

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

Мись Лідія Анатоліївна

УДК 577.164.13: 576.311.347: 612.172

**РОЛЬ АКТИВАЦІЇ СИНТЕЗУ ЕНДОГЕННОГО СІРКОВОДНЮ У
ВІДНОВЛЕННІ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ
СИСТЕМИ СТАРИХ ЩУРІВ**

03.00.13 –фізіологія людини та тварин

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ-2021

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Науковий керівник:

член-кор. НАНУ, д.м.н., професор

Сагач Вадим Федорович

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

завідувач відділу фізіології кровообігу

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор

Янчук Петро Іванович

професор кафедри фізіології людини і тварин

ННЦ «Інститут біології та медицини»,

Київського національного університету ім. Тараса Шевченка

доктор медичних наук, професор

Шатило Валерій Броніславович

заступник директора з наукової роботи,

провідний науковий співробітник відділу клінічної

фізіології та патології внутрішніх органів

Державної установи «Інститут геронтології

імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»

Захист відбудеться « 16 » березня 2021 року о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та на сайті інституту:

http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council

Автореферат розісланий « 15 » лютого 2021 року

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01

кандидат біологічних наук



О.П. Любанова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. За останні десятиліття тривалість життя у всьому світі значно зросла (Wang H., 2012). Це в свою чергу призвело до збільшення частки населення світу старше 60 років, які зазнають погіршення самопочуття, пов'язаного з віком. Відомо, що при старінні знижуються функціональні резерви серцево-судинної системи, що підвищує ризик серцево-судинних захворювань. Тому розуміння того, що спричиняє старіння та пошук шляхів його попередження є актуальною медико-біологічною проблемою.

Останнім часом з'являється все більше даних про те, що газовий трансмітер сірководень (H_2S) має кардіопротекторні властивості (Kimura H., 2015; Donnamanna et al., 2017). У ендогенному синтезі цієї сигнальної молекули з амінокислоти L-цистеїну беруть участь такі ферменти: цистатіонін- β -синтаза (CBS), цистатіонін- γ -ліаза (CSE), а також 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза (3-MST), що кон'югована з цистеїнамінотрансферазою (CAT). CAT, CBS та CSE є піридоксаль-5-фосфатзалежними ферментами (Wang R., 2012). Піридоксаль-5-фосфат (PLP) як метаболічно активна форма вітаміну B_6 є важливим фактором обміну речовин людини. Показано, що низький вміст PLP у плазмі крові пов'язаний з більш високими показниками серцево-судинних захворювань та інсульту (Vanuzzo et al., 2007; Rimm et al., 1998).

Існують дані, які свідчать про те, що H_2S має захисну дію при ішемічно-реперфузійному пошкодженні серця та відіграє важливу роль у відновленні ендотелійзалежного розслаблення судин (Wu et al., 2015, Elrod et al., 2007; Ford et al., 2013). Відомо, що при старінні і серцево-судинній патології, яка супроводжується серцевою недостатністю, ішемією міокарда, гіпертензією і атеросклерозом, синтез сірководню в тканинах істотно знижений (Yan et al., 2004; Jiang et al., 2005). Для відновлення недостатнього синтезу H_2S найчастіше використовують донори сірководню, значне число яких розроблено в останні роки (Szabo and Parapetrovulo, 2017). Їх використання здійснює протективний або коригуючий вплив на порушення функціонального стану тканин при тій чи іншій патології, що зумовлена недостатнім синтезом H_2S (Levin et al., 2019; Zaorska et al., 2020). Однак використання донорів не впливає на причину виникнення дефіциту H_2S в тканинах, якою найчастіше є знижена експресія або активність H_2S -синтезуючих ферментів. Тому враховуючи, що коензимом ферментів синтезу сірководню є PLP ми вирішили використати його з метою відновлення активності ферментів і збільшення рівнів синтезу H_2S у старих тварин, що може бути більш природним шляхом, ніж використання донорів. Ця робота присвячена пошуку шляхів стимуляції ендогенного синтезу сірководню та його впливу на функціональний стан серцево-судинної системи у старих щурів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана відповідно до загального плану науково-дослідних робіт відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Вивчення впливу сірководню на діяльність серця, судинний тонус і функціональний стан мітохондрій», 2010-2013pp. (№ держреєстрації 0107U005336) та «Дослідження

ролі сигнальних сполук сірки в реакціях серцево-судинної системи щурів при різних станах організму», 2014-2018рр. (№ держреєстрації 0113U007276).

Мета і завдання дослідження.

Метою роботи було дослідити вплив активації синтезу ендogenousного сірководню на відновлення функціонального стану серцево-судинної системи у старих щурів.

Для досягнення даної мети було встановлено такі завдання:

1. Вивчити вплив кофактора H_2S -синтезуючих ферментів – піридоксаль-5-фосфату (PLP) на синтез сірководню та відновлення його пулів у тканинах серцево-судинної системи старих щурів.
2. Визначити експресію генів H_2S -синтезуючих ферментів (*CSE*, *3-MST*) в умовах модуляції ендogenousної продукції H_2S у серці старих щурів.
3. З'ясувати вплив PLP на показники оксидативно-нітрозативного стресу, а також конститутивного синтезу оксиду азоту в мітохондріях серця, тканинах серця та аорти старих щурів.
4. Оцінити чутливість МП до індуктора її відривання – кальцію у серці старих щурів при введенні їм PLP.
5. З'ясувати вплив PLP на показники скорочувальної функції ізольованого серця старих щурів в умовах ішемії-реперфузії.
6. Вивчити вплив PLP на ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти при старінні.

Об'єкт дослідження: функціональний стан серцево-судинної системи старих щурів в умовах активації ендogenousного синтезу сірководню.

Предмет дослідження: зміни біохімічних показників, експресії генів, що кодують H_2S -синтезуючі ферменти у тканинах серцево-судинної системи старих щурів, скорочувальної функції серця та препаратів аорти у разі дії кофактора H_2S -синтезуючих ферментів – піридоксаль-5-фосфату у старих щурів.

Методи дослідження: визначення вмісту H_2S , показників оксидативно-нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO у мітохондріях серця, тканинах серця та аорти старих щурів; експресія мРНК; виділення мітохондрій методом диференційного центрифугування; дослідження відкривання мітохондріальної пори транзиторної проникності (МП) за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання органел серця за наявності індукторів; перфузія коронарних судин ізольованого серця щурів за методом Лангендорфа; реєстрація скорочувальної активності м'язових препаратів аорти методом тензометрії.

Наукова новизна отриманих результатів. Проведене комплексне дослідження впливу PLP – кофактора H_2S -синтезуючих ферментів, на функціональний стан серця та судин при старінні. Вперше виявлено, що курсове введення PLP призводить до відновлення суттєво знижених у старих тварин концентрацій сірководню у мітохондріях серця, тканинах серця та аорти. Показано, що отримані результати можуть бути наслідком збільшення рівнів експресії генів *CSE*

та 3-MST у тканинах серця старих щурів. Вперше продемонстровано, що стимуляція ендогенного синтезу сірководню супроводжується обмеженням проявів оксидативного стресу в тканинах серця і судин при старінні, про що свідчать зниження швидкості генерації супероксидного та гідроксильного радикалів, а також зниження вмісту продуктів неферментативного окиснення ліпідів (дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду). Вперше показано, що застосування PLP у старих тварин, для стимуляції синтезу сірководню призводить до відновлення активності конститутивної NO-синтази (cNOS) і синтезу NO, а також знижує активність індукбельної NO-синтази (iNOS) у тканинах серцево-судинної системи. Нами вперше продемонстровано, що застосування PLP пригнічувало Ca^{2+} -індуковане відкривання МП та зменшувало її підвищену чутливість до індуктора у мітохондріях серця старих щурів. При цьому інгібування мітохондріального H_2S -синтезуючого ферменту 3-MST за допомогою О-СМН зменшувало протекторні ефекти PLP щодо відкривання МП у серці старих щурів, що засвідчує H_2S -залежний механізм дії PLP. Застосування PLP протягом двох тижнів сприяло кращому відновленню функції серця старих тварин після ішемії-реперфузії. Вперше показано, що введення коензиму H_2S -синтезуючих ферментів – PLP призводить до відновлення пригніченого у старих організмів ендотелійзалежного розслаблення гладеньких м'язів аорти і цей ефект скасовувався за допомогою інгібіторів NO-синтази та 3-MST.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів. Враховуючи важливу біологічну роль сигнальної молекули H_2S у регуляції фізіологічних функцій організму, а саме у зменшенні оксидативно-нітрозативного стресу, у попередженні ендотеліальної дисфункції судин та дисфункції міокарда після ішемії-реперфузії, пошук нових засобів, здатних відновлювати вміст ендогенно синтезованого сірководню при старінні, вважається важливою терапевтичною метою для зниження ризику захворюваності та смертності від серцево-судинних захворювань. Краще розуміння ролі H_2S у процесах старіння може дати уявлення про потенційні терапевтичні заходи для попередження розвитку вікових захворювань. Отримані результати щодо відновлення ендогенного синтезу H_2S внаслідок застосування PLP, як кофактора H_2S -синтезуючих ферментів, може стати наступним потужним профілактичним та терапевтичним засобом для запобігання та полегшення симптомів захворювань пов'язаних з віком.

Особистий внесок здобувача. Формулювання мети та завдання дослідження, розробка експериментальної моделі і протоколів проведення досліджень, обговорення отриманих результатів проводилися здобувачем спільно з науковим керівником чл.-кор. НАНУ, д.м.н., професором Сагачем В.Ф. Самостійно проведено аналіз літератури по темі дослідження, статистичну обробку результатів, оформлення всіх рисунків та таблиць, написання статей і тез. Вимірювання біохімічних показників, які є маркерами оксидативно-нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO, та реєстрацію скорочення-розслаблення м'язових препаратів аорти здійснено дисертантом самостійно. Решта досліджень проведено разом з співробітниками відділу фізіології кровообігу, зокрема реєстрацію відкривання мітохондріальної пори за участю ст.н.с., к.б.н. Струтинської Н.А., реєстрацію

показників скорочувальної функції ізольованого серця щурів за участю ст.н.с., к.б.н. Гошовської Ю.В., м.н.с. Федічкіної Р.А.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи були представлені на профільних наукових конференціях: IV міжнародна науково-практична конференція «Наука и медицина: современный взгляд молодежи» (20-21 апреля 2017 года, г. Алматы, Казахстан); V міжнародна науково-практична конференція студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини» (20-21 квітня 2017 року, м. Суми, Україна); 2nd Conference for Young Scientists CYS-2017 (6-9 June, 2017, Kyiv, Ukraine); 34th Meeting of the European Section of the International Society for Heart Research (24-27 July, 2017, Hamburg, Germany); Third Annual International School in Biomedical Sciences 2017 Them «Cell Function in Health and Disease» (18-20 September, 2017, Kyiv, Ukraine); 52nd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation (30 May-1 June, 2018, Barcelona, Spain); Heart Failure 2019 & 6th World Congress on Acute Heart Failure (25-28 May, 2019, Athens, Greece); XX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (27-30 травня, 2019, Київ).

Публікації. Результати досліджень опубліковано у 15 наукових працях: зокрема 5 статей у наукових фахових виданнях (з яких 1 – у міжнародних й 4 – у національних), патент на корисну модель № 122865. 25.01.2018 та 9 тез доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаної літератури, що включає в себе 224 найменувань. Основний текст роботи викладено на 109 сторінках. Загальний обсяг роботи складає 142 сторінок. Результати проілюстровано 19 рисунками та 8 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури наведено інформацію стосовно фізико-хімічних властивостей сірководню, механізми його синтезу та катаболізму. Також охарактеризована роль цього газового трансмітера у серцево-судинній системі

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проведено на 50 дорослих (6–8 міс, маса тіла 200–250 г) та 100 старих (22–24 міс, маса тіла 350–450 г) щурах-самцях лінії Вістар. Усі експериментальні процедури проводилися з урахуванням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986) та Директиви ЄС 2010/63/EU «Стосовно захисту тварин, що використовуються у наукових цілях». Протоколи експериментів були затверджені Комітетом з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (дозвіл №1/13 від 15.03.2017).

Для стимуляції ендогенного синтезу сірководню застосовували кофактор H₂S-синтезуючих ферментів – піридоксаль-5-фосфат. Його розводили в дистильованій

воді і вводили *per os* у дозі 0,7 мг/кг один раз на добу протягом 14 днів. Курсове введення PLP здійснювали старим щурам.

Виділення РНК з тканин серця та полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі. Загальну РНК виділили із тканин серця за допомогою Trizol-реагенту (Sigma-Aldrich) згідно з інструкцією виробника. Концентрацію РНК визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Зворотну транскрипцію проводили за допомогою 500-600 нг загальної РНК та гексамерного праймера, використовуючи «комплект зворотної транскрипції RevertAid» (Thermo Fisher Scientific). Комплементарна ДНК була використана як шаблон для полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі з зондом TaqMan Master Mix і праймерами для 3-MST (Rn00593744_m1, Thermo Fisher Scientific) і CSE (Rn00567128_m1, Thermo Fisher Scientific). GADHP використовувався як внутрішній контроль.

Біохімічні дослідження.

Визначення вмісту H_2S . До аліквот проб додавали 0,5 мл 1% розчину ацетату цинку, інкубували при 37,5°C протягом 10 хв, далі додавали 0,5 мл 20 ммоль/л розчину N,N-DPD (диметил-п-фенілендіамін) та 0,5 мл 30 ммоль/л розчину $FeCl_3$. Отриману суміш інкубували в холодному ($t=4^\circ C$) та темному місці протягом 10 хв та визначали оптичну густину при $\lambda=670$ нм (Svenson et al., 1980).

Визначення показників, які є маркерами оксидативно-нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO. Швидкість утворення супероксидного радикала визначали за окисненням цитохрому С (Kuthan et al., 1982). Вміст H_2O_2 досліджували лактопероксидазним методом (Huwiler et al., 1984). Швидкість генерування гідроксильного радикала ($\cdot OH$ -радикалу) визначали методом окиснення дезоксирибози (Halliwell B. et al., 1988). Вміст дієнових кон'югатів визначали спектрофотометрично за поглинанням при $\lambda=232$ нм гептанових екстрактів проб (Gavrilov et al., 1988). Вміст малонового діальдегіду визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (Mihara and Uchiyama 1978). Активність кальційзалежних конститутивних ($cNOS=eNOS+nNOS$) та кальційнезалежної $iNOS$ оцінювали за комбінацією класичного метода (Salter M. et al., 1991) та сучасної його модифікації (Chin S.Y. et al., 1999), адаптованої до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитруліну. Вміст нітрат-аніона (NO_3^-) визначали бруциновим методом у безбілкових аліквотах проб спектрофотометричним методом (Tsukahara et al. 1996), а вміст нітрит-аніона (NO_2^-) визначали за методом Гріна (Green et al. 1982).

Виділення мітохондрій та реєстрація відкривання мітохондріальної пори. Фракцію мітохондрій отримували із серця щурів за методом диференційного центрифугування у нашій модифікації (Sagach et al., 2004). Видалені серця промивали охолодженим 0,9 %-м розчином KCl, подрібнювали та гомогенізували у середовищі виділення у співвідношенні 1:9. Гомогенат центрифугували двічі при 700 і 11000g ($2^\circ C$). Мітохондріальний осад ресуспендували в середовищі ресуспендування та одразу використовували в експерименті. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі (Lowry et al., 1951).

Для дослідження відкривання МП ізольовані органели поміщали в інкубаційне середовище (кінцевий об'єм – 3 мл) і за допомогою спектрофотометра реєстрували зниження оптичної щільності при $\lambda=520$ нм протягом 15 хв. Концентрація білка становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію нативних мітохондрій в інкубаційному середовищі без індуктора МП – Ca^{2+} . Для інгібування мітохондріального H_2S -синтезуючого ферменту 3-MST використовували О-карбоксиметилгідроксиламін (О-СМН, «Sigma», США, 50 мг/кг), який вводили внутрішньочеревно за 30 хвилин до декапітації.

Реєстрація показників скорочувальної функції ізольованого серця старих щурів. Для індукції ішемії-реперфузії у серці старих щурів застосовували модель перфузії коронарних судин ізольованого серця методом Лангендорфа (Doring 1990). Серця приєднували до апарату, в якому перфузія коронарних судин здійснювалася через аорту. Для перфузії застосовували розчин Кребса-Хензелейта з постійним тиском 75-80 мм.рт.ст., при 37 °С, що містить (ммоль / л): NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO_4 – 1,2; NaHCO_3 – 24; KH_2PO_4 – 1,2; глюкоза – 10; CaCl_2 – 2,5 при $\text{pH} = 7,4$, та який аерували карбогеном (95% O_2 та 5% CO_2). Кожному серцю давали стабілізуватися протягом 20 хв. Після періоду стабілізації серця піддавали 20-хвилинній тотальній ішемії через повне перекривання перфузійного потоку з подальшим періодом 40-хвилинної реперфузії у всіх групах.

Скорочувальну функцію ізольованого серця реєстрували за допомогою латексного балончика, розміщеного у порожнині лівого шлуночка та підключеного до тензометричного датчика 746 («Мінгограф – 82», «ELeMa», Швеція) і реєстрували на комп'ютері за допомогою програмного забезпечення Global Lab. Розраховували тиск, що розвивається у лівому шлуночку, кінцево-діастолічний тиск (КДТ) та швидкісні параметри (dP/dt_{max} і dP/dt_{min}). Швидкість коронарного потоку оцінювали як об'єм перфузійного розчину, який відтікав від серця за 1 хв.

Реєстрація скорочення-розслаблення м'язових препаратів аорти. Дослідження скорочення-розслаблення інтактних м'язових препаратів судин грудного відділу аорти проводили в режимі тензометрії. Судини обережно нарізали на кільцеві препарати шириною 3-4 мм з урахуванням циркулярної орієнтації їх гладеньком'язового шару. Після цього аорту поміщали в проточну термостатовану камеру (35 – 36 °С), що була заповнена модифікованим розчином Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 133,0; NaHCO_3 – 16,3; NaH_2PO_4 – 1,38; KCl – 4,7; MgCl_2 – 1,05; глюкози – 7,8; CaCl_2 – 2,5; $\text{pH} 7,4$. Електричний сигнал з виходу механоелектричного перетворювача реєстрували за допомогою реєструючого модуля АЦП з подальшою візуалізацією та обробкою сигналів у програмі LGraph2. Для активації гладеньких м'язів (ГМ) аорти до перфузуючого розчину Кребса додавали норадреналін (НА, 10^{-5} моль/л, «Sigma», США). Реєстрували зміни тонічного напруження ГМ на ацетилхолін (АХ, 10^{-5} моль/л, "Sigma", США).

Для з'ясування ролі NO або H_2S в ендотелійзалежній вазорелаксації застосовували блокатор синтезу оксиду азоту – N-Нітро-L-аргінін метилестергідрохлорид (L-NAME, «Sigma», США, 27 мг/кг) та інгібітор ферменту

синтезу сірководню 3-MST – O-CMN (50 мг/кг), які вводили внутрішньочеревно за 30 хвилин до декапітації.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Дослідження впливу піридоксаль-5-фосфату на вміст H_2S у серцево-судинній системі старих щурів. У наших дослідженнях показано, що вміст H_2S у мітохондріях і тканинах серця та аорти істотно зменшується з віком. Встановлено, що у мітохондріях серця старих щурів він виявився у 1,9 раза нижче ($2,38 \pm 0,45$ нмоль/мг), ніж у дорослих щурів ($4,58 \pm 0,3$ нмоль/мг, $P < 0,05$) (рис. 1).

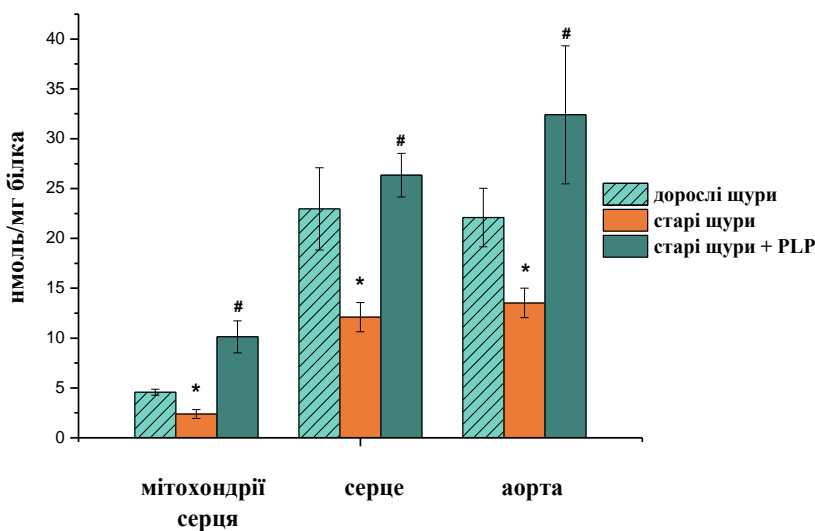


Рис. 1. Вміст H_2S у мітохондрії серця, тканинах серця та аорти старих щурів після курсового введення піридоксаль-5-фосфату (PLP).

* $P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів;

$P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Так, у тканинах серця та аорти у старих щурів вміст H_2S був удвічі та 1,6 раза нижчим відповідно, ніж у дорослих щурів. Застосування PLP призводило до зростання вмісту сірководню у мітохондріях серця у 4,2 раза ($10,13 \pm 1,6$ нмоль/мг білка у старих тварин після дії PLP, $P < 0,05$) порівняно зі старими тваринами. Щодо тканин серця та аорти, то курсове введення PLP викликало також достовірне підвищення вмісту цього трансмітера до значень контролю (дорослі тварини) ($26,35 \pm 2,18$ нмоль/мг білка у тканинах серця старих тварин після дії PLP, $P < 0,05$) та у 2,4 раза ($32,4 \pm 6,92$ нмоль/мг білка у тканинах аорти старих тварин після дії PLP, $P < 0,05$) відповідно. Таким чином, ми спостерігали відновлення синтезу ендogenous сірководню у старих тварин, ймовірно, за рахунок активації H_2S -синтизуючих ферментів кофактором PLP.

2. Визначення експресії генів CSE та 3-MST у тканинах серця старих щурів.

Встановлено зменшення вдвічі експресії гена CSE у тканинах серця старих щурів порівняно з дорослими тваринами (рис. 2, а). CSE є PLP-залежним ферментом, тому застосування цього кофактора у старих щурів відновило експресію гена цього ферменту до значень контрольної групи (дорослі тварини).

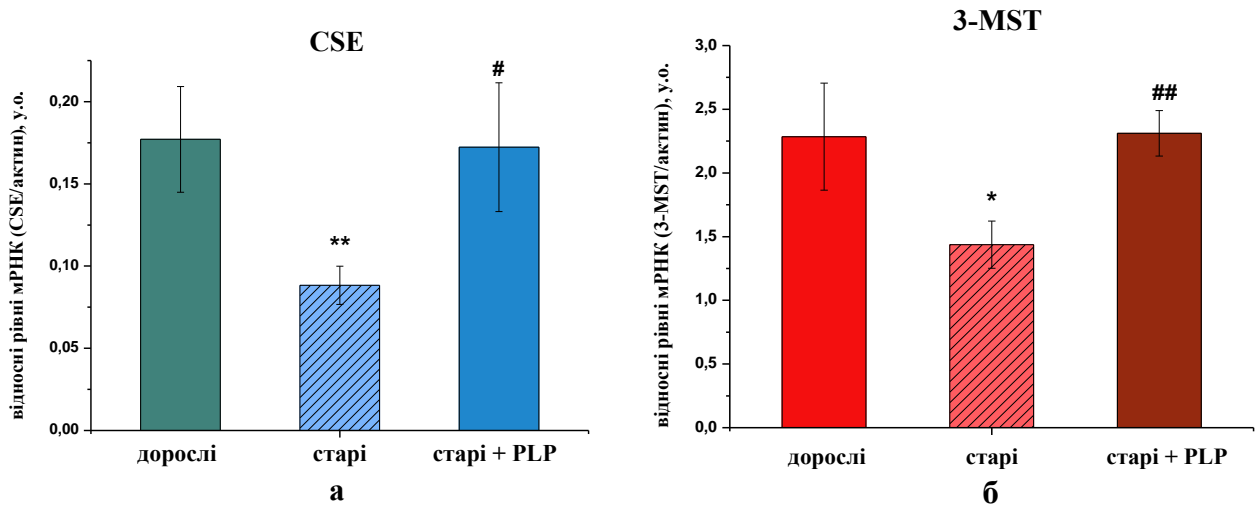


Рис. 2. Експресія генів *CSE* та *3-MST* у тканинах серця старих щурів за умов дії піридоксаль-5-фосфату (PLP). * $P < 0,05$ та ** $P < 0,01$ статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; # $P < 0,05$ та ## $P < 0,01$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

У тканинах серця старих щурів було виявлено зниження у 1,6 раза експресії гена *3-MST* відносно значень у дорослих тварин (рис. 2, б). Курсове введення PLP впродовж двох тижнів сприяло збільшенню рівня експресії *3-MST* до такого як у дорослих щурів. Хоча *3-MST* є PLP-незалежним ферментом, але він кон'югований з САТ, ферментом який для своєї роботи потребує PLP. Ми припускаємо, що збільшення експресії *3-MST* відбулося опосередковано, внаслідок активації САТ.

Таким чином, курсове введення PLP призводило до стимуляції синтезу ендогенного H_2S , збільшуючи експресію генів *CSE* та *3-MST* у тканинах серця старих щурів.

3. Зміни показників оксидативно-нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в серцево-судинній системі старих щурів за умов активації ендогенного синтезу H_2S . Як видно з рис. 3, більшість показників оксидативного стресу у мітохондріях і тканинах серця та аорти при старінні були вищими від контрольних значень, або мали тенденцію до зростання, що свідчить про посилення вільнорадикальних процесів. Виявлено, що введення PLP, кофактора H_2S -синтезуючих ферментів, зменшувало рівень окисного стресу у серцево-судинній системі старих щурів. За цих умов суттєво знижувалися такі показники – швидкість генерації супероксидного ($\bullet O_2^-$) у 3 і 2,2 раза і гідроксильного ($\bullet OH$) аніон-радикалів у 1,8 та 2,2 раза відповідно у тканинах серця та аорти порівняно з старими тваринами. Подібна тенденція дії PLP спостерігалася і у мітохондріях серця. Вміст стабільного H_2O_2 знизився до рівнів контрольних тварин в усіх зазначених тканинах та мітохондріях серця за дії PLP.

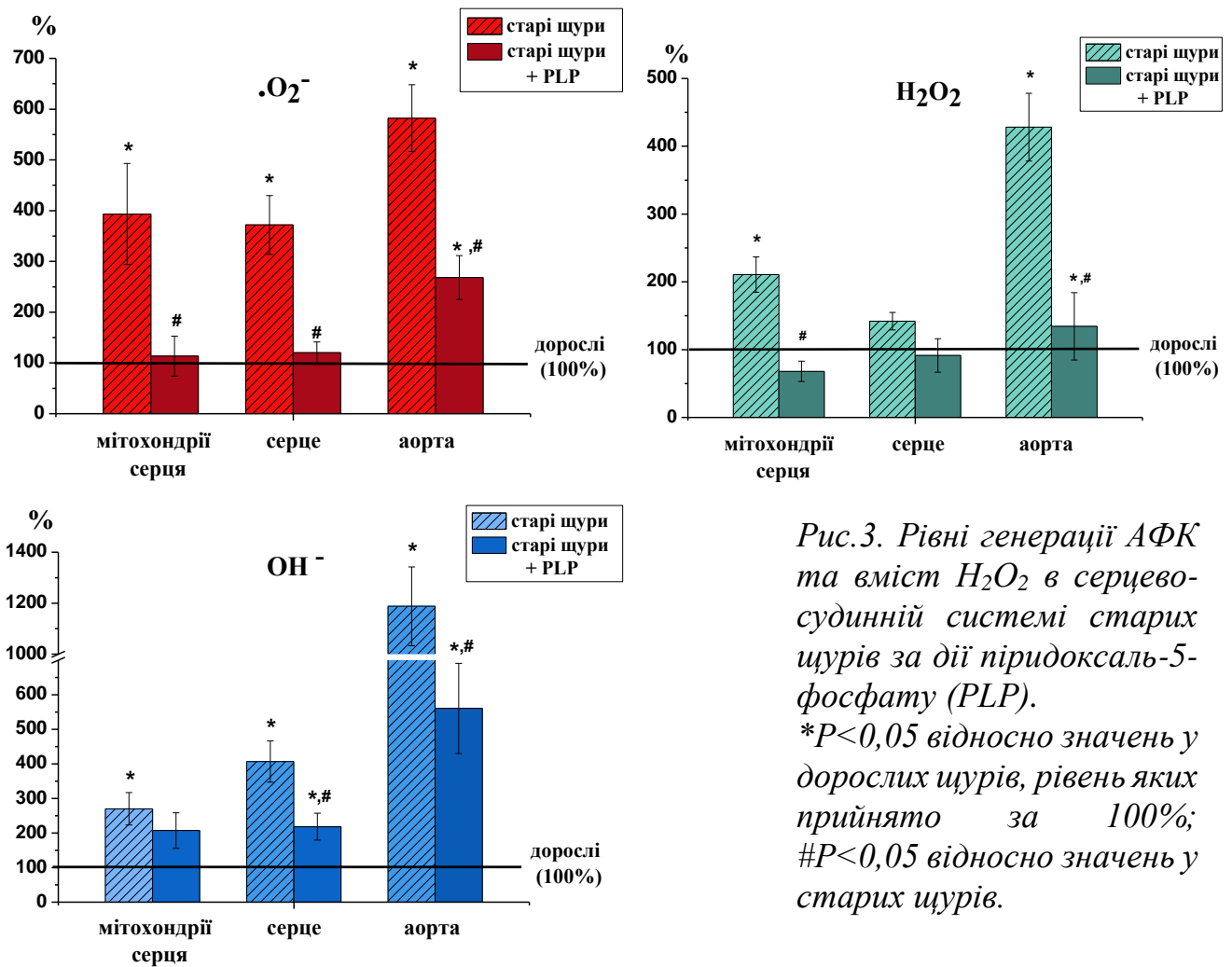


Рис.3. Рівні генерації АФК та вміст H_2O_2 в серцево-судинній системі старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP).

* $P < 0,05$ відносно значень у дорослих щурів, рівень яких прийнято за 100%; # $P < 0,05$ відносно значень у старих щурів.

Про обмеження окисдативного стресу при старінні в умовах стимуляції ендогенного синтезу H_2S свідчать також зниження вмісту стабільних продуктів неферментативного (ДК та МДА) окиснення ліпідів (рис. 4).

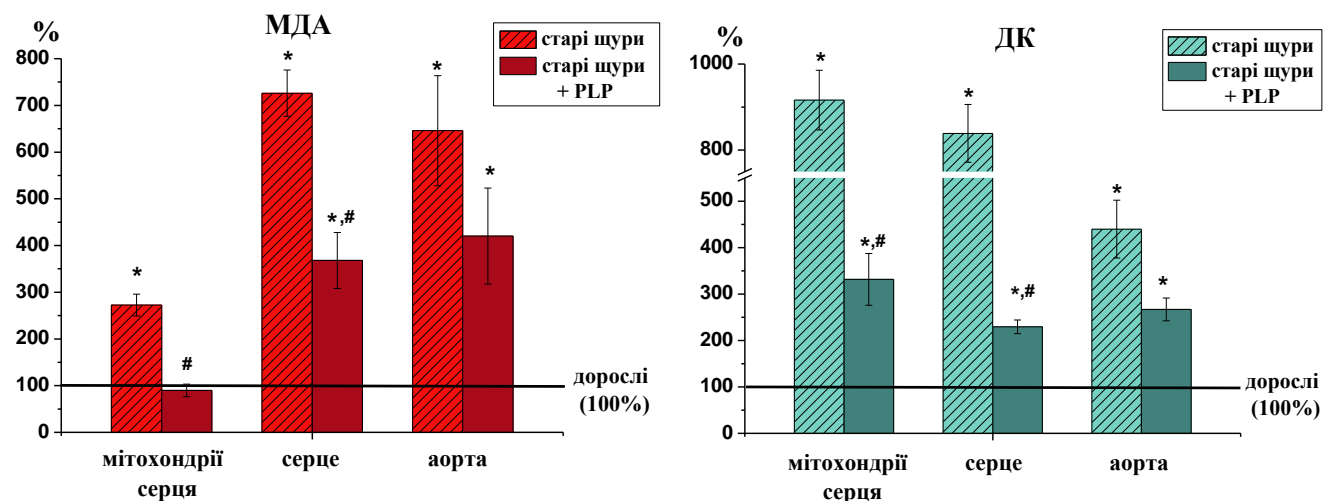


Рис.4. Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів (малонового діальдегіду – МДА та дієнових кон'югатів – ДК) у тканинах серцево-судинної системи старих щурів * $P < 0,05$ відносно значень у дорослих щурів, рівень яких прийнято за 100%; # $P < 0,05$ відносно значень у старих щурів.

Важливим наслідком стимуляції ендогенного синтезу сірководню PLP при старінні є зниження активності iNOS, а також збільшення активності cNOS, що призводило до посилення конститутивного синтезу NO, який відіграє суттєву роль у реакціях серцево-судинної системи (рис. 5).

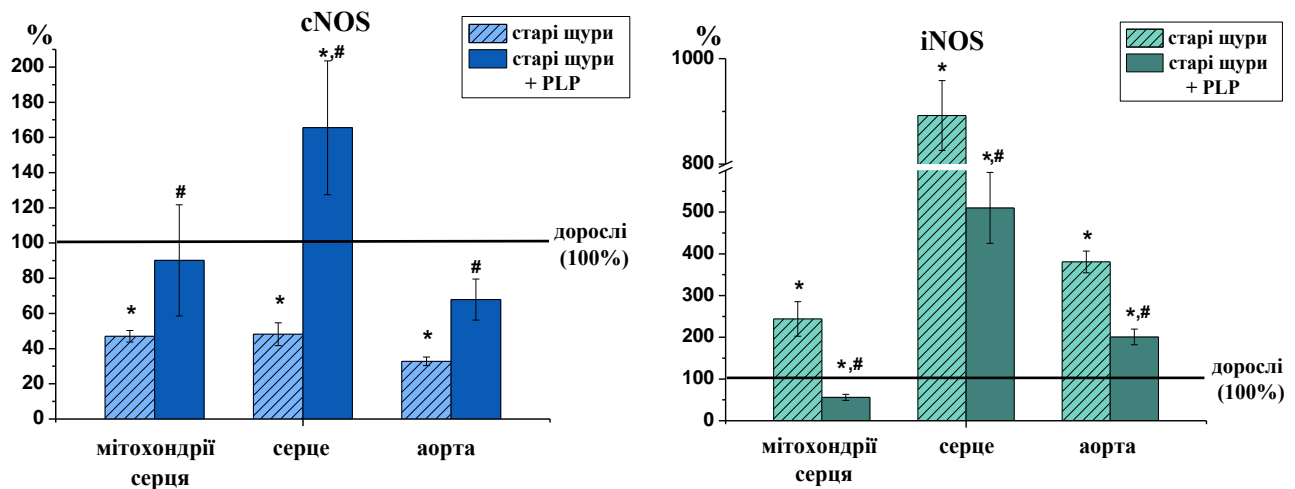


Рис.5. Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на активність ферментів конститутивної (cNOS) та індукцибельної (iNOS) NO-синтаз в тканинах серцево-судинної системи старих щурів * $P < 0,05$ відносно значень у дорослих щурів, рівень яких прийнято за 100%; # $P < 0,05$ відносно значень у старих щурів.

Відомо, що NO трансформується в такі стабільні метаболіти, як NO_2^- і NO_3^- (Bachmann and Mundel, 1994). Встановлено, що в мітохондріях і тканинах серця та аорти старих щурів пули NO_2^- знижуються майже вдвічі (рис. 6). Водночас введення PLP призводило до повернення цих значень до рівня контрольних.

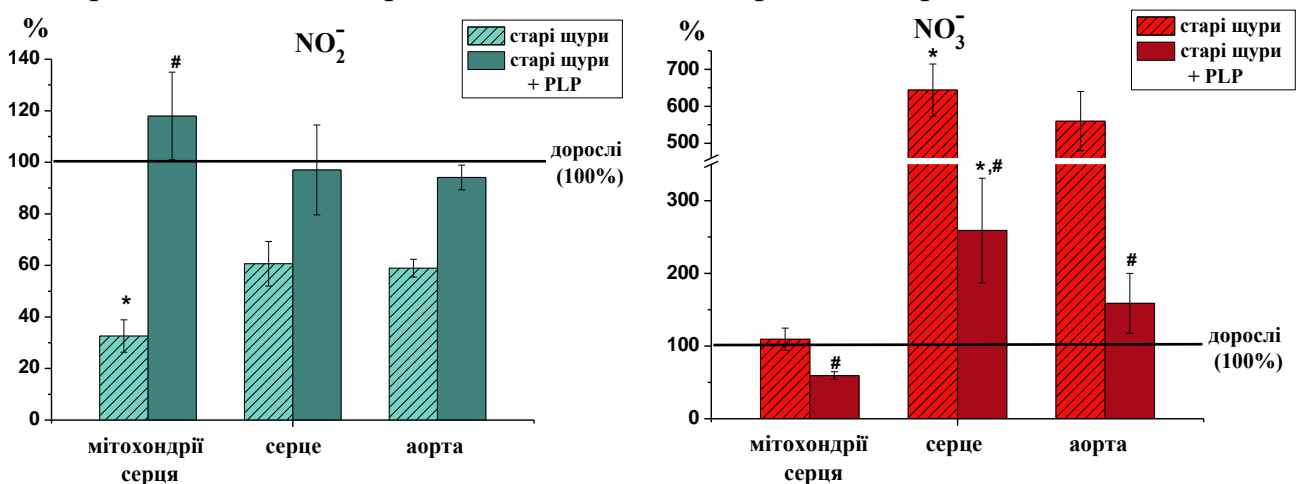


Рис.6. Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на стабільні пули NO в тканинах серцево-судинної системи старих щурів * $P < 0,05$ відносно значень у дорослих щурів, рівень яких прийнято за 100%; # $P < 0,05$ відносно значень у старих щурів.

При цьому пули NO_3^- , що є маркером утворення і розпаду пероксинітриту, при старінні суттєво зростали. Стимуляція синтезу сірководню нормалізувала вміст цих пулів. Це може свідчити про те, що надлишок NO, який синтезований ферментом iNOS, задіяний у спонтанному окисненні молекулами кисню до аніонів нітриту, а не на утворення пероксинітриту і його вільнорадикальний розпад.

Ми показали антиоксидантний ефект стимуляції ендогенного синтезу сірководню при старінні, який викликав послаблення оксидативно-нітрозативного стресу за цього стану та, водночас, сприяв відновленню конститутивного синтезу NO.

4. Вплив активації ендогенного синтезу H_2S на набухання ізольованих мітохондрій серця старих щурів.

Результати попередніх досліджень показали, що мітохондрії тканин серця старих щурів на відміну від таких у дорослих мають підвищену проникність мембран, у результаті чого набувають здатності до вивільнення через пору низькомолекулярних речовин з молекулярною масою більше ніж 1,5 кДа, що є показником її відкриття (Sagach et al., 2004). Також відомо, що відкриття МП у серці дорослих щурів повністю пригнічується специфічним її інгібітором циклоспорином А, а у старих тварин – лише частково. Це свідчить про те, що в мітохондріях серця старих щурів поряд з утворенням класичної МП, формується неспецифічна циклоспорин А-нечутливої пора (Sagach et al., 2004). У наших дослідках *in vitro* на ізольованих мітохондріях реєстрували відкриття МП у серці щурів, використовуючи природний її індуктор Ca^{2+} у концентрації 10^{-4} моль/л (рис. 7). Показано, що зміна амплітуди набухання мітохондрій ($\Delta D_{520} \cdot 10^2$) при старінні збільшувалася у 1,3 раза порівняно зі значеннями у дорослих тварин (рис. 7, а).

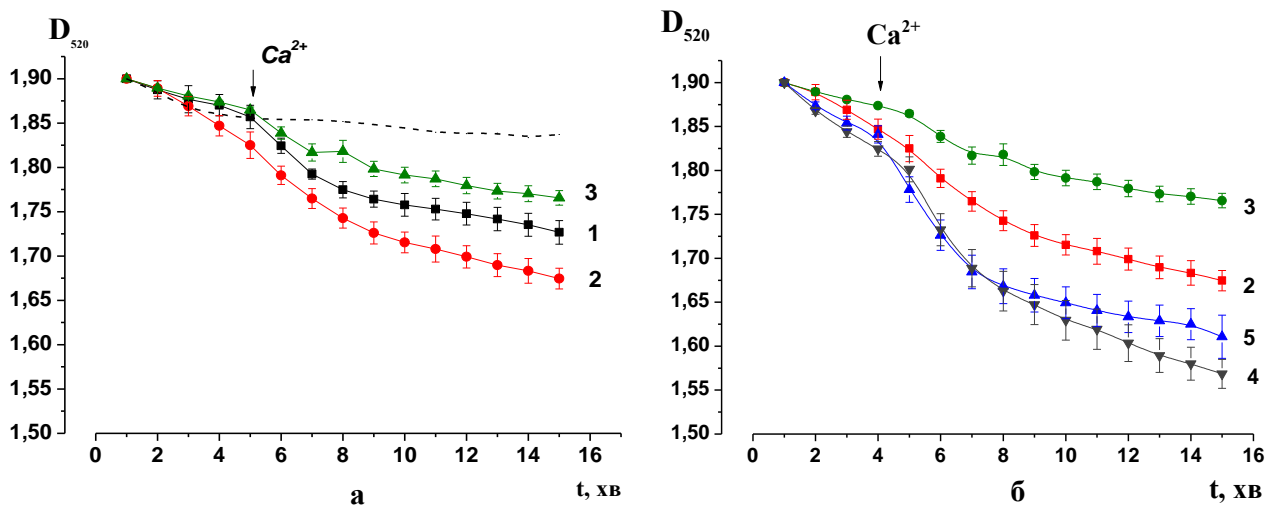


Рис. 7. Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) (а) та інгібітора синтезу H_2S О-карбоксиметилгідроксиламіну (О-СМН) (б) на відкриття кальційіндукованої мітохондріальної пори у серці старих щурів: 1 – дорослі щури; 2 – старі щури; 3 – старі щури після введення PLP; 4 – старі щури після дії *in vivo* О-СМН; 5 – старі щури після введення PLP та дії *in vivo* О-СМН. Пунктирною лінією позначено набухання мітохондрій серця дорослих щурів у безкальцієвому середовищі.

При застосуванні PLP амплітуда набухання мітохондрій серця старих тварин була меншою у 1,7 раза відносно старих щурів. Це призвело до зниженої здатності до пороутворення (рис. 7, а). Таким чином, застосування PLP попереджало Ca^{2+} -індуковане відкриття МП. Для з'ясування участі сірководню у механізмах протекторної дії PLP у процесах пороутворення ми застосували інгібітор одного із

H_2S -синтезуючих ферментів, а саме 3-MST – О-СМН. Ми показали, що введення О-СМН старим тваринам після дії PLP призводило до посилення у 2,1 раза амплітуди кальційіндукованого набухання органел відносно старих щурів, яким вводили лише PLP (рис. 7, б).

Таким чином, інгібування мітохондріального H_2S -синтезуючого ферменту 3-MST за допомогою О-СМН зменшувало протекторні ефекти PLP щодо відкривання МП у серці старих щурів, що засвідчує H_2S -залежний механізм дії PLP.

На наступному етапі роботи ми досліджували вплив PLP на чутливість МП до дії природного індуктора Ca^{2+} , використовуючи його в діапазоні концентрацій 10^{-7} – 10^{-4} моль/л (рис. 8, а). Поріг чутливості відповідав найменшій концентрації Ca^{2+} , яка викликала набухання мітохондрій у серці. Як видно з рис. 8, а при старінні відбувається зсув концентраційної кривої вгору відносно контролю, що свідчить про зниження порога дії Ca^{2+} на набухання органел і, як наслідок, збільшення чутливості МП до дії цього іона.

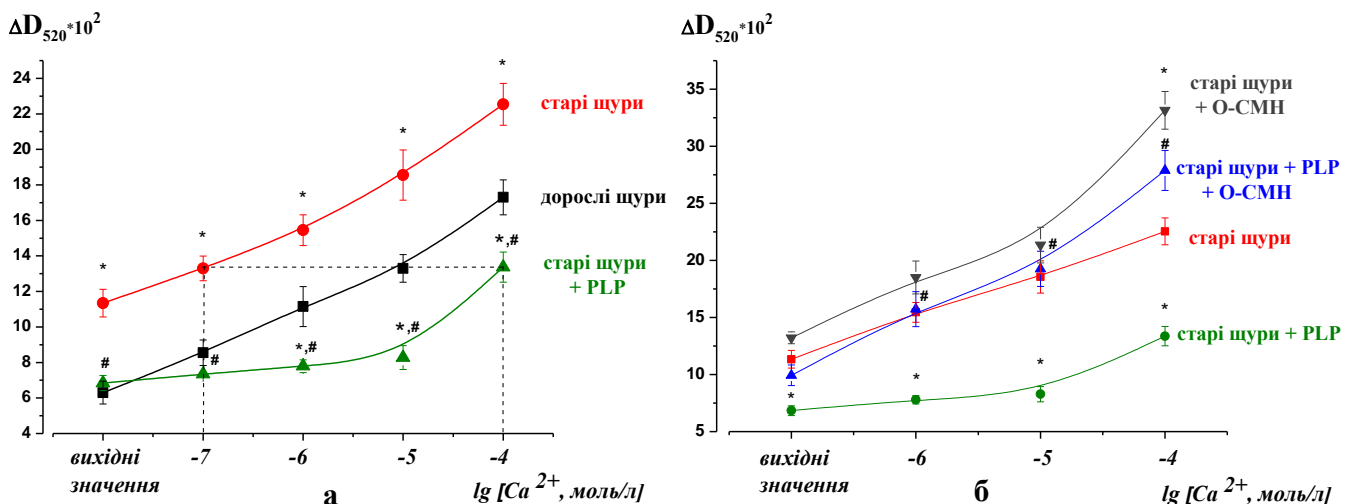


Рис. 8. Зміна чутливості мітохондріальної пори до її індуктора кальцію у серці старих щурів за умов дії піридоксаль-5-фосфату (PLP)(а) та О-СМН (б). * $P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; # $P < 0,01$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Показано, що використання модулятора синтезу H_2S (застосування PLP як коензиму H_2S -синтезуючих ферментів) зменшувало амплітуду набухання мітохондрій за дії всіх використаних концентрацій індуктора порівняно з цим показником у старих тварин (рис. 8). Отже, відбувалося зменшення чутливості МП до кальцію, внаслідок підвищення на три порядки порогової концентрації індуктора, яка спричиняла набухання органел.

Застосування *in vivo* інгібітора мітохондріального ферменту синтезу сірководню 3-MST мало негативний вплив на динаміку набухання мітохондрій старих тварин (рис. 8, б). Введення О-СМН старим щурам, які зазнали дії PLP, призводило до підвищення чутливості МП до Ca^{2+} (у діапазоні концентрацій 10^{-6} – 10^{-4} моль/л) та зростання амплітуди набухання мітохондрій серця порівняно із зниженими такими

показниками у старих щурів, які зазнавали лише курсового введення PLP. Отримані результати є доказом того, що протективний вплив PLP на МП реалізувався через дію цього кофактора на систему синтезу сірководню.

Результати наших досліджень показали, що застосування кофактора H_2S -синтезуючих ферментів – PLP пригнічувало Ca^{2+} -індуковане відкривання МП через зменшення чутливості до її індуктора у серці старих щурів. Таким чином, ендогенний H_2S бере участь у модуляції змін проникності мітохондріальних мембран, що може бути важливим регуляторним фактором у розвитку серцево-судинних порушень при старінні.

5. Дослідження впливу піридоксаль-5-фосфату на показники скоротливої функції та коронарний потік ізольованого серця старих щурів при ішемії-реперфузії.

Ішемічно-реперфузійне пошкодження серця характеризується припиненням кровопостачання органа або його частини з подальшим його відновленням (Eltzschig and Eckle, 2011). Такий стан може розвиватися внаслідок тимчасового звуження просвіту судин, що призводить до кисневого дефіциту та енергетичної недостатності кардіоміоцитів в ішемізованій ділянці. Це супроводжується зниженням ефективності окисного фосфорилування, збільшенням продукції вільних радикалів кисню, дисфункцією ендотелію коронарних судин і активацією сигнальних шляхів апоптозу чи некрозу в кардіоміоцитах.

Відомо, що сірководень разом з NO та CO відіграє важливу роль в попередженні розвитку ішемічно-реперфузійного пошкодження (Wuet al., 2015). Нами показано зменшення продукції H_2S у мітохондріях та тканинах серця при старінні (рис. 3.1), що може бути однією з причин зниженої резистентності міокарда до ішемії. Раніше нами було продемонстровано, що екзогенне введення донора сірководню (NaHS) попереджало розвиток реперфузійних порушень скорочувальної активності міокарда (Shymans'ka et al., 2012). Тому ми досліджували вплив PLP на функціональний стан ізольованого серця старих щурів за умов ішемії-реперфузії.

Раніше ми показали, що 20-хвилинна тотальна ішемія серця та наступна його реперфузія призводять до розвитку суттєвих порушень кардіодинаміки та окисного метаболізму міокарда (Goshovska et al., 2009). Курсове введення PLP старим тваринам в наших дослідках запобігало розвитку значних ішемічно-реперфузійних порушень функції серця. Відновлення кардіодинаміки після 20 хвилин ішемії і протягом всієї реперфузії було значно кращим, ніж у старих щурів, яким не вводили PLP. Через 40 хвилин реперфузії показники відновлення функції ішемізованого серця також були значно вищими. Виявлено, що PLP сприяє відновленню скорочувальної активності міокарда ізольованого серця після ішемії. Зокрема, відновлення тиску, що розвивається у лівому шлуночку на 5-й хвилині реперфузії становило 76 % порівняно з 50,7 % у тварин, яким не вводили PLP (рис. 9, а). Позитивна динаміка відновлення тиску спостерігалася до кінця експерименту і на 40-й хвилині реперфузії його величина становила 100,6% порівняно з 52,5% у контрольних щурів ($P < 0,01$).

Водночас, кінцево-діастолічний тиск під час всього періоду реперфузії при впливі PLP був значно нижчим, ніж в контролі і на 40-й хвилині реперфузії становив $9,6 \pm 2,7$ мм.рт.ст. порівняно з $26,7 \pm 5,3$ мм.рт.ст. у старих контрольних щурів ($P < 0,05$) (рис. 9, б).

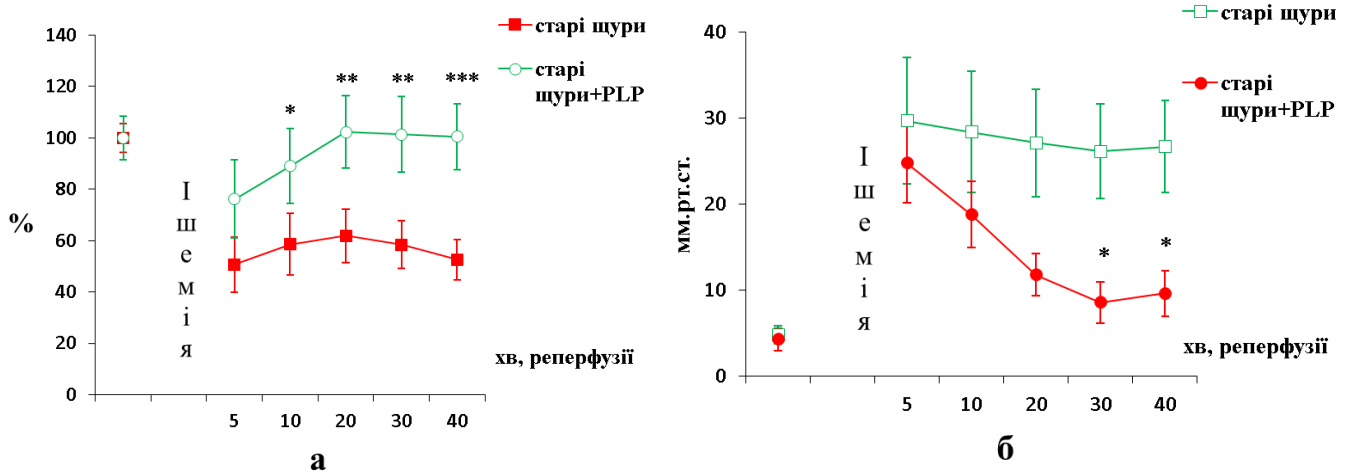


Рис. 9. Вплив ішемії-реперфузії на зміни тиску, що розвивається у лівому шлуночку (а) і кінцево-діастолічного тиску (б) ізолюваного серця старих щурів в умовах дії піридоксаль-5-фосфату (PLP). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ та *** $P < 0,001$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Показники швидкості скорочення та розслаблення міокарда в умовах курсового введення PLP також були значно кращими, ніж у контрольних тварин (рис. 10). Зокрема, швидкість скорочення міокарда (dP/dt max) після введення PLP значно зросла: $107,9 \pm 13,1\%$ порівняно з $54,7 \pm 8,4\%$ у старих щурів на 40-й хвилині реперфузії (рис. 10). Швидкість розслаблення міокарда (dP/dt min) також була збільшена, що вказує на краще відновлення діастолічної функції міокарда: $101,9\%$ відносно $51,5\%$ у старих щурів (рис. 11).

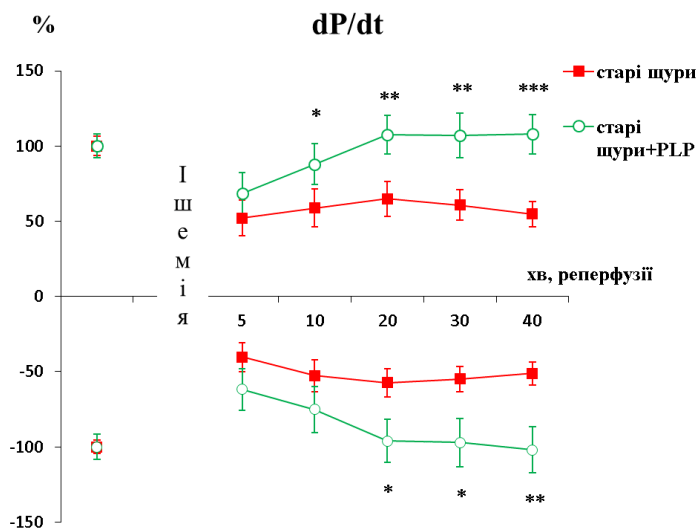


Рис. 10. Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на зміни швидкості скорочення та розслаблення міокарда (dP/dt) ізолюваного серця старих щурів при ішемії-реперфузії.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ та *** $P < 0,001$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Крім того, PLP збільшував величину коронарного потоку порівняно з контрольними старими щурами (рис. 11).

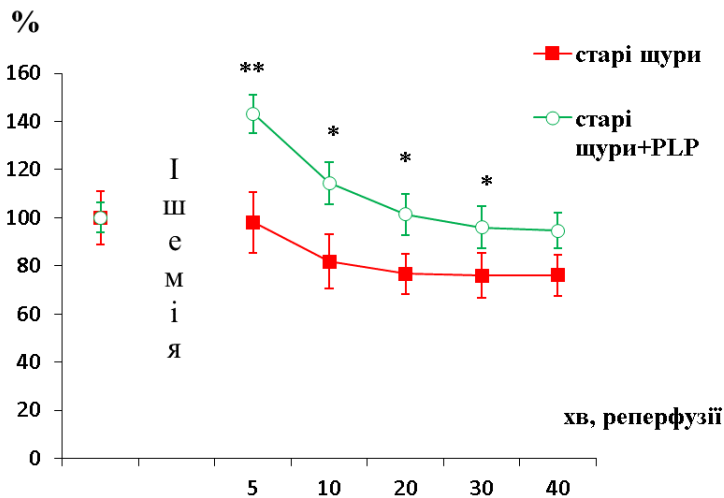


Рис. 11. Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на зміни коронарного потоку ізолюваного серця старих щурів при ішемії-реперфузії. * $P < 0,05$ та ** $P < 0,01$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів

Таким чином, курсове введення PLP старим щурам здійснювало кардіопротекторну дію при ішемії-реперфузії.

6. Вплив активації ендогенного синтезу H_2S на ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти старих щурів.

Порушення ендотелійзалежної вазорелаксації супроводжує старіння та вікові захворювання, включаючи гіпертонію, хворобу Паркінсона, діабет тощо. Основним механізмом дисфункції ендотелію та порушення синтезу NO є активація окисного стресу в клітинах ендотелію, що відіграє вирішальну роль у процесі старіння (El Assar et al., 2012). Нещодавні дослідження свідчать про те, що NO взаємодіє з H_2S , який, в свою чергу, здатний відновлювати активність NO-синтезуючих ферментів та збільшувати біодоступність NO (Szabo, 2017). Дійсно, є докази того, що донори H_2S , як NaHS, який використовується в багатьох дослідженнях, мають кардіо- та вазопротекторні властивості, інгібують окисний стрес, збільшують вироблення NO та сприяють розслабленню гладеньких м'язів судин (Kida et al. 2013; Materazzi et al. 2017; Benetti et al. 2013; Drachuk et al., 2015). Ми припустили, що судинна дисфункція, що пов'язана з віком, може виникнути через недостатнє вироблення ендогенного H_2S , а відновлення синтезу H_2S покращить ендотелійзалежну вазорелаксацію. Для цього ми досліджували вплив коензиму ферментів синтезу сірководню – PLP на ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти старих щурів.

Як свідчать результати нашого дослідження, при старінні відбувається порушення ендотелійзалежного розслаблення ГМ аорти (рис. 12, а, б). У старих тварин показник АХ-індукованого розслаблення становив в середньому $18,4 \pm 4,1\%$ від базового скорочення, викликаного норадреналіном порівняно з $66,5 \pm 6,4\%$ у дорослих тварин. Застосування PLP значно покращувало ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти у старих щурів. Так, амплітуда АХ-індукованого розслаблення, яка була суттєво знижена у старих щурів, збільшувалась більш ніж у 2,5 раза. Середнє значення його амплітуди було $47,7 \pm 4,8\%$ порівняно з $18,4 \pm 4,1\%$ у старих тварин, яким не вводили PLP (рис.12).

Нами було зроблено припущення, що відновлення АХ-індукованого розслаблення ГМ аорти старих щурів за умов дії PLP відбувається внаслідок збільшення продукції ендотеліальними клітинами конститутивного NO. Для підтвердження цієї гіпотези ми застосували *in vivo* блокатор синтезу оксиду азоту – L-NAME у дозі 27 мг/кг за 30 хв до декапітації. На тлі PLP та L-NAME суттєво зменшувалась амплітуда розслаблення ГМ аорти старих щурів у відповідь на ацетилхолін (рис. 12, а). Середнє значення його амплітуди було $15,2 \pm 4,2 \%$, що вказує на залучення NO у відновленні цієї реакції. А у старих щурів, яким вводили лише L-NAME, середнє значення амплітуди релаксації аорти у відповідь на ацетилхолін становило $2,8 \pm 5,5 \%$.

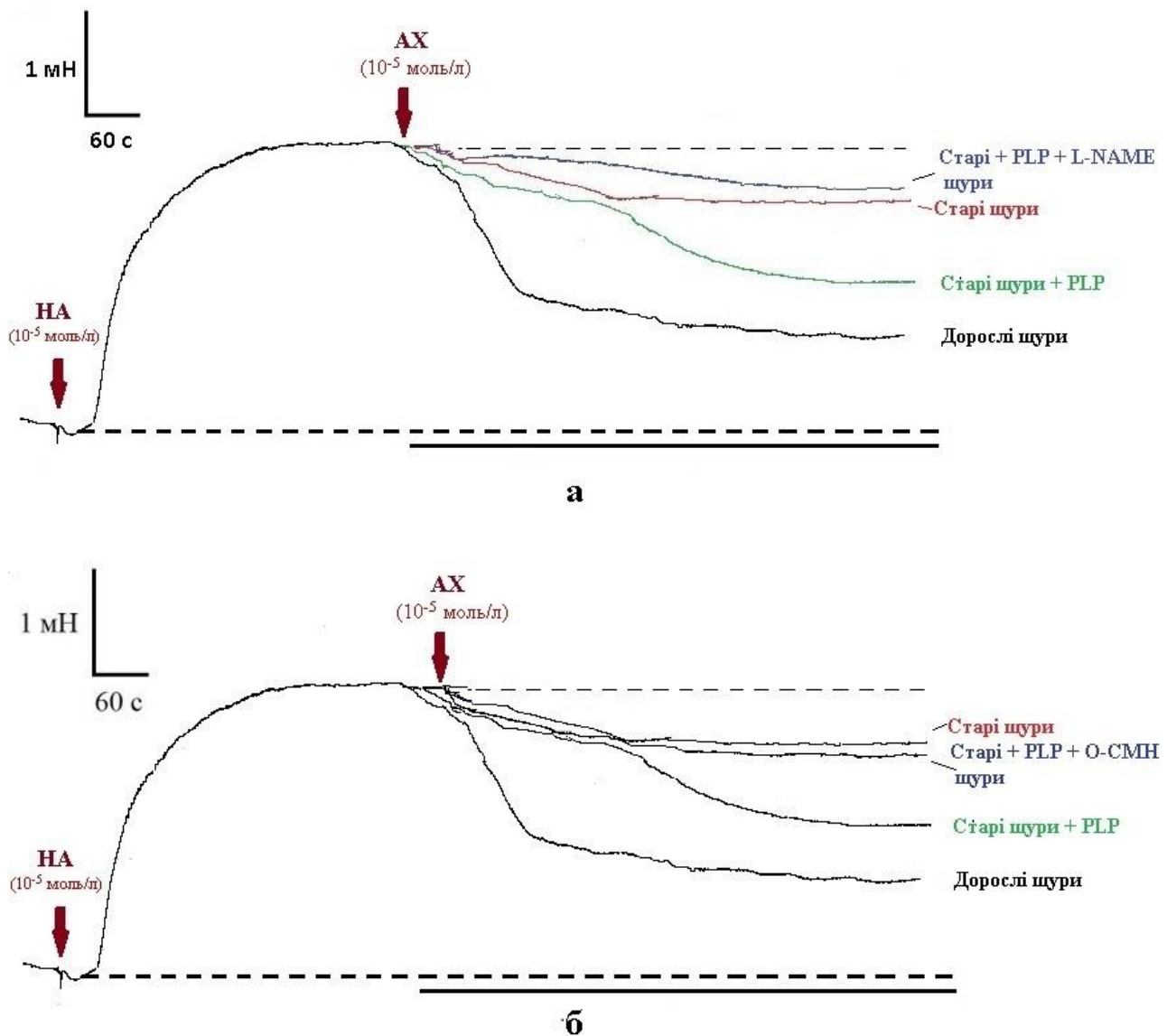


Рис. 12. Нативні криві впливу курсового введення піридоксаль-5-фосфату (PLP) на ацетилхолініндуковане розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти старих щурів: а – на тлі дії блокатора синтезу NO синтезу – L-NAME; б – на тлі дії блокатора 3-MST - O-СМН. Абсциса – час; ордината – напруження розвинуто препаратом, мН. Темна лінія під кривими позначає тривалість застосування ацетилхоліну (АХ) (10⁻⁵ моль/л). Переривчаста лінія показує еталонний рівень тонічного напруження ГМ та рівень їх активації після застосування норадреналіну (НА), прийнятий за 100%.

Для розуміння механізму залучення H_2S у процес вазорелаксації ми застосували інгібітор ферменту 3-MST – O-CMN *in vivo* у дозі 50 мг/кг за 30 хв до декапітації. У старих тварин, яким вводили PLP та O-CMN спостерігали зменшення амплітуди АХ-індукованого розслаблення ГМ аорти (рис. 12, б). Середнє значення його амплітуди було подібним до того, що спостерігалось у старих щурів, і становило $19,5 \pm 1,9\%$. У старих щурів, яким вводили лише O-CMN, середнє значення амплітуди релаксації аорти у відповідь на ацетилхолін становило $6,88 \pm 1,02\%$.

Отже, активація H_2S -синтезуючих ферментів PLP сприяла поліпшенню пригніченого у старих тварин ендотелійзалежного розслаблення ГМ аорти, яке обмежувалося при застосуванні інгібіторів NOS та 3-MST.

Таким чином, застосування PLP відновлювало синтез ендогенного H_2S і конститутивного NO, а також інгібувало оксидативно-нітрозативний стрес у тканинах серцево-судинної системи старих щурів, що сприяло поліпшенню пригніченого ендотелійзалежного розслаблення гладеньких м'язів аорти та покращенню функції серця у старих щурів.

Отримані результати дослідження можуть бути представлені у вигляді схеми, яка характеризує вазо- та кардіопротекторні механізми дії H_2S при стимуляції його ендогенного синтезу PLP у старих тварин.



ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі було досліджено вплив кофактора H_2S -синтезуючих ферментів – піридоксаль-5-фосфату (PLP) на синтез сірководню, експресію генів *CSE* та *3-MST* у тканинах серця старих щурів. Розглянуто вплив PLP на показники окисного (як оксидативного, так і нітрозативного) стресу та компенсації порушень функції серця і судин при старінні.

1. Двотижневе введення PLP стимулює синтез ендogenous сірководню і може бути використане для відновлення рівнів його синтезу в мітохондріях і тканинах серця та аорти у старих щурів.
2. У тканинах серця старих щурів виявили зменшення експресії генів *CSE* та *3-MST* у 2 та 1,6 рази відповідно порівняно з дорослими тваринами. Введення PLP відновлює експресію досліджуваних генів у тканинах серця старих щурів.
3. Застосування PLP сприяє зниженню продукції активних форм кисню (оксидативного стресу) та азоту (нітрозативного стресу), а також забезпечує відновлення активності cNOS і посилює конститутивний синтез NO у мітохондріях і тканинах серця та аорти старих тварин.
4. В умовах стимуляції ендogenous синтезу сірководню пригнічується Ca^{2+} -індуковане відкривання МП та зменшується її чутливість до Ca^{2+} у мітохондріях серця старих щурів. Інгібування мітохондріального H_2S -синтезуючого ферменту 3-MST за допомогою О-СМН зменшує протекторні ефекти PLP щодо відкривання МП у серці старих щурів. Це вказує на те, що мітохондріальний сірководень, синтез якого збільшується при дії PLP, регулює чутливість МП до Ca^{2+} .
5. Застосування PLP протягом двох тижнів сприяє відновленню функції серця старих тварин після ішемії-реперфузії.
6. Відновлення синтезу ендogenous H_2S за допомогою PLP сприяє поліпшенню пригніченого у старих тварин ендотелійзалежного розслаблення гладеньких м'язів аорти і цей ефект скасовується за допомогою інгібіторів NOS та 3-MST.

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

В яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Струтинська Н.А., Коцюруба А.В., Будько А.Ю., Мись Л.А., Сагач В.Ф. Порушення функціонування мітохондрій у серці при старінні супроводжується не спряженням конститутивних NO-синтаз на тлі оксидативного та нітрозативного стресу. Фізіол. журн. 2016; 62(2), с. 3-11. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні дослідження, аналізі отриманих результатів та написанні статті).*
2. Мись Л.А., Будько А.Ю., Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. Піридоксаль-5-фосфат відновлює синтез сірководню та редокс-статус тканин серця і судин старих тварин. Фізіол. журн. 2017; 63(1), с. 3-9. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальної роботи, аналізі отриманих результатів та написанні статті).*
3. Мись Л.А., Струтинська Н.А., Струтинський В.Р., Сагач В.Ф. Активація синтезу ендogenous сірководню пригнічує відкривання мітохондріальної пори та відновлює

спряження конститутивної NO-синтази у серці старих щурів. Фізіол. журн. 2017; 63(3), с. 16-23. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальної роботи, статистичній обробці даних, участі в обговоренні результатів, оформленні результатів у вигляді статті).*

4. **Мись Л.А.**, Гошовська Ю.В., Федічкіна Р.А., Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. Ефект піридоксаль-5-фосфату на функцію ізольованого серця старих щурів при ішемії-реперфузії. Патологія, реабілітація, адаптація. 2017; 15(3), с.176-179. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні частини дослідження самостійно та активній участі в іншій, аналізі отриманих результатів та написанні статті).*

5. **Mys L.A.**, Strutynska N.A., Goshovska Y.V., Sagach V.F. Stimulation of the endogenous hydrogen sulfide synthesis suppresses oxidative-nitrosative stress and restores endothelial-dependent vasorelaxation in old rats. Can J Physiol Pharmacol. 2020. 98(5): 275-281. DOI: 10.1139/cjpp-2019-0411. PMID: 31846354. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальної роботи, статистичній обробці даних, аналізі отриманих результатів та написанні статті).*

Патент:

Мись Л.А., Струтинська Н.А., Дорофєєва Н.О., Сагач В.Ф. Спосіб покращення розслаблення гладеньких м'язів судин за рахунок відновлення рівнів синтезу сірководню при старінні. Патент на корисну модель № 122865 від 25.01.2018 року.

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Мысь Л.А.**, Лучкова А.Ю., Струтинская Н.А., Сагач В.Ф. Пиридоксаль-5-фосфат восстанавливает синтез сероводорода, повышает активность cNOS и синтез NO при старении. IV международная научно-практическая конференция «Наука и медицина: современный взгляд молодежи», 20-21 апреля 2017 года, г. Алматы, Казахстан, С.501-502.

2. **Мись Л.А.**, Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. Відновлення ендогенного синтезу сірководню сприяє зниженню чутливості мітохондріальної пори до Ca^{2+} при старінні. V міжнародна науково-практична конференція студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини», 20-21 квітня 2017 року, м. Суми, Україна, С.135.

3. **Мись Л.А.**, Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. Піридоксаль-5-фосфат знижує чутливість мітохондріальної пори до Ca^{2+} та відновлює синтез конститутивної NO-синтази при старінні. Бюлетень XVI читань ім. В.В. Підвисоцького, присвячений до 160-річчя з дня його народження, 18-19 травня 2017 року, м. Одеса, Україна, С.235-236.

4. **Mys L.A.**, Strutynska N.A., Sagach V.F. Pyridoxal-5-phosphate restores H_2S synthesis and endothelium-depended relaxation of aorta smooth muscles in old rats. 2nd Conference for Young Scientists (CYS-2017), 6-9 June, 2017, Kyiv, Ukraine, P.123.

5. **Mys L.A.**, Strutynska N.A., Sagach V.F. Stimulation of endogenous H₂S synthesis inhibits oxidative and nitrosative stress, restores cNOS activity and endothelium dependent vasorelaxation in old rats. 34th Meeting of the European Section of the International Society for Heart Research (24-27 July, 2017, Hamburg, Germany).
6. **Mys L.A.**, Strutynska N.A., Sagach V.F. Pirydoxal-5-phosphate induced relaxation of aorta smooth muscles is abolished by L-NAME in old rats. Third Annual International School in Biomedical Sciences 2017 Them «Cell Function in Health and Disease», 18-20 September, 2017, Kyiv, Ukraine, P.24.
7. **L. Mys**, Y. Goshovska, N. Strutynska, V. Sagach. Stimulation of endogenous hydrogen sulfide synthesis contributes to the restoration of cardiac function after ischemia-reperfusion in old animals. 52-nd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, 30th May-1st June, 2018, Barcelona, Spain.
8. **L.A. Mys**, N. Strutynska, V. Sagach. Restoration of endogenous hydrogen sulfide synthesis decreases the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore opening to Ca²⁺ and increases of cNOS activity in old rat heart. Heart Failure 2019 & 6th World Congress on Acute Heart Failure, 25-28 May, 2019, Athens, Greece, European Journal of Heart Failure (2019) 21 (Suppl. S1) p. 32.
9. **Мись Л.А.**, Струтинська Н.А., Гошовська Ю.В., Федічкіна Р.А., Сагач В.Ф. Піридоксаль-5-фосфат відновлює синтез сірководню та сприяє покращенню функції серця у старих щурів після ішемії-реперфузії. XX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка. 27-30 травня 2019, Київ, Україна, Фізіол. журн. 2019, 65(3), с.83-84.

АНОТАЦІЯ

Мись Л.А. Роль активації синтезу ендогенного сірководню у відновленні функціонального стану серцево-судинної системи у старих щурів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена вивченню стимуляції ендогенного синтезу сірководню (H₂S) та його впливу на функціональний стан серцево-судинної системи старих щурів. Показано, що в тканинах серця та судин старих щурів суттєво знижений вміст цього ендогенного трансмітера, а також розвивається оксидативно-нітрозативний стрес. Для стимуляції синтезу ендогенного сірководню ми використали введення коензиму H₂S-синтезуючих ферментів – піридоксаль-5-фосфату (PLP). Вперше показано, що курсове введення PLP сприяло відновленню вмісту ендогенного H₂S у тканинах серцево-судинної системи старих тварин, яке відбувалося за рахунок збільшення експресії генів, що кодують ферменти його синтезу – *CSE* та *3-MST*. Така активація ендогенного синтезу H₂S супроводжувалася суттєвим пригніченням оксидативного стресу, що характеризувався зниженням швидкості генерації супероксидного та гідроксильного аніон-радикалів, а також

вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів порівняно з суттєво підвищеними значеннями цих показників у тканинах старих тварин.

Внаслідок стимуляції ендогенного синтезу H_2S у старих щурів відбулося також зниження показників нітрозативного стресу, а саме активності індукцйбельної NO-синтази та збільшення активності конститутивної NO-синтази, що призводило до посилення конститутивного синтезу NO, який відіграє суттєву роль у реакціях серцево-судинної системи. Протекторні механізми дії H_2S можуть бути пов'язані як з відновленням конститутивного Ca^{2+} -залежного синтезу NO (сNOS), пригніченням окисного стресу, так і впливом на внутрішньоклітинні структури, а саме неспецифічний мегаканал – мітохондріальну пору транзиторної провідності (МП) (англ. mitochondrial permeability transition pore). Нами вперше показано, що застосування PLP пригнічувало Ca^{2+} -індуковане відкривання МП через зменшення її чутливості до індуктора, яка суттєво підвищена у старих щурів. При цьому інгібування мітохондріального H_2S -синтезуючого ферменту 3-MST за допомогою O-CMN зменшувало протекторні ефекти PLP щодо відкривання МП у серці старих щурів, що засвідчує про H_2S -залежний механізм дії PLP. Вперше виявлено, що курсове введення PLP запобігало розвитку значних ішемічно-реперфузійних порушень функції серця. Про це свідчать попередження значного падіння тиску у лівому шлуночку, а також швидкості скорочення міокарда. Застосування PLP значно покращувало ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти у старих щурів. Так, амплітуда ацетилхолініндукованого розслаблення, яка була суттєво знижена у старих щурів, збільшувалася більш ніж у 2,5 рази. Цей ефект скасовувався за допомогою інгібіторів NO-синтази та 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази, що свідчить про залучення NO та H_2S до збільшення ендотелійзалежного розслаблення судин. Таким чином, PLP відновлював синтез ендогенного H_2S і конститутивного NO, а також інгібував окисативно-нітрозативний стрес у тканинах серцево-судинної системи старих щурів, що сприяло поліпшенню пригніченого ендотелійзалежного розслаблення гладеньких м'язів аорти та покращенню функції серця у старих щурів.

Ключові слова: старіння; сірководень; окисативно-нітрозативний стрес; мітохондріальна пора; ендотелійзалежне розслаблення; ізольоване серце; ішемія-реперфузія; щури.

SUMMARY

Mys L.A. The role of activation of endogenous hydrogen sulfide synthesis in the restoration of the functional state of the cardiovascular system in old rats. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

A dissertation submitted to acquire the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biological Sciences, specialty 03.00.13. – Human and animal physiology. – Bogomolets Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to the study of stimulation of endogenous hydrogen sulfide (H_2S) synthesis and its influence on the functional state of the cardiovascular system of old rats. It has been shown that the content of this endogenous transmitter is significantly reduced and oxidative-nitrosative stress also develops in the tissues of the heart and blood

vessels of old rats. To stimulate the synthesis of endogenous hydrogen sulfide, we used the coenzyme of H₂S-synthesizing enzymes – pyridoxal-5-phosphate (PLP). For the first time, we have shown that the course administration of PLP restored the content of endogenous H₂S in the tissues of the cardiovascular system of old animals, that occurred due to increased expression of *CSE* and *3-MST* genes. Such activation of endogenous H₂S synthesis was accompanied by a significant inhibition of oxidative stress, a decrease in the rate of generation of superoxide, hydroxyl anion radicals and the content of lipid peroxidation products compared with old animals kept on standard diet.

Due to the stimulation of endogenous H₂S synthesis in old rats, there was also a decrease in nitrosative stress, namely the activity of inducible NO synthase was decreased and activity of constitutive NO synthase was increased that led to increased constitutive NO synthesis, which plays a significant role in reactions of cardiovascular systems. The protective mechanisms of action of H₂S can be associated with the restoration of constitutive Ca²⁺-dependent synthesis of NO (cNOS), inhibition of oxidative stress and the impact on intracellular structures, namely nonspecific megachannel – mitochondrial permeability transition pore (MPTP). We showed for the first time that consumption of PLP inhibited Ca²⁺-induced opening of the MPTP due to a decrease in its sensitivity to the inducer which is significantly increased in old rats. Inhibition of the mitochondrial H₂S-synthesizing enzyme 3-MST by O-CMH reduced the protective effects of PLP on the MPTP opening in the heart of old rats which indicates the H₂S-dependent mechanism of PLP. We have found that consumption of PLP prevented the development of ischemic-reperfusion disturbances of the heart function. This was evidenced by the prevention of a drastic drop in pressure in the left ventricle and the rate of contraction and relaxation of the myocardium. PLP significantly improved endothelium-dependent aortic smooth muscle relaxation in old rats. Thus, the amplitude of acetylcholine-induced relaxation which was significantly reduced in old rats was increased more than 2.5-fold. This effect was reversed by inhibitors of NO-synthase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase indicating the involvement of NO and H₂S in the improved endothelium-dependent vascular relaxation. Thus, PLP restored of the endogenous H₂S synthesis, constitutive NO and inhibited oxidative-nitrosative stress in the tissues of the cardiovascular system of old rats which helped to improve the endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscle and heart function in old rats.

Key words: aging; hydrogen sulfide; oxidative-nitrosative stress; mitochondrial permeability transition pore; endothelium-dependent relaxation; isolated heart; ischemia-reperfusion; rats.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АХ – ацетилхолін
ГМ – гладенькі м'язи
ДК – дієнові кон'югати
КДТ – кінцево-діастолічний тиск
КП – коронарний потік
МДА – малоновий диальдегід
МП – мітохондріальна пора
НА – норадреналін
ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів
ТЛШ – тиск, що розвиває лівий шлуночок
CSE – цистатіонін-γ-ліаза
 dP/dt_{max} – швидкість підвищення ТЛШ
 dP/dt_{min} – швидкість зниження ТЛШ
 H_2O_2 – пероксид водню
 H_2S – сірководень
L-NAME – гідрохлорид N-нiтро-L-аргiнін метилового естеру
NO – оксид азоту
cNOS – конститутивна ізоформа синтази оксиду азоту
iNOS – індукцiбельна ізоформа синтази оксиду азоту
PLP – піридоксаль-5-фосфат
•O₂⁻ – супероксидний радикал
•OH – гідроксильний радикал
3-MPST – 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза