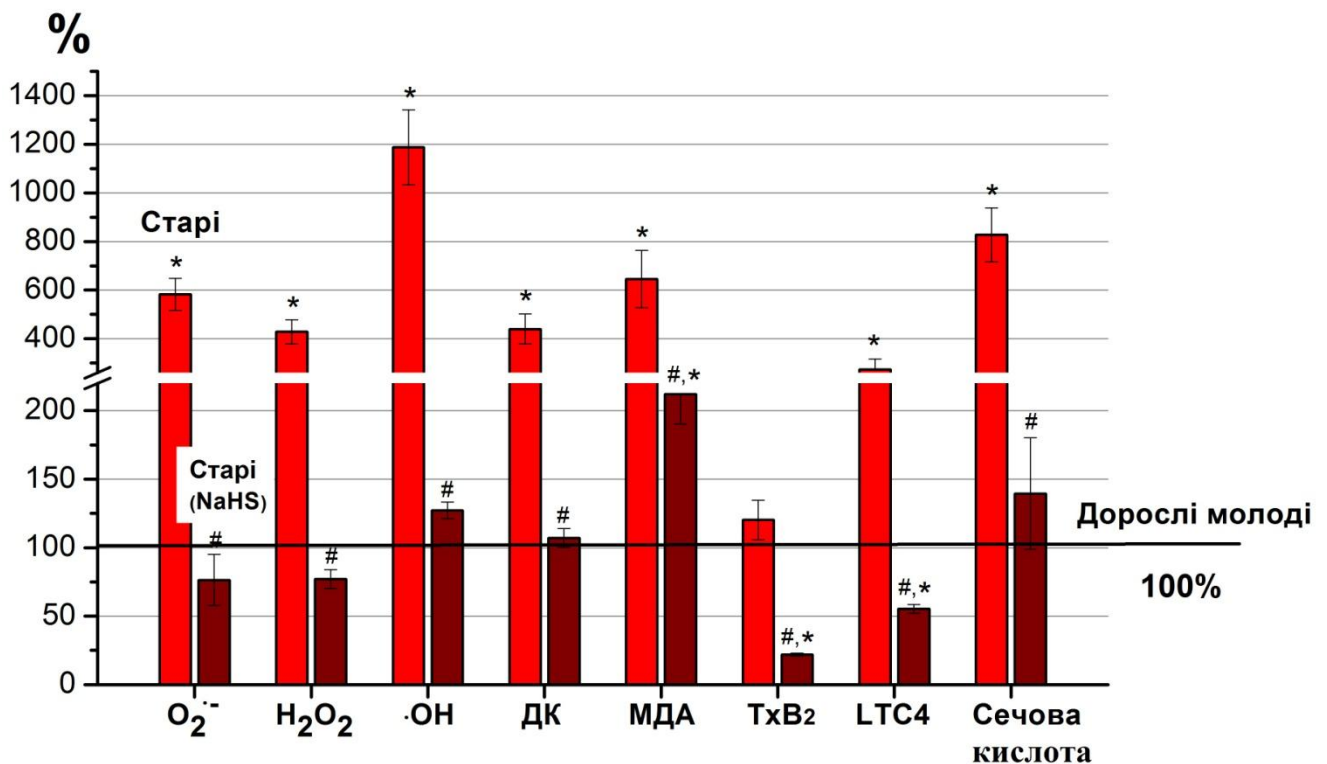


Рис. 3. 4. Вплив NaHS на нормовані величини (%) показників оксидативного стресу і ПОЛ в тканинах аорти старих щурів: швидкість утворення  $O_2^{\bullet-}$ , вміст  $H_2O_2$ , швидкість утворення  $\cdot OH$ -радикалу, вміст дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА), пули тромбоксану В2 (ТхВ2), лейкотрієну С4 (LTC4) та сечової кислоти. \* $P < 0,05$  відносно показників у дорослих молодих (контроль), рівень яких прийнято за 100%, # $P < 0,05$  відносно показників у старих щурів.

Логічним наслідком зниження утворення  $\cdot\text{OH}$ -радикалу, ініціатора ПОЛ, стало зниження інтенсивності даного процесу, про що свідчило зменшення вмісту ДК (у 4 рази) і МДА (у 3 рази) (рис. 3. 4.).

Таким чином донор NaHS суттєво послаблював оксидативний стрес і ПОЛ в тканинах аорти старих щурів.

**3.2.4. Дослідження впливу NaHS на показники нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в тканинах аорти у старих щурів.** Введення *in vivo* NaHS старим тваринам супроводжувалось також суттєвим пригніченням нітрозативного стресу (рис. 3. 5.) через зменшення надлишкового утворення NO і його високотоксичного похідного  $\text{ONOO}^-$ . Так, активність iNOS і нітратредуктази знижувались у 9,2 і 12,9 разів, відповідно, а пули  $\text{NO}_3^-$ , маркера нерадикального розпаду  $\text{ONOO}^-$ , — у 3,8 рази.

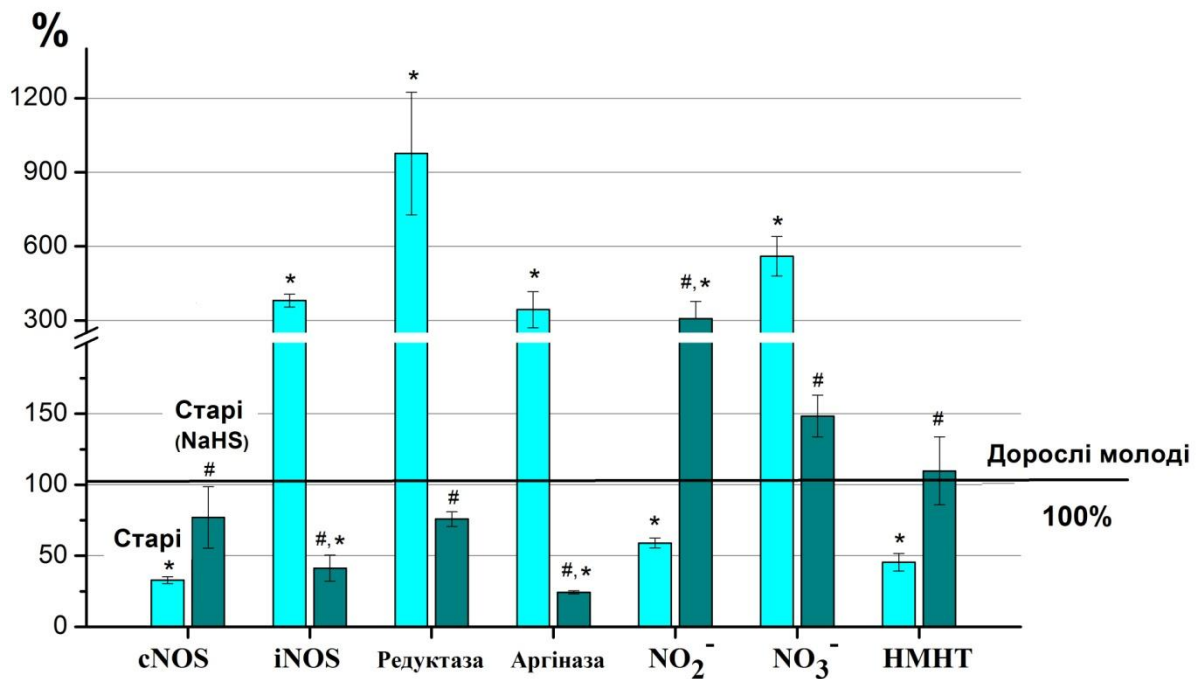


Рис. 3. 5. Вплив NaHS на нормовані величини (%) показників нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в тканинах аорти старих щурів: активність конститутивної (cNOS), індукцибельної NO-синтази (iNOS), нітратредуктази і аргінази, вміст  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$  аніонів та низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ). \* $P < 0,05$  відносно показників у дорослих молодих (контроль), рівень яких прийнято за 100%, # $P < 0,05$  відносно показників у старих щурів.

Одночасно із пригніченням нітрозативного стресу, спостерігалось відновлення спряженого стану cNOS, що супроводжувалось посиленням конститутивного синтезу вазорелаксуючого NO (рис. 3.5.). Так, індекс спряження cNOS збільшувався майже у 24 рази (рис. 3.6.), активність cNOS зростала у 2,3 рази, а пули  $\text{NO}_2^-$  — у 5,2 рази. Причиною відновлення спряженого стану cNOS могло стати збільшення біодоступності L-аргініну (активність аргінази зменшилась в 14,2 рази) і пригнічення утворення  $\text{O}_2^{\bullet-}$  і  $\text{ONOO}^-$  (див вище). Одночасно зі збільшенням синтезу вазорелаксуючого NO відбувалось зростання вмісту його депонуючої фракції – НМНТ (збільшились у 2,4 рази).

Отримані результати свідчать про здатність сірководню пригнічувати нітрозативний стрес, одночасно, відновлювати спряжений стан cNOS і конститутивний синтез дилататорного NO. Наслідком чого було покращення ендотелійзалежного розслаблення ГМ у старих тварин.

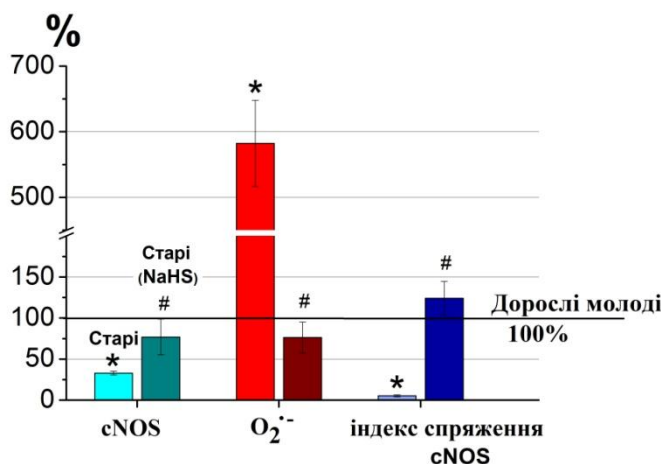


Рис. 3. 6. Вплив NaHS на нормовані величини (%) індексу спряження cNOS і пов'язані з ним показники в тканинах аорти старих щурів: активність конститутивної NO-синтази (cNOS), швидкість утворення  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . \*P<0,05 відносно показників у дорослих молодих (контроль), рівень яких прийнято за 100%, #P<0,05 відносно показників у старих щурів.

**3.2.5. Дослідження впливу інгібітора CSE-залежного шляху утворення сірководню, пропаргілгліцину (ПГ) на показники оксидативного стресу в тканинах аорти старих щурів.** Враховуючи антиоксидантні властивості сірководню, які полягають у його здатності пригнічувати утворення АФК і АФА, очищати від них внутрішньоклітинне середовище — виступати у якості



“скавенджера” та збільшувати активність ендогенних антиоксидантних ферментів, ми вважали, що блокування ферменту його синтезу має призвести до посилення утворення АФК і до посилення оксидативного стресу і ПОЛ. Проте, як і на етапі фізіологічних досліджень, отримали протилежний нашим очікуванням результат.

Введення ПГ (11,3 мг/кг) не змінювало ендогенні пули  $H_2S$  в тканинах аорти старих щурів (рис. 3. 7.).

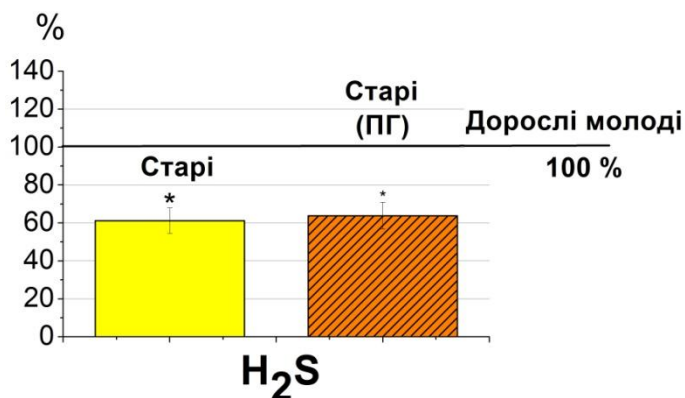


Рис. 3.7. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на нормовані величини (%) пулів  $H_2S$  в тканинах аорти старих щурів. \* $P < 0,05$  відносно дорослих молодих (контроль), рівень яких прийнято за 100%, # $P < 0,05$  відносно старих щурів.

Однак, як і у випадку із  $NaHS$ , введення ПГ супроводжувалось пригніченням оксидативного стресу (рис. 3.8.) Так, повністю нормалізувалась швидкість утворення  $O_2^{\bullet-}$ . Середнє її значення зменшилось в 4,2 рази. Це відбулось внаслідок зменшення активності ксантиноксидазного (вміст сечової кислоти зменшився майже в 2,2 разів) шляху генерації  $O_2^{\bullet-}$ . При цьому ліпідні оксигенази на введення ПГ не зреагували. На основі цього, можна зробити висновок, що саме ксантиноксидаза була основним генератором супероксиду в тканинах аорти старих щурів. Також без змін залишились пули вільної арахідонової кислоти, субстрату ліпідних оксигеназ. Дія блокатора супроводжувалась повною нормалізацією вмісту  $H_2O_2$  (пули зменшились у 3,2 рази) і суттєвим зниженням швидкості утворення  $\bullet OH$ -радикалу (у 3,2 рази). Проте зниження утворення  $\bullet OH$ -радикалу не супроводжувалось послабленням інтенсивності ПОЛ, про що свідчать незмінені пули ДК і МДА. Таким чином введення ПГ супроводжувалось пригніченням оксидативного стресу, але не позначалось на інтенсивності ПОЛ (рис. 3. 8.).

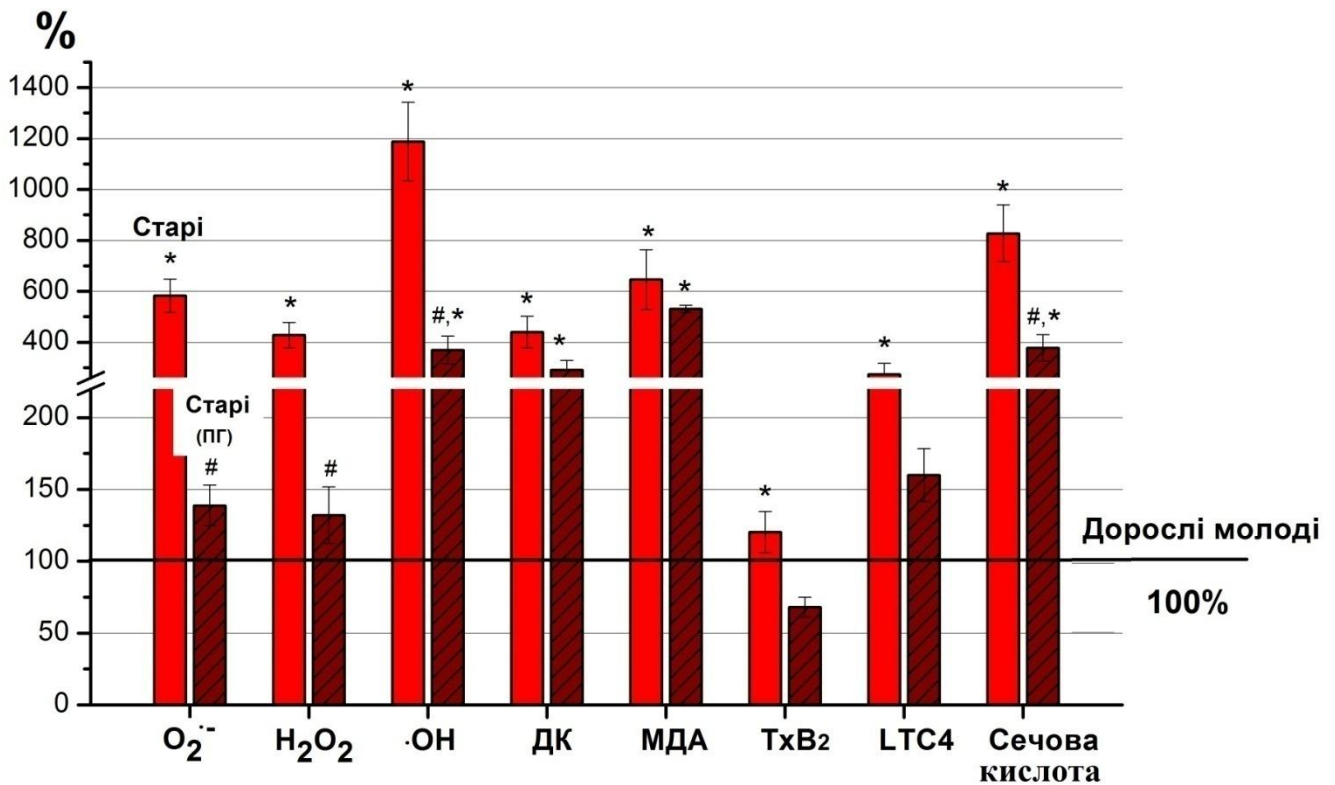


Рис. 3. 8. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на нормовані величини (%) показників оксидативного стресу і ПОЛ в тканинах аорти старих щурів: швидкість утворення  $O_2^{\bullet-}$ , вміст  $H_2O_2$ , швидкість утворення  $\cdot OH$ -радикалу, вміст дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА), пули тромбоксану В2 (ТхВ2), лейкотрієну С4 (LTC4), сечової кислоти. \* $P < 0,05$  відносно показників у дорослих молодих (контроль), рівень яких прийнято за 100%, # $P < 0,05$  відносно показників у старих щурів.

**3.2.6. Дослідження впливу пропаргілгліцину (ПГ) на показники нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в тканинах аорти старих щурів.** Введення *in vivo* ПГ старим тваринам супроводжувалось частковим пригніченням нітрозативного стресу, через зменшення надлишкового *de novo* і реутилізаційного синтезу NO (рис 3.9.). Так, активність iNOS і нітратредуктази знижувались у 3,8 і 5,5 разів, відповідно. Однак цього було недостатньо для достовірного зменшення пулів  $NO_3^-$ , маркера нерадикального розпаду  $ONOO^-$ . Одночасно відбувалось збільшення у 8,5 разів індексу спряження

cNOS (рис. 3.10.) і збільшення у 3 рази пулів  $\text{NO}_2^-$ , окисного метаболіту NO. Однак, активність cNOS при цьому не змінювалась.

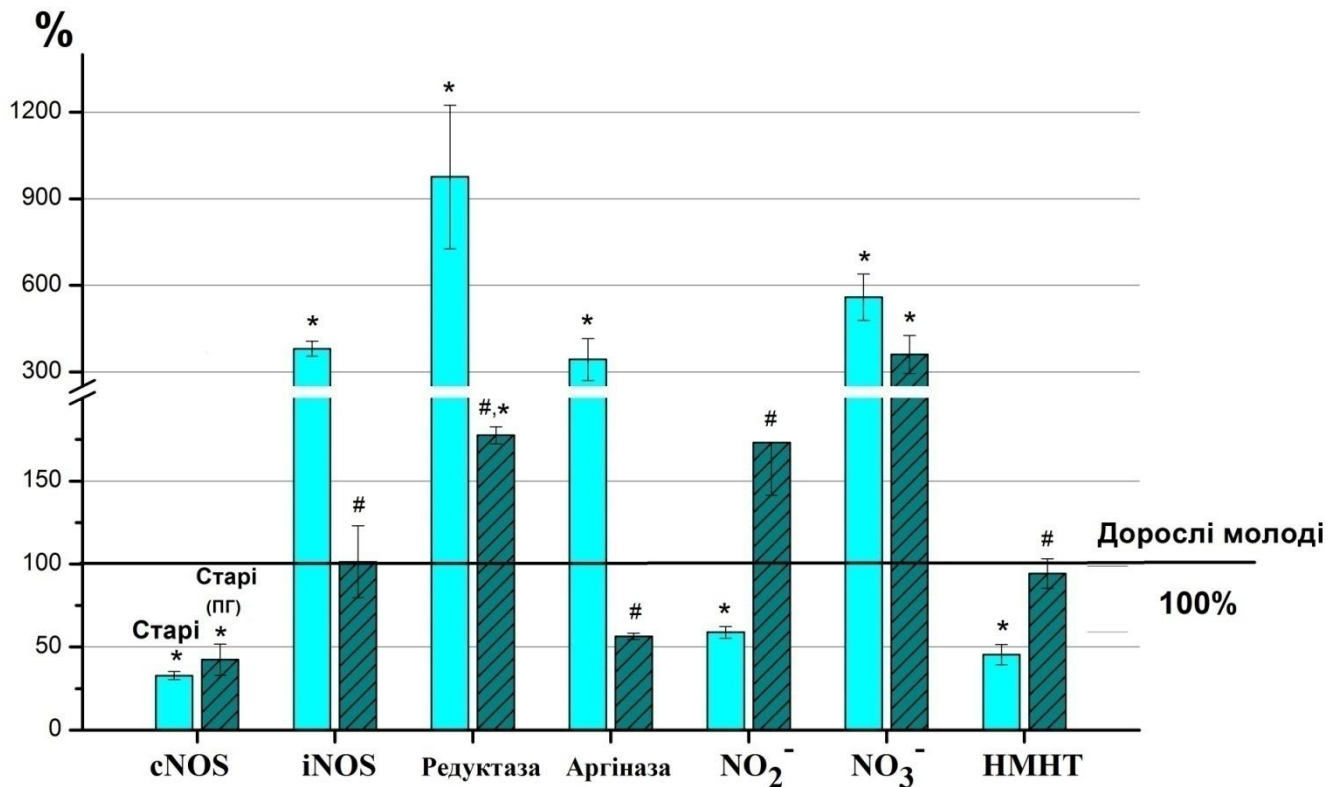


Рис. 3.9. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на нормовані величини (%) показників нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в тканинах аорти старих щурів: активність конститутивної (cNOS), індукцибельної NO-синтази (iNOS), нітратредуктази, і аргінази, вміст  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$ -аніонів та низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ). \* $P < 0,05$  відносно показників у дорослих молодих (контроль), рівень яких прийнято за 100%, # $P < 0,05$  відносно показників у старих щурів.

Відомо, що  $\text{O}_2^{\bullet-}$  здатен, по-перше, стимулювати активність iNOS, наслідком чого є розвиток нітрозативного стресу, по-друге, окислювати GSH і  $\text{BH}_4$ , результатом чого є неспряження cNOS і синтез супероксиду замість оксиду азоту і по-третє взаємодіяти з NO, викликаючи деградацію і зменшення біодоступності останнього. Наслідком даних процесів є порушення ендотелійзалежного розслаблення. Ми вважаємо, що в основі здатності ПГ пригнічувати нітрозативний стрес, покращувати спряження cNOS і збільшувати пули  $\text{NO}_2^-$ , а отже і біодоступність NO, знаходиться встановлений нами

інгібіторний його вплив на утворення  $O_2^{\bullet-}$  в тканинах аорти старих щурів. Наслідком даних ефектів ПГ було покращення ендотелійзалежного розслаблення ГМ аорти старих тварин.

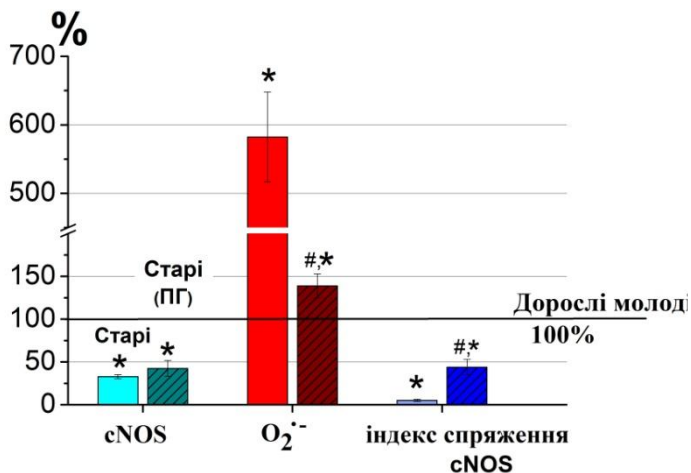


Рис. 3.10. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на нормовані величини (%) індексу спряження cNOS і пов'язані з ним показники в тканинах аорти старих щурів: активність конститутивної NO-синтази (cNOS), швидкість утворення  $O_2^{\bullet-}$ . \* $P < 0,05$  відносно показників у дорослих молодих (контроль), рівень яких прийнято за 100%, # $P < 0,05$  відносно показників у старих щурів.

### 3.3. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СІРКОВОДНЮ НА ПОКАЗНИКИ КАРДІОГЕМОДИНАМІКИ У СТАРИХ ЩУРІВ

Згідно з наведених вище [255, 260] літературних даних, при старінні розвитку систолічної дисфункції передуює порушення діастолічної функції серця. Причиною останньої є пошкодження механізмів, які забезпечують адекватне заповнення шлуночків кров'ю. Відомо, що повноцінна релаксація міокарда в ранню діастолу забезпечується енергозалежним процесом транспорту  $Ca^{2+}$  із міоплазми в саркоплазматичний ретикулум та позаклітинне середовище за участі двох насосів –  $Ca^{2+}$ -АТФази саркоплазматичного ретикулума і  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани, відповідно [265]. Енергодефіцит, порушуючи роботу цих переносників, викликає діастолічну дисфункцію. З іншого боку, при старінні саме окисний стрес спричинює зниження біосинтезу АТФ і розвиток енергодефіциту в мітохондріях [262, 268-270, 272].

Метою даного етапу роботи було дослідити дію донора сірководню, NaHS та блокатора пропаргілгіцину на показники кардіогемодинаміки *in vivo* і з'ясувати основні механізми цього впливу.

**3.3.1. Показники кардіогемодинаміки у старих щурів *in vivo*.** При вивченні показників кардіогемодинаміки у групі дорослих молодих і старих щурів виявлено відмінності. (Табл. 3. 6).

Таблиця 3. 6.

**Основні показники кардіогемодинаміки у старих щурів *in vivo***

Показник	Дорослі молоді	Старі
Кінцево-сistolічний тиск, мм рт.ст.	101,4 ±1,73	113,2 ±3,75*
Кінцево-діастолічний тиск, мм рт.ст.	3,45 ±0,37	10,64 ±0,7*
Кінцево-сistolічний об'єм, мкл	216,85 ± 4,32	220,83± 6,2
Кінцево-діастолічний об'єм, мкл	258,1 ±6,86	268,09± 2,31
Ударний об'єм, мкл	67,09 ±4,01	58,9 ±4,05
Хвилинний об'єм крові, мл/хв.	23,0 ±1,22	20,0 ± 1,32
Фракція викиду, %	21,15 ±0,55	21 ±1,43
Частота серцевих скорочень, хв <sup>-1</sup>	356,5 ± 2,91	340,3 ±6,38*
Ударна робота, мм рт.ст./мкл	2835,38 ± 184,13	4091,77 ± 450,72

Із таблиці видно, що у старих щурів кінцево-сistolічний тиск і кінцево-діастолічний тиск були достовірно вище, ніж у дорослих молодих. Так, кінцево-сistolічний тиск у старих щурів був на 11,6% (на 11,8 мм рт.ст) більше, а КДТ – в 3,1 рази більше (на 7,19 мм рт.ст.) ніж в контрольній групі. ЧСС в у старих щурів була достовірно нижче, ніж у дорослих молодих.

При вивченні насосної функції серця нами виявлено, що показники кінцево-діастолічного об'єму, кінцево-сistolічного об'єму, ударного об'єму і хвилинного об'єму крові у старих щурів достовірно не відрізнялись від значень у дорослих молодих. Водночас, нами виявлено, що споживання кисню міокардом на одиницю ударного об'єму у старих щурів становило  $6,64 \pm 0,8$  мл/хв, а в групі дорослих молодих цей показник був  $3,9 \pm 0,48$  мл/хв ( $P < 0,01$ ). Тобто, на 70% більше порівняно з контролем. Це може вказувати на більш енерговитратну роботу серця у старих щурів.

Ударна робота серця у старих щурів була в 1,4 раза більше, ніж у дорослих молодих щурів. Тобто, серце старих щурів при однаковому ударному об'ємі виконувало більшу роботу, з більшим споживанням кисню. Це теж підтверджує, що серце старих щурів працювало менш ефективно з більшим споживанням кисню. Можливо, менш ефективна робота серця пов'язана з порушенням функції розслаблення ЛШ у старих щурів.

При вивченні показників діастолічної функції ЛШ, виявлено зниження на 27,4% максимальної швидкості зниження тиску ( $dP/dt_{min}$ ), яка становила  $(-5466 \pm 391)$  мм рт. ст./с порівняно з  $(-8131 \pm 308)$  мм рт. ст./с. у групі дорослих молодих ( $P < 0,05$ ;  $n=7$ ). При цьому відмічалось збільшення жорсткості камери ЛШ, яка визначає його наповнення в період пізньої діастолі. Так, кінцево-діастолічна жорсткість (КДЖ) міокарда у старих щурів була достовірно вище і становила  $0,23 \pm 0,05$  мм рт.ст./мкл, а у дорослих молодих щурів цей показник був  $0,108 \pm 0,03$  мм рт.ст./мкл ( $P < 0,001$ ;  $n=7$ ) (рис. 3. 11.). Збільшення КДЖ міокарда у старих щурів в 2,1 раза може вказувати на порушення процесів розслаблення серця. Крім того, нами виявлено, що константа активного розслаблення ( $\tau$ ) у старих щурів була в 1,4 рази більше, ніж у групі дорослих молодих, що також

вказує на порушення процесу релаксації серця. Так, цей показник у дорослих молодих щурів становив  $(11 \pm 0,2)$  мс, а у старих щурів –  $(15,77 \pm 0,49)$  мс ( $P < 0,05$ ;  $n=7$ ) (Рис. 3. 12.).

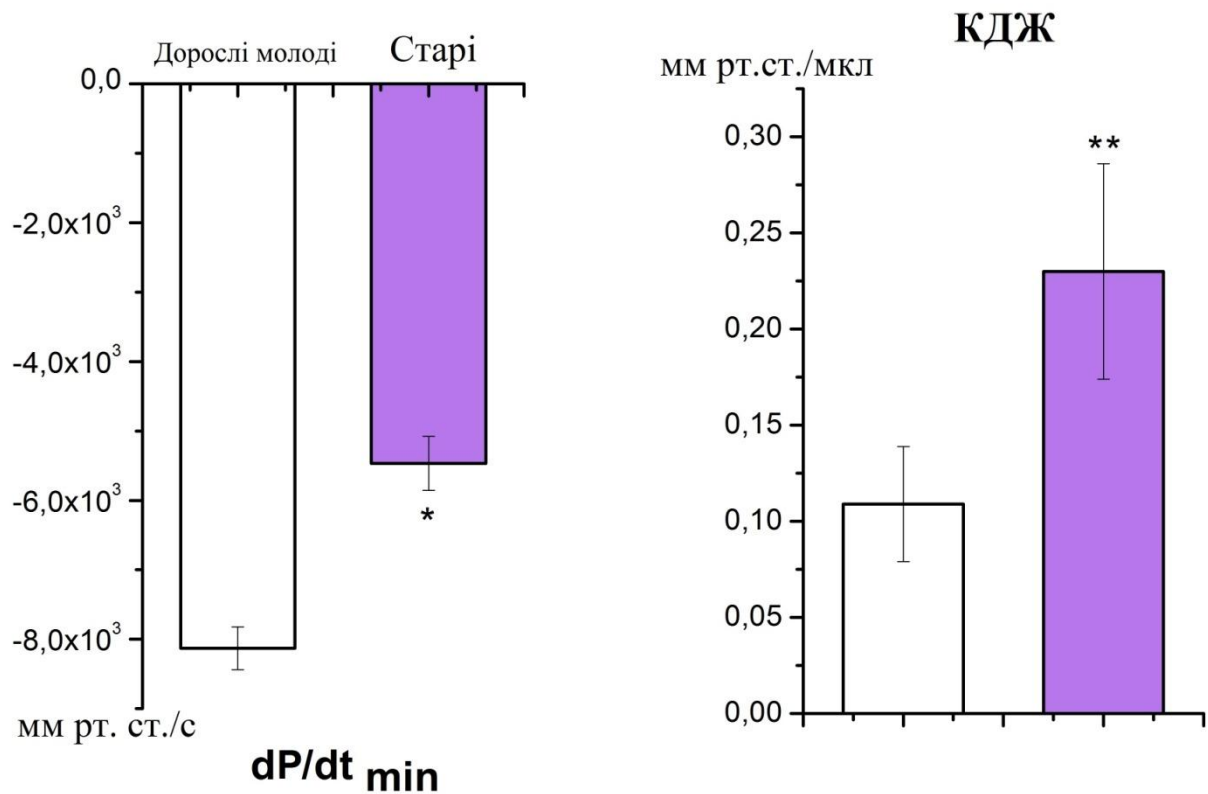


Рис. 3. 11. Показники максимальної швидкості зниження тиску ( $dP/dt_{min}$ ) і кінцево-діастолічної жорсткості міокарда (КДЖ) у дорослих молодих і старих щурів. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,001$  відносно показників у дорослих молодих щурів.

Отже, зниження максимальної швидкості зниження тиску, при збільшенні кінцево-діастолічної жорсткості міокарда і константи активного розслаблення та при підвищенні кінцево-діастолічного тиску вказує на діастолічну дисфункцію ЛШ і порушення розслаблення серця у старих щурів.

При дослідженні показників скоротливої активності міокарда достовірних змін у старих щурів не відмічалось. Значення максимальної швидкості наростання тиску у них становило  $(10495 \pm 338)$  мм рт.ст./с, а у дорослих молодих щурів –  $(10989 \pm 517)$  мм рт.ст./с. Індекси скоротливості, максимальна кінцево-систолічна

жорсткість міокарда у старих щурів вірогідно не відрізнялись від показників контролю.

Для оцінки функціональних резервів серця використовували тест на навантаження об'ємом і будували криву Франка–Старлінга. У старих щурів функціональні резерви серця знижувались, оскільки приріст показників насосної функції і скоротливої активності міокарда був менше, ніж у дорослих молодих тварин. Встановлено тенденцію до зменшення ефективності механізму Франка–Старлінга (Дударний об'єм/ $\Delta$ кінцево-діастолічний об'єм) у старих щурів, оскільки цей показник був на 12% нижче, ніж в контрольній групі.

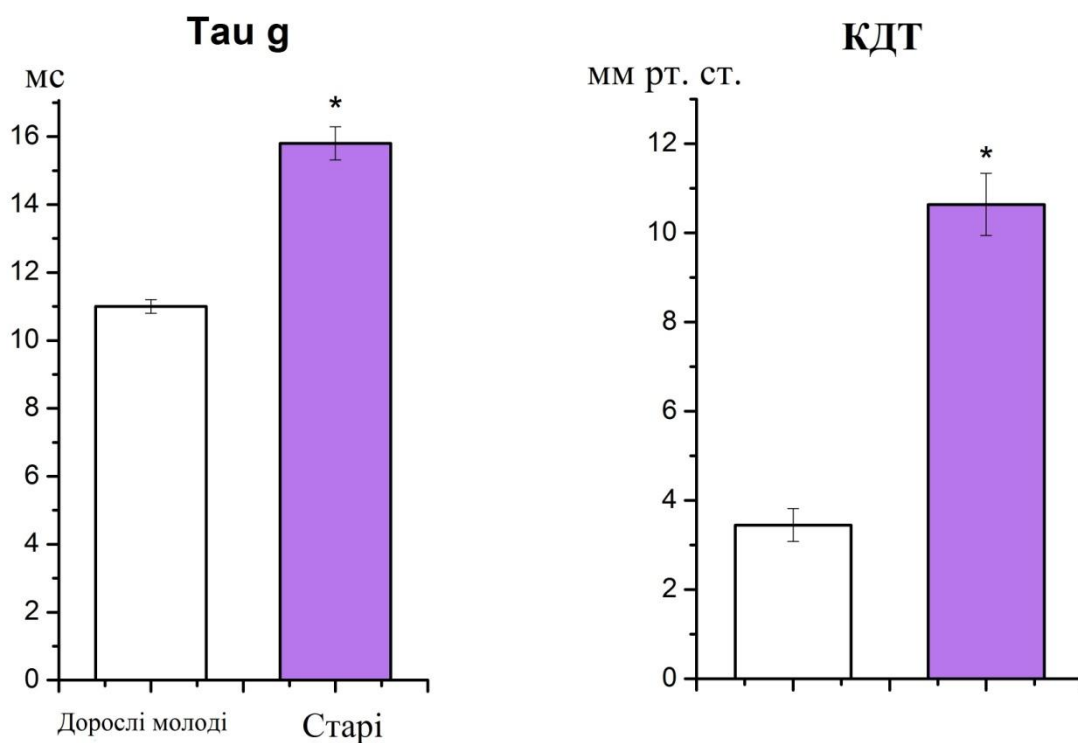


Рис. 3. 12. Показники константи активного розслаблення (Tau g) і кінцево-діастолічного тиску (КДТ) лівого шлуночка у дорослих молодих і старих щурів. \* $P < 0,05$  відносно показників у дорослих молодих щурів.

Таким чином, у старих щурів серце працювало менш ефективно з більшим споживанням кисню (на 70%). Це може бути пов'язано з порушенням



функціонування дихального ланцюга мітохондрій, і посиленням утворення АФК. Так, у раніше проведених дослідженнях було виявлено мітохондріальну дисфункцію у старих щурів, яка проявлялась у зменшенні величини мембранного потенціалу мітохондрій, що негативно впливає на синтез АТФ, зменшенні порогу відкривання МП при старінні і збільшенні чутливості МП до природного індуктора  $\text{Ca}^{2+}$  [315]. А це сприяє надлишковій генерації АФК й АФК, в результаті чого розвивається глибоке порушення метаболізму клітин, фізико-хімічних і функціональних властивостей їх мембран. Зокрема, погіршується ефективність окисного фосфорилування та здатність синтезу АТФ мітохондріями [316, 317]. А зменшення його вмісту сприяє розвитку виявленої нами діастолічної дисфункції серця старих щурів і зниженню релаксації та розтяжності міокарда, викликає обмеження функціональних резервів і адаптаційних можливостей серця.

### **3.3.2. Вплив донора NaHS на кардіогемодинаміку у старих тварин.**

Відомо, що сірководень може впливати на показники кардіогемодинаміки у дорослих тварин [318]. Проте залишається недослідженим, як сірководень впливає на показники кардіогемодинаміки при старінні. Нами встановлено, що у старих щурів були відмінності показників кардіогемодинаміки від дорослих молодих щурів, зокрема мало місце порушення діастолічної функції і зниження ефективності роботи серця. Тому становив інтерес вивчення дії сірководню на показники кардіогемодинаміки у старих щурів.

Виявлено, що під дією NaHS покращувалось розслаблення ЛШ у старих щурів. Так,  $dP/dt_{\min}$  достовірно збільшувалось на 20% і становило  $(-6534 \pm 348)$  мм рт. ст./с, порівняно з  $(-5466 \pm 391)$  мм рт. ст./с у старих до введення NaHS, а  $\tau_{\text{relax}}$  зменшувалось на 13% і становило  $(13,76 \pm 0,41)$ , порівняно з  $(15,77 \pm 0,49)$  мс у старих до введення NaHS ( $P < 0,05$ ;  $n=7$ ) (рис. 3. 13.). Одночасно, введення NaHS не викликало зміни показників насосної функції, скоротливої активності серця і об'єму споживання кисню.

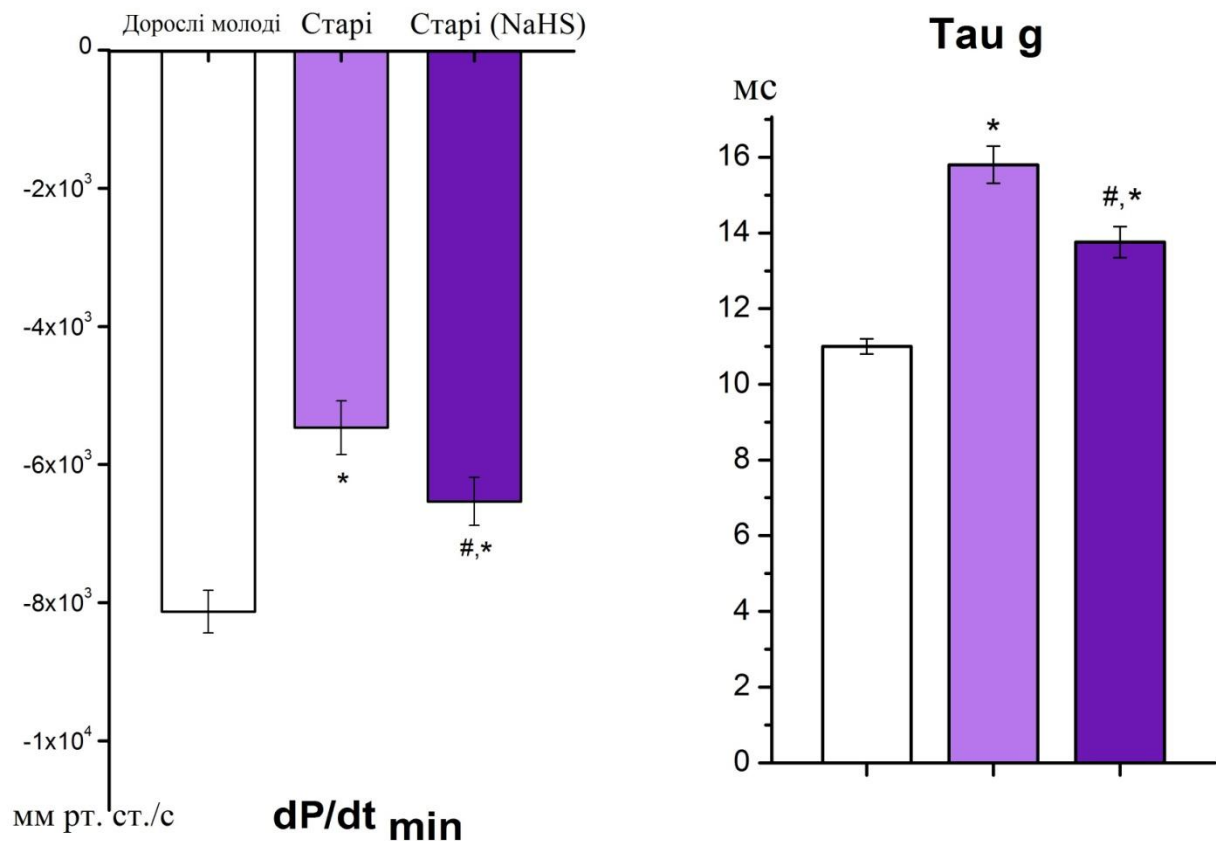


Рис. 3. 13. Вплив NaHS на показники максимальної швидкості зниження тиску ( $dP/dt_{min}$ ) і константи активного розслаблення ( $\tau_g$ ) у старих щурів. \* $P < 0,05$  відносно показників у дорослих молодих щурів, # $P < 0,05$  відносно показників у старих щурів.

**3.3.3. Вплив пропарглігліцину (ПГ) на кардіогемодинаміку у старих тварин.** На попередніх етапах дослідження ми встановили, що ПГ збільшує ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти старих щурів. В основі даного ефекту знаходиться його здатність пригнічувати оксидативний/нітрозативний стрес, відновлювати спряжений стан cNOS, пригнічувати деградацію NO. Наслідком цього може бути збільшення біодоступності NO. З іншого боку, з літературних даних відомо, що NO покращує діастолічну функцію серця, індукуючи більш ранній початок релаксації ЛШ, зниження максимального, кінцево-сistolічного тиску, максимального і КДТ, а також, збільшення кінцево-діастолічного об'єму [319]. Даний ефект обумовлений активацією цГМФ-залежної протеїнкінази із наступним фосфорилуванням тропоніну I, наслідком чого є

зменшення чутливості міофіламентів серцевого м'язу до  $\text{Ca}^{2+}$ , при незмінній внутрішньоклітинній концентрації останнього [320].

На даному етапі дослідження ми вирішили з'ясувати вплив ПГ на кардіогемодинаміку, зокрема, показники діастолічної функції серця у старих щурів.

При аналізі показників виявлено, у старих щурів введення ПГ не супроводжувалося зміною насосної функції серця (кінцево-сistolічного об'єму, кінцево-діастолічного об'єму, ударного об'єму, хвилинного об'єму крові). ПГ мав потужний вплив на артеріальну жорсткість, яка містить в собі такі основні елементи судинного навантаження, як загальний периферичний опір, податливість, імпеданс. У старих щурів після введення ПГ цей показник зменшувався в 1,5 раза, що свідчить про зниження постнавантаження на серце. Відомо, що артеріальна жорсткість залежить від тонуусу гладеньком'язових клітин, основним регулятором якого є NO і від співвідношення волокон еластину і колагену в стінці судин.

Виявлено, що під дією ПГ покращувалось розслаблення ЛШ у старих щурів. КДЖ міокарду зменшилась на 52% і становила  $0,11 \pm 0,035$  мм рт.ст./мкл, порівняно з  $0,23 \pm 0,05$  мм рт.ст./мкл у старих до введення ПГ, а КДТ знизився на 19% і становив  $8,6 \pm 0,7$  мм рт.ст., порівняно з  $10,64 \pm 0,7$  мм рт.ст. у старих тварин до введення ПГ ( $P < 0,05$ ;  $n=7$ ) (рис 3. 14, 3. 15.).

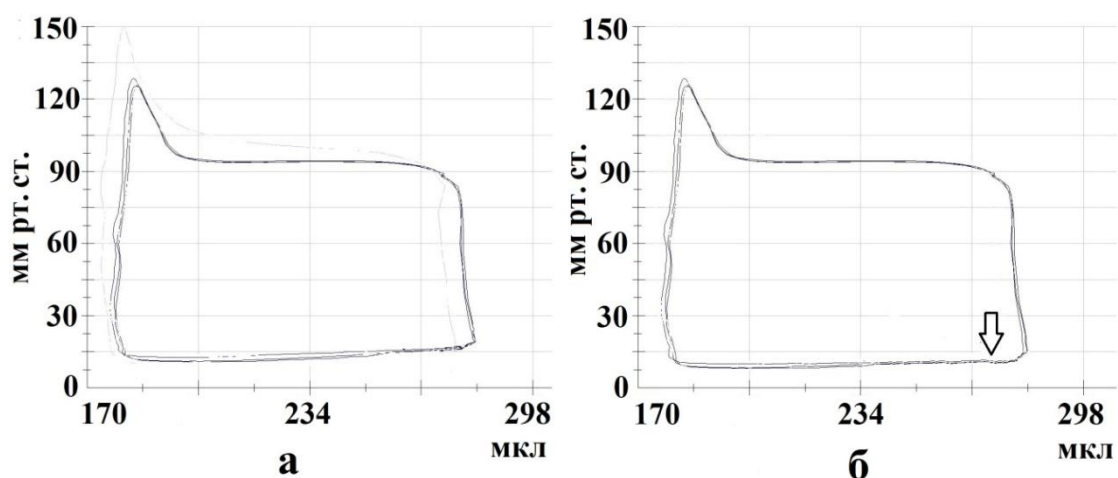


Рис. 3.14. Нативні криві співвідношення тиск - об'єм у старих щурів до (а) і після (б) введення ПГ. Стрілкою показано зниження кінцево-діастолічного тиску.

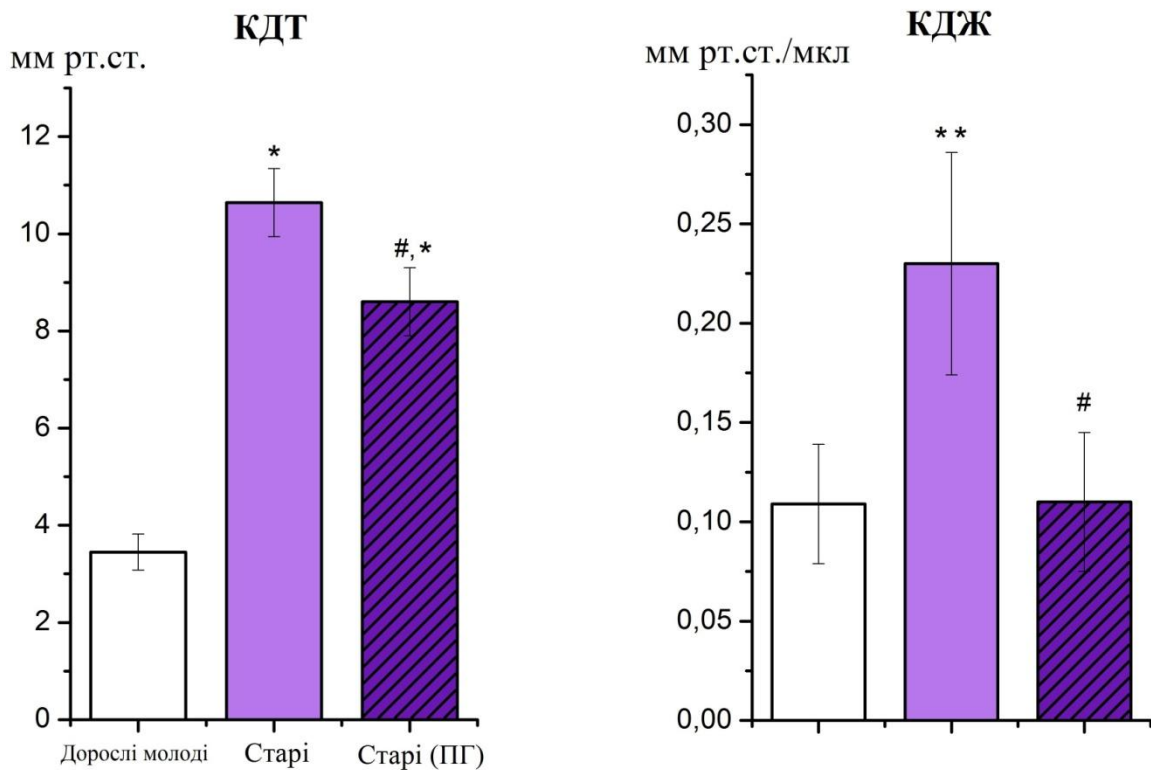


Рис. 3.15. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на показники кінцево-діастолічного тиску (КДТ) і кінцево-діастолічної жорсткості (КДЖ) у старих щурів. \* $P < 0,05$  відносно показників у дорослих молодих щурів, # $P < 0,05$  відносно показників у старих щурів.

### 3.4. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СІРКОВОДНЮ НА ПОКАЗНИКИ ОКСИДАТИВНОГО/НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСУ ТА КОНСТИТУТИВНОГО СИНТЕЗУ NO В ПРЕПАРАТАХ МІТОХОНДРІЙ І ГОМОГЕНАТІ ТКАНИН СЕРЦЯ СТАРИХ ЩУРІВ

Дві важливі причини діастолічної дисфункції – порушення енергозалежного процесу транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  із міоплазми в саркоплазматичний ретикулум та позаклітинне середовище та збільшення чутливості міофіламентів до  $\text{Ca}^{2+}$  через зниження біодоступності NO – можуть бути обумовлені окисним стресом. Так, надмірна продукція АФК і АФА, з одного боку, спричиняє розвиток мітохондріальної дисфункції, погіршуючи ефективність окисного

фосфорилювання і викликаючи зниження синтезу АТФ, наслідком чого є погіршення протікання енергозалежних процесів в клітині, а з іншого боку, викликає порушення спряження cNOS і підвищення деградації NO, що призводить до зниження біодоступності останнього. Результати попереднього етапу дослідження продемонстрували, що як донор так і блокатор CSE-залежного шляху синтезу  $H_2S$  покращують порушену у старих тварин діастолічну функцію серця. Для встановлення конкретних механізмів впливу NaHS і ПГ ми провели серію біохімічних дослідів, метою яких було визначити вплив даних речовин на показники оксидативного/нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів.

**3.4.1. Дослідження розвитку оксидативного стресу в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів.** Як видно з табл. 3. 7, в тканинах серця старих щурів розвивається оксидативний стрес. Так, швидкість генерації  $O_2^{\bullet-}$  в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів перевищувала контрольні значення (у дорослих молодих тварин) в 3,9 і 3,7 рази, відповідно. Дисмутація нестабільного радикала  $O_2^{\bullet-}$  в стабільний  $H_2O_2$  перевищувала контрольні значення в 2,1 і 1,4 рази. Пули найбільш активного радикалу кисню  $\bullet OH$ , який утворюється із  $H_2O_2$  в реакції Фентона, були збільшені в 2,7 і 4,1 рази.

Таблиця 3. 7.

**Швидкість генерації  $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$ -радикалу і пули стабільного  $H_2O_2$  в препаратах мітохондрій (MX) і гомогенаті тканин серця старих щурів за дії NaHS і пропаргілгліцину (ПГ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Показник	Швидкість генерації $O_2^{\bullet-}$ ум.од.		Пули $H_2O_2$ пмоль/мг білка		Швидкість генерації $\bullet OH$ , ум. од.	
	MX	гомогенат	MX	гомогенат	MX	гомогенат
Дорослі молоді	4,46±0,41	3,49±0,59	12,2±1,6	2,79±0,35	4,2±0,35	0,87±0,09
Старі	17,54±4,44*	12,98±2,02*	25,71±3,41*	3,96±0,36	11,34±1,97*	3,54±0,52*

Старі+NaHS	2,6±0,34 <sup>#</sup>	1,73±0,23 <sup>#,*</sup>	6,26±0,51 <sup>#,*</sup>	1,15±0,19 <sup>#,*</sup>	6,57±0,85 <sup>#</sup>	0,83±0,04 <sup>#</sup>
Старі+ПГ	3,76±0,24 <sup>#</sup>	4,87±0,69 <sup>#</sup>	14,72±1,09 <sup>#</sup>	2,1±0,98	5,96±0,35 <sup>#</sup>	1,78±0,05 <sup>#,*</sup>

Одночасно із оксидативним стресом в тканинах серця старих щурів зростала інтенсивність ПОЛ. Про це свідчило підвищення в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця пулів ДК у 9,2 і 8,4 разів, відповідно, і пулів МДА – у 2,7 і 7,3 рази (табл. 3. 8). Вміст сечової кислоти, маркера активності ксантиноксидазного шляху продукції  $O_2^{\bullet-}$ , інтенсивності розпаду АТФ і гіпоксії, перевищував контрольні значення в 11,9 і 2,6 разів. Пули арахідонової кислоти, субстрату цикло- і ліпооксигеназного шляхів генерації  $O_2^{\bullet-}$  були знижені в 5,4 рази в препаратах мітохондрій і підвищені в 2,2 рази в гомогенаті тканин серця (табл. 3. 9). Натомість, вміст ТхВ2 та LTC4, продуктів і маркерів цикло- і ліпооксигеназного шляхів, відповідно, не відрізнявся від контрольних значень (табл. 3. 10).

Таблиця 3. 8.

**Пули маркерів перекисного окиснення ліпідів в препаратах мітохондрій (МХ) і гомогенаті тканин серця старих щурів за дії NaHS і пропаргілгліцину (ПГ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Показник	Дієнові кон'югати, <i>нг/мг білка</i>		Малоновий діальдегід, <i>нмоль/мг білка</i>	
	МХ	ГОМОГЕНАТ	МХ	ГОМОГЕНАТ
Дорослі молоді	3,6±0,23	3,4±0,47	2,06±0,38	3,75±0,43
Старі	32,98±2,5*	28,52±2,28*	5,61±0,48*	27,23±1,86*
Старі+NaHS	7,18±1,29 <sup>#,*</sup>	6,82±0,71 <sup>#,*</sup>	1,3±0,16 <sup>#</sup>	7,4±1,01 <sup>#,*</sup>
Старі+ПГ	17,2±1,29 <sup>#</sup>	15,69±0,92*	2,92±0,31 <sup>#</sup>	17,24±1,79*

Таблиця 3. 9.

**Вміст арахідонової кислоти (субстрату маркерів ферментативного утворення  $O_2^{\cdot-}$ ) в препаратах мітохондрій (МХ) і гомогенаті тканин серця старих щурів за дії NaHS і пропаргілгліцину (ПГ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Показник	Арахідонова кислота, нмоль/мг білка	
	МХ	гомогенат
Дорослі молоді	20,6 $\pm$ 3,8	5,43 $\pm$ 0,58
Старі	7,03 $\pm$ 1,15*	11,85 $\pm$ 1,55*
Старі+NaHS	21,9 $\pm$ 2,49 <sup>#</sup>	1,62 $\pm$ 0,09 <sup>#,*</sup>
Старі+ПГ	12,6 $\pm$ 1,66	3,84 $\pm$ 0,24 <sup>#</sup>

Таблиця 3. 10.

**Зміни пулів маркерів ферментативного утворення  $O_2^{\cdot-}$  в препаратах мітохондрій (МХ) і гомогенаті тканин серця старих щурів за дії NaHS і пропаргілгліцину (ПГ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Показник	Тромбоксан В2, нмоль/мг білка		Лейкотрієн С4, нмоль/мг білка		Сечова кислота, нмоль/мг білка	
	МХ	гомогенат	МХ	гомогенат	МХ	гомогенат
Дорослі молоді	2,37 $\pm$ 0,16	2,25 $\pm$ 0,2	1,26 $\pm$ 0,12	0,9 $\pm$ 0,02	1,19 $\pm$ 0,26	1,98 $\pm$ 0,38
Старі	2,62 $\pm$ 0,33	2,4 $\pm$ 0,46	1,35 $\pm$ 0,15	0,98 $\pm$ 0,16	14,18 $\pm$ 1,27*	5,12 $\pm$ 0,5*
Старі+NaHS	0,41 $\pm$ 0,02 <sup>#,*</sup>	0,6 $\pm$ 0,02 <sup>#</sup>	0,3 $\pm$ 0,05 <sup>#,*</sup>	0,29 $\pm$ 0,02 <sup>#</sup>	4,05 $\pm$ 0,47 <sup>#,*</sup>	1,57 $\pm$ 0,27 <sup>#</sup>
Старі+ПГ	1,28 $\pm$ 0,13 <sup>#</sup>	1,5 $\pm$ 0,11	0,77 $\pm$ 0,05 <sup>#</sup>	0,68 $\pm$ 0,05	9,19 $\pm$ 0,47	2,85 $\pm$ 0,27

Отримані результати свідчать про те, що як в препаратах мітохондрій так і в гомогенаті тканин серця старих щурів мав місце оксидативний стрес і ПОЛ.

**3.4.2. Дослідження розвитку нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в препаратах мітохондрій та гомогенаті тканин серця старих щурів.** Одночасно з розвитком оксидативного стресу і ПОЛ в тканинах серця

старих щурів мав місце і нітрозативний стрес. На це вказував посилений надлишковий *de novo* синтез NO – активність iNOS була підвищена в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця в 2,4 і 8,9 рази, відповідно та його реутилізаційний синтез – активність нітратредуктази була підвищена у 3,2 і 4,9 рази (табл. 3. 11). Пули  $\text{NO}_3^-$ , продукту розпаду пероксинітриту, утвореного при взаємодії NO і  $\text{O}_2^{\bullet-}$  були збільшені в 6,4 рази в гомогенаті тканин серця (табл. 3. 12).

Одночасно із розвитком нітрозативного стресу в тканинах серця старих щурів знижувався конститутивний *de novo* синтез NO і зменшувався вміст його вазорелаксуючої фракції. Про це свідчило зниження активності cNOS (в 2,1 і 2 рази) і зменшення пулів  $\text{NO}_2^-$  (в 3,1 і 1,6 разів), окисного метаболіту конститутивного синтезу NO (табл. 3. 11, 3. 12). Причиною зниження активності cNOS і додатковим джерелом утворення  $\text{O}_2^{\bullet-}$  міг бути неспряжений стан cNOS (синтез ним  $\text{O}_2^{\bullet-}$  замість NO), на що вказувало зниження розрахованого нами індексу спряження у 8 і 7,5 рази (табл. 3. 13).

Таблиця 3. 11.

**Активність ферментів синтезу NO в препаратах мітохондрій (MX) і гомогенаті тканин серця старих щурів за дії NaHS і пропаргілгліцину (ПГ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Показник	cNOS, <i>пмоль/хв. мг білка</i>		iNOS, <i>пмоль/хв. мг білка</i>		Нітратредуктаза, <i>пмоль/хв. мг білка</i>	
	MX	гомогенат	MX	гомогенат	MX	гомогенат
Дорослі молоді	3,64±0,27	6,99±1,11	1,5±0,06	1,78±0,26	0,86±0,05	0,49±0,05
Старі	1,71±0,12*	3,37±0,45*	3,66±0,62*	15,88±1,18*	2,77±0,45*	2,42±0,32*
Старі+NaHS	12,53±2,81 <sup>#,*</sup>	8,56±1,32 <sup>#</sup>	1,39±0,25	3,84±0,68 <sup>#,*</sup>	0,51±0,03 <sup>#</sup>	0,63±0,04 <sup>#,*</sup>
Старі+ПГ	3,68±0,94 <sup>#</sup>	6,87±1,01 <sup>#</sup>	3,45±0,25*	7,48±0,18 <sup>#,*</sup>	1,16±0,03 <sup>#</sup>	1,26±0,07 <sup>#,*</sup>



Таблиця 3. 12.

**Пули стабільних метаболітів NO, низькомолекулярних нітрозотіолів в препаратах мітохондрій (MX) і гомогенаті тканин серця старих щурів за дії NaHS і пропаргілгліцину (ПГ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Показник	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , пмоль/мг білка		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , нмоль/мг білка		Низькомолекулярні нітрозотіолі, пмоль/мг білка	
	MX	гомогенат	MX	гомогенат	MX	гомогенат
Дорослі молоді	488,2 ±60,3	354,4 ±22,6	76,3 ±4,1	11,72 ±0,64	735,24 ±84,9	178,52 ±16,36
Старі	159,33* ±30,68	214,88 ±30,6	83,41 ±11,72	75,45* ±8,28	375,66* ±26,03	67,84* ±7,12
Старі+NaHS	655,6 ±97,13 <sup>#</sup>	825,57 ±68,61 <sup>#,*</sup>	17,8 ±1,09 <sup>#,*</sup>	16,78 ±2,9 <sup>#</sup>	1305,51 ±144,17 <sup>#,*</sup>	128,12 ±9,46 <sup>#,*</sup>
Старі+ПГ	361,7 ±29,48 <sup>#</sup>	476,17 ±45,86 <sup>#</sup>	40,8 ±5,46 <sup>#</sup>	36,98 ±1,61 <sup>#,*</sup>	753,16 ±88,35 <sup>#</sup>	72,73 ±3,64*

Таблиця 3. 13.

**Величина індексу спряження cNOS і пов'язані з ним показники в препаратах мітохондрій (MX) і гомогенаті тканин серця старих щурів за дії NaHS і пропаргілгліцину (ПГ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Показник	cNOS, пмоль/хв. мг білка		Швидкість генерації O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> , ум.од.		Індекс спряження cNOS, ум. од.	
	MX	гомогенат	MX	гомогенат	MX	гомогенат
Дорослі молоді	3,64±0,27	6,99±1,11	4,46±0,41	3,49±0,59	0,8±0,08	1,94±0,43
Старі	1,71±0,12*	3,37±0,45*	17,54±4,44*	12,98±2,02*	0,1±0,02*	0,26±0,05*
Старі+NaHS	12,53±2,81 <sup>#,*</sup>	8,56±1,32 <sup>#</sup>	2,6±0,34*	1,73±0,23 <sup>#,*</sup>	4,85±0,99 <sup>#,*</sup>	4,94±0,34 <sup>#,*</sup>
Старі+ПГ	3,68±0,94 <sup>#</sup>	6,87±1,01 <sup>#</sup>	3,76±0,24 <sup>#</sup>	4,87±0,69 <sup>#</sup>	0,97±0,19 <sup>#,*</sup>	1,39±0,4 <sup>#,*</sup>

Активність аргінази, від якої залежить біодоступність L-аргініну, була підвищена (у 4,2 і 4 рази) (табл. 3. 14). За умов зниження конститутивного *de novo* синтезу вазодилататорного NO ферментами cNOS встановлене зменшення пулів НМНТ (у 2 і 2,6 рази) є компенсаторною реакцією (табл. 3. 12).

Таблиця 3. 14.

**Активність аргінази в препаратах мітохондрій (МХ) і гомогенаті тканин серця старих щурів за дії NaHS і пропаргілглїцину (ПГ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Показник	Аргіназа, нмоль/хв. мг білка	
	МХ	гомогенат
Дорослі молоді	2,11 $\pm$ 0,17	1,07 $\pm$ 0,1
Старі	8,78 $\pm$ 1,05*	4,23 $\pm$ 0,31*
Старі+NaHS	2,23 $\pm$ 0,36 <sup>#,*</sup>	0,54 $\pm$ 0,05 <sup>#,*</sup>
Старі+ПГ	4,84 $\pm$ 0,36 <sup>#</sup>	2,4 $\pm$ 0,13 <sup>#,*</sup>

Окремо, слід відмітити зниження в 1,9 разів (як в препаратах мітохондрій так і в гомогенаті тканин серця) ендогенних пулів H<sub>2</sub>S, регулятора синтезу NO і потужного кардіо- і васкулопротектора (табл. 3. 15). Це супроводжувалось різноспрямованою зміною активності ферментів синтезу H<sub>2</sub>S. Так, активність CSE була підвищена в 3,6 і 3,5 рази, натомість, 3MST – знижена в 3,7 і 2,2 рази. Отже можна зробити висновок, що саме 3MST є основним ферментом синтезу H<sub>2</sub>S в тканинах серця, а пригнічена його активність спричиняє зменшення вмісту газу в досліджуваних тканинах.

Таблиця 3. 15.

**Пули H<sub>2</sub>S в препаратах мітохондрій (МХ) і гомогенаті тканин серця старих щурів за дії NaHS і пропаргілглїцину (ПГ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Показник	H <sub>2</sub> S, нмоль/мг білка	
	МХ	гомогенат
Дорослі молоді	4,58 $\pm$ 0,3	22,97 $\pm$ 2,13
Старі	2,38 $\pm$ 0,45*	12,1 $\pm$ 1,47*

Старі+NaHS	9,69±1,53 <sup>#,*</sup>	39,49±2,05 <sup>#</sup>
Старі+ПГ	5,31±0,53 <sup>#</sup>	22,87±1,31 <sup>#</sup>

Таким чином, як в препаратах мітохондрій, так і в гомогенаті тканин серця старих щурів знижувався рівень  $H_2S$ , розвивався оксидативний/нітрозативний стрес і неспряження cNOS. Наслідком цього було зниження конститутивного синтезу дилататорного NO і порушення діастолічної функції.

**3.4.3. Визначення впливу донора сірководню, NaHS на показники оксидативного стресу в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів.** Введення *in vivo* NaHS (56,1 мг/кг) старим тваринам значно збільшувало (у 4,1 рази) ендогенні пули  $H_2S$  в препаратах мітохондрій і повністю їх відновлювало в гомогенаті тканин серця. При цьому активність CSE зменшувалась у 4,1 і 1,6, а активність 3MST – у 2,4 і 2,2 рази (рис. 3. 16.).

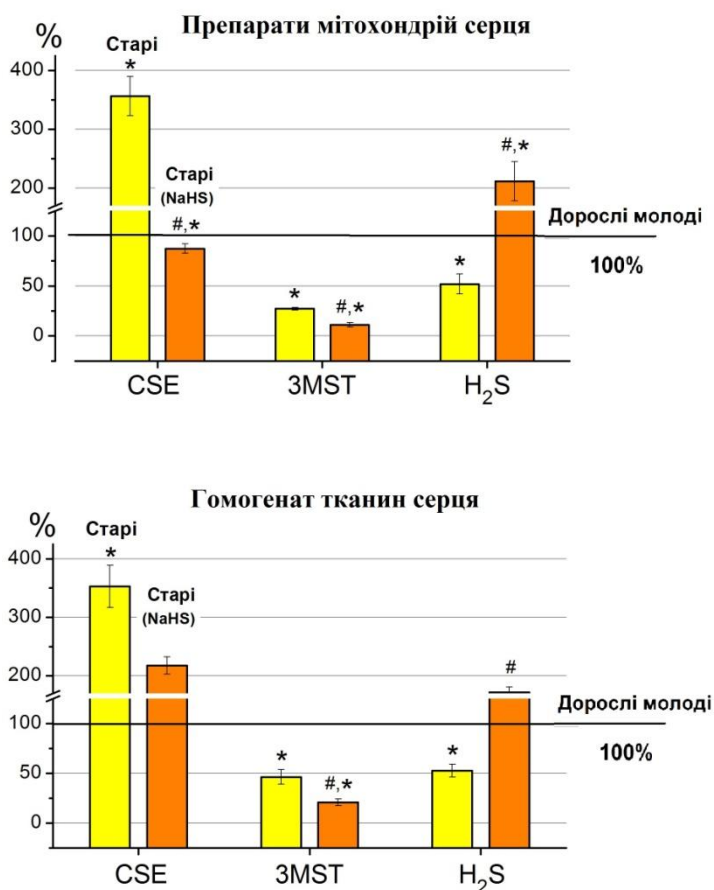


Рис. 3. 16. Вплив NaHS на нормовані величини (%) пулів  $H_2S$  і активність ферментів синтезу сірководню: цистатіонін-γ-ліази (CSE) та 3-меркаптопіруват-сульфуртрансфери (3MST), в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів. \* $P < 0,05$  відносно дорослих молодих (контроль), рівень яких прийнято за 100%, # $P < 0,05$  відносно старих щурів.

Це супроводжувалось зниженням в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця швидкості утворення  $O_2^{\bullet-}$  у 6,7 і 7,5 рази, відповідно, пулів  $H_2O_2$  у 4,1 і 3,4 рази і швидкості продукції  $\cdot OH$ -радикалу в 1,7 і 4,3 рази (рис. 3. 17).

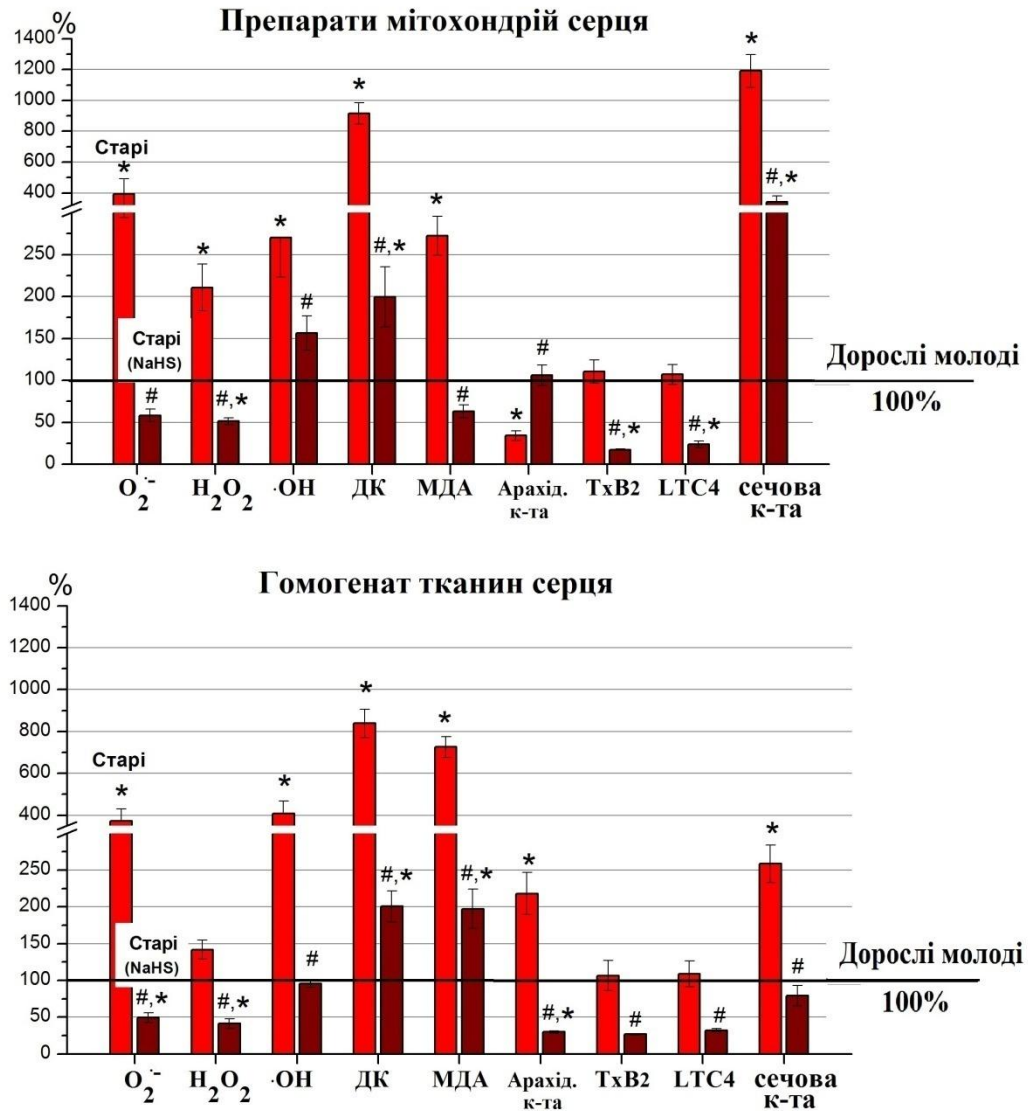


Рис. 3. 17. Вплив NaHS на нормовані величини (%) показників оксидативного стресу і ПОЛ в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів: швидкість утворення  $O_2^{\bullet-}$ , вміст  $H_2O_2$ , швидкість утворення  $\cdot OH$ -радикалу, вміст дієнових кон'югатів (ДК), малонового діальдегіду (МДА) і арахідонової кислоти, пули тромбоксану В2 (ТхВ2), лейкотрієну С4 (LTC4) та сечової кислоти. \* $P < 0,05$  відносно показників у дорослих молодих (контроль), рівень яких прийнято за 100%, # $P < 0,05$  відносно показників у старих щурів.

Причиною зниження швидкості утворення  $O_2^{\bullet-}$  могло бути зменшення активності ксантиноксидазного (пули сечової кислоти зменшились у 3,5 і 3,3 рази), циклооксигеназного (пули  $TxB_2$  зменшились в 6,4 і 4 рази) і ліпоксигеназного (пули  $LTC_4$  зменшились в 4,5 і 3,4 рази) шляхів генерації радикалу. Зниження вмісту  $TxB_2$  і  $LTC_4$  в гомогенаті тканин серця можливо було зумовлено зменшенням (в 7,3 рази) вмісту арахідонової кислоти, субстрату циклооксигеназного і ліпооксигеназного метаболічних шляхів. Зниження швидкості утворення  $\cdot OH$ -радикалу (ініціатора ПОЛ) супроводжувалось зменшенням пулів ДК (первинного продукту ПОЛ) в 4,6 і 4,2 рази і МДА (вторинного продукту ПОЛ) у 4,3 і 3,7 рази (рис. 3. 17)

Таким чином донор  $NaHS$  збільшував пули  $H_2S$  в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів, що супроводжувалось пригніченням оксидативного стресу і ПОЛ.

**3.4.4. Дослідження впливу  $NaHS$  на показники нітрозативного стресу і конститутивного синтезу  $NO$  в препаратах мітохондрій та гомогенаті тканин серця старих щурів.** Введення  $NaHS$  старим тваринам супроводжувалось також суттєвим пригніченням нітрозативного стресу в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця (рис. 3. 18.), через зменшення надлишкового утворення  $NO$  і його високотоксичного похідного  $ONOO^-$ . Так активність  $iNOS$  знижувалась у 2,6 і 4,1 рази, нітратредуктази – у 5,4 і 3,8 рази, а пули  $NO_3^-$  – у 4,7 і 4,5 рази.

В результаті пригнічення оксидативного/нітрозативного стресу відбувалось відновлення спряження  $sNOS$  і посилення конститутивного синтезу  $NO$ . Про це свідчило зростання розрахованого нами індексу спряження в 48,5 і 19 разів (рис. 3. 19.), підвищення активності  $sNOS$  у 7,3 і 2,5 рази і збільшення пулів  $NO_2^-$  у 4,1 і 3,8 рази (рис. 3. 18.). Можна припустити, що причиною відновлення спряженого стану  $sNOS$  стало не лише пригнічення оксидативного стресу, але й збільшення біодоступності  $L$ -аргініну, субстрату синтезу  $NO$ , в результаті зниження активності аргінази в 3,4 і 7,9 разів. Збільшення конститутивного

синтезу NO і вмісту його релаксуючої фракції супроводжувалось збільшенням НМНТ (у 3,5 і 1,9 разів) – його депонуючої фракції (рис. 3. 18.).

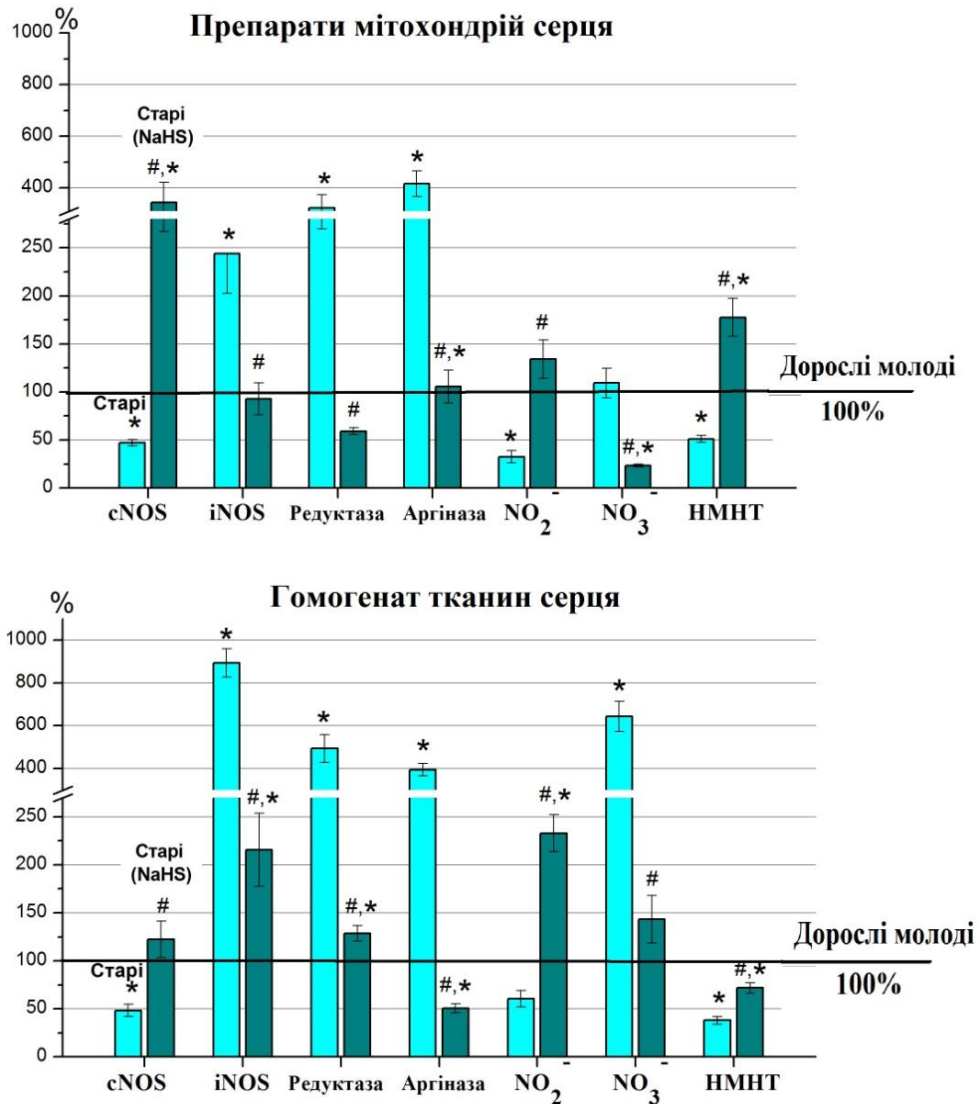


Рис. 3. 18. Вплив NaHS на нормовані величини (%) показників нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів: активність конститутивної (cNOS), індукцибельної NO-синтази (iNOS), нітратредуктази і аргінази, вміст NO<sub>2</sub><sup>-</sup> і NO<sub>3</sub><sup>-</sup> аніонів та низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ). \*P<0,05 відносно показників у дорослих молодих (контроль), рівень яких прийнято за 100%, #P<0,05 відносно показників у старих щурів.

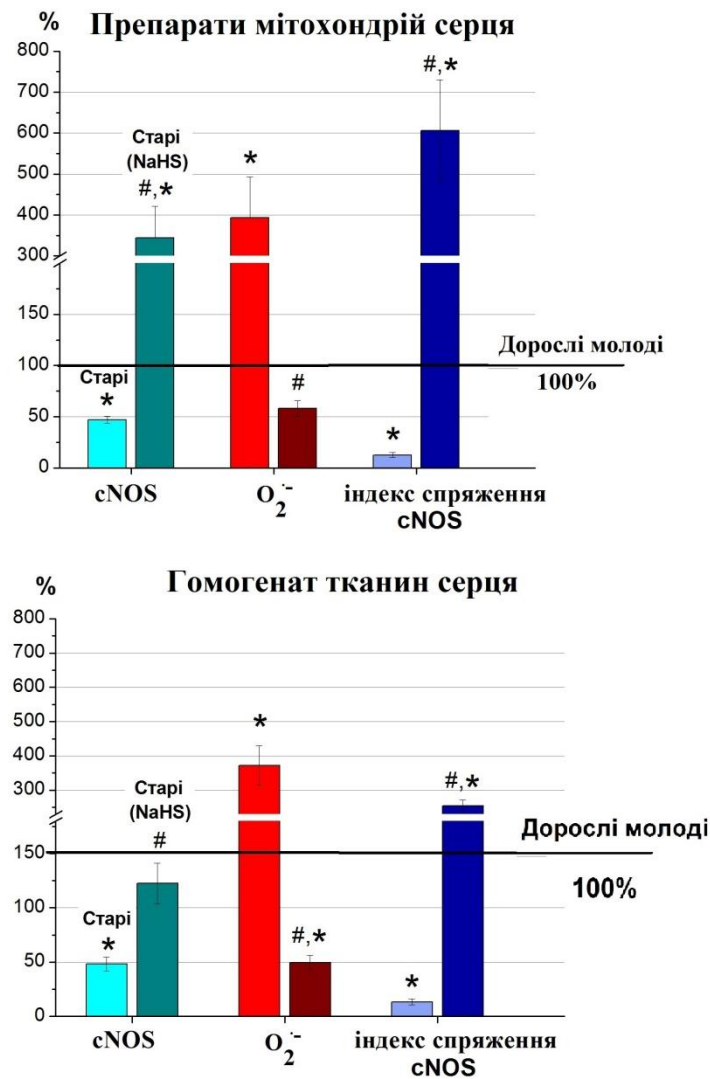


Рис. 3. 19. Вплив NaHS на нормовані величини (%) індексу спряження cNOS і пов'язані з ним показники в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів: активність конститутивної NO-синтази (cNOS), швидкість утворення O<sub>2</sub><sup>-</sup>. \*P<0,05 відносно показників у дорослих (контроль), рівень яких прийнято за 100%, #P<0,05 відносно показників у старих щурів.

Отримані результати свідчать про здатність сірководню пригнічувати нітрозативний стрес, одночасно, відновлювати спряжений стан cNOS і конститутивний синтез NO в досліджуваних тканинах серця старих щурів. Наслідком цього є покращення у них діастолічної функції серця.

**3.4.5. Визначення впливу пропаргілгліцину (ПГ) на показники оксидативного стресу в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів.** Введення ПГ старим щурам повністю відновлювало пули  $H_2S$  в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця. Це відбувалось внаслідок підвищення активності 3MST (у 2,4 і 2,5 рази). Активність CSE, специфічним блокатором якої є ПГ, знижувалась в 1,8 і 4,1 рази (рис. 3. 20.). Можна зробити висновок, що ПГ, інгібуючи CSE, компенсаторно збільшував активність другого ферменту, 3MST, наслідком чого стало відновлення пулів  $H_2S$  в досліджуваних тканинах серця старих щурів.

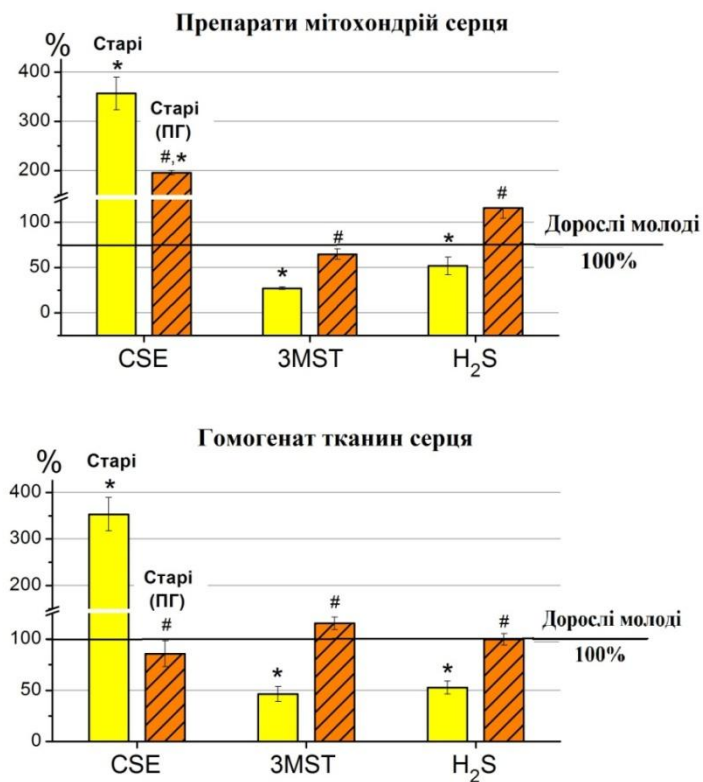


Рис. 3. 20. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на нормовані величини (%) пулів  $H_2S$  і активності ферментів синтезу сірководню – цистатіонін-γ-ліази (CSE) та 3-меркаптопіруват сульфуртрансферази (3MST), в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів. \*P<0,05 відносно дорослих молодих (контроль), рівень яких прийнято за 100%, #P<0,05 відносно старих щурів.

Відновлення вмісту  $H_2S$  супроводжувалось пригніченням оксидативного стресу (рис. 3. 21.). При цьому даний ефект був більш виражений в препаратах мітохондрій серця старих тварин. Так, в них знижувалась швидкість утворення  $O_2^{\bullet-}$  (в 4,7 рази),  $\bullet OH$ -радикалу (в 1,9 рази) і зменшувався вміст  $H_2O_2$  (в 1,7 рази). Однією з причин зниження швидкості генерації  $O_2^{\bullet-}$  було пригнічення



циклооксигеназного (пули ТхВ2 зменшувались у 2,1 рази) і ліпооксигеназного (пули LTC4 зменшувались в 1,8 рази) шляхів його утворення.

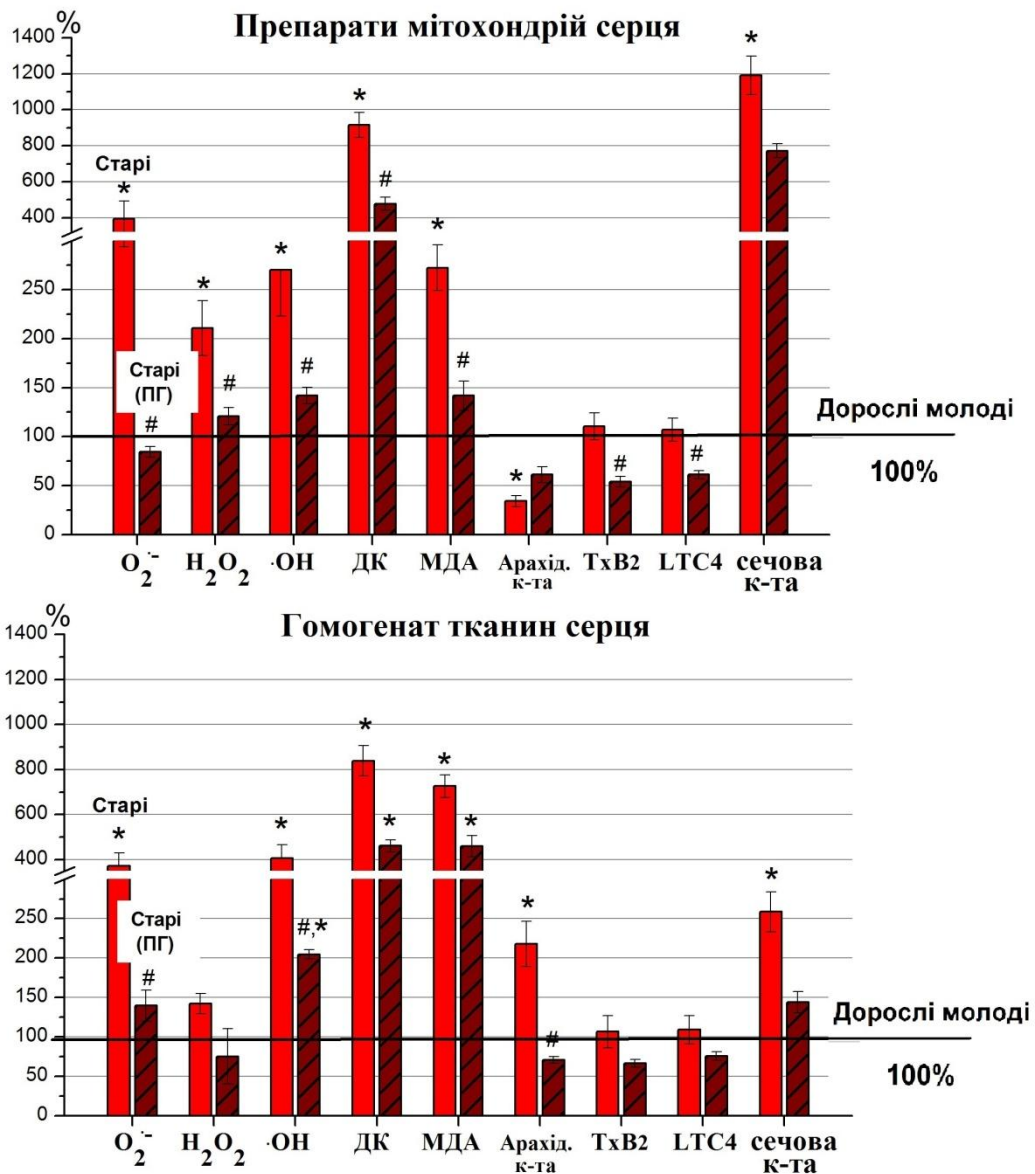


Рис. 3. 21. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на нормовані величини (%) показників оксидативного стресу і ПОЛ в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів: швидкість утворення  $O_2^{\cdot-}$ , вміст  $H_2O_2$ , швидкість утворення  $\cdot OH$ -радикалу, вміст дієнових кон'югатів (ДК), малонового діальдегіду (МДА), арахідонової кислоти, пули тромбоксану В2 (ТхВ2), лейкотрієну С4 (LTC4) і сечової кислоти. \* $P < 0,05$  відносно показників у дорослих молодих (контроль), рівень яких прийнято за 100%, # $P < 0,05$  відносно показників у старих щурів.

Зниження швидкості продукції  $\cdot\text{OH}$ -радикалу, ініціатора ПОЛ, супроводжувалось зменшення пулів ДК і МДА, маркерів інтенсивності ПОЛ, в 1,9 рази. В гомогенаті серця спостерігалось лише зниження швидкості утворення  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (в 2,7 рази),  $\cdot\text{OH}$ -радикалу (в 2,0 рази) і зменшення вмісту арахідонової кислоти (в 3,1 рази) (рис. 3. 21.).

Таким чином, введення старим тваринам ПГ викликало компенсаторне підвищення активності 3MST, наслідком чого було повне відновлення вмісту  $\text{H}_2\text{S}$  в досліджуваних тканинах серця. Це супроводжувалось пригніченням оксидативного стресу і ПОЛ. Останні ефекти були більше виражені в мітохондріях серця, місці локалізації 3MST.

**3.4.6. Дослідження впливу пропаргілгліцину (ПГ) на показники нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в препаратах мітохондрій та гомогенаті тканин серця старих щурів.** Введення *in vivo* ПГ старим тваринам супроводжувалось пригніченням нітрозативного стресу, через зниження надлишкового утворення NO і вмісту його високотоксичного похідного,  $\text{ONOO}^-$  (рис. 3. 22.). Так, активність iNOS знижувалась в гомогенаті тканин серця в 2,1 рази, а активність нітратредуктази – в 2,4 і 1,9 рази в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця, відповідно. Пули  $\text{NO}_3^-$  (продукт розпаду  $\text{ONOO}^-$ ) знижувались в 2 рази як в препаратах мітохондрій так і в гомогенаті тканин серця. Одночасно із пригніченням надлишкового утворення NO відбувалось повне відновлення спряженого стану cNOS і конститутивного синтезу NO (рис. 3. 22). Про це свідчило зростання індексу спряження в 9,7 і 5,3 рази (рис. 3. 23.), підвищення активності cNOS в 2,2 і 2 рази і збільшення вмісту  $\text{NO}_2^-$  в 2,3 і 2,2 рази. Причиною відновлення спряженого стану NO може могло бути пригнічення оксидативного стресу (див. вище) і зниження активності аргінази в 1,8 разів в досліджуваних тканинах серця. Посилення конститутивного синтезу NO супроводжувалось збільшенням в мітохондріях пулів НМНТ (в 2 рази).

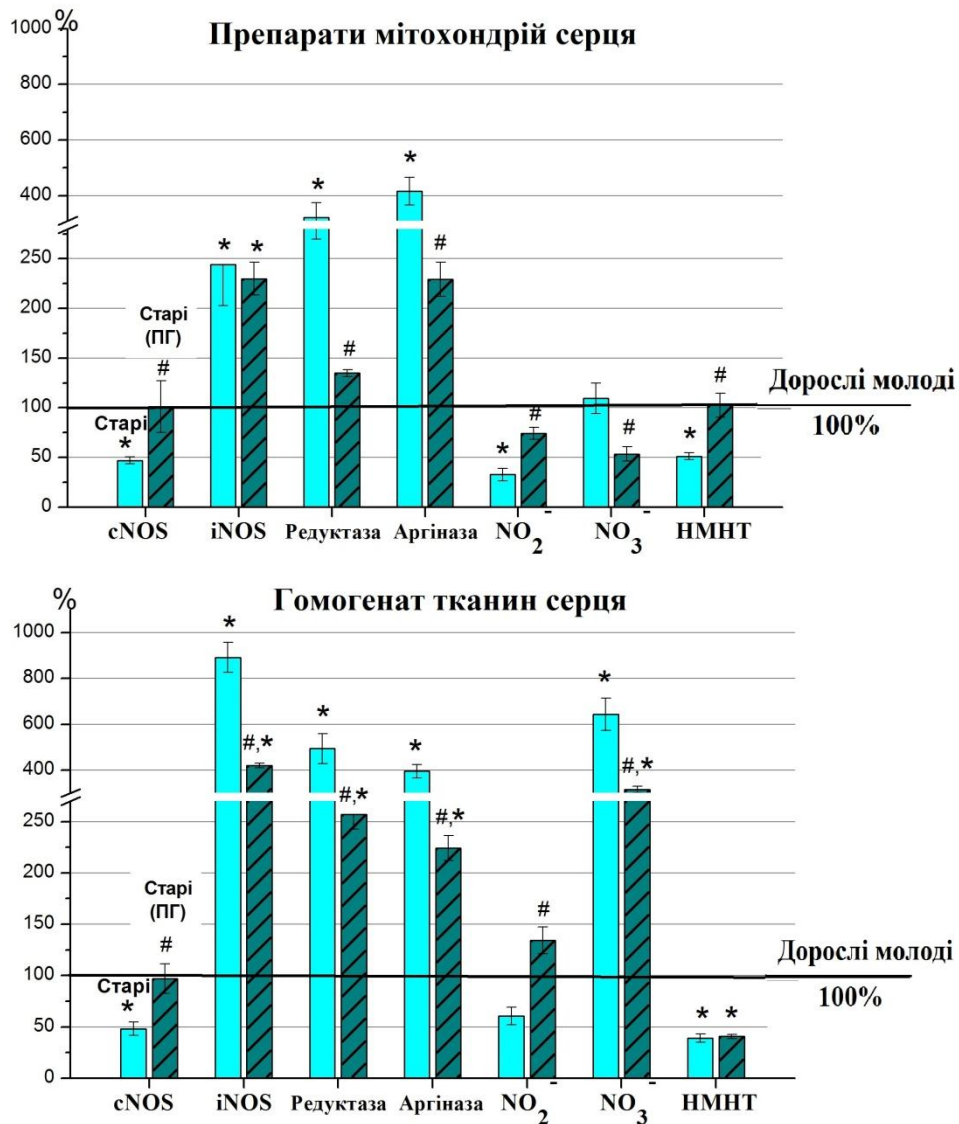


Рис. 3. 22. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на нормовані величини (%) показників нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів: активність конститутивної (cNOS), індукцибельної NO-синтази (iNOS), нітратредуктази і аргінази, вміст NO<sub>2</sub><sup>-</sup> і NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-аніонів та низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ). \*P<0,05 відносно показників у дорослих молодих (контроль), рівень яких прийнято за 100%, #P<0,05 відносно показників у старих щурів.

Таким чином, введення ПГ супроводжувалося збільшенням активності 3MST, що призводило до збільшення пулів H<sub>2</sub>S в досліджуваних тканинах серця старих щурів. Наслідком цього було пригнічення оксидативного/нітрозативного

стресу і відновлення спряження cNOS, що призводило до підвищення конститутивного синтезу NO.

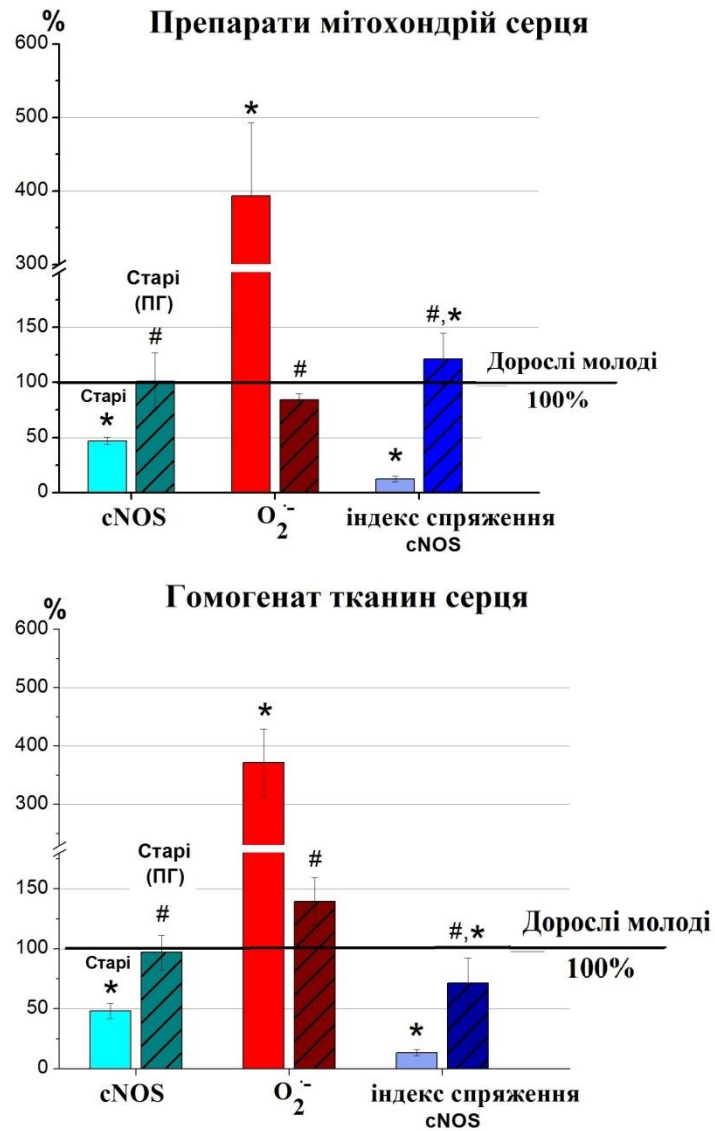


Рис. 3. 23. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на нормовані величини (%) індексу спряження cNOS і пов'язані з ним показники в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів: активність конститутивної NO-синтази (cNOS), швидкість утворення O<sub>2</sub><sup>-</sup>. \*P<0,05 відносно показників у дорослих молодих (контроль), рівень яких прийнято за 100%, #P<0,05 відносно показників у старих щурів.

## АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

При старінні відбувається прогресивне зниження функціональних резервів організму, що підвищує ризик розвитку серцево-судинних захворювань і ризик смерті від них. Дані різноманітних експериментальних і клінічних досліджень вказують на те, що найпершими функціональними змінами, що розвиваються при старінні, в серці є порушення діастолічної функції, а в судинах – зниження ендотелійзалежного розслаблення [114, 205, 255, 256, 259, 260]. Серед механізмів розвитку даних порушень основне місце може займати оксидативний стрес [114, 262].

Останнім часом все більше даних з'являється про кардіо- і васкулопротекторні властивості сірководню, які обумовлені, зокрема, його здатністю пригнічувати оксидативний стрес [52, 63]. Проте його участь у розвитку порушення функції серця і судин при старінні не з'ясовано.

Метою даного дослідження було вивчення ролі  $\text{H}_2\text{S}$  у розвитку порушення функцій серця і судин при старінні.

Нами виявлено суттєве зниження АХ-індукованого розслаблення м'язових препаратів аорти старих щурів. Дане розслаблення є ендотелійзалежним і обумовлене дією NO. Останній дифундує в ГМ, активує ГЦ і збільшує утворення цГМФ. В результаті активується цГМФ-залежна протеїнкіназа, яка зменшує вміст внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ , що викликає розслаблення ГМ [41]. Існують докази і про прямий релаксуючий вплив NO на ГМ, при якому відбувається ГЦ/цГМФ-незалежна активація  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази саркоплазматичного ретикулума і зменшення цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  [321]. Також показана здатність NO викликати релаксацію ГМ судин, не через зменшення внутрішньоклітинного вільного  $\text{Ca}^{2+}$ , а через зниження спорідненості до нього скоротливих білків [322].

Згідно з літературними даними головною причиною порушення ендотелійзалежного розслаблення при старінні є зменшення біодоступності основного ендогенного вазорелаксанта – NO – через зниження синтезу і, навпаки, підвищення його деградації зокрема, при оксидативному стресі, в результаті

збільшення утворення  $O_2^{\cdot-}$  [205]. Зниження утворення NO спостерігається через зменшення біодоступності субстрата, L-аргініна чи кофактора,  $BH_4$  для cNOS, наявності ендогенних інгібіторів cNOS, ADMA та пригнічені експресії/активності cNOS. Добре відомо, що з віком може підвищуватись активність аргінази [216], що розщеплює L-аргінін, зменшуючи біодоступність останнього, зменшується рівень  $BH_4$  [218], зокрема, через його окиснення до  $BH_2$  та збільшується вміст ADMA [220]. Одночасно зменшується активність cNOS, зокрема в результаті порушення Akt-залежного фосфорилування [227- 229]. При цьому експресія cNOS може бути підвищеною і свідчити про неспряження (uncoupling) cNOS – переключення активності cNOS на утворення  $O_2^{\cdot-}$  замість NO [230]. Одночасно зі зниженням біодоступності NO при старінні спостерігається збільшення утворення ендотеліальних вазоконстрикторів, зокрема ендотеліну і тромбоксану  $A_2$ , що є також одним із механізмів порушення ендотелійзалежного розслаблення [242, 248]. Таким чином зниження біодоступності NO – основного чинника порушення ендотелійзалежного розслаблення при старінні, може виникати через цілий ряд причин.

На наступному етапі дослідження ми вивчали показники кардіогемодинаміки у старих щурів і встановили розвиток у них діастолічної дисфункції, про що свідчило зниження максимальної швидкості розслаблення-, збільшення кінцево-діастолічної жорсткості-, константи активного розслаблення міокарду і кінцево-діастолічного тиску в ЛШ. Згідно з літературними даними основною причиною діастолічної дисфункції серця при старінні є порушення енергозалежного процесу транспорту  $Ca^{2+}$  із міоплазми в саркоплазматичний ретикулум та позаклітинне середовище за участі двох насосів – SERCA і  $Na^+-Ca^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани [265]. Зниження ефективності роботи даних насосів спостерігається в умовах пригнічення утворення в мітохондріях АТФ. Останнє має місце, зокрема, при окисному стресі [262, 268-270, 272]. Другою причиною діастолічної дисфункції при старінні може бути знижена біодоступність NO в тканинах серця і викликана цим підвищена чутливості міофіламентів до іонів  $Ca^{2+}$  [320].

На наступному етапі роботи, під час біохімічних досліджень, направлених на вивчення механізмів розвитку встановлених порушень функцій серця і судин, ми встановили, що ендотеліальна і діастолічна дисфункції супроводжувались зниженням вмісту сірководню в тканинах аорти, гомогенаті і препаратах мітохондрій тканин серця та пригніченням активності  $\text{H}_2\text{S}$ -синтезуючого ферменту – 3MST. Зниження вмісту  $\text{H}_2\text{S}$  поєднувалось із розвитком оксидативного стресу в досліджуваних тканинах. Про це свідчило збільшення швидкості генерації  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (ініціатора оксидативного стресу), пулів  $\text{H}_2\text{O}_2$ , швидкості генерації  $\cdot\text{OH}$ -радикалу (ініціатора ПОЛ). Відомо, що основними джерелами утворення  $\text{O}_2^{\bullet-}$  є комплекси I і III дихального ланцюга мітохондрій, НАДФН-оксидаза, ксантинооксидаза, неспряжена cNOS, цикло- і ліпооксигеназа [113, 114]. Ми показали, що при старінні посилена генерація  $\text{O}_2^{\bullet-}$  була обумовлена збільшенням активності ксантин-, ліпооксигеназного шляхів його утворення в тканинах аорти і ксантинооксидазного – в мітохондріях та гомогенаті серця. Крім цього, в усіх досліджуваних тканинах мало місце і неспряження cNOS, про що свідчило зниження запропонованого нами індексу спряження. Також у старих щурів спостерігалась підвищена інтенсивність ПОЛ, про що свідчило зростання пулів ДК і МДА, продуктів даного процесу. Згідно з літературними даними, МДА викликає карбонілювання білків, ліпідів, нуклеїнових кислот, що призводить до порушення функціонування клітинних органел, зокрема мітохондрій, наслідком чого є зниження продукції АТФ, зниження ефективності роботи SERCA і розвиток діастолічної дисфункції [261, 262, 267, 323].

Якщо про участь оксидативного стресу у процесі старіння і порушеннях функції серця і судин достатньо відомо, то про залучення нітрозативного стресу дані відсутні. Ми встановили, що в тканинах аорти, препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів одночасно із оксидативним розвивався і нітрозативний стрес. Про це свідчила активація надлишкового *de novo* (зростання активності iNOS) і реутилізаційного (зростання активності нітратредуктази) синтезу NO. Причиною надмірної активності iNOS могла бути посилена генерація

$O_2^{\bullet-}$ . Одночасне посилене утворення NO і  $O_2^{\bullet-}$  створює умови для їх взаємодії між собою із утворенням високотоксичного  $ONOO^-$  [118-120, 310]. Нами встановлено підвищення пулів  $NO_3^-$ , продукту розпаду  $ONOO^-$ . Серед пошкоджуючих впливів останнього слід окремо відмітити його здатність індукувати ПОЛ, а отже опосередковано призводити до розвитку діастолічної дисфункції.

Розвиток нітрозативного стресу супроводжувався зниженням конститутивного синтезу NO, про що свідчило пригнічення активності cNOS і зменшення вмісту  $NO_2^-$ , метаболічного продукту NO. Причиною зниження конститутивного синтезу NO міг бути неспряжений стан cNOS із переключенням NO-синтезуючої активності на утворення  $O_2^{\bullet-}$ . Для оцінки стану спряження – не спряження cNOS, ми запропонували індекс спряження, який розраховували через відношення активності cNOS до швидкості генерації  $O_2^{\bullet-}$ . Даний індекс був суттєво зниженим в тканинах аорти, мітохондріях і гомогенаті серця старих щурів. Причинами не спряження cNOS можуть бути: 1) окиснення глутатіону із наступним глутатіонуванням молекули ферменту за залишком цистеїну; 2) зниження біодоступності кофактору  $BH_4$ , через його окиснення до  $BH_2$ ; 3) зниження доступності субстрату синтезу, L-аргініну, через посилення аргіназної активності [316, 317]. Встановлена нами посилена генерація  $O_2^{\bullet-}$  і активність аргінази демонструє, що всі названі причини могли мати місце в досліджуваних тканинах старих щурів. Цікаво, що підвищене утворення  $O_2^{\bullet-}$  не лише може викликати зниження конститутивного синтезу NO, але й взаємодіючи із останнім призводити до посиленої деградації газу [205].

Таким чином отримані нами результати свідчили про зниження вмісту сірководню в тканинах аорти, препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів. Це супроводжувалось розвитком як оксидативного, так і нітрозативного стресу, наслідком чого було неспряження стану cNOS, зниження конститутивного синтезу NO і зменшення біодоступності даного газу. Результатом встановлених біохімічних змін стало порушення ендотелійзалежного розслаблення судин і розвиток діастолічної дисфункції у старих щурів.



Враховуючи той факт, що в основі кардіо-, васкулопротекторних властивостей сірководню є, зокрема, його здатність пригнічувати оксидативний стрес [52, 53, 62, 63] ми вирішили з'ясувати вплив донора, NaHS на функцію серця і судин у старих тварин. Введення NaHS ( $10^{-3}$  моль/л) супроводжувалось значним відновленням ендотелійзалежного розслаблення ГМ аорти старих щурів. Цей ефект був обумовлений саме NO, адже знімався при одночасному застосуванні інгібітора синтезу оксиду азоту (L-NAME). Дані про прямий вплив  $H_2S$  на тонус ГМ судин є добре відомими. Раніше в нашому відділі було показано, що NaHS залежно від концентрації змінює тонус ГМ ізольованих препаратів аорти і ворітної вени. Так, у низьких концентраціях ( $10^{-5}$  моль/л) він здійснював констрикторну реакцію обох видів судин, у значно вищих концентраціях ( $10^{-4}$  моль/л -  $10^{-3}$  моль/л), донор сірководню викликав розслаблення ГМ досліджуваних судин. Останній ефект обумовлений активацією  $K_{ATP}^{+}$  каналів [278]. Встановлена нами здатність сірководню покращувати ендотелійзалежне розслаблення знаходиться в площині взаємодії  $H_2S$  і NO. Останнє представляє великий інтерес. Біохімічні аспекти цієї взаємодії залишаються протиречливими і до кінця не визначені. Деякі дослідження вказують на стимулюючий вплив кожного із двох газотрансмітерів на продукцію і функцію іншого, а деякі роблять цілком протилежні висновки про їх взаємовплив. Згідно окремих даних сірководень стимулює утворення NO шляхом реалізації декількох механізмів: 1) через мобілізацію  $Ca^{2+}$  із ендоплазматичного ретикулуму і подальшу активацію системи  $Ca^{2+}$ -кальмодулін [43]; 2) внаслідок Akt- та p38 MAPK-залежного фосфорилування  $Ser^{1177}$  молекули cNOS [44]; 3) через Akt-незалежне фосфорилування  $Ser^{1177}$ , пов'язане із попередньою активацією системи  $Ca^{2+}$ -кальмодулін [43]. Крім стимуляції синтезу NO,  $H_2S$  пролонгує його дію, завдяки пригніченню активності фосфодіестерази, фермента, що викликає розщеплення цГМФ. Питання впливу  $H_2S$  на утворення NO при старінні залишається не вивченим.

В подальшому ми встановили, що введення донора NaHS ( $10^{-3}$  моль/л) покращувало також діастолічну функцію у старих тварин, про що свідчило

збільшення максимальної швидкості зниження тиску і зменшення константи активного розслаблення.

Для встановлення механізмів впливу NaHS на ендотелійзалежне розслаблення і діастолічну функцію серця старих щурів нами були проведені біохімічні дослідження. Введення NaHS (56,1 мг/кг) збільшувало пули  $\text{H}_2\text{S}$  в тканинах аорти, препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів. Це супроводжувалось пригніченням оксидативного стресу через зниження швидкості утворення  $\text{O}_2^{\bullet-}$  в результаті пригнічення активності циклоокси-, ліпокси- і ксантиноксигеназного шляхів його утворення. Субстратом для перших двох шляхів є вільна арахідонова кислота активне вивільнення якої відбувається під дією тогож таки  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Таким чином утворюється само підсилююче коло генерації супероксиду. Одночасне зменшення швидкості генерації вказаного радикалу і вмісту арахідонової кислоти після введення NaHS свідчить про здатність сірководню розривати дане коло. Також за дії донора зменшувались пули  $\text{H}_2\text{O}_2$ , що супроводжувалось зниженням швидкості утворення  $\text{OH}^\bullet$  радикалу. Це свідчить про те, що при старінні джерелом токсичного  $\text{OH}^\bullet$ -радикалу було його утворення із  $\text{H}_2\text{O}_2$  у класичній реакції Фентона. Причиною останнього може бути порушення альтернативного реакції Фентона, нетоксичного метаболізму  $\text{H}_2\text{O}_2$  за участі каталази, активність якої знижується при старінні [325-327].

Логічним наслідком зниження утворення  $\text{OH}^\bullet$ -радикалу, ініціатора ПОЛ, стало зниження інтенсивності даного процесу, про що свідчило зменшення вмісту ДК і МДА.

Введення *in vivo* NaHS старим тваринам супроводжувалось також суттєвим пригніченням в досліджуваних тканинах нітрозативного стресу, через зменшення надлишкового утворення NO і його високотоксичного похідного ONOO $^-$ . Одночасно із пригніченням нітрозативного стресу, спостерігалось відновлення спряженого стану cNOS (суттєво збільшувався індекс спряження cNOS), що супроводжувалось посиленням конститутивного синтезу вазорелаксуючого NO. Ми вважаємо, що причиною відновлення спряженого стану cNOS і посилення

конститутивного синтезу NO стало суттєве пригнічення оксидативного стресу і відновлення біодоступності субстрату синтезу L-аргініну (через зменшення аргіназної активності).

Таким чином, донор NaHS відновлював ендотелійзалежне розслаблення і покращував діастолічну функцію серця у старих щурів. В основі даного ефекту було пригнічення в тканинах аорти, препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця оксидативного та нітрозативного стресу, що супроводжувалось відновленням спряженого стану cNOS і посиленням конститутивного синтезу NO (рис. 3. 24.).

В серцево-судинній системі  $H_2S$  утворюється за участі двох ферментів – CSE і 3MST. Пропаргілгліцин (ПГ) є блокатором першого з них [5, 6, 16, 19]. Деякі дослідження наводять переконливі докази, що кардіо, васкулопротекторні властивості обумовлені саме CSE-синтезованим  $H_2S$ . Так при ішемії-реперфузії CSE-синтезований сірководень ініціює активацію Akt-залежного сигнального шляху та приймає участь у регуляції Nrf 2, фактора транскрипції, який передає стимулюючі сигнали на компонент антиоксидантного реагуючого елемента (ARE). В результаті відбувається пригнічення оксидативного стресу і апоптозу, а також відновлення біоенергетичної функції мітохондрій [303]. Одночасно з цим, встановлено, що деякі патофізіологічні ефекти  $H_2S$ , а саме, індукція і здатність підтримувати запалення обумовлені також CSE-синтезованим сірководнем [93].

Враховуючи встановлені нами позитивні ефекти донору сірководню, ми очікували, що застосування ПГ призведе до погіршення функції серця і судин у старих щурів. Однак введення ПГ викликало протилежні нашим очікуванням результати. Ми спостерігали відновлення ендотелійзалежного розслаблення і покращення діастолічної функції серця, про що свідчило зменшення КДТ і КДЖ. Так як ефект ПГ на ендотелійзалежне розслаблення знімався L-NAME ми зробили висновок, що він був обумовлений саме дією NO, а для з'ясування більш глибоких механізмів впливу ПГ ми провели серії біохімічних досліджень.

В біохімічних дослідженнях введення ПГ (11,3 мг/кг) парадоксальним чином відновлювало пули  $\text{H}_2\text{S}$  в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих тварин. Це призводило до пригнічення оксидативного/нітрозативного стресу, відновлення спряженого стану cNOS та збільшення конститутивного синтезу NO. Той факт, що відновлення рівня  $\text{H}_2\text{S}$  супроводжувалось підвищенням зниженої у старих щурів активності 3MST (можливо компенсаторним чином) свідчить про те, що саме даний фермент є основним у генерації  $\text{H}_2\text{S}$  в серцево-судинній системі і зниження його активності є причиною зменшення вмісту  $\text{H}_2\text{S}$  при старінні. В тканинах аорти введення ПГ не викликало зміну рівня сірководню, проте супроводжувалось пригніченням оксидативного/нітрозативного стресу наслідком чого було зменшення деградації NO, про що свідчило збільшення пулів  $\text{NO}_2^-$  при не зміненій активності cNOS.

Таким чином ПГ відновлював ендотелійзалежне розслаблення шляхом пригнічення оксидативного/нітрозативного стресу і зменшення деградації NO та покращував діастолічну функцію серця старих щурів, через відновлення пулів  $\text{H}_2\text{S}$  в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця, наслідком чого було пригнічення оксидативного/нітрозативного стресу, відновлення спряження cNOS і посилення конститутивного синтезу NO (рис. 3. 24.).

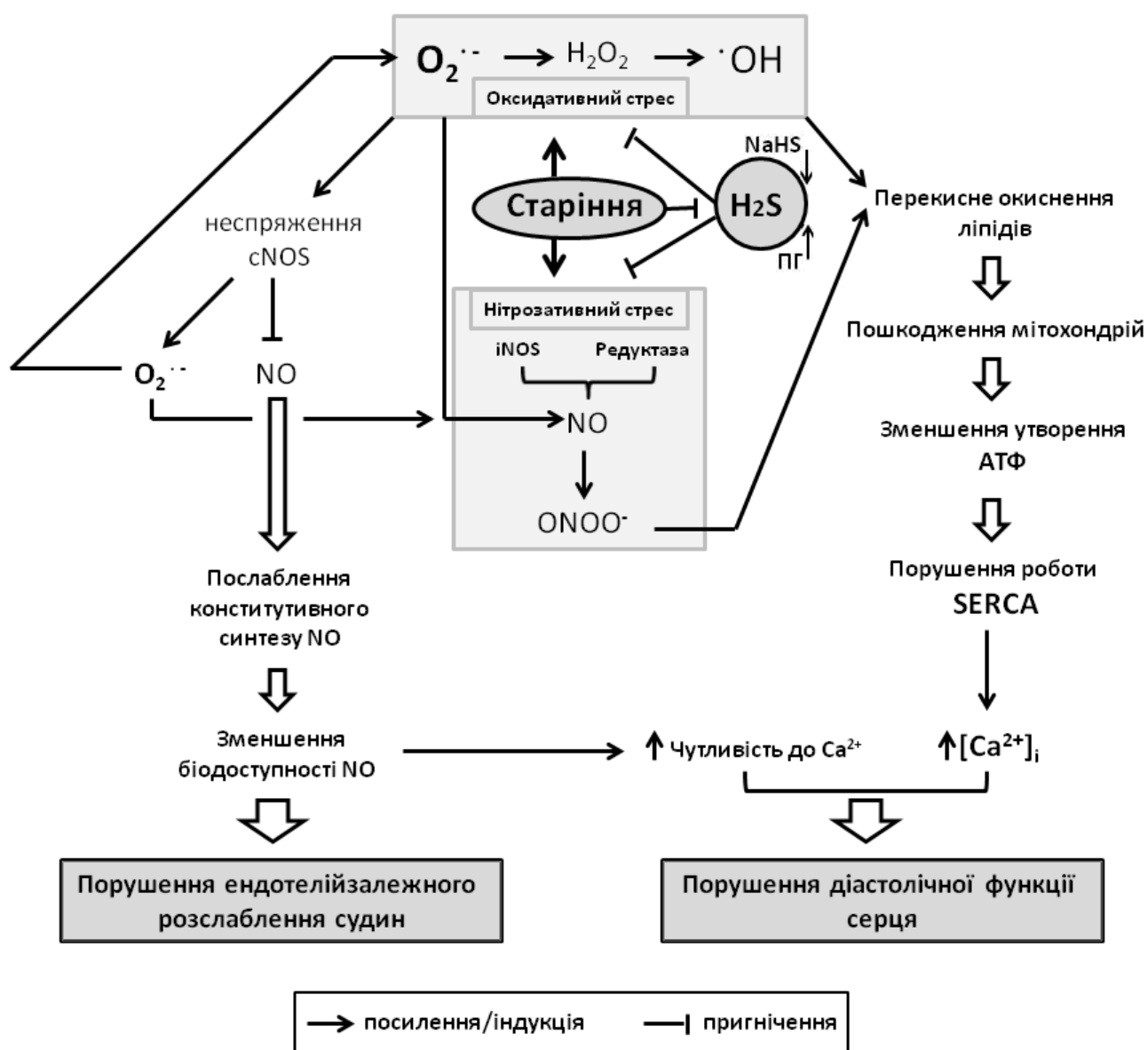


Рис. 3. 24. Механізм впливу сірководню (H<sub>2</sub>S), як донора (NaHS) так і блокатора пропаргілгліцину (ПГ) на ендотелійзалежне розслаблення судин і діастолічну функцію серця при старінні.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі охарактеризовано особливості ендотелійзалежного розслаблення гладеньких м'язів аорти і показників кардіогемодинаміки у старих щурів; встановлено роль рівнів сірководню і окисного (як оксидативного, так і нітрозативного) стресу в розвитку і компенсації порушень функції серця і судин при старінні.

1. Встановлено, що у старих щурів порушені ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти та діастолічна функція серця у порівнянні з такими у дорослих молодих тварин; знижена максимальна швидкість розслаблення (в середньому на 27,4%), збільшена кінцево-діастолічна жорсткість (в 2,1 рази) і константа активного розслаблення (в 1,4 рази) міокарду та підвищений кінцево-діастолічний тиск (в 3,1 рази) в лівому шлуночку.

2. Порушення функції серця і судин при старінні зумовлено, зокрема, зниженням вмісту сірководню ( $H_2S$ ) в тканинах аорти, препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця, що є наслідком пригнічення активності  $H_2S$ -синтезуючого ферменту 3-меркаптопіруват-сульфуртрансфери (3MST).

3. Зниження вмісту сірководню в досліджених тканинах сприяє розвитку оксидативного/нітрозативного стресу, наслідком чого є неспряження (uncoupling) cNOS і послаблення конститутивного синтезу NO.

4. Уведення донору  $H_2S$  (NaHS) і блокатора цистатіонін-γ-ліаза-залежного шляху синтезу сірководню (пропаргілгліцин) істотною мірою нормалізують ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти і діастолічну функцію серця у старих щурів.

5. Уведення NaHS і пропаргілгліцину пригнічує оксидативний/нітрозативний стрес, забезпечує відновлення спряженого стану cNOS і посилює конститутивний синтез NO, що і забезпечує нормалізацію розслаблення гладеньких м'язів аорти.

6. Вплив NaHS і пропаргілгліцину на діастолічну функцію серця обумовлений їх здатністю збільшувати в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів вміст ендogenous  $H_2S$ , пригнічувати

оксидативний/нітрозативний стрес, відновлювати спряжений стан cNOS і посилювати конститутивний синтез NO.

7. Парадоксальна здатність пропаргілгліцину збільшувати вміст  $H_2S$  в тканинах серця старих щурів опосередкована компенсаторним підвищенням активності 3MST (у 2,4 рази в мітохондріях і 2,5 рази в гомогенаті серця) під дією даного агента.

8. Таким чином, NaHS і пропаргілгліцин можуть бути рекомендовані як лікувально-профілактичні засоби при терапії вік-асоційованих серцево-судинних захворювань.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Zhao W. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener / W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, R. Wang // *EMBO J.* – 2001. – V. 20, № 20. – P. 6008–16.
2. 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. [Електронний ресурс] / [S. C. Bir, G. K. Kolluru, P. McCarthy та ін.] // *J Am Heart Assoc.* – 2012. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=23316304>.
3. Papapetropoulos A. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis / A. Papapetropoulos, A. Pyriochou, Z. Altaany [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* – 2009. – V. 106, № 51. – P. 21972–7.
4. Hydrogen sulfide attenuated tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inflammatory signaling and dysfunction in vascular endothelial cells. [Електронний ресурс] / [L. L. Pan, X. H. Lui, Q. H. Gong та ін.] // *PLoS One.* – 2011. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=PMC3091882>.
5. Asimakopoulou A. Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine  $\beta$  synthase (CBS) and cystathionine  $\gamma$  lyase (CSE) / A. Asimakopoulou, P. Panopoulos, CT Chasapis [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2013. – V. 169, № 4. – P. 922–32.
6. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. [Електронний ресурс] / [P. Patel, M. Vatish, J. Heptinstall та ін.] // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2009. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=19200371>.
7. The Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Heart Diseases: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential. [Електронний ресурс] / [Y. Shen, Z. Shen, S. Luo S та ін.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2015. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=PMC4442295>.
8. Kimura H. Hydrogen sulfide as a neuromodulator / H. Kimura // *Mol*



Neurobiol. – 2002. – V. 26, №1. – P. 13– 9.

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

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

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

12. Casey J. R. Sensors and regulators of intracellular pH / J. R. Casey, S. Grinstein, J. Orlowski // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2010. – V. 11, № 1. – P. 50–61.

13. Kimura H. Production and physiological effects of hydrogen sulfide / H. Kimura // *Antioxid Redox Signal.* – 2014. – V. 20, № 5. – P. 783–93.

14. Ishigami M. A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain / M. Ishigami, K. Hiraki, K. Umemura [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2009. – V. 11, № 2. – P. 205–14.

15. Toohey J. I. Sulfur signaling: is the agent sulfide or sulfane? / J. I Toohey // *Anal Biochem.* – 2011. – V. 413, №1. – P. 1–7.

16. Shibuya N. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain / N. Shibuya, M. Tanaka, M. Yoshida [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2009. – V. 11, № 4. – P. 703–14.

17. Furne J. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values / J. Furne, A. Saeed, M. D. Levitt // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2008. – V. 295, № 5. – P. 1479–85.

18. Levitt M. D. Free and acid-labile hydrogen sulfide concentrations in mouse tissues: anomalously high free hydrogen sulfide in aortic tissue / M. D. Levitt, MS Abdel-Rehim, J. Furne // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – V. 15, № 2. – P. 373 – 8.

19. Kimura H. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond / H. Kimura // *Nitric Oxide.* – 2014. – V. 4, № 1. – P. 4–10.

20. Hosoki R. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide / R. Hosoki, N. Matsuki, H. Kimura // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1997. – V. 237, № 3. – P. 527–31.
21. Yang G. H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase / G. Yang, L. Wu, B. Jiang [et al.] // *Science.* – 2008. – V. 322, № 5901. – P. 587–90.
22. Shibuya N. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide / N. Shibuya, Y. Mikami, Y. Kimura [et al.] // *J Biochem.* – 2009. – V. 146, № 5. – P. 623–6.
23. Differential effects of cystathionine- $\gamma$ -lyase-dependent vasodilatory H<sub>2</sub>S in periadventitial vasoregulation of rat and mouse aortas [Электронный ресурс] / [C. Köhn, J. Schleifenbaum, I. A. Szijártó та ін.] // *PLoS One.* – 2012. – Режим доступа до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22870268>.
24. Niu W. N. S-glutathionylation enhances human cystathionine  $\beta$ -synthase activity under oxidative stress conditions / W. N. Niu, P. K. Yadav, J. Adamec, R. Banerjee // *Antioxid Redox Signal.* – 2015. – V. 22, № 5. – P. 350–61.
25. Taoka S. Characterization of NO binding to human cystathionine beta-synthase: possible implications of the effects of CO and NO binding to the human enzyme / S. Taoka, R. Banerjee // *J Inorg Biochem.* – 2001. – V. 87, № 4. – P. 245–51.
26. Morikawa T. Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway / T. Morikawa, M. Kajimura, T. Nakamura [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012. – V. 109, № 4. – P. 1293–8.
27. Szabó C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential / C. Szabó // *Nat Rev Drug Discov.* – 2007. – V. 6, № 11. – P. 917–35.
28. Whiteman M. Emerging role of hydrogen sulfide in health and disease: critical appraisal of biomarkers and pharmacological tools / M. Whiteman, S. Le Trionnaire, M. Chopra, [et al.] // *Clin Sci (Lond).* – 2011. – V. 121, № 11. – P. 459–88.
29. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed / R. Wang // *Physiol Rev.* – 2012. – V. 92, № 2. – P. 791–

896.

30. Shibuya N. A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells / N. Shibuya, S. Koike, M. Tanaka [et al.] // *Nat Commun.* – 2013. – №4. – P. 1366.

31. Nagahara N. Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis / N. Nagahara, T. Ito, H. Kitamura, T. Nishino // *Histochem Cell Biol.* – 1998. – V. 110, № 3. – P. 243–50.

32. Mikami Y. Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyrivate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide / Y. Mikami, N. Shibuya, Y. Kimura [et al.] // *J Biochem.* – 2011. – V. 439, № 3. – P. 479–85.

33. Porter D. W. Specificity studies of 3-Mercaptopyrivate sulfurtransferase / D. W. Porter, S. I. Baskin // *J Biochem Toxicol.* – 1995. – V. 10, № 6. – P. 287–92.

34. Porter D. W. The effect of three alpha-keto acids on 3-mercaptopyrivate sulfurtransferase activity / D. W. Porter, S. I. Baskin // *J. Biochem. Toxicol.* – 1996. – V. 11, № 1. – P. 45–50.

35. Gould S. J. Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins / S. J. Gould, G. A. Keller, S. Subramani // *J Cell Biol.* – 1988. – V. 107, № 3. – P. 897–905.

36. Shibuya N. Production of hydrogen sulfide from d-cysteine and its therapeutic potential / N. Shibuya, H. Kimura // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2013. – № 16. – P. 4–87.

37. Kimura H. Metabolic turnover of hydrogen sulfide / H. Kimura // *Front Physiol.* – 2012. – № 3. – P. 101.

38. Caliendo G. Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S): development of H<sub>2</sub>S-releasing drugs as pharmaceuticals / G. Caliendo, G. Cirino, V. Santagada, J. L. Wallace // *J Med Chem.* – 2010. – V. 53, № 17. – P. 6275–86.

39. Bartholomew T. C. Oxidation of sodium sulphide by rat liver, lungs and kidney / T. C. Bartholomew, G. M. Powell, K. S. Dodgson, C. G. Curtis // *Biochem Pharmacol.* – 1980. – V. 29, № 18. – P. 2431–7.

40. Picton R. Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese / R. Picton, M. C. Eggo, G. A. Merrill [et al.] // *Gut*. – 2002. – V. 50, № 2. – P. 201–5.
41. Francis S. H. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action / S. H. Francis, J. L. Busch, J. D. Corbin, D. Sibley // *Pharmacol Rev*. – 2010. – V. 62, № 3. – P. 525–63.
42. Heiss E. H. Regulation of eNOS enzyme activity by posttranslational modification / E. H. Heiss, V. M. Dirsch // *Curr Pharm Des*. – 2014. – V. 20, № 22. – P. 3503–13.
43. Kida M. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production with calcium-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells / M. Kida, T. Sugiyama, T. Yoshimoto, Y. Ogawa // *Eur J Pharm Sci*. – 2013. – V. 48, № 1–2. – P. 211–5.
44. Predmore B. L. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production from endothelial cells by an akt-dependent mechanism / B. L. Predmore, D. Julian, AJ Cardounel // *Front Physiol*. – 2011. – № 2. – P. 104.
45. Bucci M. Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity / M. Bucci, A. Papapetropoulos, V. Vellecco [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2010. – V. 30, № 10. – P. 1998–2004.
46. Yamamoto K. New molecular mechanisms for cardiovascular disease: blood flow sensing mechanism in vascular endothelial cells / K. Yamamoto, J. Ando // *J Pharmacol Sci*. – 2011. – V. 116, № 4. – P. 323–31.
47. Mustafa A. K. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels / A. K. Mustafa, G. Sikka, S. K. Gazi [et al.] // *Circ Res*. – 2011. – V. 109, № 11. – P. 1259–68.
48. Leptin-induced endothelium-dependent vasorelaxation of peripheral arteries in lean and obese rats: role of nitric oxide and hydrogen sulfide. [Электронный ресурс] / [A. Jamroz-Wiśniewska, A. Gertler, G. Solomon та ін.] // *PLoS One*. – 2014. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24475175>.
49. Tang G. H<sub>2</sub>S is an endothelium-derived hyperpolarizing factor / G. Tang,

G. Yang, B. Jiang [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2013. – V. 19, № 14. – P. 1634–46.

50. Bełtowski J. Hydrogen sulfide and endothelium-dependent vasorelaxation / J. Bełtowski, A. Jamroz-Wiśniewska // *Molecules.* – 2014. – V. 19, № 12. – P. 21183–99.

51. Cai W. J. The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation / W. J. Cai, M. J. Wang, P. K. Moore [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 2007. – V. 76, № 1. – P. 29–40.

52. Benetti L. R. Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice in vivo / L. R. Benetti, D. Campos, S. A. Gurgueira [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 2013. – V. 698, № 1–3. – P. 463–9.

53. Sun W. H. Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion / W. H. Sun, F. Liu, Y. Chen, Y. C. Zhu // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2012. – V. 421, № 2. – P. 164–9.

54. Kimura Y. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress / Y. Kimura, H. Kimura // *FASEB J.* – 2004. – V. 18, № 10. – P. 1165–7.

55. Calvert J. W. Novel insights into hydrogen sulfide--mediated cytoprotection / J. W. Calvert, W. A. Coetzee, D. J. Lefer // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – V. 12, № 10. – P. 1203–17.

56. Yang G. Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulfhydration of Keap1 and activation of Nrf2 / G. Yang, K. Zhao, Y. Ju // *Antioxid Redox Signal.* – 2013. – V. 18, № 15. – P. 1906–19.

57. Hourihan J. M. The gasotransmitter hydrogen sulfide induces nrf2-target genes by inactivating the keap1 ubiquitin ligase substrate adaptor through formation of a disulfide bond between cys-226 and cys-613 / J. M. Hourihan, J.G. Kenna, J.D. Hayes // *Antioxid Redox Signal.* – 2013. – V. 19, № 5. – P. 465–81.

58. Peake B. F. Hydrogen sulfide preconditions the db/db diabetic mouse heart against ischemia-reperfusion injury by activating Nrf2 signaling in an Erk-dependent manner / B. F. Peake, C. K. Nicholson, J. P. Lambert [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ*

Physiol. – 2013. – V. 304, № 9. – P. H1215–24.

59. Thomas M. Thirty-day results of the SAPIEN aortic Bioprosthesis European Outcome (SOURCE) Registry: A European registry of transcatheter aortic valve implantation using the Edwards SAPIEN valve / M. Thomas, G. Schymik, T. Walther [et al.] // *Circulation*. – 2010. – V. 122, № 1. – P. 62–9.

60. Streeter E. Hydrogen sulfide as a vasculoprotective factor / E. Streeter, H. H. Ng, J. L. Hart // *Med Gas Res*. – 2013. – V. 3, № 1. – P. 9.

61. Petri S. Nrf2/ARE Signaling Pathway: Key Mediator in Oxidative Stress and Potential Therapeutic Target in ALS. [Электронный ресурс] / S. Petri, S. Körner, M. Kiaei // *Neurol Res Int*. – 2012. – Режим доступа до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=PMC3461296>.

62. Muzaffar S. Exogenous hydrogen sulfide inhibits superoxide formation, NOX-1 expression and Rac1 activity in human vascular smooth muscle cells / S. Muzaffar, N. Shukla, M. Bond [et al.] // *J Vasc Res*. – 2008. – V. 45, № 6. – P. 521–8.

63. Zhong X. Exogenous hydrogen sulfide attenuates diabetic myocardial injury through cardiac mitochondrial protection / X. Zhong, L. Wang, Y. Wang [et al.] // *Mol Cell Biochem*. – 2012. – V. 371, № 1–2. – P. 187–98.

64. Si Y. F. Treatment with hydrogen sulfide alleviates streptozotocin-induced diabetic retinopathy in rats / Y. F. Si, J. Wang, J. Guan [et al.] // *Br J Pharmacol*. – 2013. – V. 169, № 3. – P. 619–31.

65. Yan S. K Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells / S. K. Yan, T. Chang, H. Wang // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2006. – V. 351, № 2. – P. 485–91.

66. Tyagi N. H<sub>2</sub>S protects against methionine-induced oxidative stress in brain endothelial cells / N. Tyagi, K. S. Moshal, U. Sen [et al.] // *Antioxid Redox Signal*. – 2009. – V. 11, № 1. – P. 25–33.

67. Whiteman M. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? / M. Whiteman, J. S. Armstrong, S. H. Chu [et al.] // *J Neurochem*. – 2004. – V. 90, № 3. – P. 765–8.

68. Thomson L. 3-nitrotyrosine modified proteins in atherosclerosis.

[Электронный ресурс] / Thomson // Dis Markers. – 2015. – Режим доступа до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=PMC4359869>.

69. Al-Magableh M. R. Hydrogen sulfide protects endothelial nitric oxide function under conditions of acute oxidative stress in vitro / M. R. Al-Magableh, B. K. Kemp-Harper, H. H. Ng [et al.] // Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. – 2014. – V. 387, № 1. – P. 67–74.

70. Lu M. Hydrogen sulfide protects astrocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neural injury via enhancing glutamate uptake / M. Lu, L. F. Hu, G. Hu, J. S. Bian // Free Radic Biol Med. – 2008. – V. 45, № 12. – P. 1705–13.

71. Whiteman M. Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? / M. Whiteman, N. S. Cheung, Y. Z. Zhu [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. – 2005. – V. 326, № 4. – P. 794–8.

72. Carballal S. Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest / S. Carballal, M. Trujillo, E. Cuevasanta [et al.] // Free Radic Biol Med. – 2011. – V. 50, № 1. – P. 196–205.

73. Tait S. W. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond / S. W. Tait, D. R. Green // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2010. – V. 11, № 9. – P. 621–32.

74. Lopez J. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within / J. Lopez, S. W. Tait // Br J Cancer. – 2015. – V. 112, № 6. – P. 957–62.

75. Exogenous hydrogen sulfide restores cardioprotection of ischemic post-conditioning via inhibition of mPTP opening in the aging cardiomyocytes. [Электронный ресурс] / [H. Li, C. Zhang, W. Sun та ін.] // Cell Biosci. – 2015. – Режим доступа до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=PMC4520088>.

76. Barr L. A. Discoveries of hydrogen sulfide as a novel cardiovascular therapeutic / L. A. Barr, J. W. Calvert // Circ J. – 2014. – V. 78, № 9. – P. 2111–8.

77. Osipov R. M. Effect of hydrogen sulfide in a porcine model of myocardial ischemia-reperfusion: comparison of different administration regimens and characterization of the cellular mechanisms of protection / R. M. Osipov, M. P. Robich,

J. Feng [et al.] // J Cardiovasc Pharmacol. – 2009. – V. 54, № 4. – P. 287–97.

78. Yao L. L. Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by preventing GSK-3 $\beta$ -dependent opening of mPTP / L. L. Yao, X. W. Huang, Y. G. Wang [et al.] // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2010. – V. 298, № 5. – P. 1310–9.

79. Mediation of exogenous hydrogen sulfide in recovery of ischemic post-conditioning-induced cardioprotection via down-regulating oxidative stress and up-regulating PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway in isolated aging rat hearts. [Электронный ресурс] / [H. Li, Y. Wang, C. Wei та ін.] // Cell Biosci. – 2015. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=PMC4364662>.

80. Hydrogen sulfide preconditioning protects rat liver against ischemia/reperfusion injury by activating Akt-GSK-3 $\beta$  signaling and inhibiting mitochondrial permeability transition. [Электронный ресурс] / [Q. Zhang, H. Fu, H. Zhang та ін.] // PLoS One. – 2013. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=PMC3772845>.

81. Czabotar P. E. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy / P. E. Czabotar, G. Lessene, A. Strasser, J. M. Adams // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2014. – V. 15, № 1. – P. 49–63.

82. Besbes S. New dimension in therapeutic targeting of BCL-2 family proteins / S. Besbes, M. Mirshahi, M. Pocard, C. Billard // Oncotarget. – 2015. – V. 6, № 15. – P. 12862–71.

83. Meng G. GYY4137 protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by attenuating oxidative stress and apoptosis in rats / G. Meng, J. Wang, Y. Xiao [et al.] // J Biomed Res. – 2015. – V. 29, № 3. – P. 203–13.

84. Park Y. H. Death domain complex of the TNFR-1, TRADD, and RIP1 proteins for death-inducing signaling / Y. H. Park, M. S. Jeong, S. B. Jang // Biochem Biophys Res Commun. – 2014. – V. 443, № 4. – P. 1155–61.

85. Nikolettou V. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy / V. Nikolettou, M. Markaki, K. Palikaras, N. Tavernarakis // Biochim Biophys Acta. – 2013. – V. 1833, № 12. – P. 3448–59.



86. Sen N. Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF- $\kappa$ B mediates its antiapoptotic actions / N. Sen, B. D. Paul, M. M. Gadalla [et al.] // *Mol Cell*. – 2012. – V. 45, № 1. – P. 13–24.
87. Varfolomeev E. Roles of c-IAP proteins in TNF receptor family activation of NF- $\kappa$ B signaling / E. Varfolomeev, T. Goncharov, D. Vucic // *Methods Mol Biol*. – 2015. – № 1280. – P. 269–82.
88. Andruski B. Leukocyte trafficking and pain behavioral responses to a hydrogen sulfide donor in acute monoarthritis / B. Andruski, D. M. McCafferty, T. Ignacy [et al.] // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. – 2008. – V. 295, № 3. – P. 814–20.
89. Chen Y. H. Involvement of endogenous hydrogen sulfide in cigarette smoke-induced changes in airway responsiveness and inflammation of rat lung / Y. H. Chen, P. P. Wang, X. M. Wang [et al.] // *Cytokine*. – 2011. – V. 53, № 3. – P. 334–41.
90. Fischer R. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. [Электронный ресурс] / R. Fischer, O. Maier // *Oxid Med Cell Longev*. – 2015. – Режим доступа до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=PMC4365363>.
91. Oh G. S. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide / G. S. Oh, H. O. Pae, B. S. Lee [et al.] // *Free Radic Biol Med*. – 2006. – V. 41, № 1. – P. 106–19.
92. Hu L. F. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia / L. F. Hu, P. T. Wong, P. K. Moore, J.S. Bian // *J Neurochem*. – 2007. – V. 100, № 4. – P. 1121–8.
93. Bhatia M. Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury / M. Bhatia, F. L. Wong, D. Fu [et al.] // *FASEB J*. – 2005. – V. 19, № 6. – P. 623–5.
94. Li L. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse / L. Li, M. Bhatia, Y. Z. Zhu [et al.] // *FASEB J*. – 2005. – V.

19, № 6. – P. 1196–8.

95. Rahman K. Effects of garlic on platelet biochemistry and physiology / K. Rahman // *Mol Nutr Food Res.* – 2007. – V. 51, № 11. – P. 1335–44.

96. Allison G. L. Aged garlic extract inhibits platelet activation by increasing intracellular cAMP and reducing the interaction of GPIIb / IIIa receptor with fibrinogen / G. L. Allison, G. M. Lowe, K. Rahman // *Life Sci.* 2012. –V.91, № 25–26. – P. 1275–80.

97. Ali M. Antithrombotic activity of garlic: its inhibition of the synthesis of thromboxane-B2 during infusion of arachidonic acid and collagen in rabbits / M. Ali, M. Thomson, M. A. Alnaqeeb [et al.] // *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* – 1990. –V. 41, № 2. – P. 95–9.

98. Garlic extracts prevent oxidative stress, hypertrophy and apoptosis in cardiomyocytes: a role for nitric oxide and hydrogen sulfide. [Электронный ресурс] / [X. L. Louis, R. Murphy, S. J. Thandapilly та ін.] // *BMC Complement Altern Med.* – 2012. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=PMC3519616>.

99. Benavides G. A. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic / G. A. Benavides, G. L. Squadrito, R. W. Mills [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* –2007. – V. 104, № 46. – P.17977–82.

100. Bordia A. Effect of essential oil of onion and garlic on experimental atherosclerosis in rabbits / A. Bordia, S. K. Verma, A. K. Vyas [et al.] // *Atherosclerosis.* – 1977. – V. 26, № 3. – P. 379–86.

101. Mirhadi S. A. Effect of garlic supplementation to atherogenic diet on collagen biosynthesis in various tissues of rabbits. / S. A. Mirhadi, S. Singh, P. P. Gupta // *Indian Heart J.* – 1990. – V. 42, № 2. – P. 99–104.

102. Arora R. C. Comparative effect of clofibrate, garlic and onion on alimentary hyperlipemia / R. C. Arora, S. Arora // *Atherosclerosis.* – 1981. – V. 39, № 4. – P. 447–52.

103. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry / D. Harman // *J Gerontol.* – 1956. – V. 11, № 3. – P. 298–300.

104. Harman D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009 / D. Harman // *Biogerontology*. – 2009. – V. 10, № 6. – P. 773–81.
105. Hayflick L. A brief history of the mortality and immortality of cultured cells / L. Hayflick // *Keio J Med*. – 1998. – V. 47, № 3. – P. 174– 82.
106. Hayflick L. The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation / L. hayflick // *Exp Cell Res*. – 1961. – № 23. – P. 14– 20.
107. Olovnikov A. M. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory / A. M. Olovnikov // *Exp Gerontol*. – 1996. – V. 31, № 4. – P. 443–8.
108. Dilman V. M. Age-associated elevation of hypothalamic, threshold to feedback control, and its role in development, ageing, and disease / V. M. Dilman // *Lancet*. – 1971. – V. 1, № 7711. – P. 1211–9.
109. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения / В. Н. Анисимов. – СПб. : Наука, 2003. – 468 с.
110. Kirkwood T. B. Design and analysis of aging studies / T. B. Kirkwood // *Aging (Milano)*. – 1997. – V. 9, № 6. – P. 438– 9.
111. Фролькис В. В. Геронтология: прогнозы и гипотезы / В. В. Фролькис // *Вестник НАН Украины*. – 1999. – Т. 37. – С. 28–40.
112. Ljubuncic P. The evolutionary theories of aging revisited--a mini-review / P. Ljubuncic, A. Z. Reznick // *Gerontology*. – 2009. – V. 55, № 2. – P. 205–16.
113. Dai D. F. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan / D. F. Dai, Y. A. Chiao, D. J. Marcinek [et al.] // *Longev Healthspan*. – 2014. – № 3. – P. 6.
114. El Assar M. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction / M. El Assar, J. Angulo, S. Vallejo [et al.] // *Front Physiol*. – 2012. – № 3. – P. 132.
115. Weydert C. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue / C. J. Weydert, J. J. Cullen // *Nat Protoc*. – 2010. – V. 5, № 1. – P. 51–66.
116. Lloyd R. V. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction / R. V. Lloyd, P. M. Hanna, R. P. Mason // *Free Radic Biol Med*. – 1977. – V.

22, № 5. – P. 885–8.

117. Sergent O. Simultaneous measurements of conjugated dienes and free malondialdehyde, used as a micromethod for the evaluation of lipid peroxidation in rat hepatocyte cultures / O. Sergent, I. Morel, P. Cogrel [et al.] // *Chem Phys Lipids*. – 1993. – V. 65, № 2. – P. 133–9.

118. Förstermann U. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling / U. Förstermann, H. Li // *Br J Pharmacol*. – 2011. – V. 164, № 2. – P. 213–23.

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

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

121. Darwish R. S. Nitrotyrosine as an oxidative stress marker: evidence for involvement in neurologic outcome in human traumatic brain injury / R. S. Darwish, N. Amiridze, B. Aarabi // *J Trauma*. – 2007. – V. 63, № 2. – P. 439–42.

122. Kuhn D. M. Nitrotyrosine as a marker for peroxynitrite-induced neurotoxicity: the beginning or the end of the end of dopamine neurons? / D. M. Kuhn, S. A. Sakowski, M. Sadidi, T. J. Geddes // *J Neurochem*. – 2004. – V. 89, № 3. – P. 529–36.

123. Van der Loo B. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging / B. van der Loo, R. Labugger, J. N. Skepper [et al.] // *J Exp Med*. – 2000. – V. 192, № 12. – P. 1731–44.

124. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors / K. Rahman // *Clin Interv Aging*. – 2007. – V. 2, № 2. – P. 219–36.

125. Fusco D. Effects of antioxidant supplementation on the aging process / D. Fusco, G. Colloca, M. R. Lo Monaco, M. Cesari // *Clin Interv Aging*. – 2007. – V. 2, № 3. – P. 377–87.

126. Harman D. Free radical theory of aging: effect of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF mice / D. Harman // J. Gerontol. – 1968. – V. 23, № 4. – P. 476–82.
127. Фролькис В. В. Молекулярная физиология старения / В. В. Фролькис // Физиологический журнал. – 1984. – Т. 30, № 3. – С. 309–316.
128. Peng C. Biology of ageing and role of dietary antioxidants / C. Peng, X. Wang, J. Chen [et al.] // Biomed Res Int. – 2014. – № 2014. – P. 831841.
129. Munro D. Low hydrogen peroxide production in mitochondria of the long-lived *Arctica islandica*: underlying mechanisms for slow aging / D. Munro, N. Pichaud, F. Paquin [et.al] // Aging Cell. – 2013. – V. 12, № 4. – P. 584–92.
130. Abele D. Bivalve models of aging and the determination of molluscan lifespans / D. Abele, T. Brey, E. Philipp // Exp Gerontol. – 2009. – V. 44, № 5. – P. 307–15.
131. Walker A. D. Tailwaggers Club Trust / A. D. Walker // Vet Rec. – 1990. – V. 126, № 18. – P. 466.
132. Ungvari Z. Extreme longevity is associated with increased resistance to oxidative stress in *Arctica islandica*, the longest-living non-colonial animal / Z. Ungvari, I. Ridgway, E. E. Philipp [et al.] // J Gerontol A Biol Sci Med Sci. – 2011. – V. 66, № 7. – P. 741–50.
133. Sohal R. S. Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies / R. S. Sohal, B. H. Sohal, W. C. Orr // Free Radic Biol Med. – 1995. – V. 19, № 4. – P. 499–504.
134. Ku H. H. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species / H. H. Ku, U. T. Brunk, R. S. Sohal // Free Radic Biol Med. – 1993. – V. 15, № 6. – P. 621–7.
135. Herrero A. Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon / A. Herrero, G. Barja // Mech Ageing Dev. – 1997. – V. 98, № 2. – P. 95–111.
136. Barja G. Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? / G. Barja // Biol Rev

Camb Philos Soc – 2004. – V. 79, № 2. – P. 235–51.

137. Lambert A. J. Low complex I content explains the low hydrogen peroxide production rate of heart mitochondria from the long-lived pigeon, *Columba livia* / A. J. Lambert, J. A. Buckingham, H. M. Boysen, M. D. Brand // *Aging Cell*. – 2010. – V. 9, № 1. – P. 78–91.

138. Ku H. H. Comparison of mitochondrial pro-oxidant generation and anti-oxidant defenses between rat and pigeon: possible basis of variation in longevity and metabolic potential / H. H. Ku, R. S. Sohal // *Mech Ageing Dev*. – 1993. – V. 72, № 1. – P. 67–76.

139. Mecocci P. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain / P. Mecocci, U. MacGarvey, A. E. Kaufman [et al.] // *Ann Neurol*. – 1993. – V. 34, № 4. – P. 609–16.

140. Chomyn A. MtDNA mutations in aging and apoptosis / A. Chomyn, G. Attardi // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2003. – V. 304, № 3. – P. 519–29.

141. Kraytsberg Y. Mutation and intracellular clonal expansion of mitochondrial genomes: two synergistic components of the aging process? / Y. Kraytsberg, E. Nekhaeva, N. B. Bodyak, K. Khrapko // *Mech Ageing Dev*. – 2003. – V. 124, № 1. – P. 49–53.

142. Trifunovic A. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase / A. Trifunovic, A. Wredenberg, M. Falkenberg [et al.] // *Nature*. – 2004. – V. 429, № 6990. – P. 417–23.

143. Smith C. D. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease / C. D. Smith, J. M. Carney, P. E. Starke-Reed [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1991. – V. 88, № 23. – P. 10540–3.

144. Nicolle M. M. Signatures of hippocampal oxidative stress in aged spatial learning-impaired rodents / M. M. Nicolle, J. Gonzalez, K. Sugaya [et al.] // *Neuroscience*. – 2001. – V. 107, № 3. – P. 415–31.

145. Simonian P. T. Pretibial cyst formation after anterior cruciate ligament surgery with soft tissue autografts / P. T. Simonian, T. L. Wickiewicz, S. J. O'Brien [et al.] // *Arthroscopy*. – 1998. – V. 14, № 2. – P. 215–20.

146. Shin C. M. Age-related changes in the distribution of nitrotyrosine in the cerebral cortex and hippocampus of rats / C. M. Shin, Y. H. Chung, M. J. Kim [et al.] // *Brain Res.* – 2002. – V. 931, № 2. – P. 194–9.
147. Chung Y. H. Immunohistochemical study on the distribution of nitrotyrosine and neuronal nitric oxide synthase in aged rat cerebellum / Y. H. Chung, C. M. Shin, K. M. Joo [et al.] // *Brain Res.* – 2002. – V. 951, № 2. – P. 316–21.
148. Barja G. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals / G. Barja, A. Herrero // *FASEB J.* – 2000. – V. 14, № 2. – P. 312–8.
149. Meng Q. Age-related changes in mitochondrial function and antioxidative enzyme activity in fischer 344 rats / Q. Meng, Y. T. Wong, J. Chen, R. Ruan // *Mech Ageing Dev.* – 2007. – V. 128, № 3. – P. 286–92.
150. Sullivan-Gunn M. J. Elevated hydrogen peroxide and decreased catalase and glutathione peroxidase protection are associated with aging sarcopenia / M. J. Sullivan-Gunn, P. A. Lewandowski // *BMC Geriatr.* – 2013. – № 13. – P. 104.
151. Barja de Quiroga G. Anti-oxidant defences and peroxidation in liver and brain of aged rats / G. Barja de Quiroga, R. Pérez-Campo, M. López Torres. – 1990. – V. 272, № 1. – P. 247–50.
152. Age-related changes in the activity of free-radical processes in rat tissues and blood serum. [Электронный ресурс] / [V. N. Anisimov, A. V. Arutiunian, T. I. Oparina та ін.] // *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* – 1999. – Режим доступа до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Age-related+changes+in+the+activity+of+free-radical+processes+in+rat+tissues+and+blood+serum>.
153. Ciriolo M. R. Age-related changes in Cu,Zn superoxide dismutase, Se-dependent and -independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain / M. R. Ciriolo, K. Fiskin, A. De Martino [et al.] // *Mech Ageing Dev.* – 1991. – V. 61, № 3. – P. 287–97.
154. Matsuo M. Resistance of cultured human skin fibroblasts from old and young donors to oxidative stress and their glutathione peroxidase activity / M. Matsuo,

H. Ikeda, T. Sugihara [et al.] // *Gerontology*. – 2004. – V. 50, № 4. – P. 193–9.

155. Koltover V. K. Free radical theory of aging: view against the reliability theory / V. K. Koltover // *EXS*. – 1992. – № 62. – P. 11–9.

156. Goncharova N. D. Correlation between activity of antioxidant enzymes and circadian rhythms of corticosteroids in *Macaca mulatta* monkeys of different age / N. D. Goncharova, A. V. Shmaliy, T. N. Bogatyrenko, V. K. Koltover // *Exp Gerontol*. – 2006. – V. 41, № 8. – P. 778–83.

157. Sohal R. S. Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species / R. S. Sohal, B. H. Sohal, U. T. Brunk // *Mech Ageing Dev*. – 1990. – V. 53, № 3. – P. 217–27.

158. Andziak B. Antioxidants do not explain the disparate longevity between mice and the longest-living rodent, the naked mole-rat / B. Andziak, T. P. O'Connor, R. Buffenstein // *Mech Ageing Dev*. – 2005. – V. 126, № 11. – P. 1206–12.

159. Wilhelm Filho D. Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats / D. Wilhelm Filho, S. L. Althoff, A. L. Dafré, A. Boveris // *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. – 2007. – V. 146, № 1–2. – P. 214–20.

160. Barja G. Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction / G. Barja // *Ageing Res Rev*. – 2002. – V. 1, № 3. – P. 397–411.

161. Buffenstein R. The oxidative stress theory of aging: embattled or invincible? Insights from non-traditional model organisms / R. Buffenstein, Y. H. Edrey, T. Yang, J. Mele // *Age (Dordr)*. – 2008. – V. 30, № 2–3. – P. 99–109.

162. Barja G. Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity / G. Barja // *Free Radic Biol Med*. – 2002. – V. 33, № 9. – P. 1167–72.

163. Clapp N. K. Effects of the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) on mortality in BALB/c mice / N. K. Clapp, L. C. Satterfield, N. D. Bowles // *J. Gerontol*. – 1979. – V. 34, № 4. – P. 497–501.

164. Kohn R. R. Effect of antioxidants on life-span of C57BL mice / R. R. Kohn // *J. Gerontol*. – 1971. – V. 26, № 3. – P. 378–80.

165. Heidrick M. L. Effect of dietary 2-mercaptoethanol on the life span, immune system, tumor incidence and lipid peroxidation damage in spleen lymphocytes



of aging BC3F1 mice / M. L. Heidrick, L. C. Hendricks, D. E. Cook // *Mech Ageing Dev* – 1984. – V. 27, № 3. – P. 341–58.

166. Milgram N. W. Maintenance on L-deprenyl prolongs life in aged male rats / N. W. Milgram, R. J. Racine, P. Nellis [et al.] // *Life Sci.* – 1990. – V. 47, № 5. – P. 415–20.

167. Orr W. C. Does overexpression of Cu,Zn-SOD extend life span in *Drosophila melanogaster*? / W. C. Orr, R. S. Sohal // *Exp Gerontol.* – 2003. – V. 38, № 3. – P. 227–30.

168. Orr W. C. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster* / W. C. Orr, R. S. Sohal // *Science.* – 1994. – V. 263, № 5150. – P. 1128–30.

169. Rando T. A. Copper / zinc superoxide dismutase: more is not necessarily better! / T. A. Rando, C. J. Epstein // *Ann Neurol.* – 1999. – V. 46, № 1. – P. 135–6.

170. Schriener S. E. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria / S. E. Schriener, N. J. Linford, G. M. Martin [et al.] // *Science.* – 2005. – V. 308, № 5730. – P. 1909–11.

171. Chen X. Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress / X. Chen, H. Liang, H. Van Remmen [et al.] // *Arch Biochem Biophys.* – 2004. – V. 422, № 2. – P. 135–6.

172. Huang T. T. Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice / T. T. Huang, E. J. Carlson, A. M. Gillespie [et al.] // *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* – 2000. – V. 55, № 1. – P. 5–9.

173. Hulbert A. J. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals / A. J. Hulbert, R. Pamplona, R. Buffenstein, W. A. Buttemer // *Physiol Rev.* – 2007. – V. 87, № 4. – P. 1175–213.

174. Muller F. L. Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production / F. L. Muller, W. Song, Y. C. Jang [et al.] // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2007. – V. 293, № 3. – P. 1159–68.

175. Van Remmen H. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging /

H. Van Remmen, Y. Ikeno, M. Hamilton [et al.] // *Physiol Genomics*. – 2003. – V. 16, № 1. – P. 29–37.

176. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains / L. Hayflick // *Exp Cell Res*. – 1965. – V. , № 37. – P. 614–36.

177. Campisi J. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals / J. Campisi // *Cell*. – 2005. – V. 120, № 4. – P. 513–22.

178. Campisi J. Cell senescence: role in aging and age-related diseases / J. Campisi, L. Robert // *Interdiscip Top Gerontol*. – 2014. – V. ,№ 39. – P. 45–61.

179. Schneider E. L. The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age / E. L. Schneider, Y. Mitsui // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1976. – V. 73, № 10. – P. 3584–8.

180. Allsopp R. C. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts / R. C. Allsopp, H. Vaziri, C. Patterson [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1992. – V. 89, № 22. – P. 10114–8.

181. Bierman E. L. The effect of donor age on the in vitro life span of cultured human arterial smooth-muscle cells / E. L. Bierman // *In Vitro*. – 1978. – V. 14, № 1. – P. 951–5.

182. Bruce S. A. In vitro senescence of Syrian hamster mesenchymal cells of fetal to aged adult origin. Inverse relationship between in vivo donor age and in vitro proliferative capacity / S. A. Bruce, S. F. Deamond, P. O. Ts'o // *Mech Ageing Dev*. – 1986. – V. 34, № 2. – P. 151–73.

183. Jiang H. Proteins induced by telomere dysfunction and DNA damage represent biomarkers of human aging and disease / H. Jiang, E. Schiffer, Z. Song [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2008. – V. 105, № 32. – P. 11299–304.

184. Song Z. Lifestyle impacts on the aging-associated expression of biomarkers of DNA damage and telomere dysfunction in human blood / Z. Song, G. von Figura, Y. Liu [et al.] // *Aging Cell*. – 2010. – V. 9, № 4. – P. 607–15.

185. Shamas M. A. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging / M. A. Shamas // *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. – 2011. – V. 14, № 1. – P. 28–34.

186. Fick L. J. Telomere length correlates with life span of dog breeds / L. J.

Fick, G. H. Fick, Z. Li [et al.] // *Cell Rep.* – 2012. – V. 2, № 6. – P. 151–73.

187. Van der Harst P. Telomere length of circulating leukocytes is decreased in patients with chronic heart failure / P. van der Harst, G. van der Steege, R. A. de Boer [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* – 2007. – V. 49, № 13. – P. 1459–64.

188. Fitzpatrick A. L. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study / A. L. Fitzpatrick, R. A. Kronmal, J. P. Gardner [et al.] // *Am J Epidemiol.* – 2007. – V. 165, № 1. – P. 14–21.

189. Zee R. Y. Association of shorter mean telomere length with risk of incident myocardial infarction: a prospective, nested case-control approach / R. Y. Zee, S. E. Michaud, S. Germer, P. M. Ridker // *Clin Chim Acta.* – 2009. – V. 403, № 1–2. – P. 139–41.

190. Sampson M.. J. Monocyte telomere shortening and oxidative DNA damage in type 2 diabetes / M.J. Sampson, M.C. Winterbone, J.C. Hughes [et al.] // *Diabetes Care.* – 2006. – V. 29, № 2. – P. 283–9.

191. Valdes A. M. Telomere length in leukocytes correlates with bone mineral density and is shorter in women with osteoporosis / A.M. Valdes, J.B. Richards, J.P. Gardner [et al.] // *Osteoporos Int.* – 2007. – V. 18, № 9. – P. 1203–10.

192. Greider C. W. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts / C.W. Greider, E.H. Blackburn // *Cell.* – 1985. – V. 43, № 2. – P. 405–13.

193. Bodnar A. G. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells / A.G. Bodnar, M. Ouellette, M. Frolkis [et al.] // *Science.* – 1998. – V. 279, № 5349. – P. 349–52.

194. Mao L. Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues / L. Mao, A.K. El-Naggar, Y.H. Fan [et al.] // *Cancer Res.* – 1996. – V. 56, № 24. – P. 5600–4.

195. Kannan S. Telomerase activity in premalignant and malignant lesions of human oral mucosa / S. Kannan, H. Tahara, H. Yokozaki [et al.] // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 1997. – V. 6, № 6. – P. 413–20.

196. Liao J. Telomerase activity in oral and maxillofacial tumors / J. Liao, T.

Mitsuyasu, K. Yamane, M. Ohishi // *Oral Oncol.* – 2000. – V.36, № 4. – P. 347–52.

197. Miyazaki Y. Telomerase activity in the occurrence and progression of oral squamous cell carcinoma / Y. Miyazaki, N. Yoshida, T. Nozaki [et al.] // *J Oral Sci.* – 2015. – V.57, № 4. – P. 295–303.

198. van Waarde-Verhagen M. A. Continuous growth of telomerase-immortalised fibroblasts: how long do cells remain normal / M.A. van Waarde-Verhagen, H.H. Kampinga, M.H. Linskens // *Mech Ageing Dev.* – 2006. – V.127, № 1. – P. 85–7.

199. Dilman V. M. Neuroendocrine-ontogenetic mechanism of aging: toward an integrated theory of aging / V.M. Dilman, S.Y. Revskoy, A.G. Golubev // *Int Rev Neurobiol.* – 1986. – №28. – P. 89–156.

200. Dilman V. M. Hypothalamic mechanisms of ageing and of specific age pathology--I. Sensitivity threshold of hypothalamo-pituitary complex to homeostatic stimuli in the reproductive system / V.M. Dilman, V.N. Anisimov // *Exp Gerontol.* – 1979. – V.14, № 4. – P.161–74.

201. Nair N. P. Plasma melatonin—an index of brain aging in humans / N.P. Nair, N. Hariharasubramanian, C. Pilapil [et al.] // *Biol Psychiatry.* – 1986. – V.21, № 2. – P. 141–50.

202. Dilman V. M. Hypothalamic mechanisms of ageing and of specific age pathology–III. Sensitivity threshold of hypothalamo-pituitary complex to homeostatic stimuli in energy systems / V.M. Dilman, J.F. Bobrov, M.N. Ostroumova [et al.] // *Exp Gerontol.* – 1979. – V.14, № 5. – P. 217–24.

203. Dilman V. M. Hypothalamic mechanisms of ageing and of specific age pathology–II. on the sensitivity threshold of hypothalamo–pituitary complex to homeostatic stimuli in adaptive homestasis / V.M. Dilman, M.N. Ostroumova, E.V. Tsyrlina // *Exp Gerontol.* – 1979. – V.14, № 5. – P. 175–81.

204. Kirkwood T. B. Why do we age / T.B. Kirkwood, S.N. Austad // *Nature.* – 2000. – V.408, № 6809. – P. 233–8.

205. Kotsis V. Early vascular aging and the role of central blood pressure / V. Kotsis, S. Stabouli, I. Karafillis, P. Nilsson // *J Hypertens.* – 2011. – V.29, № 10. –

P.1847–53.

206. Ткаченко М. М. Ендотелійзалежні скорочувальні реакції судинних гладеньких м'язів і вміст вільних радикалів кисню у щурів за умов старіння / М.М. Ткаченко, В.Ф. Сагач, А.В. Коцюрба [та ін.] // Фізіол журн. – 2002. – Т.48, № 4. – Ст. 3–13.

207. Коркушко О.В. / Возрастные изменения микроциркуляции слизистой оболочки желудка: роль эндотелиальной дисфункции // О.В. Коркушко, В.Б. Шатило, Ю.В. Гавалко [и др. ] // Кровообіг та гемостаз. – 2015. – № 1-2. – С. 44–48.

208. Коркушко О.В. Возрастные изменения реологических свойств крови и состояния эндотелиальной функции микроциркуляторного сосудистого русла / О.В. Коркушко, Г.В. Дужак // Проблемы старения и долголетия. – 2011. – Т. 20, № 1. – С. 35–52.

209. Коркушко О.В. Возрастные особенности функционального состояния эндотелия сосудов / О.В. Коркушко, В.Ю. Лишневская, Г.В. Дужак // Кровообіг та гемостаз. – 2007. – № 4. – С. 5–11.

210. Коркушко, О. В. Деякі механізми розвитку ендотеліальної дисфункції при старінні / О. В. Коркушко, В. Ф. Сагач, В. Ю. Лішневська // Фізіол журн. – 2004. – №2. – С.43–49.

211. Безруков В.В. Вікові особливості порушень функції ендотелію та їх фармакологічна корекція (експериментальне дослідження) / В.В. Безруков, Н.В. Сикало, О.К. Кульчицький [та ін.] // Журн. АМН України. – 2005. – Т. 11, № 1. – С. 128–135.

212. Egashira K. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans / K. Egashira, T. Inou, Y. Hirooka [et al.] // Circulation. –1993. – V.88, № 1. – P. 77–81.

213. Taddei S. Hatake K. Effect of aging on endothelium-dependent vascular relaxation of isolated human basilar artery to thrombin and bradykinin / K. Hatake, E. Kakishita, I. Wakabayashi [et al.] // Stroke. –1990. – V.21, № 7. –P. 1039–43.

214. Singh N. Ageing is associated with impairment of nitric oxide and

prostanoid dilator pathways in the human forearm / N. Singh, S. Prasad, D.R. Singer, R.J. MacAllister // Clin Sci (Lond). –2002. – V.102, № 5. –P. 595–600.

215. Brandes R. P. Endothelial aging / R.P. Brandes, I. Fleming, R. Busse.// Cardiovasc Res. – 2005. – V.66, № 2. – P. 286–94.

216. Santhanam L. Arginase and vascular aging / L. Santhanam, DW Christianson, D. Nyhan, D.E. Berkowitz // J Appl Physiol (1985). – 2008. – V.105, № 5. – P. 1632–42.

217. Holowatz L. A. L-Arginine supplementation or arginase inhibition augments reflex cutaneous vasodilatation in aged human skin / L.A. Holowatz, C.S. Thompson, WL Kenney // J. Physiol. –2006. – V.574, № 2. – P. 573–81.

218. Higashi Y. Tetrahydrobiopterin improves aging-related impairment of endothelium-dependent vasodilation through increase in nitric oxide production / Y. Higashi, S. Sasaki, K. Nakagawa [et al.] // Atherosclerosis. – 2006. – V.186, № 2. – P. 390–5.

219. Cooke J. P. ADMA: its role in vascular disease / J.P. Cooke // Vasc Med. – 2005. – V.10, № 1. – P. S11–7.

220. Schulze F. Determination of a reference value for N(G), N(G) –dimethyl–L-arginine in 500 subjects / F. Schulze, R. Maas, R. Freese [et al.] // Eur J Clin Invest. –2005. – V.35, № 10. – P. 622–6.

221. Bode–Böger S. M. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) accelerates cell senescence / S.M. Bode–Böger, F. Scalera, J. Martens–Lobenhoffer // Vasc Med. – 2005. – V.10, № 1. – P.65–71.

222. Cernadas M. R. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats / M.R. Cernadas, L. Sánchez de Miguel [et al.] // Circ Res. –1998. – V.83, № 3. – P. 279–86.

223. Barton M. Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin / M. Barton, F. Cosentino, R.P. Brandes [et al.] // Hypertension. –1997. – V.30, № 4. – P. 817–24.

224. Tang E. H. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and

hypertension / E.H. Tang, P.M. Vanhoutte // *Physiol Genomics*. – 2008. – V.32, № 3. – P. 409–18.

225. Donato A. J. Vascular endothelial dysfunction with aging: endothelin – 1 and endothelial nitric oxide synthase / A.J. Onato, L.B. Gano, I. Eskurza [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. –2009. – V.297, № 1. – P. 425–32.

226. Rodríguez–Mañas L. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation / L. Rodríguez–Mañas, M. El–Assar, S. Vallejo [et al.] // *Aging Cell*. –2009. – V.8, № 3. – P. 226–38.

227. Soucy K. G. Impaired shear stress–induced nitric oxide production through decreased NOS phosphorylation contributes to age-related vascular stiffness / K.G. Soucy, S. Ryoo, A. Benjo [et al.] // *J Appl Physiol* (1985). –2006. – V.101, № 6. – P. 1751–9.

228. LeBlanc A. J. Age impairs Flk–1 signaling and NO–mediated vasodilation in coronary arterioles / A.J. LeBlanc, R.D. Shipley, L.S. Kang, J.M. Muller-Delp // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. –2008. – V.295, № 6. – P. 2280–8.

229. Сагач В. Ф. Вплив еналаприлу на синтез оксиду азоту, окисний метаболізм і тонус судин у старих щурів / В.Ф. Сагач, О.В. Базілюк, Л.Г. Степаненко [ та ін.] // *Фізіол журн*. – 2007. – Т. 53, № 4. – Ст. 15–26.

230. Bevers L. M. Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase / L.M. Bevers, B. Braam, J.A. Post [et al.] // *Hypertension*. – 2006. – V.47, № 1. – P. 87–94.

231. Oudot A. NADPH oxidases are in part responsible for increased cardiovascular superoxide production during aging / A. Oudot, C. Martin, D. Busseuil [et al.] // *Free Radic Biol Med*. –2006. –V.40, № 12. – P. 2214–22.

232. Guzik T. J. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase / T.J. Guzik, S. Mussa, D. Gastaldi [et al.] // *Circulation*. – 2002. – V.105, № 14. – P. 1656–62.

233. Lassègue B. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature / B. Lassègue, K.K. Griendling // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2010. –

V.30, № 4. – P. 653–61.

234. Cai H. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress / H. Cai, DG Harrison // *Circ Res.* – 2000. – V.87, № 10. – P. 840–4.

235. Newaz M. A. Oxidative stress-associated vascular aging is xanthine oxidase-dependent but not NAD(P)H oxidase-dependent / M.A. Newaz, Z. Yousefipour, A. Oyekan // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 2006. – V.48, № 3. – P. 88–94.

236. Pang C. Y. MtDNA mutations, functional decline and turnover of mitochondria in aging / C.Y. Pang, Y.S. Ma, Y.U. Wei // *Front Biosci.* – 2008. – V.13, – P. 3661–75.

237. Francia P. Deletion of p66shc gene protects against age-related endothelial dysfunction / P. Francia, C. delli Gatti, M. Bachschmid [et al.] // *Circulation.* – 2004. – V.110, № 18. – P. 2889–95.

238. Donato A. J. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB / A.J. Donato, I. Eskurza, A.E. Silver [et al.] // *Circ Res.* – 2007. – V.100, № 11. – P. 1659–66.

239. Vanhoutte P. M. Endothelium-dependent contractions in hypertension / P.M. Vanhoutte, M. Feletou, S. Taddei // *Br J Pharmacol.* – 2005. – V.144, № 4. – P. 449–58.

240. Korzick D. H. Exaggerated coronary vasoreactivity to endothelin-1 in aged rats: role of protein kinase C / D.H. Korzick, J.M. Muller-Delp, P. Dougherty [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 2005. – V.66, № 2. – P. 384–92.

241. Schrage W. G. Ageing reduces nitric-oxide- and prostaglandin-mediated vasodilatation in exercising humans / W.G. Schrage, J.H. Eisenach, M.J. Joyner // *J Physiol.* – 2007. – V.579, № 1. – P. 227–36.

242. Vanhoutte P. M. Endothelium-dependent contractions in hypertension / P.M. Vanhoutte, M. Feletou, S. Taddei // *Br J Pharmacol.* – 2005. – V.144, № 4. – P. 449–58.

243. Upmacis R. K. Oxidative alterations of cyclooxygenase during atherogenesis / R.K. Upmacis, R.S. Deeb, D.P. Hajjar // *Prostaglandins Other Lipid*



Mediat. – 2006. – V.80, – № 12. – P. 1–14.

244. Masaki T. Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. Implications for vascular function / T. Masaki, S. Kimura, M. Yanagisawa, K. Goto // *Circulation*. – 1991. – V.84, № 4. – P. 1457–68.

245. Lüscher T. F. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs / T.F. Lüscher, M. Barton // *Circulation*. – 2000. – V.102, № 19. – P. 2434–40.

246. Haynes W. G. Endothelin ETA and ETB receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo / W.G. Haynes, F.E. Strachan, D.J. Webb // *Circulation*. – 1995. – V.92, № 3. – P. 357–63.

247. Tsukahara H. Molecular and functional characterization of the non-isopeptide-selective ETB receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase / H. Tsukahara, H. Ende, H.I. Magazine [et al.] // *J Biol Chem*. – 1994. – V.269, № 34. – P. 21778–85.

248. Donato A. J. Vascular endothelial dysfunction with aging: endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase / A.J. Donato, L.B. Gano, I. Eskurza [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2009. – V.297, № 1. – P. 425–32.

249. Donato A. J. The effects of aging and exercise training on endothelin-1 vasoconstrictor responses in rat skeletal muscle arterioles / A.J. Donato, L.A. Lesniewski, M.P. Delp // *Cardiovasc Res*. – 2005. – V.66, № 2. – P. 393–401.

250. Thijssen D. H. Enhanced endothelin-1-mediated leg vascular tone in healthy older subjects / D.H. Thijssen, G.A. Rongen, A. van Dijkxeye [et al.] // *J Appl Physiol*. (1985). – 2007. – V.103, № 3. – P. 852–7.

251. Vaitkevicius P. V. Effects of age and aerobic capacity on arterial stiffness in healthy adults / PV Vaitkevicius, JL Fleg, JH Engel [et al.] // *Circulation*. – 1993. – V.88, № 4. – P. 1456–62.

252. Avolio A. Genetic and environmental factors in the function and structure of the arterial wall / A. Avolio // *Hypertension*. – 1995. – V.26, № 1. – P. 34–7.

253. Zureik M. Cross-sectional and 4-year longitudinal associations between brachial pulse pressure and common carotid intima-media thickness in a general

population. The EVA study / M. Zureik, P.J. Touboul, C. Bonithon-Kopp [et al.] // *Stroke*. – 1999. – V.30, № 3. – P. 550–5.

254. Sesso H. D. Systolic and diastolic blood pressure, pulse pressure, and mean arterial pressure as predictors of cardiovascular disease risk in Men / H.D. Sesso, M.J. Stampfer, B. Rosner [et al.] // *Hypertension*. – 2000. – V.36, № 5. – P. 801–7.

255. Коркушко О. В. Вікові зміни структурно–функціонального стану серця / О. В. Коркушко, І. В. Долот // *Фізіол журн*. – 2001. – Т.47, № 1. – Ст. 26–33.

256. Коркушко О. В. Резервные возможности основных функций сердечно-сосудистой системы при старении / О. В. Коркушко, Ю. Т. Ярошенко // *Пробл старения и долголетия*. – 2012. – Т. 21, № 2. – Ст. 119–52.

257. Lakatta E. G. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease / E.G. Lakatta, D. Levy // *Circulation*. – 2003. – V.107, № 2. – P. 346–54.

258. Фролькис В.В. Кровообращение и старение / В.В. Фролькис, В.В. Безруков, В.Г. Шевчук // М.: Ленинград : Наука, ЛО, 1984 . – 216 с.

259. Schulman S. P. Age-related decline in left ventricular filling at rest and exercise / S.P. Schulman, E.G. Lakatta, J.L. Fleg [et al.] // *Am J Physiol*. – 1992. – V.263, № 6. – P. 1932–8.

260. Hollingsworth K. G. Left ventricular torsion, energetics, and diastolic function in normal human aging / K.G. Hollingsworth, A.M. Blamire, B.D. Keavney, G.A. Macgowan // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2012. – V.302, № 4. – P. 885–92.

261. Schmidt U. In vivo gene transfer of parvalbumin improves diastolic function in aged rat hearts / U. Schmidt, X. Zhu, D. Lebeche [et al.] // *Cardiovasc Res*. – 2005. – V.66, № 2. – P. 318–23.

262. Dai D. F. Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging / D.F. Dai, L.F. Santana, M. Vermulst [et al.] // *Circulation*. – 2009. – V.119, № 21. – P. 2789–97.

263. Garcia M. J. New Doppler echocardiographic applications for the study of

diastolic function / M.J. Garcia, J.D. Thomas, A.L. Klein // *J Am Coll Cardiol.* –1998. – V.32, № 4. – P. 865–75.

264. Гошовська Ю.В. Зміни експресії генів UCP2 та UCP3, функціонального стану і кисневої вартості роботи міокарда в умовах старіння та ішемії–реперфузії / Ю.В. Гошовська, О.О. Лісовий, Т.В. Шиманська, В.Ф. Сагач // *Фізіол журн.* – 2009. –Т.55, № 3. – Ст. 26–36.

265. Asp M. L. Calcium mishandling in diastolic dysfunction: mechanisms and potential therapies / M.L. Asp, J.J. Martindale, F.I. Heinis [et at.] // *Biochim Biophys Acta.* –2013. – V.1833, № 4. – P. 895–900.

266. Tian R. Thermodynamic limitation for Ca<sup>2+</sup> handling contributes to decreased contractile reserve in rat hearts / R. Tian, JM Halow, M. Meyerxy [et al.] // *Am J Physiol.* – 1998. – V.275, № 6. – P. 2064–71.

267. Taffet G. E. CaATPase content is lower in cardiac sarcoplasmic reticulum isolated from old rats / G.E. Taffet, C.A. Tate // *Am J Physiol.* – 1993. – V.264, № 5. – P. 1609–14.

268. Marín–García J. Mitochondrial centrality in heart failure / J. Marín–García, M.J. Goldenthal // *Heart Fail Rev.* – 2008. – V.13, № 2. – P.137–50.

269. Asakura M. Global gene expression profiling in the failing myocardium / M. Asakura, M. Kitakaze // *Circ J.* –2009. – V.73, № 9. – P. 1568–76.

270. Brink T. C. Age–related transcriptional changes in gene expression in different organs of mice support the metabolic stability theory of aging / T.C. Brink, L. Demetrius, H. Lehrach, J.H. Adjaye // *Biogerontology.* – 2009. –V.10, № 5. – P. 549–64.

271. AGEMAP: a gene expression database for aging in mice. [Електронний ресурс] / [J. M. Zahn, S. Poosala, A. B. Owen та ін.] // *PLoS Genet.* – 2007. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=PMC2098796>.

272. Moslehi J. Telomeres and mitochondria in the aging heart / J. Moslechi, R.A. DePinho, E. Sahin // *Circ Res.* – 2012. –V.110, № 9. – P. 1226–37.

273. Burlew B. S. Diastolic dysfunction in the elderly–the interstitial issue / B.S. Burlew // *Am J Geriatr Cardiol.* –2004. – V.13, № 1. – P. 29–38.

274. Siwik D. A. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts / D.A. Siwik, P.J. Pagano, W.S. Colucci // *Am J Physiol Cell Physiol* – 2001. – V.280, № 1. – P. 53–60.
275. Yu M. Inhibitory effects of enalaprilat on rat cardiac fibroblast proliferation via ROS/P38MAPK/TGF- $\beta$ 1 signaling pathway / M. Yu, Y. Zheng, H.X. Sun, D.J. Yu. // *Molecules*. – 2012. – V.17, № 3. – P. 2738–51.
276. Biernacka A. Aging and Cardiac Fibrosis / A. Biernacka, N.G. Frangogiannis // *Aging Dis.* – 2011. – V.2, № 2. – P. 158–173.
277. Robert V. Differential regulation of matrix metalloproteinases associated with aging and hypertension in the rat heart / V. Robert, S. Besse, A. Sabri [et al.] // *Lab Invest.* – 1997. – V.76, № 5. – P. 729–38.
278. Семенихіна О.М. Механізми впливу сірководню на скоротливу активність гладеньких м'язів судин щурів / О.М. Семенихіна, О.В. Базілюк, Ю.П. Коркач, В.Ф. Сагач // *Фізіол журн.* – 2011. – Т.57, № 4. – Ст. 3–11.
279. Rashid S. Hydrogen sulphide-induced relaxation of porcine peripheral bronchioles / S. Rashid, J.K. Heer, M.J. Garle [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2013. – V.168, № 8. – P.1902–10.
280. Teague B. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility / B. Teague, S. Asiedu, P.K. Moore // *Br J Pharmacol.* – 2002. – V.137, № 2. – P.139–45.
281. Burkhoff D. Assessment of systolic and diastolic ventricular properties via pressure–volume analysis: a guide for clinical, translational, and basic researchers / D. Burkhoff, I. Mirsky, H. Suga // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2005. – V.289, № 2. – P. 501–12.
282. Pacher P. Measurement of cardiac function using pressure–volume conductance catheter technique in mice and rats / P. Pacher, T. Nagayama, P. Mukhopadhyay [et al.] // *Nat Protoc.* – 2008. – V.3, № 9. – P. 1422–34.
283. Suga H. Graphical estimation of ventricular wall force and stress from pressure–volume diagram / H. Suga, K. Sagawa // *Am J Physiol.* – 1979. – V.236, № 6. – P. 787–9.

284. Suga H. How we view systolic function of the heart: Emax and PVA. – In: Systolic and diastolic function of the heart / H. Suga // Amsterdam: IOS Press and Ohmsha. – 1995. – P. 215–225.
285. Suga H. Ventricular energetics / H. Suga // *Physiol Rev.* – 1990. – V. 70, № 2. – P. 247–77.
286. Костерин С. А. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия / С.А.Костерин, Н.Ф. Браткова, М.Д. Курский // *Биохимия.* – 1985. – Т. 50, № 8. – С. 1350–1361.
287. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // *J Biol Chem.* – 1951. – V. 193, № 1. P. 265–75.
288. Salter M. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of  $\text{Ca}^{2+}$  dependent and  $\text{Ca}^{2+}$  independent nitric oxide syntases / M. Salter, R.G. Knowles, S. Moncada // *FEBS Lett.* – 1991. – V. 291, № 1. – P. 145–149.
289. Chin S. Y. Increased activity and expression of  $\text{Ca}^{2+}$  dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats / S.Y. Chin, K.N. Pandey, S.J. Shi, H. Kobori [et al.] // *Amer J Physiol.* – 1999. – V. 277, № 5. – P. 797–804.
290. Green L. L. Analysis of nitrate, nitrite and [ $+5\text{N}$ ] nitrate in biological fluids / L.L. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski [et al.] // *Anal Biochem.* – 1982. – V. 126, № 1. – P. 131–138.
291. Tsukahara H. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats / H. Tsukahara, M. Miura, S. Tsuchida [et al.] // *Am J Physiol.* – 1996. – V. 270, № 5. – P. 840–845.
292. Boyde J. R. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime / J.R. Boyde, M. Rahmotullah // *Anal Biochem.* – 1980. – V. 107. – P. 424–431.
293. McCord J. M. The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia / J.M. McCord, R.S. Roy // *Can J Physiol Pharmacol.* – 1982. – V. 60, № 11. – P. 1346–1352.
294. Forman H. J. Superoxide dismutase: a comparison of rate constants / H.J.

Forman, I. Fridovich // Arch Biochem Biophys. – 1973. – V.158, № 1. – P.396–400.

295. Huwiler M. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / iodide system / M. Huwiler, H. Kohler // Eur J Biochem. – 1984. – V.141, № 1. – P.69–74.

296. Halliwell B. Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biomedical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation / B. Halliwell, M. Grootveld, J.M. Gutteridge // Methods Biochem Anal. – 1988. – № 33. – P.59–90.

297. Шаріпов Р.Р. Фокальна ішемія–реперфузія головного мозку викликає зниження стійкості до кислотного гемолізу еритроцитів венозної крові, яке запобігається дією екдистерону / Р.Р. Шаріпов, А.В. Коцюрuba, Б.С. Коп'як, В.Ф. Сагач // Фізіол журн. – 2015. – Т.61, № 5. – Ст. 3–11

298. Гаврилов В. Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / В.Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, Н.Ф. Хмара // Лаб. дело. – 1988. – № 2. – С.60–64.

299. Conte D. In vivo and in vitro iron replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage / D. Conte, K. S. Narindrasorasa, B. Sarkar // Eur J Biochem. – 1996. – V.271, № 9. – P. 5125–5130.

300. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Anal Biochem. – 1976. – V. 72 – P. 248 – 254.

301. Svenson A. A rapid and sensitive spectrophotometric method for determination of hydrogen sulfide with 2,2'-dipyridyl disulfide / A. A. Svenson // Anal Biochem. – 1980. – V. 107 – P. 51 – 55.

302. Заїчко Н. В. Визначення вмісту гідроген сульфїду в сироватці крові / Н. В. Заїчко, Н. О. Пентюк, Л. О. Пентюк [et al.] // Вісник наукових досліджень. – 2009. – Т. 1, № 54. – Ст. 29–32.

303. Calvert J. W. Genetic and pharmacologic hydrogen sulfide therapy attenuates ischemia-induced heart failure in mice / J. W. Calvert, M. Elston, C. K. Nicholson [et al.] // Circulation. – 2010. – V. 122, № 1. – P. 11–9.

304. Elrod J. W. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function / J. W. Elrod, J. W. Calvert, J. Morrison [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2007. – V. 104, № 39. – P. 15560–5.

305. Brown W. J. Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function / W. J. Brown, K. Chambers, A. Doody // Traffic. – 2003. – V. 4, № 4. – P. 214–21.

306. Greenberg M. E. The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes / M. E. Greenberg, X. M. Li, B. G. Gugu [et al.] // J Biol Chem. – 2008. – V. 283, № 4. – P. 2385–96.

307. Shelat P. B. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons / P. B. Shelat, M. Chalimoniuk, J. H. Wang [et al.] // J Neurochem. – 2008. – V. 106, № 1. – P. 45–55.

308. Schreiber J. The oxidation of arachidonic acid by the cyclooxygenase activity of purified prostaglandin H synthase: spin trapping of a carbon-centered free radical intermediate / J. Schreiber, T. E. Eling, R. P. Mason // Arch Biochem Biophys. – 1986. – V. 249, № 1. – P. 126–36.

309. Kontos H. A. Oxygen radicals from arachidonate metabolism in abnormal vascular responses / H. A. Kontos // Am Rev Respir Dis. – 1987. – V. 136, № 2. – P. 474–7.

310. Pryor W. A. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide / W. A. Pryor, G. L. Squadrito // Am J Physiol. – 1995. – V. 268, № (5 Pt 1). – P. 699–722.

311. Jensen F. B. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: a comparative perspective. [Электронный ресурс] / Jensen // Biochim Biophys Acta. – 2009. – Режим доступа до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+role+of+nitrite+in+nitric+oxide+homeostasis%3A+a+comparative+perspective>.

312. Kleinbongard P. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase

activity in mammals / P. Kleinbongard, A. Dejam, T. Lauer [et al.] // *Free Radic Biol. Med.* – 2003. – V. 35, № 7. – P. 790–6.

313. Luo S. Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling / S. Luo, H. Lei, H. Qin, Y. Xia // *Curr Pharm Des.* – 2014. . – V. 20, № 22. . – P. 3548–53.

314. Schiffrin E. L. Oxidative stress, nitric oxide synthase, and superoxide dismutase: a matter of imbalance underlies endothelial dysfunction in the human coronary circulation / E. L. Schiffrin // *Hypertension.* – 2008. – V. 51, № 1. – P. 31–2.

315. Сагач В.Ф. Старіння підвищує чутливість до індукторів мітохондріальної пори в серці щурів / В.Ф. Сагач, Г.Л. Вавілова, Н.А. Струтинська, О.В. Рудик // *Фізіол журн.* – 2004. – Т. 50, № 2. – Ст. 49–63.

316. Preston C. C. Aging-induced alterations in gene transcripts and functional activity of mitochondrial oxidative phosphorylation complexes in the heart / C. C. Preston, A. S. Oberlin, E. L. Holmuhamedov [et al.] // *Mech Ageing Dev.* – 2008. – № 129. – P. 304–12.

317. Desler C. Is There a Link between Mitochondrial Reserve Respiratory Capacity and Aging? / C. Desler, T. L. Hansen, J. B. Frederiksen [et al.] // *J Aging Res.* – 2012. – № 2012. – P.192503.

318. Geng B. H<sub>2</sub>S generated by heart in rat and its effects on cardiac function / B. Geng, J. Yang, Y. Qi [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2004. – № 313. – P. 362–8.

319. Paulus W. J. Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion. [Електронний ресурс] / W. J. Paulus, P. J. Vantrimpont, A. M. Shah // *Circulation.* – 1994. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Acute+effects+of+nitric+oxide+on+left+ventricular+relaxation+and+diastolic+distensibility+in+humans.+Assessment+by+bicoronary+sodium+nitroprusside+infusion>.

320. cGMP-dependent protein kinase decreases calcium sensitivity of skinned cardiac fibers. [Електронний ресурс] / G.Pfitzer, J. C. Rüegg, V. Flockerzi, F.



Hofmann // FEBS Lett. – 1982. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6185364>.

321. Van Hove C. E. Vasodilator efficacy of nitric oxide depends on mechanisms of intracellular calcium mobilization in mouse aortic smooth muscle cells / C. E. Van Hove, C. Van der Donckt, A. G. Herman [et al.] // Br J Pharmacol. – 2009. – V. 158, № 3. – P. 920–30.

322. Soloviev A. Nitric oxide relaxes rat tail artery smooth muscle by cyclic GMP-independent decrease in calcium sensitivity of myofilaments / A. Soloviev, V. Lehen'kyi, S. Zelensky, P. Hellstrand // Cell Calcium. – 2004. – V. 36, № 2. – P. 165–73.

323. Perluigi M. 4-Hydroxy-2-Nonenal, a Reactive Product of Lipid Peroxidation, and Neurodegenerative Diseases: A Toxic Combination Illuminated by Redox Proteomics Studies / M. Perluigi, R. Coccia, D.A. Butterfield // Antioxid Redox Signal. – 2012. – V. 17, № 11. – P.1590–1609.

324. Glutathionylation mediates angiotensin II-induced eNOS uncoupling, amplifying NADPH oxidase-dependent endothelial dysfunction. [Електронний ресурс] / [K. K. Galougahi, C. C. Liu, C. Gentile та ін.] // J Am Heart Assoc. – 2014. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Galougahi+K.+K.+Glutathionylation+mediates+angiotensin+II-induced+eNOS+uncoupling%2C+amplifying+NADPH+oxidase-dependent+endothelial+dysfunction>.

325. Sullivan-Gunn M. J. Elevated hydrogen peroxide and decreased catalase and glutathione peroxidase protection are associated with aging sarcopenia [Електронний ресурс] / M. J. Sullivan-Gunn, P. A. Lewandowski // BMC Geriatr. – 2013. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24093947>.

326. Sohal R. S. Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP+ and NADH/NAD+ in Drosophila melanogaster / R. S. Sohal, L. Arnold, W. C. Orr // Mech Ageing Dev. – 1990. – V. 56, № 3. – P. 223–35.

327. Tian L. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging / L. Tian, Q. Cai, H. Wei // Free Radic Biol Med. – 1998. – V. 24, № 9. – P. 1477–84.