

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Мись Лідія Анатоліївна

УДК 577.164.13: 576.311.347: 612.172

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

03.00.13 –фізіологія людини та тварин

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

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

Науковий керівник: **Сагач Вадим Федорович**
чл.-кор. НАНУ, доктор медичних наук, професор

Київ-2021

АНОТАЦІЯ

Мись Л.А. Роль активації синтезу ендogenous 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 ендogenous синтезу сірководню (H_2S) та його впливу на функціональний стан серцево-судинної системи старих щурів. Показано, що в тканинах серця та судин старих щурів суттєво знижений вміст цього ендogenous трансмітера, а також розвивається оксидативно-нітрозативний стрес. Для стимуляції синтезу ендogenous сірководню ми використали введення коензиму H_2S -синтезуючих ферментів – піридоксаль-5-фосфату (PLP). Вперше показано, що курсове введення PLP сприяло відновленню вмісту ендogenous H_2S 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 ендogenous синтезу H_2S 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 ендogenous синтезу H_2S у старих щурів відбулося також зниження показників нітрозативного стресу, а саме активності індукцйбельної NO-синтази (iNOS) та збільшення активності конститутивної NO-синтази (cNOS), 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 (cNOS), 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 раза. 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 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.

Ключові слова: старіння; сірководень; оксидативно-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 (H₂S) 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 (iNOS) was decreased and activity of constitutive NO synthase (cNOS) 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 Ca^{2+} -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 H_2S -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 H_2S -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 H_2S in the improved endothelium-dependent vascular relaxation. Thus, PLP restored of the endogenous H_2S 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.

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ

РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Струтинська Н.А., Коцюруба А.В., Будько А.Ю., **Мись Л.А.**, Сагач В.Ф. Порухення 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.
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.
3. **Мись Л.А.**, Струтинська Н.А., Струтинський В.Р., Сагач В.Ф. Активация 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.
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.
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.

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.

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Тези доповідей:

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 ендogenous 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 H_2S 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-posphate 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. 52nd 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 Ca^{2+} 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.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ЗМІСТ.....	9
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	12
ВСТУП.....	14
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	20
1.1. Фізико-хімічні властивості H_2S у ссавців	20
1.2. Ендогенний синтез та метаболізм H_2S	22
1.3. Роль H_2S у серцево-судинній системі.....	28
1.3.1. Механізми дії H_2S як антиоксиданта.....	28
1.3.2. Роль H_2S у захисті міокарда після ішемічно-реперфузійного пошкодження.....	30
1.3.3. Вплив H_2S на тонус гладеньких м'язів судин.	32
1.3.4. Вплив H_2S на мітохондрії.....	35
1.4. Взаємодія H_2S і NO у серцево-судинній системі.....	37
1.5. Мітохондріальна пора, її структура та роль.....	39
1.6. Характеристика піридоксаль-5-фосфату та його біологічна роль...43	
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	47
2.1. Експериментальні тварини.....	47
2.2. Курсове введення старим щурам кофактора H_2S -синтезуючих ферментів – піридоксаль-5-фосфату.....	47
2.3. Виділення РНК з тканин серця та полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі.....	48
2.4. Біохімічні дослідження.....	48
2.5. Виділення фракції мітохондрій із серця щурів.....	52
2.6. Реєстрація відкривання мітохондріальної пори.....	53
2.7. Дослідження показників скорочувальної функції ізольованого серця щурів.....	54

2.8. Реєстрація скорочення-розслаблення м'язових препаратів аорти.....	55
2.9. Статистична обробка результатів дослідження.....	57
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	59
3.1. Дослідження впливу піридоксаль-5-фосфату на вміст H_2S у серцево-судинній системі старих щурів.....	59
3.2. Визначення експресії генів <i>CSE</i> та <i>3-MST</i> у тканинах серця старих щурів.....	61
3.2.1. Дослідження рівнів експресії <i>CSE</i> у тканинах серця старих щурів в умовах дії піридоксаль-5-фосфату.....	61
3.2.2. Зміни експресії <i>3-MST</i> у тканинах серця старих щурів в умовах дії піридоксаль-5-фосфату.....	62
3.3. Зміни показників оксидативно-нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в серцево-судинній системі старих щурів при активації ендogenous синтезу H_2S	63
3.3.1. Дослідження впливу піридоксаль-5-фосфату на показники оксидативного стресу в мітохондріях серця старих щурів.....	65
3.3.2. Визначення впливу піридоксаль-5-фосфату на показники оксидативного стресу в тканинах серця старих щурів.....	67
3.3.3. Показники оксидативного стресу в тканинах аорти старих щурів в умовах дії піридоксаль-5-фосфату.....	69
3.3.4. Дослідження впливу піридоксаль-5-фосфату на показники нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в мітохондріях серця старих щурів.....	71
3.3.5. Показники нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в тканинах серця старих щурів при дії піридоксаль-5-фосфату.....	75
3.3.6. Визначення впливу піридоксаль-5-фосфату на показники нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в тканинах аорти старих щурів.....	79

3.4. Вплив активації ендогенного синтезу H_2S на набухання ізольованих мітохондрій серця старих щурів.....	82
3.4.1. Дослідження впливу піридоксаль-5-фосфату на Ca^{2+}-індуковане набухання ізольованих мітохондрій серця старих щурів.....	83
3.4.2. Дослідження чутливості МП до дії Ca^{2+} в серці старих щурів в умовах дії in vivo піридоксаль-5-фосфату.....	87
3.5. Дослідження впливу піридоксаль-5-фосфату на показники скоротливої функції та коронарний потік ізольованого серця старих щурів при ішемії-реперфузії.....	91
3.6. Вплив активації ендогенного синтезу H_2S на ендотеліїзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти старих щурів.....	97
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	102
ВИСНОВКИ.....	108
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	110
ДОДАТОК 1.	
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.....	140

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АНТ – аденіннуклеотидтранслоказа
АТФ – аденозинтрифосфат
АФА – активні форми азоту
АФК – активні форми кисню
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
Цф-Д – циклофілін Д
ЦсА – циклоспорин А
САТ – цистеїнамінотрансфераза
CBS – цистатіонін- β -синтаза
CsA – циклоспорином А
CSE – цистатіонін- γ -ліаза
cNOS – конститутивна ізоформа синтази оксиду азоту
 dP/dt_{\max} – швидкість підвищення ТЛШ
 dP/dt_{\min} – швидкість зниження ТЛШ
 H_2O_2 – пероксид водню
 H_2S – сірководень
iNOS – індукцйбельна ізоформа синтази оксиду азоту
L-NAME – гідрохлорид N-нітро-L-аргінін метилового естеру

$\cdot\text{O}_2^-$ – супероксидний радикал

$\cdot\text{OH}$ – гідроксильний радикал

ONOO^- – пероксинітрит

NaHS – гідросульфід натрію

NO – оксид азоту

PLP – піридоксаль-5-фосфат

VDAC – потенціалзалежний аніонний канал

3-MPST – 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза

ВСТУП

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; Donnarumma 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-меркаптопіруват-сульфуртрансфераза (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 Papapetropoulo, 2017). Їх використання здійснює протективний або коригуючий вплив на порушення функціонального стану тканин при тій чи іншій патології, що зумовлена недостатнім синтезом H_2S (Levinn 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», 2010-2013 рр. (№ держреєстрації 0107U005336) та «Дослідження ролі сигнальних сполук сірки в реакціях серцево-судинної системи щурів при різних станах організму», 2014-2018 рр. (№ держреєстрації 0113U007276).

Мета і завдання дослідження.

Метою роботи було дослідити вплив активації синтезу ендогенного 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 ендогенної 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 ендогенного 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 транзитornoї 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 cNOS і синтезу NO, а також знижує активність 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 O-CMN 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, можуть 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 усіх 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Сірководень (H_2S) розглядається як наймолодший представник сімейства газових трансмітерів, до якого входять також оксид азоту (NO) та оксид вуглецю (CO). Завдяки їх унікальній властивості вільно дифундувати через біологічні мембрани без залучення специфічних рецепторів, взаємодіяти з мішенями, важко уявити фізіологічні або патологічні процеси, до яких вони не були б залучені (Kimura H., 2016; Wang R. 2012).

1.1. Фізико-хімічні властивості H_2S у ссавців

Сірководень – це безбарвний, легкозаймистий, водорозчинний газ із характерним запахом тухлих яєць. За останні кілька століть H_2S був відомий лише своєю токсичністю та небезпекою для навколишнього середовища, нині багато дослідників визнають його важливим цитопротекторним ендогенним модулятором багатьох фізіологічних функцій. Молекулярна маса сірководню становить 34,08 г/моль, густина – 1,19, що є важчою за повітря (1,0), температура кипіння становить $-60,3\text{ }^\circ\text{C}$, температура плавлення $-82,3\text{ }^\circ\text{C}$, а температура замерзання $-86\text{ }^\circ\text{C}$. При кімнатній температурі ($20\text{ }^\circ\text{C}$), один грам H_2S розчиниться у 242 мл води. Підвищення температури збільшує розчинність сірководню. 1 г H_2S розчиняється в 94,3 мл абсолютного етанолу, або 48,5 мл діетилового ефіру. H_2S не утворює водневих зв'язків і є ліпофільним, що дає змогу йому проходити через біологічні мембрани і діяти як паракринна сигнальна молекула (Cuevasanta et al., 2012).

У водному розчині H_2S являється слабкою кислотою з константою дисоціації кислоти (pK_a) = 6,76 при $37\text{ }^\circ\text{C}$, яка дисоціює, утворюючи іони H^+ , гідросульфідний аніон (HS^-) та сульфідний аніон (S^{2-}): $\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{H}^+ + \text{HS}^- \rightarrow 2\text{H}^+ + \text{S}^{2-}$. За умов $\text{pK}_{a1} \sim 7.0$ і $\text{pK}_{a2} > 17$ та при $37\text{ }^\circ\text{C}$ і $\text{pH } 7,4$ у біологічних

тканинах сірководень практично не існує як іон S^{2-} , тоді як H_2S та іони HS^- перебувають у майже однаковій кількості в клітині, і приблизно у співвідношенні 20% H_2S та 80% HS^- у позаклітинній рідині та плазмі (Wang R., 2012). У лужному мітохондріальному матриксі (pH 8,0) кількість іонів HS^- сягає 92%, тоді як решта 8% знаходиться у формі H_2S . Навпаки, в кислих умовах (pH 4,7) у лізосомах > 99% сірководню знаходиться у формі H_2S і є трохи полярним, що дає змогу йому вільно дифундувати і накопичуватися у водних або гідрофобних середовищах, таких як біологічні мембрани (Giuffre and Vicente, 2018).

Гідросульфідний аніон може піддаватися окисненню за наявності O_2 , утворюючи окиснені сульфідні форми, такі як сульфїт (SO_3^{2-}), сульфат (SO_4^{2-}), тіосульфат ($S_2O_3^{2-}$), політїонати (SnO_{n+2}^-) та полісульфїди (S_x^{2-}), а також інші види окиснених полісульфїдів (Chen and Morris, 1972).

Фїзіологічна концентрація H_2S

Концентрації H_2S можуть відрізнятися залежно від віку, тканин та методів вимірювання. Для підтримки фізіологічних клітинних функцій у людини вміст H_2S у тканинах може бути в мікромольному діапазоні. Повідомляється, що концентрація H_2S у крові може становити 10-100 мкмоль/л, у мозку 50-100 мкмоль/л та 160 мкмоль/л у плазмі (Elsey et al., 2010).

Кислотно лабільна сірка та сульфанова сірка – дві основні форми зберігання H_2S в клітинах ссавців, що може мати вирішальне значення для регулювання доступності H_2S за різних внутрішньоклітинних умов. Сульфанові сірчані сполуки включають елементарну сірку, дисульфїди, персульфїди, полісульфїди, політїонати та тіосульфат (Ishigami et al., 2009). Вільний (неокислений) H_2S , ймовірно, наявний при нижчих концентраціях, ніж оцінювали спочатку (Elsey et al., 2010).

Дослідження, що проведені за допомогою полярографічного датчика H_2S , показують, що швидкість продукції H_2S у печінці, мозку, аорті та серці щурів становить $12,3 \pm 4,6$, $10,6 \pm 3,2$, $5,8 \pm 1,7$ та $1,1 \pm 0,3$ пмоль / с / мг білка відповідно. Швидкість вироблення H_2S у тканинах аорти, хвостової артерії та брижової артерії становить $3,6 \pm 1,3$, $8,7 \pm 2,7$ та $3,4 \pm 0,7$ нмоль/хв/г відповідно; крім того, концентрація H_2S у клітинах гладенької мускулатури може становити приблизно 100 мкмоль/л у певних судинах (Zhao and Wang, 2002).

1.2. Ендогенний синтез та метаболізм H_2S

У тканинах ссавців H_2S може вироблятися як ферментними, так і неферментативними шляхами, і саме за допомогою ферментативного способу (транссульфурація) генерується найбільше H_2S в організмі (рис.1.1) (Wang R., 2012). Неферментативне утворення H_2S відбувається в результаті реакції пертворення тіолу або тіол-вмісних сполук. Yang та ін. повідомляють, що цистеїн є найкращим субстратом для неферментативного утворення H_2S і що такий процес каталізується залізом та вітаміном B_6 (Yang et al., 2019). Цей шлях продукції H_2S переважає у всіх тканинах людини, крім печінки та нирок. Також відомо, що незначна кількість H_2S продукується кишковими бактеріями, які відновлюють сірку (Shen et al., 2013).

У ферментативному синтезі H_2S беруть участь такі ензими: цистатіонін- β -синтаза (cystathionine β -synthase, CBS), цистатіонін- γ -ліаза (cystathionine γ -lyase, CSE), а також 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, 3-MST), що кон'югована з цистеїнамінотрансферазою (CAT) (рис.1.1) (Wang R., 2012). Основний внесок у ендогенному утворенні H_2S здійснюють два PLP-залежні ферменти, а саме CSE та CBS. Вони використовують L-цистеїн або гомоцистеїн як субстрати. Продукція H_2S за участю CBS включає реакцію конденсації між

гомоцистеїном та L-цистеїном з утворенням цистатіоніну та H_2S . CSE каталізує реакцію перетворення L-цистеїну в тіоцистеїн та піруват. Утворений таким чином тіоцистеїн лізується до цистеїну та H_2S . CAT є теж піридоксаль-5-фосфатзалежним ензимом, і він каталізує синтез 3-меркаптопірувату з L-цистеїну та α -кетоглутарату. Потім 3-MST десульфурує 3-меркаптопіруват, утворюючи тіосульфат, який відновлюється до H_2S . Нещодавно Shibuya та співавт. визначили новий шлях виробництва H_2S з D-цистеїну шляхом активації 3-MST та D-амінокислотної оксидази (Shibuya et al., 2013).

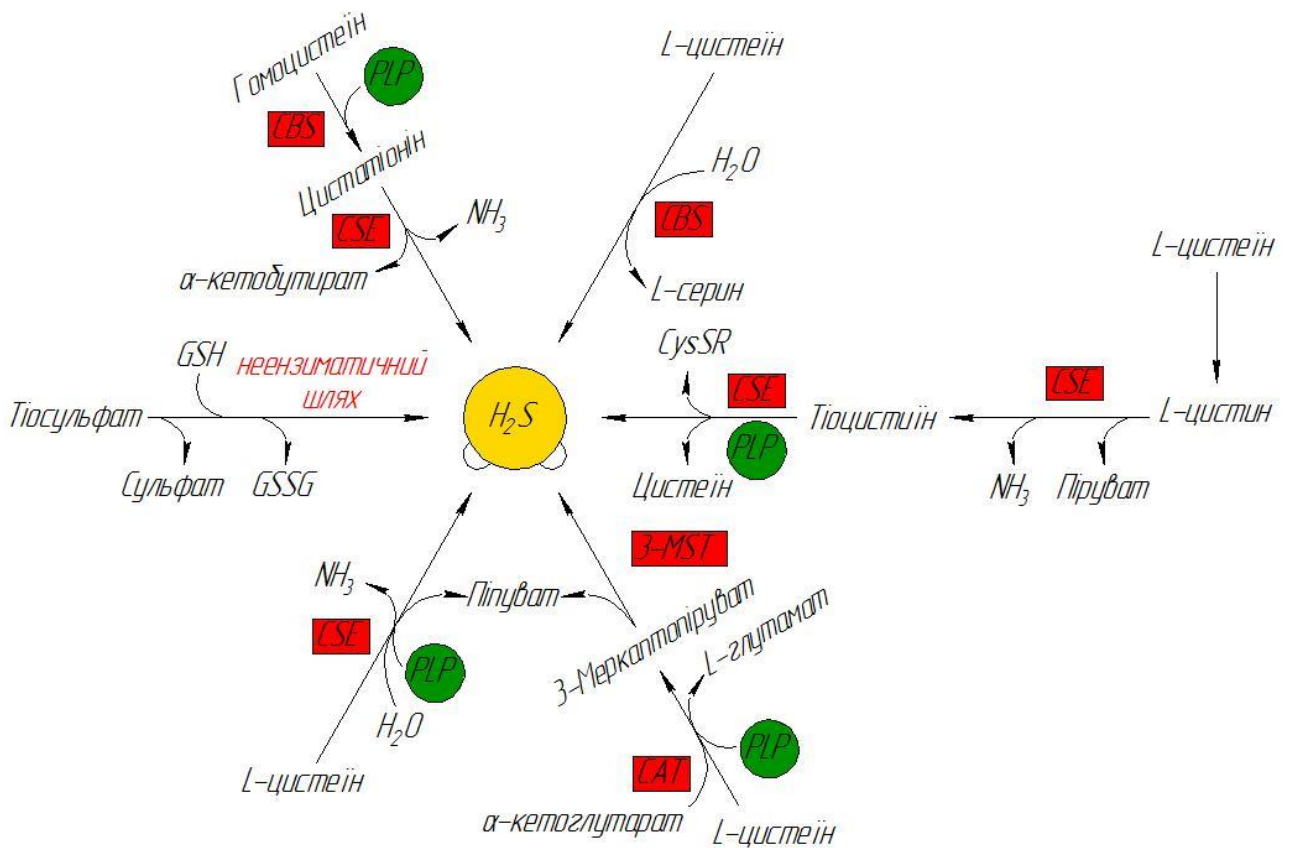


Рис. 1.1. Схема ендогенного синтезу сірководню. CBS, цистатіонін- β -синтаза; CSE, цистатіонін- γ -ліаза; CAT, цистеїнамінотрансфераза; 3-MST, 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза; PLP, піридоксаль-5-фосфат (Wang R., 2012).

CBS (рис.1.2.) є гомотетрамерним ферментом із молекулярною масою кожної субодиниць 63 кДа, який пов'язує два кофактори – PLP та гем (Miles and Kraus, 2004). Кожна субодиниця CBS складається із 551 амінокислотного залишку і утворює три домени (рис. 4, а): N-кінцевий домен (залишки 1-70), який пов'язує некаталітичний гем-кофактор, центральний каталітичний PLP-зв'язуючий домен (залишки 71-381) та С-кінцевий регуляторний домен (залишки 412-551, також відомий як модуль Бейтмена, що включає CBS1 та CBS2), що відповідає за активацію ферменту після зв'язування аденозил-1-метіоніном (AdoMet) (Kery et al., 1994). Структурні дослідження на ферменті людини показали, що каталітичний домен має високозбережену структурну складку β -сімейства PLP-залежних ферментів. PLP пов'язаний з ϵ -аміногрупою Lys119 через зв'язок з основами Шиффа, утворюючи так званий «внутрішній альдимін» (Kery et al., 1999).

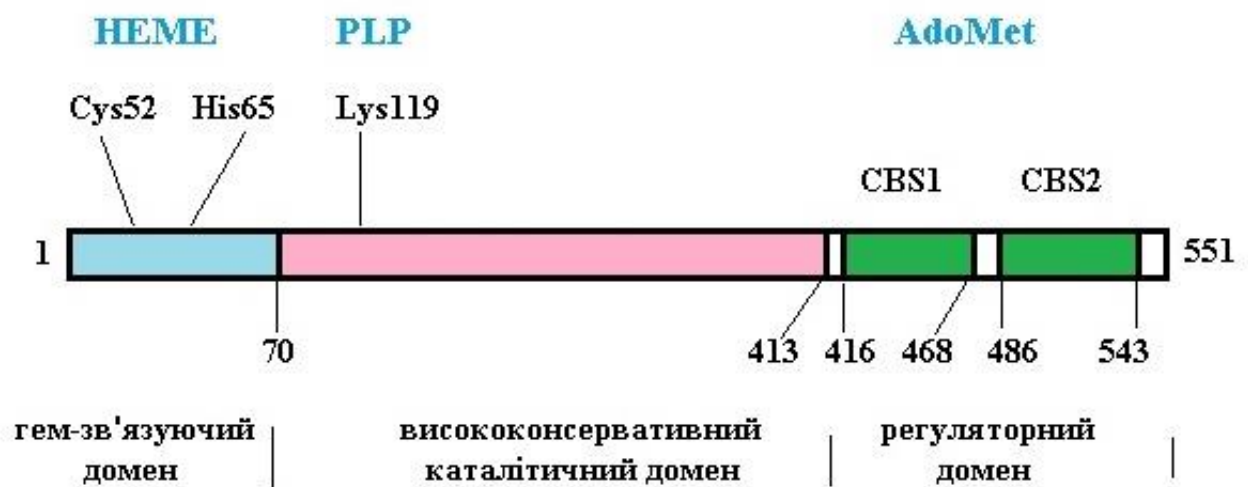


Рис. 1.2. Доменна структура цистатіонін- β -синтази (CBS) (Miles and Kraus, 2004).

CBS експресується здебільшого в нервовій системі, печінці, а також нирках, клубовій кишці, матці та острівцях підшлункової залози (Wang J., 2018; Guzma et al., 2006; Miyamoto et al., 2015; Kimura 2014). Нещодавно повідомлялося про експресію CBS у сонній артерії, а також у маткових,

брижових та пупкових артеріях (Saha et al., 2016). Хоч CBS головним чином є цитозольним ферментом, проте існують дані, які свідчать про його наявність у мітохондріях клітин раку яєчників та товстої кишки (Bhattacharyu et al., 2013, Szabo et al., 2013). Виробництво H_2S за участю CBS посилюється за допомогою S-аденоксиметионіну, алостеричного активатора CBS, і пригнічується NO і CO. Також регуляторами активності CBS являються тестостерон, глюкокортикоїди, фактор некрозу пухлин α (TNF- α) та кальмодулін/ Ca^{2+} -опосередкований шлях.

CSE – це гомотетрамер, що складається з 405-амінокислотних мономерів молекулярною масою 45 кДа, кожен з яких складається з двох структурних доменів. Більший PLP-зв'язуючий каталітичний домен (що включає залишки 9-263) складається у вигляді $\alpha/\beta/\alpha$ складки. Менший C-кінцевий домен (залишки 264-401). Подібно до CBS, PLP в CSE закріплюється через зв'язок основи Шиффа між карбонілом PLP та ϵ -аміногрупою залишку лізину (Lys212), хоча для стабілізації PLP відіграють інші сили: π -стикуюча взаємодія між фенільною частиною Tyr114, піридиновим кільцем PLP, H-зв'язками між фосфатною частиною PLP, залишками Gly90, Leu91, Ser209 та Thr211 з тієї ж субодиниці, Tyr60 та Arg62 із сусідньої субодиниці.

CSE здебільшого продукує H_2S у печінці, нирках, нейронах, макрофагах та клітинах гладких м'язів як судинних, так і несудинних (Kabil and Banerjee, 2014; Badiei et al., 2016, Dominy and Stipanuk, 2004). Експресія та активність CSE зазвичай вважаються незначними у мозку, серці та селезінці (Giuffre and Vicente, 2018; Kuo et al., 2016). CSE може транслокуватися з цитозолу в мітохондрії в умовах клітинного стресу, такого як підвищення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} (Fu et al., 2012). Вважається, що CSE є основним ендогенним джерелом H_2S у периферичних тканинах, оскільки нокаутовані за геном CSE миші мають низький вміст H_2S у сироватці крові (Yang et al., 2009). Повідомлялося про збільшення

активності CSE за участю кальцій-кальмодулінового комплексу (Yang et al., 2009). CSE індукується в клітинах за допомогою ряду подразників, включаючи стрес ендоплазматичного ретикулуму, окисний стрес, дефіцит поживних речовин та гіпергомоцистеїнемії (Sbodio et al., 2019).

3-MST є цинкнезалежним ферментом, що складається з 297 амінокислотних залишків та існує у вигляді мономеру ~ 33 кДа, що складається з двох структурно споріднених доменів з роданоподібною складкою. N-кінцеві (залишки 1-138) та C-кінцеві (залишки 165-285) домени з'єднані 26-амінокислотним лінкером, який характеризується сильною взаємодією з обома доменами. 3-MST експресується в клітинах нирок, печінки, серця та мозку людини (зокрема, нейронах). Було також показано, що він локалізується як у мітохондріях, так і в цитозолі (Fräsdorf et al., 2015). Механізми регуляції активності ферментів 3-MPST та CAT є маловідомими. Однак з'ясовано, що аспартат, інгібітор CAT, значною мірою пригнічує біосинтез H_2S і зазвичай використовується як фармакологічний інструмент для вивчення функції H_2S , який синтезується 3-MST (Shibuya et al., 2009a; Shibuya et al., 2009b). Крім того, було показано, що Ca^{2+} у підвищеній внутрішньоклітинній концентрації пригнічує активність CAT і подальший синтез H_2S незалежно від кальмодуліну (Mikami et al., 2011). Однак точний молекулярний механізм, що лежить в основі цього регулювання, невідомий.

У метаболізмі H_2S беруть участь три різні механізми: окиснення, метилювання та зв'язування з металопротеїнами. Окиснення є найпоширенішою реакцією і охоплює швидкий метаболізм H_2S . Згідно з сучасними уявленнями, цей процес відбувається у мітохондріях і включає чотири окремі, але функціонально асоційовані ферменти: сульфідхінон-оксидоредуктаза (SQR), персульфіддіоксигеназа (також відома як ETHE₁ або сірчана діоксигеназа), тіосульфатсульфуртрансфераза (роденаза) та сульфітооксидаза (SOx). Спочатку H_2S окиснюється сульфідхінон-оксидоредуктазою (SQR) та передає електронні еквіваленти хінонам і

утворює персульфід глутатіону (GSSH) як спільний продукт. Електрони переносяться на O_2 за допомогою комплексу III, цитохрому c та комплексу IV, що сприяє синтезу АТФ. Потім GSSH з O_2 , як косубстратом, перетворюється за допомогою персульфіддіоксигенази у сульфїт (SO_3^{2-}) та GSH. Сульфїт може бути перетворений, із GSSH як косубстратом, у тїосульфат ($S_2O_3^{2-}$) роданом (Rhod) або окиснений у сульфат (SO_4^{2-}) за допомогою SOx. Далі сульфїт може бути окиснений у мітохондріях тїосульфатсульфуртрансферазою, де кофактором виступає GSSH, до тїосульфату ($S_2O_3^{2-}$) або піддаватись окисненню у міжмембранному просторі SOx до сульфату (Giuffre and Vicente, 2018). Кінцеві продукти виводяться із сечею у вигляді вільного, так і кон'югованого сульфату (Liu Y.-H., et al., 2012).

Другим шляхом метаболізму H_2S є метилювання тїол-S-метильтрансферазою (TSMT) до метантіолу (CH_3-SH) та диметилсульфїду (CH_3-SCH_3) (Furneet al., 2001). Ця реакція відбувається переважно в цитозолі та відіграє меншу роль, ніж шлях окиснення. Диметилсульфїд – ще один субстрат роденази, який окиснюється до тїоціанату і сульфату, що виводиться із сечею. TSMT – це фермент з найвищою активністю в слизовій оболонці товстої і сліпої кишок, проте свою активність він проявляє також в печінці, легенях та нирках. Нарешті, H_2S може зв'язуватися з метгемоглобіном, утворюючи сульфгемоглобін (Wang R. 2012).

Виведення H_2S з організму може здійснюватися також через легені. У здорових людей щоденна втрата H_2S через легені є дуже малою порівняно з втратою сульфату з сечею, та становить 25–50 ppb H_2S у видихнутому повітрі (Wang R. 2012).

1.3. Роль H_2S у серцево-судинній системі

Останнім часом з'являється все більше даних про те, що такий газовий трансмітер, як сірководень має вазо- та кардіопротекторні властивості, а саме: індукує вазорелаксацію, зменшує окисний стрес, чинить захист від ішемічно-реперфузійного пошкодження міокарда, має протизапальний та антиоксидантний ефекти.

1.3.1. Механізми дії H_2S як антиоксиданта. Дисбаланс між продукцією вільних радикалів – активних форм кисню (АФК) та активних форм азоту (АФА) – й антиоксидантними системами захисту в клітині призводить до окисного стресу, що супроводжує фізіологічне старіння та є причиною розвитку таких патологічних станів, як ішемія, гіпоксія, діабет тощо (Zhang et al., 2013, Harman 1956). Надмірна кількість АФК/АФА може призвести до пошкодження ДНК, неправильного складання білків, пошкодження органел тощо (Maiese 2015). На сьогодні відомо, що H_2S захищає клітини від окисного стресу за допомогою двох різних механізмів: він діє, як “скаванджер” – прямий поглинач АФК/АФА, або підвищує рівень антиоксидантної системи захисту.

H_2S , як “скаванджер” АФК/АФА. Основними видами АФК/АФА, що утворюються в клітинах, є $\cdot O_2^-$, H_2O_2 та NO (Fransen et al., 2012). Відомо, що H_2S зменшує перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) у серці після ізопротериноліндукованого ішемічного пошкодження міокарда шляхом дії як “скаванджер” на H_2O_2 та $\cdot O_2^-$ (Geng et al., 2004, a). Пероксинітрит ($ONOO^-$) є цитотоксичним та потужним окиснювачем, який утворюється внаслідок швидкої взаємодії $\cdot O_2^-$ і NO , та може призвести до нітрування тирозину та залишків тирозину в білках. Застосування $NaHS$ в концентрації 30 мкмоль/л у клітинній лінії нейробластоми людини SH-SY5Y у фізіологічних умовах інгібує $ONOO^-$ -індуковане нітрування тирозину (Whiteman et al., 2004). Крім

того, повідомляється, що H_2S може захищати клітини нейробластоми мозку миші Neuro2a від окисного стресу, опосередкованого H_2O_2 , і відновлювати рівень глутатіону через пригнічення H_2O_2 (Yang et al., 2005).

Nrf2-ROS-AMPK сигнальний шлях. У дослідженнях показано, що H_2S може підвищувати регуляцію ендогенних антиоксидантів через Nrf2-залежний сигнальний шлях (Calvert et al., 2009). Nrf2 є членом NF-E2 сімейства та регулює експресію генів широкого спектра ферментів, які є важливими для ослаблення окисного стресу (Fisher et al., 2007). Ця регуляція опосередковується зв'язуванням Nrf2 з антиоксидантним реагуючим елементом (ARE), який контролює експресію генів, таких як гемоксигеназа-1 (HO-1), тіоредоксин (Trx), глутатіон-S-трансфераза (GST), глутатіонпероксидаза (GPx), тріоредоксинредуктаза (TrxR) та каталаза (Zhu et al., 2005). У цитоплазмі Nrf2 з'єднується з Kelch-подібним ECH-асоційованим білком 1 (Keap-1), який інгібує його перенесення в ядро. H_2S сприяє вивільненню Nrf2 s-сульфгідрату Keap1, що сприяє транслокації Nrf2 в ядро (Guo et al., 2014). Показано, що H_2S знижує високу глюкозо-індуковану аутофагію в ендотеліальних клітинах через сигнальний шлях Nrf2-ROS-AMPK. Введення 100 мкмоль/кг NaHS може захистити ендотеліальні клітини артерій мишей від надмірної аутофагії, індукованої при діабеті II типу, і послабити порушення експресії та активності СОД і каталази (Liu J., et al., 2016).

SR-A сигнальний шлях. SR-A, рецептор “скаванджера” макрофагів класу А, що в основному експресується на апараті Гольджі або на плазматичній мембрані макрофагів (Xu et al., 2017). SR-A може сприяти вродженій імунній відповіді, регулюючи прямий фагоцитоз патогенних бактерій та розпізнаючи різні молекулярні структури, що поєднані з патогеном (Ganesan et al., 2012; Canton et al., 2013). Було показано, що внутрішньовенне введення NaHS у дозі 100 мкг/кг після 50-хвилинної ішемії сприяє послабленню ішемічно-реперфузійного пошкодження нирки,

пригнічуючи аутофагію, яка була викликана стресом, за допомогою сигнального шляху SR-A у щурів (Ling et al., 2017). SR-A також є потенційним регуляторним фактором окисного стресу та супутнього запалення (Ozeki et al., 2006). Повідомляється, що гіпероксія збільшує експресію SR-A у легенях миші, тоді як дефіцит SR-A посилює окисну травму легень із збільшенням рівня фактора некрозу пухлини- α (TNF- α). Внутрішньолегенева SR-A експресія зменшує активацію макрофагів, інгібуючи вироблення прозапальних цитокінів та захищаючи від окисного стресу (Kobayashi et al., 2007).

Модуляція відновленої форми глутатіону (GSH). H_2S захищає нейрони від окисного стресу та покращує життєздатність клітин, збільшуючи вироблення внутрішньоклітинного GSH, головного антиоксиданта, що захищає клітини від окисного стресу (Kimura Y., et al., 2006). H_2S перерозподіляє GSH до мітохондрій, які в основному генерують АФК. Як додатковий механізм, H_2S , що синтезується 3-MST з CAT в мітохондріях, може безпосередньо зменшувати окисний стрес і захищати клітини. Оскільки H_2S не інгібує транспорт GSH з цитоплазми в мітохондрії, але ефективно збільшує мітохондріальний GSH, тому H_2S може суттєво сприяти захисту клітин від окисного стресу (Yang W., et al., 2005). Більше того, при окисному стресі, спричиненому ішемічно-реперфузійним пошкодженням, вміст GSH знижуються. H_2S збільшує внутрішньоклітинні концентрації GSH за рахунок посилення транспорту цистеїну більшою мірою, ніж цистину.

1.3.2. Роль H_2S у захисті міокарда після ішемічно-реперфузійного пошкодження. Протягом тривалого ішемічного періоду, наприклад, під час зупинки серця, тканини пристосовуються до гіпоксичного середовища таким чином, що при швидкій кисневій реперфузії, окисний стрес спричиняє пошкодження тканини. В умовах гіпоксичного стану порушується вироблення аденозинтрифосфату (АТФ) у мітохондріях та збільшується

концентрація внутрішньоклітинного Ca^{2+} . Під час реперфузії вміст внутрішньоклітинного та мітохондріального Ca^{2+} ще більше зростає, що призводить до посиленого утворення АФК. Всі ці фактори, поряд з підвищеною концентрацією неорганічного фосфату та нормалізацією внутрішньоклітинного рН, призводять до змін проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани одночасно з відкриванням неспецифічної високопровідної МП (Yellon and Hausenloy, 2007; Halestrap, 2010). Завдяки своїй центральній ролі у загибелі клітин, інгібування відкривання МП є найбільш перспективною терапевтичною стратегією захисту та відновлення функції мітохондрій під час ішемічно-реперфузійного пошкодження серця. З'являється все більше доказів того, що H_2S захищає мітохондрії під час ішемії-реперфузії, покращуючи дихання та сприяючи біогенезу. Введення ізольованим мітохондріям донора H_2S , а саме Na_2S , призводило до більшого відновлення постгіпоксичного дихання, ніж у тих мітохондрій, які не зазнавали такого лікування (Elrod et al., 2007). Крім того, було показано, що донор H_2S – AP39, який вводили щурам під час реперфузії, здійснював захисний ефект від ішемічно-реперфузійного пошкодження міокарда, інгібуючи МП (Karwi et al., 2017).

Існують вагомі докази, що вказують на вироблення АФК як первинну причину пошкодження міокарда після ішемії-реперфузії. АФК, що утворюються під час окисного стресу, можуть стимулювати перекисне окислення ліпідів (ПОЛ), окиснювати білки до неактивних станів і спричиняти розриви ланцюгів ДНК (Venardos et al., 2007). Geng та співавт. виявили, що H_2S зменшує ПОЛ після ізопротериноліндукового ішемічного пошкодження міокарда, діючи як “скаванджер” H_2O_2 та $\cdot\text{O}_2^-$ (Geng et al., 2004, a). Повідомляється, що H_2S має здатність пригнічувати такі ключові промотори патології, як: генерація АФК, активація ядерного фактора NF- κB , підвищена експресія цитокінів клітинної адгезії та індукція апоптозу (Wang Y., et al., 2009). Ці механізми, за допомогою яких H_2S може

зменшувати бляшки в артеріях та послабити атеросклеротичну травму, вказують, що протизапальний ефект H_2S є корисним у разі серцево-судинних захворювань. У культивованих кардіоміоцитах було виявлено залежні від концентрації NaHS інгібуючі ефекти апоптозу, викликані гіпоксією/реоксигенацією (Yao et al., 2010). NaHS також суттєво підвищував життєздатність клітин та скоротливість міоцитів (Hu et al., 2008). Також показано, що H_2S збільшував ядерну локалізацію Nrf2 та фосфорилування перетворювача сигналу та активатора транскрипції 3 (STAT-3) і протеїнкінази C (PKC ϵ). Крім того, H_2S підвищує експресію HO-1 і trx-1, білків теплового шоку 90 і 70, В-клітин лімфоми-2 (Bcl-2), В-клітин лімфоми - (Bcl-xL) та циклооксигенази-2 (COX-2), а також інактивував проапоптоген Bad (Calvert et al., 2009). Введення H_2S до ішемії або під час реперфузії суттєво відновлювало пошкодження міокарда в цих умовах. Активність CBS, CSE та 3-MST, ферментів синтезу H_2S пригнічується перевантаженням Ca^{2+} та окисним стресом, які є основними патологічними складовими ішемічно-реперфузійного пошкодження, під час якого продукція H_2S є зниженою (Kimura H., 2015. Signaling). При низьких концентраціях H_2S (<10 мкмоль/л) збільшує споживання мітохондріального O_2 та продукцію АТФ, тоді як при більш високих концентраціях (1 мМ) спостерігаються протилежні ефекти завдяки інгібуванню комплексу-IV (Kosir and Podbregar 2017; Jiang J et.al., 2016).

1.3.3. Вплив H_2S на тонус гладеньких м'язів судин. H_2S має різноспрямований регулюючий вплив на судинний тонус. Він може не тільки розслабити але і скорочувати судини (Caprnda et al., 2017). Дослідження, опубліковане в Science (Yang et al., 2008) показало, що основним механізмом вироблення H_2S у судинній системі у фізіологічних умовах є активація CSE кальцій-кальмодуліном (CaM). У мишей без гена CSE спостерігався нижчий вміст H_2S з аномально підвищеним артеріальним тиском та втратою

ендотелійзалежної вазодилатаційної функції. Ці висновки підтверджують значення H_2S у підтримці функції судин. Також показано, що розширення судин ворітної вени під дією H_2S було помітно сильнішим, ніж у грудній аорті (Kimura H., 2015).

H_2S також має судинозвужувальну дію за певних умов. $NaHS$ призводить до констрикції гладеньких м'язів судин у концентраціях від 5×10^{-6} М до 10^{-4} М (Orlov et al., 2017). Ping своєму дослідженні повідомив про подібні результати (Ping et al., 2015). $NaHS$ у діапазоні концентрацій від 10 до 300 мкмоль/л викликав звуження коронарних артерій у щурів. Тому H_2S -залежна регуляція судинного тонуусу характеризується різноспрямованими ефектами.

Механізми, що лежать в основі H_2S -індукованої вазодилатації, до кінця не вивчені. Припускають, що H_2S здійснює вазорелаксуючу дію через відкривання АТФ-залежних калієвих каналів (K^+_{ATP} -канали) у гладеньких м'язах (ГМ) судин (Orlov et al., 2017). Сірководень викликає сульфгідратацію цистеїну-43 (C43) в Kir6.1 (субодиниця K^+_{ATP} -каналу), що призводить до зменшення здатності Kir 6.1 зв'язуватися з АТФ, тоді як здатність Kir 6.1 зв'язуватися з PIP_2 є збільшеною. Це в свою чергу призводить до відкривання K^+_{ATP} -каналів та розслаблення ГМ судин (Mustafa et al., 2011). Дослідження останніх років показують, що Ca^{2+} -залежні калієві канали (K_{Ca} -канали) активуються також H_2S (Hedegaard et al., 2016; Wang M., 2016). H_2S збільшує активність кальцієвих спалахів у ГМ, що необхідно для активації ендотеліальних Ca^{2+} -залежних калієвих каналів високої провідності (BK_{Ca} -канали) (Jackson-Weaver et al., 2015). Потенційний перехідний рецепторний катіонний канал підсімейства V член 4 (TRPV4) також модифікується H_2S за допомогою сульфгідратації. Потім відбувається активація та відкриванням TRPV4-залежного внутрішнього потоку Ca^{2+} та ендотеліальних кальційзалежних K^+ -каналів ($BKCa$), що призводить до вазодилатації (Naik et al., 2016). Згідно з останніми даними, H_2S спричиняє S-сульфгідратацію Ca^{2+} -

каналів L-типу, що призводить до зменшення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} (Dai et al., 2019).

На сьогодні залишається суперечливим питанням чи залучений H_2S у регуляції шляху циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ). Переконлива кількість доказів вказує на те, що H_2S чинить судинорозширювальну дію завдяки активації ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS) та інгібуванню деградацію цГМФ (Beltowski and Jamroz-Wisniewska, 2014; Cao et al., 2018). Вважається, що у цьому задіяні кілька основних механізмів: (1) H_2S безпосередньо реагує з NO і утворює нітроксил (HNO), активуючи тим самим HNO/TRPA1/CGRP-шлях, який регулює тонус судин (Eberhardt et al., 2014) (де TRPA1 – потенційний перехідний рецептор анкірину 1 та CGRP – пептид, пов'язаний з геном кальцитоніну) (2) H_2S пригнічує активність фосфодіестерази 5 (PDE5), зменшуючи деградацію цГМФ та сприяючи передачі сигналів цГМФ, з подальшою активацією цГМФ-залежної протеїнкінази (PKG) для фосфорилування стимульованого вазодилатором фосфопротеїна (VASP), що врешті-решт призводить до вазодилатації (Coletta et al., 2012). (3) H_2S може зменшувати окисний стрес, що призводить до посилення спряженого стану eNOS шляхом фосфорилування eNOSS1177 (King et al., 2014; Lo Faro et al., 2014). (4) H_2S впливає на реакцію взаємодії гуанілатциклази з NO (Cao et al., 2018; Bibli et al., 2015). Оксид азоту, що утворився під дією ендотеліальної NO-синтази (eNOS), дифундує в ГМ, активує гуанілатциклазу (ГЦ), збільшує утворення цГМФ, що призводить до активації цГМФ-залежної протеїнкінази, яка стимулює вивільнення внутрішньоклітинного Ca^{2+} , внаслідок чого спостерігається розслаблення ГМ.

Ендотеліальні клітини вистилають внутрішню частину кровоносних та лімфатичних судин і їх дисфункція призводить до розвитку багатьох серцево-судинних захворювань, включаючи атеросклероз та гіпертонію (Gimbrone and Garcia-Cardena, 2016; Konukoglu and Uzun, 2017). В одному з досліджень

Liu et al. (Liu N. et al., 2017) повідомили, що ендотеліальні клітини аорти щурів, оброблені високим вмістом глюкози та високим пальмітатом (жирною кислотою), мали значно меншу експресію CSE та продукцію H_2S . Однак застосування екзогенного H_2S для цих клітин інгібувало апоптоз, що було пов'язано зі зменшенням експресії білків, які впливають на поділ мітохондрій, фрагментацію мітохондрій та АФК, а також мітофагію (Liu N. et al., 2017). Інші дослідження показали, що донори H_2S – AP39 та AP123, які орієнтовані на мітохондрії (mitochondrion-targeted H_2S donors AP39 and AP123), успішно знижують гіперполяризацію мембрани мітохондрій та вироблення АФК, а також додатково підвищують активність комплексу III ЕТЛ та метаболізм мітохондрій в ендотеліальних клітинах, що зазнали надлишкової дії глюкози (Gero et al., 2016).

В експериментах із використанням спонтанно гіпертензивних щурів було виявлено, що ці тварини мають нижчу активність ферменту CSE, а також нижчий вміст ендогенного H_2S порівняно з контролем (Yan et al., 2004; Du et al., 2003). Іншим важливим висновком було те, що у мишей CSE-KO розвилась гіпертонія, знизилася концентрація H_2S у плазмі крові та спостерігалось порушення ендотелійзалежної вазорелаксації (Yang G. et al., 2008; King et al., 2014).

1.3.4. Вплив H_2S на мітохондрії. Мітохондрії вважаються однією з основних мішеней сигналізації H_2S . Основним механізмом його впливу є дія на дихання мітохондрій, апоптоз, що залежить від мітохондрій, біогенез та морфологію. Як і інші сигнальні гази, NO і CO, H_2S , безпосередньо впливає на активність електрон-транспортного ланцюга (ЕТЛ), виступаючи одночасно субстратом і антагоністом цитохром-с-оксидази (Nicholls et al., 2013). При концентраціях < 20 мкмоль/л H_2S може виступати єдиним неорганічним субстратом, віддаючи електрон до ЕТЛ завдяки власному метаболізму за допомогою SQR (Theissen and Martin, 2008.). Електрони,

вивільнені після окислення H_2S за допомогою SQR, захоплюються убіхіноном і передаються на ЕТЛ в комплексі III для подальшого розповсюдження по ланцюгу. Ця активність може стимулювати окисне фосфорилування та вироблення АТФ у клітині. Повідомляється про важливість цього шляху окислення сульфідів мітохондрій у метаболізмі клітин товстої кишки. Епітелій товстої кишки регулярно зазнає дії високих концентрацій H_2S , що утворюється з мікробіому кишечника. Через це шлях окислення сульфідів у клітинах товстої кишки є надзвичайно ефективним. Дослідники повідомляють, що ферменти шляху сульфідного окислення розташовані на межі хазяїн-мікробіом, і експресія SQR є критично важливою для захисту епітелію від отруєння H_2S та ефективного сприяння окисному фосфорилуванню. З іншого боку, високий вміст H_2S інгібує ЕТЛ, порушує окисно-відновний баланс, зміщує метаболізм у бік відновного карбоксилювання та інгібує клітинну проліферацію (Libiad et al., 2019). Крім того, повідомляється, що H_2S , який утворюється всередині мітохондрій за допомогою 3-MST, є достатнім для посилення мітохондріального транспорту електронів та клітинної біоенергетики на низьких рівнях способом, який залежить від SQR (Modis et al., 2013). Крім того, пряме персульфування та як наслідок посилення АТФ-синтази є ще одним засобом, за допомогою якого H_2S може стимулювати ЕТС-активність у мітохондріях (Modis et al., 2016).

H_2S також здійснює свій вплив на мітохондріальний шлях апоптозу. У токсичних концентраціях H_2S індукує апоптоз шляхом транслокації Bcl-2 асоційованого X-білка (BAX) до мітохондрій, що сприяє утворенню та відкриванню МП, подальшому вивільненню цитохрому c, активації проапоптотичних білків (p21) та зниженню регуляції антиапоптотичних білків (Bcl-2) (Baskar et al., 2007; Adhikari S and Bhatia, 2008).

H_2S може сульфідувати ряд факторів транскрипції, таких як Nf-KB, IRF-1 та PGC-1a, для сприяння транскрипції декількох генів антиапоптотичного та мітохондріального біогенезу. Більше того, H_2S

збільшує експресію PGC-1 α за допомогою активації cAMP/PKA/AMPK, що посилює його транскрипційну стимуляцію мітохондріального біогенезу, а також коактивує Nrf2 та сприяє клітинному виживанню. H₂S також може стимулювати біоенергетику мітохондрій. Персульфідація АТФ-синтази та пряме перенесення електронів до ЕТЛ через взаємодії SQR/убихінон та цитохром с-оксидазу стимулюють продукцію АТФ у мітохондріях (Murphy et al., 2019).

1.4. Взаємодія H₂S і NO у серцево-судинній системі.

Сірководень та оксид азоту (NO) нині визнані важливими газовими трансмітерами, що мають деякі спільні патофізіологічні функції та шляхи передачі сигналів. H₂S та NO не тільки впливають на біосинтез один одного, але й відіграють регуляторну роль у серцево-судинній системі, залучаючи подібні сигнальні механізми або молекулярні мішені.

На моделі міокардиту спостерігалася висока експресія мРНК iNOS та білка. Застосування H₂S пригнічувало надмірну експресію iNOS та обмежувало запальну інфільтрацію клітин, зменшуючи серцевий набряк та послаблюючи ураження міокарда (Hua et al., 2013). Також було встановлено, що H₂S підвищував концентрацію кальцію та активував eNOS у залишку фосфосерину 1179. Використання хелатора кальцію скасувало H₂S-індукований синтез NO в ендотеліальних клітинах. Отже, активація eNOS та вироблення NO регулювались H₂S за рахунок вивільнення кальцію (Kida et al., 2013).

Як свідчать дані літератури, сірководень захищає серце від ішемічної травми за рахунок збільшення вивільнення NO, а додавання L-NAME послаблювало кардіопротекторну дію H₂S (Pan et al., 2006). При індукованому ізопротеренолом пошкодженні міокарда H₂S відігравав кардіопротекторну роль за рахунок підвищення рівня NO у міокарді та сироватці, але цей ефект

скасовувався, коли пригнічувалася NOS (Sojitra et al., 2012). Посткондиціонування H_2S викликало захисні ефекти при ішемічно-реперфузійному пошкодженні шляхом активації eNOS шляхів (Yong et al., 2008). У мишей CSE-KO зниження вмісту H_2S спричиняло дисфункцію eNOS, зменшення синтезу NO, що збільшувало окисний стрес та посилювало реакцію на ішемічно-реперфузійне пошкодження міокарда. При використанні екзогенного H_2S активувалася eNOS, підвищувався вміст NO та гальмувався окисний стрес. Однак H_2S не зменшив окислювальний стрес у мишей з мутацією гену eNOS. Отже, клітинний захист, який здійснювався за допомогою H_2S , тісно корелював з активацією eNOS та генеруванням NO (King et al., 2014). Також відомо, що H_2S та NO діючи сумісно послаблюють дисфункцію лівого шлуночка під час розвитку серцевої недостатності через VEGF/cGMP шлях (Wu et al., 2018). Нітрит натрію ($NaNO_2$) значно покращує функцію лівого шлуночка при індукованій ішемією хронічній серцевій недостатності за рахунок підвищення біодоступності H_2S , активації Nrf2 та антиоксидантного захисту (Donnarumma et al., 2016). GYY4137, донор H_2S , захищає серце від летального реперфузійного пошкодження через активацію PI3K/Akt шляху, що частково залежить від NO (Karwi et al., 2016). Однак інші літературні дані повідомляють деякі суперечливі твердження. Kubo та співавт. показали, що активність eNOS пригнічується H_2S в аорті щурів та мишей (Kubo et al., 2007). Крім того, Geng та співавт. встановили, що як екзогенний, так і ендогенний H_2S зменшують вироблення NO і запобігають активності та транскрипції eNOS (Geng et al., 2007). Можливо, різниця концентрацій H_2S та експериментальної моделі спричиняють суперечливі результати, і тому взаємодія між H_2S та NO у кардіопротекції потребує вивчення.

Кілька досліджень показали, що взаємодія між H_2S та NO підтримує судинний тонус. Hosoki та співавтори встановили, що H_2S викликав набагато сильнішу релаксацію судин за наявності NO (Hosoki et al., 1997). Деінервація

судин не впливала на H_2S -індуковану вазорелаксацію; однак вазорозшилювальний ефект H_2S пригнічувався у судинах без ендотелію. Блокування NOS призводило до послаблення H_2S -індукованої вазорелаксації (Zhao et al., 2001). Було показано, що продукція H_2S та NO за допомогою нового донора ZYZ-803, кон'югованого з H_2S та NO, призводила до регуляції судинного тонуусу через cGMP шлях. Блокування активності CSE та eNOS або відсутність ендотелію запобігає ZYZ-803-індукованій вазорелаксації (Wu et al., 2016). Відповідно до цих результатів, Coletta та співавтори повідомили, що H_2S і NO є взаємозалежними у регулюванні ендотелійзалежної вазорелаксації (Coletta et al., 2012). Отже ці дослідження свідчать, що H_2S виконує судинорегулюючу функцію NO-залежним чином.

1.5. Мітохондріальна пора, її структура та роль.

Перемінна проникність мітохондрій – це явище, при якому через внутрішню мембрану вільно переміщуються розчинені речовини розміром до 1,5 кДа (Haworth and Hunter, 1979). Відкривання МП призводить до колапсу потенціалу внутрішньої мембрани, роз'єднання дихального ланцюга, зупинки синтезу АТФ у мітохондріях і, врешті-решт, набухання, розриву та загибелі мітохондрій клітин (Halestrap, 2009). Слід зазначити, що ці згубні ефекти на енергозбереження та життєздатність клітин спостерігаються лише при довготривалому відкриванні МП, а саме у режимі високої провідності (Petronilli et al., 2001), тоді як короточасне її відкривання, яке було зареєстроване як в ізольованих мітохондріях, так і *in situ*, може брати участь у фізіологічній регуляції гомеостазу Ca^{2+} та АФК (Zorov et al., 2014), а також забезпечувати мітохондріям швидкий механізм вивільнення Ca^{2+} (Barsukova et al., 2011; Bernardi and von Stockum, 2012).

Відкривання МП активується іонами Ca^{2+} , фосфатами та АФК і пригнічується численними факторами, включаючи аденілові нуклеотиди, низький рН, двовалентні катіони, такі як Mg^{2+} , та інгібіторами CypD, а саме

циклоспорином А (CsA) та сангліфрініном А (Halestrap et al., 2004). Активація МП здійснюється за допомогою кіназ, а також посттрансляційної модифікації CypD (Elrod and Molkentin, 2013).

Хоча біофізичні властивості МП добре встановлені, проте молекулярні складові МП залишились не до кінця з'ясованими. Спочатку припускали, що МП складається із потенціалзалежного аніонного каналу (voltage dependent anion channel, VDAC) у зовнішній мітохондріальній мембрані, аденілінуклеотидтранслокази (adenine nucleotide translocator, ANT) – у внутрішній мембрані мітохондрій, а також циклофіліну Д (cyclophilin D, CypD), який розташований у матриксі органел (Hurst et al., 2017). Однак протягом останнього десятиліття генетичні дослідження систематично перевіряли вимоги кожного з цих спочатку запропонованих компонентів структури та функції МП, що призвело до кардинально іншої моделі. За допомогою генетичного аналізу компонентів МП показано, що ANT, переносник фосфатів (Phosphate carrier, PiC) та CypD слугують регуляторними компонентами пор, тоді як проапоптотичні білки Bax/Bak домену BH3 функціонують у зовнішній мембрані. Отже, F_1F_0 -АТР-синтаза є основним пороутворюючим комплексом.

VDAC, також відомий як порин, є найпоширенішим білком зовнішньої мітохондріальної мембрани, що функціонує як неселективна пора до аніонів і катіонів. Залучення VDAC до утворення МП було підтверджене тим, що VDAC, ANT та CypD можуть бути відновлені у протеоліпосомі з отриманням чутливої до циклоспорину А пори (Crompton et al., 1998). Однак генетичні дослідження показали, що мітохондрії, у яких відсутні всі три ізоформи VDAC, зберігали здатність зазнавати змін проникності, а далі спостерігали, що культивовані клітини без експресії VDAC2 зазнавали загибель (Baines et al., 2007). Тому було висунуто гіпотезу, що VDAC не є важливим компонентом МП.

ANT є внутрішнім мембранним транспортером, що має масу 32 кДа та відповідає за імпорт АДФ в матрикс мітохондрій в обмін на АТФ, і є невід'ємним компонентом механізму синтезу мітохондріального АТФ (Klingenberg, 2008). Вважалось, що ANT є внутрішнім мембранним компонентом МП, а його інгібітор – бонгкрекова кислота інгібує активність МП, в той час як атрактилозид стимулює відкриття МП. Результати досліджень свідчать про те, що ANT не є необхідним компонентом МП, але він чітко регулює її діяльність (Haworth and Hunter, 2000).

CypD – мітохондріальна матриксна пептидилпроліл-цис-транс-ізомераза, що має масу 18 кДа та є генетично підтвердженим і незаперечним регулятором функції МП. Залучення CypD до регуляції МП було виявлено шляхом дослідження імунодепресантів, препарату CsA, який зменшує набухання мітохондрій, а пізніше було показано, що він зв'язує та інгібує активність CypD. Остаточну роль CypD у функціонуванні МП було підтверджено дослідженнями на мишах, у яких, ген, що кодує цей білок, був видалений. У цих дослідженнях показано, що мітохондрії, у яких відсутній CypD, мають знижену чутливість до Ca^{2+} та до індукції МП окисним стресом. Однак при високому рівні Ca^{2+} все ще може бути викликана перемінна проникність, що свідчить про те, що CypD контролює чутливість відкривання МП (Nakagawa et al., 2005).

PiC – це внутрішній мембранний розчинений носій, який є основним транспортером неорганічного фосфату (Pi) в матриксі мітохондрій. Таким чином, PiC відіграє ключову роль у окисному фосфорилуванні мітохондрій (OXPHOS) та у виробництві енергії, оскільки постачає мітохондріям Pi, необхідний для синтезу АТФ (Palmieri, 2004).

Віднедавна F_1F_0 -АТФ-синтаза вважається основним компонентом МП у внутрішній мембрані. Це багатосубодиничний ферментативний комплекс, який поєднує транслокацію протонів через внутрішню мембрану із синтезом АТФ. F_1F_0 -АТФ-синтаза складається з доменів F_1 та F_0 , до складу яких

входять 17 різних типів субодиниць, що налічує в цілому понад 30 субодиниць у мітохондріях ссавців. Каталітичний домен F_1 , розташований у матриксі мітохондрій і складається з п'яти різних субодиниць (α , β , γ , δ та ϵ), тоді як домен F_0 є мембранним та включає регулярні субодиниці c , a , b , d , F_6 , олігоміцинчутливий білок (oligomycin sensitivity conferring protein, OSCP) та допоміжні субодиниці e , f , g та $A6L$. Субодиниці γ , δ , ϵ домену F_1 складають центральну ніжку, тоді як субодиниці b , d , F_6 та OSCP домену F_0 утворюють периферичну ніжку F_1F_0 -АТФ-синтази. Субодиниці a та $A6L$ домену F_0 є єдиними субодиницями F_1F_0 -АТФ-синтази, що кодовані мітохондріальною ДНК (mtDNA) (Jonckheere et al., 2012). Ці субодиниці залучені до стабілізації структури F_1F_0 -АТФ-синтази, зокрема, відповідають за взаємодію мономер-мономер під час димеризації двох мономерів АТФ-синтази через домен F_0 .

Здатність F_1F_0 -АТФ-синтази утворювати суперкомплексну структуру (АТФ-синтасому) завдяки її димеризації та взаємодії з PiC та ANT (Ko et al., 2003; Wittig and Schagger, 2008) зробила її ключовим компонентом МП. Подальшими дослідженнями виявлено, що PiC збільшує здатність $CypD$ зв'язуватись з бічною ніжкою F_1F_0 -АТФ-синтази та знижує її ферментативну активність у мітохондріях бичачого серця. Дисоціація комплексу $CypD$ - F_1F_0 -АТФ-синтази за допомогою CsA повертає ферментативну активність F_1F_0 -АТФ-синтази (Giorgio et al., 2009).

У генетичних дослідження, які були проведені у 2013 році, було показано вирішальну роль c -субодиниці F_1F_0 -АТФ-синтази в Ca^{2+} -індукованому відкриванні МП в клітинах *HeLa* (Bonora et al., 2013). Це спостереження було підтверджено дослідженнями, де відновлене кільце c -субодиниці домену F_0 утворювало чутливий до напруги канал, а постійне відкривання каналу під дією Ca^{2+} призводило до швидкої і неконтрольованої деполяризації внутрішньої мембрани мітохондрій (Alavian et al., 2014). Висока концентрація матричного Ca^{2+} збільшувала кільце c -субодиниці, яке було від'єднане від сайтів, що зв'язують $CypD$ у домені F_1 , наслідком чого

було відкриття МП. Тим не менше, залишається незрозумілим, чи відіграє с-субодиниця структурну чи регуляторну роль у діяльності МП.

Сучасні дослідження вказують на можливу регуляторну або структурну роль F_1F_0 -АТФ-синтази за допомогою наступних двох механізмів: (1) димеризації молекул F_1F_0 -АТФ-синтази через місця контакту між мономерами з утворенням МП; (2) перетворення кільця с-субодиниці в домені F_0 на неселективну МП. Однак, безумовно, необхідні подальші дослідження, щоб підтвердити, чи є F_1F_0 -АТФ-синтаза основним структурним компонентом МП. Загалом, незважаючи на інтенсивні та численні дослідження, молекулярна ідентичність МП ще не встановлена. Більшість білків, які спочатку вважались основними компонентами МП, насправді беруть участь у регуляції індукції МП.

1.6. Характеристика піридоксаль-5-фосфату та його біологічна роль

Вітамін B_6 – водорозчинний вітамін, що включає кілька сполук, таких як піридоксин (PN), піридоксаль (PL), піридоксамін (PM) та їх фосфорильовані форми: піридоксин-5-фосфат (PNP), піридоксаль-5-фосфат (PLP), та піридоксамін-5-фосфат (PMP). Нефосфорильовані форми вітаміну B_6 фосфорилуються піридоксалькіназою (PDXK), після чого PNP і PMP перетворюються в PLP за допомогою піридоксаміноксидази (PNPO). PLP є біологічно активною формою вітаміну B_6 , і складається з піридинового кільця з гідроксильною, метильною, формільною та фосфатною групами.

PLP є коферментом широкого спектру біологічно важливих реакцій, таких як метаболізм амінокислот, ліпідний обмін та глюконеогенез, де він каталізує реакції трансамінування, декарбоксилювання та фосфоролізу, а також рацемізацію, елімінацію або заміщення електрофільної групи (Percudani and Peracchi, 2003.). Окрім цього, PLP має інгібуючу дію на

ДНК/РНК-полімерази (Modak, 1976; Martial et al., 1975), топоізомерази (Vermeersch et al., 2004) та ангіогенез (Matsubara et al., 2003; Matsubara et al., 2001). PLP має антиоксидантні властивості, оскільки основне ароматичне піридинове кільце PLP є ефективним поглиначем синглетного кисню (Jain et al., 2001).

Вітамін B₆ міститься в різних продуктах харчування; РН багато в зернах, горіхах, овочах і бананах, тоді як РL і РМ містяться в рибі, м'ясі, яйцях і молоці (Roth-Maier et al., 2002). Нефосфорильовані форми всмоктуються в порожній та клубовій кишках шляхом пасивної дифузії. Тоді як, фосфорильовані форми всмоктуються в тонкому кишечнику після дефосфорильовання лужною фосфатазою (Fedde wt al., 1990; Galluzzi et al., 2013). Вживання вітаміну B₆ є важливим для здоров'я людини, дефіцит цього вітаміну призводить до дратівливості та судом у немовлят, розладів нервової системи, дерматитів, серцево-судинних захворювань та раку (Galluzzi et al., 2013; Choi and Friso, 2012; Clayton, 2006; Friso et al., 2012).

Піридоксаль-5-фосфат є коферментом до приблизно 100 ферментів (Percudani and Peracchi 2009). Як було сказано раніше PLP є кофактором також і до H₂S-синтизуючи ферментів, таких як CBS, CSE та CAT, що кон'югована з 3-MST (Wang R., 2012). Існують дані, які вказують на те, що обмеження вітаміну B₆ зменшує вироблення сірководню за участю CBS та CSE через транссульфурацію в культивованих клітинах гепатоми людини (DeRatt et al., 2014). Також було виявлено, що активність CSE була на 70% нижчою у печінці щурів, які зазнавали дефіциту вітаміну B₆ порівняно з тваринами, яких годували нормальною кількістю цього вітаміну (Lima et al., 2006).

Ряд досліджень свідчить про те, що застосування вітаміну B₆ та PLP, зменшують ускладнення, пов'язані з ішемічною хворобою артерій, діабетом, гіпертонією, старінням та нейродегенеративними розладами (Bryan et al.,

2002; Fletcher and Fairfield, 2002), проте основні механізми до кінця ще не вивчені.

Деякі дослідження показали, що розвиток атеросклерозу та ішемічної хвороби пов'язані з дефіцитом вітаміну B₆. Це може виникати в результаті підвищення рівня гомоцистеїну в плазмі (Tehlivets, 2011). Існують дослідження, що вказують на взаємозв'язок між дефіцитом вітаміну B₆, підвищеним рівнем гомоцистеїну та ішемічною хворобою (Ellis and Mc Cully 1995; Selhub et al., 2000). Низький рівень вітаміну B₆ або PLP та підвищений рівень гомоцистеїну також спостерігався у пацієнтів з ревматоїдним артритом та хворобою Альцгеймера (Roubenoff et al., 1992; Miller et al., 2002). Доведено, що дефіцит вітаміну B₆ впливає на механізми антиоксидантного захисту в печінці та серці, що може сприяти виникненню окисного стресу (Cabrini et al., 1998). Також повідомлялося, що низький вміст циркулюючого вітаміну B₆ або PLP пов'язаний з підвищеним рівнем біомаркерів для системного запалення, що включає С-реактивний білок (Friso et al., 2001). У пацієнтів з інфарктом міокарда виявлено низький рівень вітаміну B₆. Крім того, спостерігалось помітне зниження ризику розвитку інфаркту міокарда у пацієнтів з дегенеративними захворюваннями при лікуванні вітаміном B₆ (Ellis and Mc Cully 1995).

Хоча показано, що вітамін B₆ та його активна форма PLP, мають сприятливий ефект при ішемічній хворобі серця, механізми їх дії до кінця не вивчені. Деякі дослідження показали, що шлуночкові аритмії та смертність від оклюзії коронарної артерії ослаблені попередньою обробкою тварин з PLP. Більше того, індуковані ішемією-реперфузією порушення серцевої діяльності зменшувалися за допомогою PLP. (Dhalla et al., 2013). Збільшення серцевої скорочувальної активності ізольованого серця за допомогою АТФ зменшувалось за допомогою PLP, на відміну від пропранололу, тоді як за допомогою ізопротеренолу PLP не пригнічувало. Індуковане АТФ збільшення Ca²⁺, на відміну від індукованого KCl збільшення Ca²⁺ в

кардіоміоцитах, було пригнічене PLP. PLP також зменшував місця з високою та низькою спорідненістю до зв'язування АТФ у мембранах сарколеми (Friso et al., 2012). Ці спостереження підтверджують думку, що PLP може викликати кардіопротекторні ефекти при ішемічній хворобі серця, послаблюючи появу внутрішньоклітинного перевантаження Ca^{2+} через блокаду пуринаргічних рецепторів (Dhalla et al., 2013).

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Експериментальні тварини

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. Тварини перебували в стандартних умовах утримання та на раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України з вільним доступом до їжі та води. Усі експериментальні процедури проводились 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 імені Богомольця НАН України (дозвіл №1/13 від 15.03.2017).

2.2. Курсове введення старим щурам кофактора H_2S -синтезуючих ферментів – піридоксаль-5-фосфату

Для стимуляції ендогенного синтезу сірководню застосовували кофактор H_2S -синтезуючих ферментів – PLP. 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.

2.3. 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.

2.4. Біохімічні дослідження

Дослідження проводилися на препаратах мітохондрій серця, гомогенатах грудної аорти та тканин серця тварин різних груп. Вміст білка у зразках визначали за методом Лоурі (Lowry et al., 1951).

Визначення вмісту ендogenous H_2S

Вміст H_2S визначали у мітохондріях серця, тканинах серця та аорти тварин різних вікових груп (Xie et al. 2014). До 0,5 мл 1% розчину ацетату цинку ($Zn(CH_3COO)_2$) додавали аліквоти проб та інкубували при температурі 37,5 °C протягом 10 хвилин. Потім додавали 0,5 мл 20 ммоль/л N,N-DPD (диметил-п-фенілендіамін) і 0,5 мл 30 ммоль/л розчину $FeCl_3$. Отриману суміш інкубували в холодному ($t=4$ °C) та темному місці протягом 10 хв. Всі процедури проводились у центрифужних пробірках з кришками, для забезпечення герметичності. Після інкубації до реакційної суміші додавали 1 мл 10% трихлороцтової кислоти і центрифугували при 1,5 тис. об/хв

впродовж 5 хв. Далі проводили фотоелектроколориметричне вимірювання оптичної щільності надосадової рідини при $\lambda=670$ нм. Кількість H_2S у зразках розраховували на основі калібрувальної кривої NaHS , а концентрацію H_2S виражали в нмоль/г білка.

Визначення швидкості утворення супероксиду

Метод визначення супероксиду (O_2^-) ґрунтується на здатності цитохрому *c* окиснювати O_2^- до O_2 . Зміни екстинції проб реєстрували після 30 хв інкубації ($t=37^\circ\text{C}$) при $\lambda=550$ нм. Кількість супероксиду визначали за допомогою молярного коефіцієнта поглинання $28\,000\text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (Kuthan et al., 1982).

Визначення швидкості утворення гідроксильного радикалу

Швидкість генерування гідроксильного радикала (OH^\bullet -радикала) визначали методом окиснення дезоксирибози (Halliwell B. et al., 1988). Швидкість утворення OH^\bullet -радикала визначали за збільшенням поглинання при $\lambda=532$ нм, і виражали в умовних одиницях $\Delta E \cdot 10^2$ за 60 хв на 1 мг білка проби.

Визначення вмісту пероксиду водню

Метод визначення пероксиду водню (H_2O_2) базувався на опосередкованій реєстрації споживання H_2O_2 в ході окиснення йодиду (I^-) до йоду (I_3^-) за наявності надлишку лактопероксидази (Huwiler et al., 1984). Формування I_3 реєстрували спектрофотометрично при $\lambda=353$ нм, а кількість визначали за допомогою молярного коефіцієнта поглинання $26\,000\text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Визначення вмісту дієнових кон'югатів

Метод визначення дієнових кон'югатів (ДК) включав вилучення ліпідів із зразків органічним розчинником (гептан/ізопропанол 1:1) та вимірювання оптичної густини при $\lambda=232$ нм (Gavrilov et al., 1988). Кількість ДК визначали за допомогою молярного коефіцієнта поглинання $21\,000\text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Визначення вмісту малонового діальдегіду

Метод визначення малонового діальдегіду (МДА) базувався на реакції МДА з 2'-тіобарбітуровою кислотою та утворенні триметинового комплексу з максимумом поглинання при $\lambda=532$ нм (Mihara and Uchiyama 1978). Кількість МДА визначали за допомогою молярного коефіцієнта поглинання $15\,600 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Визначення активності NO-синтаз

Метод активності cNOS та iNOS базувався на здатності NOS використовувати L-аргінін як субстрат при виробництві L-цитруліну. Для визначення рівнів сумарної NOS аліквоти проб змішували з реакційною сумішшю (кінцеві концентрації: 1 мМ НАДФН, 2 мМ L-аргініну і 50 мМ KH_2PO_4 , 1 мМ MgCl_2 , 2 мМ CaCl_2) та інкубували при $t=37^\circ \text{C}$ протягом 60 хв. Для визначення рівнів Ca^{2+} -незалежної активності (iNOS) такі ж зразки інкубували в подібній реакційній суміші лише з додаванням EGTA (5 мМ) замість CaCl_2 . Реакцію зупиняли додаванням 300 мкл 2N HClO_4 , потім суміш центрифугували (3500 g протягом 10 хв) і 1 мл супернатанту збирали для вимірювання L-цитруліну методом описаним Бойдом (Boyde et al. 1980). Спосіб включав додавання 2 мл реагента (1 мл 59 ммоль/л диацетилмонооксиму ("Sigma", США), 1 мл 32 мМ антипірину ("Sigma", США) і 55 мкМ сульфату заліза (II) в 6 N H_2SO_4) до безбілкових аліквот проб. Далі суміш кип'ятили на водяній бані протягом 15 хв, після охолодження визначали величину екстинції при $\lambda=465$ нм. Концентрацію L-цитруліну виявили за допомогою калібрувальних кривих. Сумарну активність cNOS (eNOS+nNOS) вираховували, віднімаючи від сумарної активності NOS активність iNOS. Активність ферментів виражалася у пікомолях новоутвореного L-цитруліну протягом 1 хв на 1 мг загального білка у зразку.

Розрахунок індексу спряження cNOS

Індекс спряження (coupling) cNOS розраховували як відношення активності cNOS до швидкості генерації $\cdot\text{O}_2^-$. Цей індекс характеризує наявність субстратів (L-аргінін, O_2) і кофактора тетрагідробіоптерину (BH_4) для утворення NO, а не $\cdot\text{O}_2^-$ – при окисному метаболізмі L-аргініну.

Визначення вмісту нітрит-аніона

Вміст нітрит-аніона (NO_2^-) визначали методом Гріна за допомогою реактиву Гріса (Green et al. 1982). Аліквоту безбілкового зразка змішували з реактивом Гріса в пропорції 1:1. Через 5 хв інкубації при кімнатній температурі визначали оптичну густину поглинання при $\lambda=546$ нм. Концентрацію нітрит-аніона визначали за побудованими калібрувальними кривими NaNO_2 .

Визначення вмісту нітрат-аніона

Вміст нітрат-аніона (NO_3^-) визначали за допомогою бруцинового реактива в безбілкових аліквотах проб спектрофотометричним методом (Tsukahara et al. 1996). Аліквоти проб інкубували при 100°C протягом 10 хв після чого охолоджували. Величину екстинції визначали при $\lambda=405$ нм. Бруциновий реактив готували розчиненням 60 мг бруцину у 100 мл 50 % сірчаної кислоти. Кількість NO_3^- визначали за допомогою калібрувальної кривої, побудованої з використанням NaNO_3 .

Визначення активності аргінази

Метод визначення активності аргінази базувався на здатності аргінази метаболізувати L-аргінін з утворенням стабільного продукту сечовини. Дослідження проводилося за допомогою стандартизованого набору "Філісіт-Діагностика" (Україна). Суміш, що містила аліквоту зразка та 50 мкл L-аргініну (Tris-HCl; pH 9,7) інкубували при 37°C протягом 60 хв, реакцію зупиняли, додаючи 300 мкл 2N HClO_4 (Zhang et al., 2001). Суміш

центрифугували при 3500 об/хв протягом 10 хв. Для колориметричного визначення сечовини 100 мкл супернатанту додавали до суміші діацетилмоноксим/тіосемікарбазид (1:1) і нагрівали при 100 °C протягом 15 хв, потім визначали величину екстинції при $\lambda=550$ нм. Вміст сечовини виражали в $\mu\text{моль}^{-1} \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка.

Визначення активності нітратредуктази

Метод визначення активності нітратредуктази базувався на здатності редуктази перетворювати NO_3^- до NO_2^- . Інкубаційне середовище готували на фосфатному буфері (рН 7,4), воно містило 100 мкл проби, НАДН як кофактор, та NO_3^- як субстрат (Alikulov et al. 1980). Суміш інкубували при 37 °C протягом 60 хв і реакцію зупиняли додаванням 300 мкл 2N HClO_4 , центрифугували при 3500 об/хв протягом 10 хв. 0,5 мл супернатанту збирали для вимірювання NO_2^- , як описано в аналізі нітритів вище (Green et al. 1982).

Визначення вмісту нітрозотіолів

Загальний вміст низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ) визначали використовуючи реактив Гріса з HgCl_2 (Percival et al. 1999). До аліквоти зразка додавали розчин HgCl_2 /сульфаніламід (який готували змішуючи 1 об'єм 1% HgCl_2 у воді з 4 об'ємами 3,4% сульфаніламід у 0,4 М HCl) та залишали на 5 хв. Потім суміш змішували з 0,1% N-(1-нафтил)етилендіаміном дигідрохлориду в 0,4 М HCl у пропорції 2:1. Величину екстинції вимірювали при $\lambda=543$ нм. Кількість НМНТ визначали за допомогою молярного коефіцієнта поглинання $42\,000 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

2.5. Виділення фракції мітохондрій із серця щурів

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 . Серцеву

тканину подрібнювали та гомогенізували у середовищі виділення у співвідношенні 1:9, що містило (ммоль/л): сахарозу – 250, ЕДТА – 1, тріс-НСІ – 25, рН 7,4. Для осадження ядер і грубої клітинної фракції гомогенат центрифугували при 700 g протягом 8 хв (2°C). Отриманий супернатант центрифугували при 11000 g протягом 16 хв (2°C) для осадження мітохондрій. Мітохондріальний осад ресуспендували в середовищі ресуспендування, що містив (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСІ – 25 (рН 7,2) та одразу використовували в експерименті.

2.6. Реєстрація відкривання мітохондріальної пори

Відкривання МП досліджували за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій. Для цього методу застосовували спектрофотометр СФ-46. Зменшення оптичної густини розчину, де містились мітохондрії, свідчило про набухання даних органел. Для цього мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): КСІ – 120, тріс-НСІ – 25, KH_2PO_4 – 3; сукцинат натрію – 5; рН 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл). Реєстрацію зниження оптичної густини суспензії мітохондрій проводили при $\lambda=520$ нм, показники знімали щохвилини впродовж 15 хв. Індуктор відкривання МП – іони Ca^{2+} додавали на 5 хвилині вимірювання. Як контроль використовували суспензію нативних мітохондрій в інкубаційному середовищі без індукторів з послідуною реєстрацією оптичної густини протягом 15 хв. Амплітуду набухання органел визначали як різницю між значеннями оптичної щільності суспензії мітохондрій на 15-й та 1-й хвилині ($\Delta D_{520} \cdot 10^2$). Концентрація білка в кожній пробі становила 0,4 мг/мл. 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.

2.7. Дослідження показників скорочувальної функції ізольованого серця щурів

Для індукції ішемії-реперфузії у серці старих щурів застосовували модель перфузії коронарних судин ізольованого серця методом Лангендорфа (Doring 1990). Після декапітації та розтину грудної порожнини серце швидко вилучали і одразу поміщали в охолоджений (5°C) розчин Кребса-Хензелейта до повної його зупинки. Серця приєднували до апарату (рис. 2.1.), в якому перфузія коронарних судин здійснювалася через аорту.

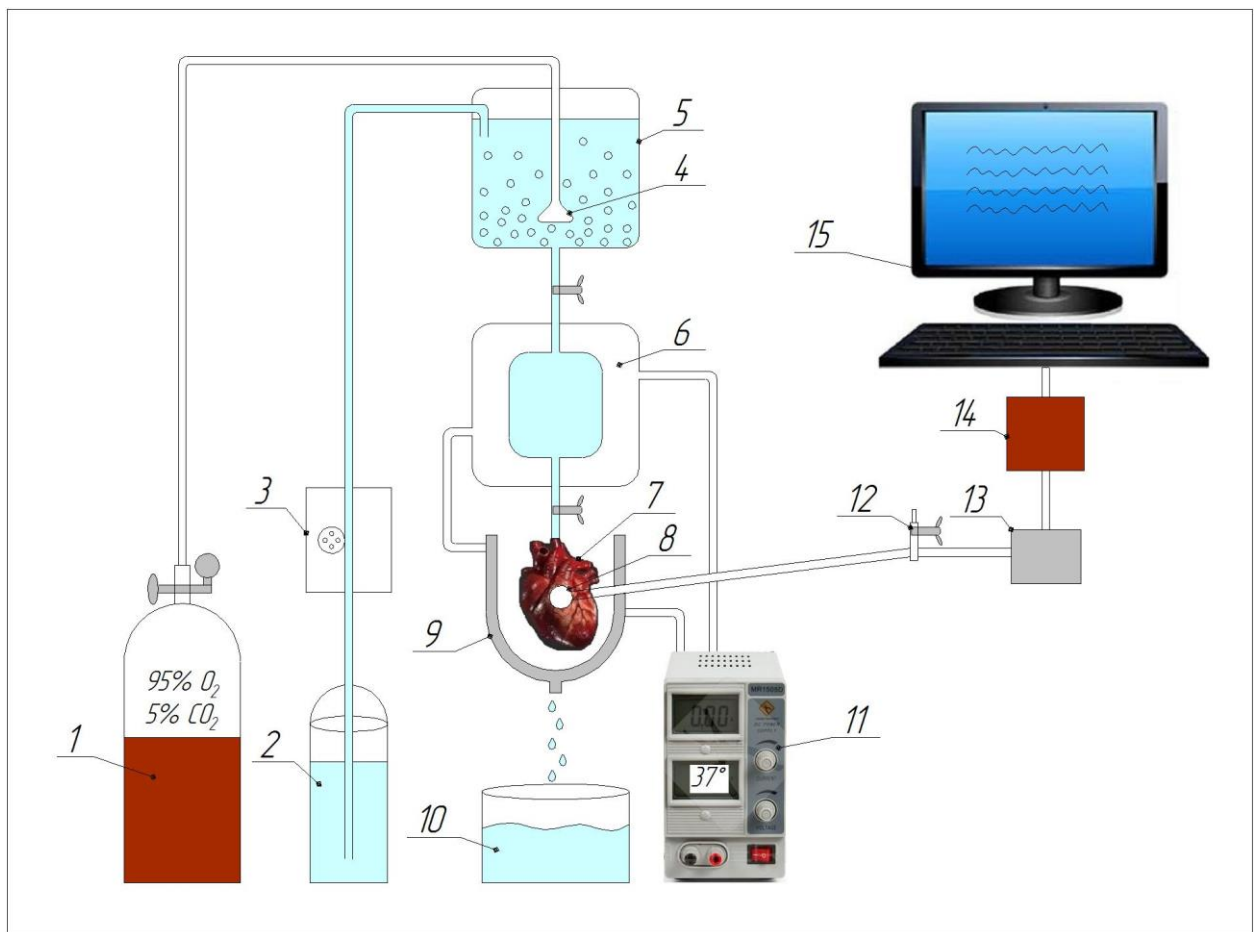


Рис. 2.1. Схема установки для перфузії ізольованого серця за Лангендорфом при постійному тиску. 1 – балон з карбогеном; 2 – резервуар з розчином Кребса-Хейнзелейта; 3 – перистальтичний насос; 4 – розпилювач; 5 – резервуар з перфузійним розчином Кребса-Хейнзелейта, насиченим киснем; 6 – колба для обігріву перфузійного розчину та для стравлення газу; 7 – ізольоване серце; 8 – латексний балончик у лівому шлуночку;

9 – термостатована камера для обігріву серця; 10 – ємність з відпрацьованим розчином Кребса; 11 – термостат; 12 – шприц, що підтримує герметичність системи «балончик-тензодатчик»; 13 – тензодатчик; 14 – підсилювач; 15 – комп'ютер. Блакитним кольором відмічено розчин Кребса.

Для перфузії застосовували розчин Кребса-Хензелейта з постійним тиском 75-80 мм.рт.ст., при 37°C, що містить (ммоль / л): NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 24; KH₂PO₄ – 1,2; глюкоза – 10; CaCl₂ – 2,5 (pH 7,4), та який аерували карбогеном (95% O₂ та 5% CO₂). 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/dtmax і dP/dtmin). Швидкість коронарного потоку оцінювали як об'єм перфузійного розчину, який відтікав від серця за 1 хв.

2.8. Реєстрація скорочення-розслаблення м'язових препаратів аорти

Дослідження скорочення-розслаблення інтактних м'язових препаратів судин грудного відділу аорти проводили в режимі тензометрії. Після декапітації та торакотомії виділяли грудну частину аорти, яку потім препарували та очищували від сполучної тканини. Судину обережно, щоб не пошкодити ендотелій, розрізали на кільцеві препарати шириною 3-4 мм з урахуванням циркулярної орієнтації їх гладеньком'язового шару. Після цього

аорту поміщали у спеціальну камеру об'ємом 1,5 мл, виготовлену з хімічно неактивного плексигласу (рис. 2.2.).

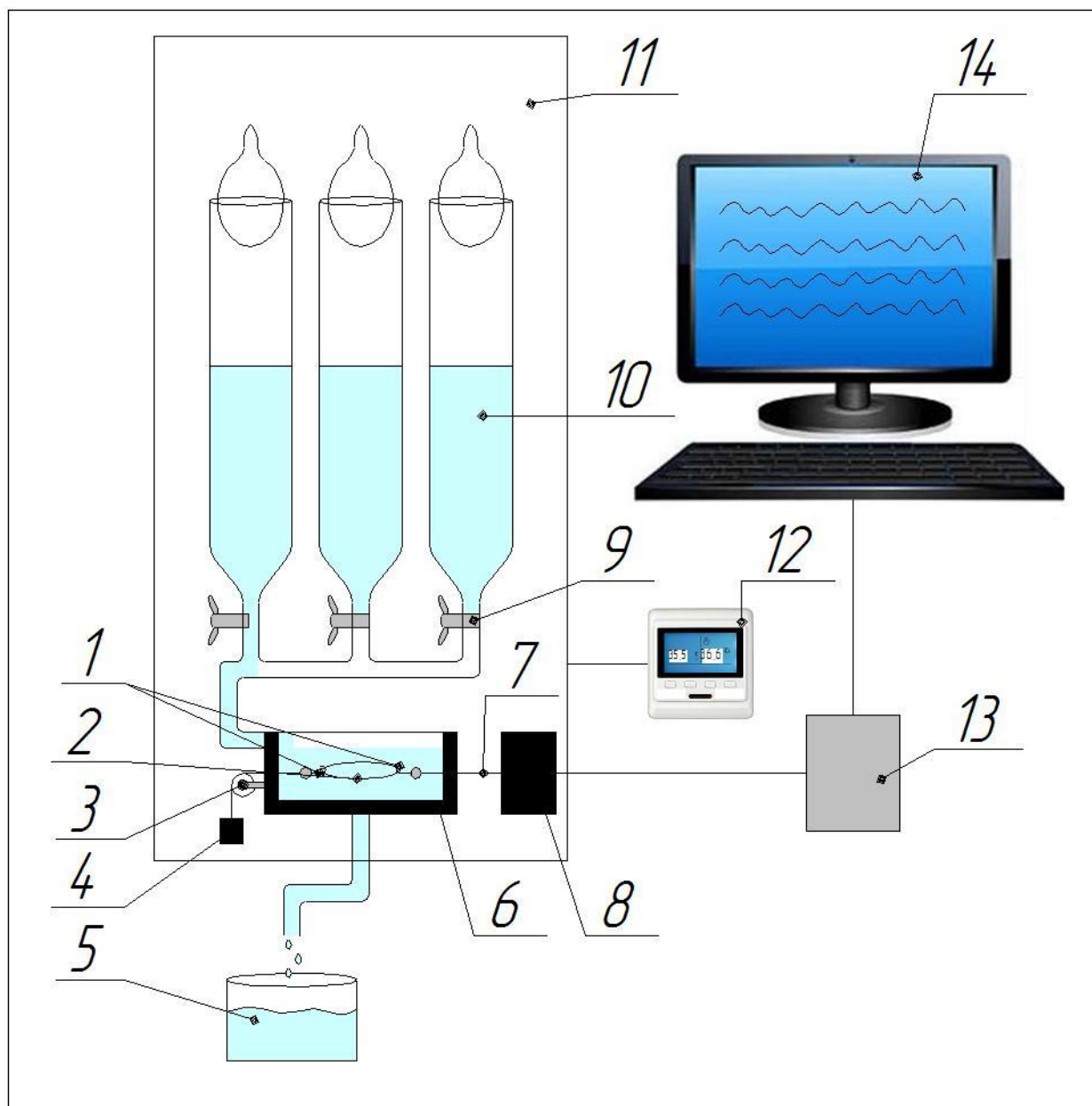


Рис. 2.1. Схема установки для реєстрації скорочувальної активності ізольованих судинних препаратів: 1 – гачки для фіксації судинної смужки; 2 – судинна смужка; 3 – блок; 4 – вантаж; 5 – ємкість з відпрацьованим розчином Кребса; 6 – перфузійна камера; 7 – нитка, що з'єднана з тензодатчиком; 8 – тензодатчик; 9 – кран; 10 – колби з розчином Кребса; 11 – термостатована камера; 12 – терморегулятор; 13 – АЦП; 14 – комп'ютер. Блакитним кольором відмічено розчин Кребса.

Судинний препарат фіксували в горизонтальному положенні за допомогою двох гачків, один з яких був з'єднаний з механоелектричним перетворювачем 6MX-1C, а другий кріпився через блок до вантажу, за допомогою якого розтягувалася смужка. Сила розтягнення аорти становила 4-8 мН. Препарат аорти після фіксації залишали для стабілізації режиму роботи на 30-40 хв, перфузуючи його розчином Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 133,0; NaHCO₃ – 16,3; NaH₂PO₄ – 1,38; KCl – 4,7; MgCl₂ – 1,05; глюкоза – 7,8; CaCl₂ – 2,5; pH 7,4. Для запобігання витікання розчину з камери лігатури проходили через фторопластикові втулки.

Температуру в камері підтримували в діапазоні від 35 до 36°C за допомогою системи автоматичного контролю температури перфузійного розчину. Електричний сигнал з виходу механоелектричного перетворювача реєстрували за допомогою реєструючого модуля АЦП з подальшою візуалізацією та обробкою сигналів у програмі LGraph2. Для активації ГМ аорти до перфузуючого розчину Кребса додавали норадреналін (НА, 10⁻⁵ моль/л, «Sigma», США). Стійкий рівень НА-залежного скорочення («плато») приймали за 100%. Щодо нього проводили розрахунки зміни амплітуди ендотелійзалежних скорочувальних реакцій ГМ аорти на аплікацію ендотелійзалежного вазодилататора ацетилхоліна (АХ, 10⁻⁵ моль/л, «Sigma», США).

Для з'ясування ролі NO або H₂S в ендотелійзалежній вазорелаксації застосовували блокатор синтезу оксиду азоту – N-Нітро-L-аргінін метилестергидрохлориду (L-NAME, «Sigma», США, 27 мг/кг) та інгібітор ферменту синтезу сірководню 3-MST – O-СМН (50 мг/кг), які вводили внутрішньочеревно за 30 хвилин до декапітації.

2.9. Статистична обробка результатів дослідження

Для статистичного аналізу отриманих результатів використовували програми Excell 2010 (MS Office XP), та Origin 8.0 («Microcal Software Inc.»),

(США). Дані були виражені як середнє арифметичне значення \pm стандартна похибка середнього ($M \pm m$). Для оцінки нормальності розподілу даних у кожній групі ми використовували тест Шапіро-Вілка. Для виявлення однорідності дисперсії серед груп ми використовували тест Левіна. У випадку однорідності ми використовували односторонній дисперсійний аналіз (ANOVA) для порівняння середніх показників між однорідними групами з подальшим тестом Bonferroni post hoc. Значення $P < 0,05$ вважалося статистично достовірним.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження впливу піридоксаль-5-фосфату на вміст H_2S у серцево-судинній системі старих щурів.

Порушення синтезу сірководню характерні для розвитку таких патологічних станів як гіпертензія, атеросклероз, діабет, серцева недостатність, нейродегенеративні захворювання та ін. (Wang R., 2012; Yan et al., 2004, Jiang et al., 2005). Тим паче, що більшість цих патологічних станів характерні і частіше всього розвиваються у старих організмів, у яких синтез сірководню суттєво знижений (Jin et al., 2015; Drachuk et al., 2015). В останні роки для підвищення концентрації H_2S в тканинах використовують екзогенні шляхи його стимуляції, такі, наприклад, як застосування донорів сірководню (NaHS , Na_2S) (Szabo and Papapetropoulos, 2017). Показано, що введення старим тваринам донора сірководню відновлювало його вміст у тканинах старих тварин до значень у дорослих (Drachuk et al., 2015). З метою стимуляції ендогенного синтезу H_2S і відновлення його пулів у тканинах серцево-судинної системи старих тварин ми використали введення кофактора H_2S -синтезуючих ферментів – PLP.

У наших дослідженнях показано, що вміст H_2S у мітохондріях, а також 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. 3.1). 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.

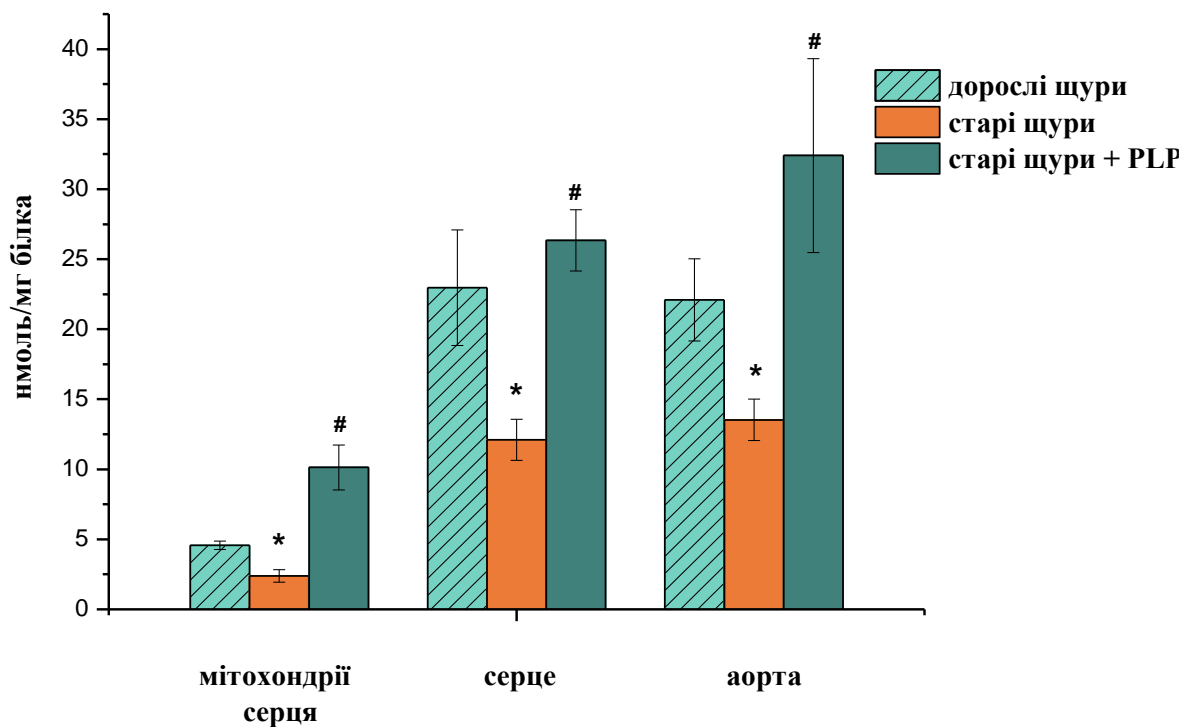


Рис. 3.1. Вміст H_2S у мітохондрії серця, тканинах серця та аорти старих щурів після курсового введення піридоксаль-5-фосфату (PLP). * $P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; # $P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Отже, курсове введення PLP відновлювало синтез ендogenous сірководню у серцево-судинній системі старих щурів.

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

На відміну від інших тканин у серцево-судинній системі головними ферментами, що синтезують H_2S , являються *CSE* та *3-MST*. У міокарді щурів переважно експресується мРНК *CSE*, що свідчить про значну кількість генерування H_2S цим ферментом (Geng et al., 2004). У іншому дослідженні показано, що *3-MST*, а не *CSE*, був виявлений в ендотеліальних клітинах коронарних артерій людини, а також щурів та мишей, і є основним регулятором синтезу сірководню в цих судинах (Куо et al., 2016). Для розуміння шляхів збільшення ендогенної продукції сірководню ми провели визначення рівнів експресії генів H_2S -синтизуючих ферментів (*CSE*, *3-MST*) за умов дії PLP.

3.2.1. Дослідження рівнів експресії *CSE* у тканинах серця старих щурів в умовах дії піридоксаль-5-фосфату.

Встановлено зменшення вдвічі експресії гена *CSE* у тканинах серця старих щурів порівняно з дорослими тваринами (рис. 3.2). *CSE* є піридоксаль-5-фосфатозалежним ферментом, тому застосування цього кофактора у старих щурів, відновило експресію цього ферменту до значень контрольної групи (дорослі тварини).

Отже, курсове введення PLP призводило до стимуляції синтезу ендогенного H_2S , збільшуючи експресію гена *CSE* у тканинах серця старих щурів.

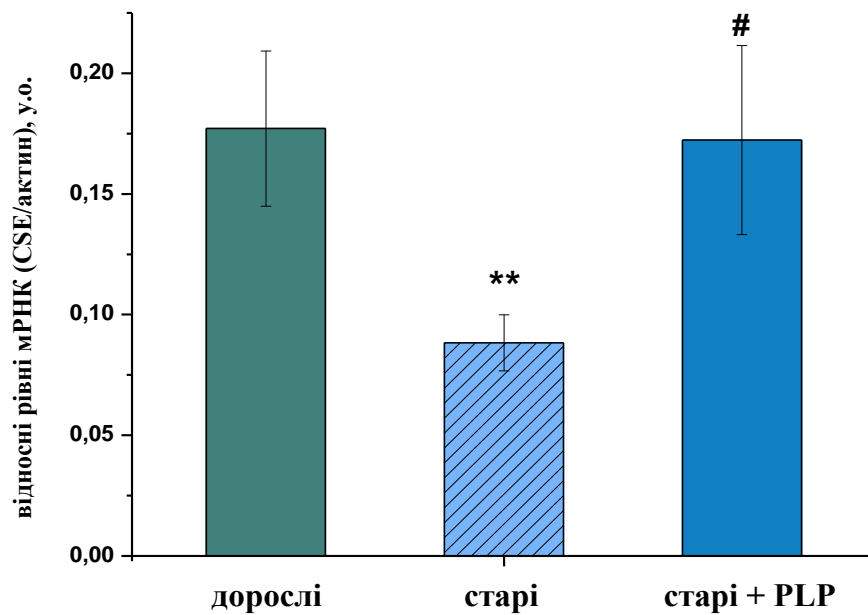


Рис. 3.2. Експресія гена *CSE* у тканинах серця старих щурів за умов дії піридоксаль-5-фосфату (PLP). ** $P < 0,01$ статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; # $P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

3.2.2. Зміни експресії *3-MST* у тканинах серця старих щурів в умовах дії піридоксаль-5-фосфату.

У тканинах серця старих щурів було виявлено зниження у 1,6 раза експресії гена *3-MST* відносно значень у дорослих тварин (рис. 3.3). 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 CAT, ферментом який для своєї роботи потребує PLP. Ми припускаємо, що збільшення експресії *3-MST* відбулося опосередковано, внаслідок активації CAT.

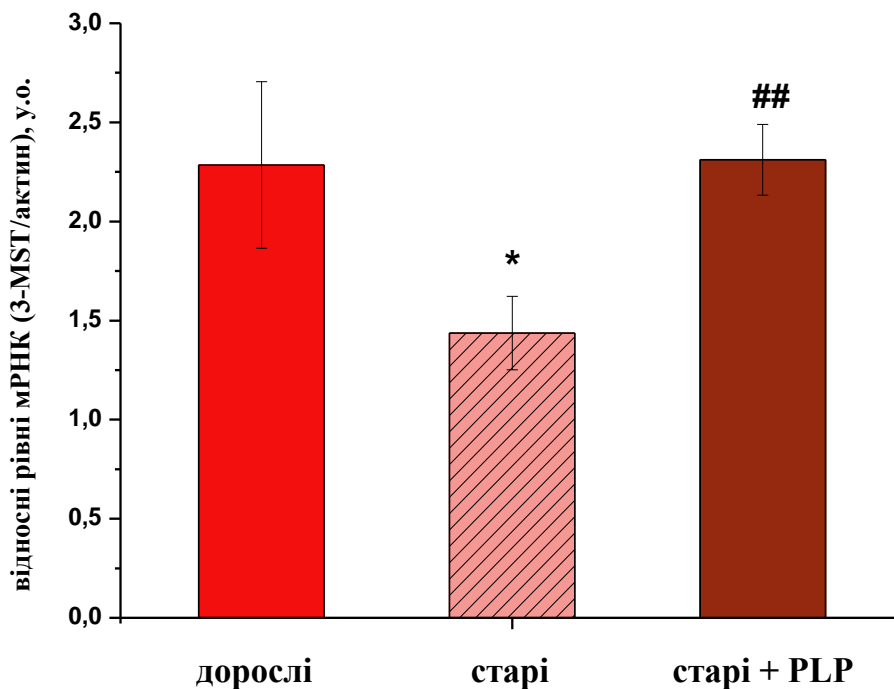


Рис. 3.3. Експресія гена *3-MST* у тканинах серця старих щурів за умов дії піридоксаль-5-фосфату (PLP). * $P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; ## $P < 0,01$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Таким чином, курсове введення PLP призводило до стимуляції синтезу ендogenous H_2S , збільшуючи експресію гена *3-MST* у тканинах серця старих щурів.

3.3. Зміни показників оксидативно-нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в серцево-судинній системі старих щурів при активації ендogenous синтезу H_2S .

Активні форми кисню, азоту та сірки являють собою продукти нормальної функції клітин та їх реакції на різноманітні стимули. Дисбаланс цих проміжних продуктів обміну речовин призводить до такого відомого феномену, як оксидативно-нітрозативний стрес, за якого вільні радикали

можуть пошкоджувати різні біомолекули, призводячи до порушень функції органів та їх систем. У тканинах серцево-судинної системи цей процес є характерним для старих організмів і, як наслідок, вільно-радикальна теорія старіння є домінуючою протягом багатьох років (Wang R, 2002; Rose et al., 2017).

До найбільш токсичних вільних радикалів відносять $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, синглетний кисень і пероксинітрил (ONOO^-). Основними джерелами утворення $\cdot\text{O}_2^-$, як ініціатора оксидативного стресу, є комплекси I і III дихального ланцюга мітохондрій, НАДФН- і ксантиноксидаза, неспряжена cNOS, цикло- і ліпооксигеназа (Dai et al., 2014). Утворений $\cdot\text{O}_2^-$ за дії супероксиддисмутази дисоціює у H_2O_2 , метаболізм якого відбувається двома шляхами: нетоксичним за участі каталази з утворенням H_2O і O_2 і токсичним у реакції Фентона з утворенням $\cdot\text{OH}$ (Weydert and Cullen, 2009). Як відомо, останній ініціює перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), розпад яких призводить до появи різноманітних вторинних і кінцевих продуктів, а саме ДК і МДА. У разі одночасної надмірної продукції $\cdot\text{O}_2^-$ і NO, що спостерігається, зокрема, при неспряженій cNOS та підвищеній активності iNOS, вони взаємодіють із утворенням високотоксичного ONOO^- .

Останнім часом з'являється все більше даних про кардіопротекторні властивості H_2S , які зумовлені, зокрема, його здатністю стимулювати синтез NO та пригнічувати оксидативно-нітрозативний стрес і розвиток апоптозу. Раніше нами було показано, що екзогенне введення донора сірководню (NaHS) пригнічує окисний стрес, забезпечує відновлення спряженого стану cNOS і посилює конститутивний синтез NO (Drachuk et al., 2015). Для з'ясування конкретних механізмів впливу активації ендogenous синтезу сірководню у серцево-судинній системі старих щурів за умов дії PLP, ми визначили біохімічні показники, які характеризують наявність оксидативно-нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO у серцево-судинній системі старих щурів за цих умов.

3.3.1. Дослідження впливу піридоксаль-5-фосфату на показники оксидативного стресу в мітохондріях серця у старих щурів.

Як видно з табл. 3.1, більшість показників оксидативного стресу у мітохондріях при старінні були більшими від контрольних значень, або мали тенденцію до зростання, що свідчить про посилення вільнорадикальних процесів. Так, швидкості генерації нестабільних активних форм кисню, а саме $\cdot\text{O}_2^-$, як результат функціонування ксантиноксидази, НАДФН-оксидази, чи дихального ланцюга мітохондрій, а також $\cdot\text{OH}$ збільшувалися при старінні у 4 і 2,7 рази відповідно у мітохондріях серця. Підвищувався також вміст стабільного H_2O_2 порівняно з контролем.

Таблиця 3. 1.

Швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ -радикалів і пули стабільного H_2O_2 та маркерів перекисного окиснення ліпідів в мітохондріях серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP) ($M \pm m$, $n=9$).

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
Швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$, ум.од.	4,46±0,41	17,54±4,44*	5,06±1,76#
Пули H_2O_2 , нмоль/мг білка	12,2±1,6	25,71±3,18*	8,3±1,83#
Швидкість генерації $\cdot\text{OH}$, ум. од.	4,2±0,35	11,34±1,97*	8,7±2,16
Малоновий діальдегід, нмоль/мг білка	2,06±0,38	5,61±0,48*	1,85±0,28#
Дієнові кон'югати, нг/мг білка	3,6±0,23	32,98±2,5*	11,94±2,01#

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

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

Показано, що за умов активації ендогенного синтезу H_2S після застосування PLP швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$ знижувалася у 3,5 раза порівняно з таким у старих тварин (табл. 3.1). Зокрема, вміст H_2O_2 після дії PLP був нижчим у 3,1 раза порівняно з контрольними значеннями. Швидкість утворення найбільш активного радикала кисню – $\cdot\text{OH}$, який є продуктом деградації H_2O_2 в реакції Фентона, після модуляції синтезу H_2S знижувалася в 1,3 раза порівняно зі значеннями у старих щурів.

Ще одним проявом антиоксидантної дії PLP може бути зменшення вмісту продуктів ПОЛ – високотоксичних сполук ДК та МДА (табл. 3.1). Ці речовини не лише негативно впливають на мембрани, але й ініціюють мітохондіальний процес апоптозу, що призводить до пошкодження клітин внаслідок відкривання МП. У мітохондріях серця при старінні ми отримали збільшення в 9,2 раза вмісту ДК та в 2,7 раза МДА щодо контролю. Введення PLP достовірно зменшувало у 2,7 і 3 рази пули ДК та МДА порівняно з такими при старінні, що свідчить про потужний протекторний ефект H_2S та пригнічення утворення ініціаторів ПОЛ – $\cdot\text{OH}$ та $\cdot\text{NO}_2^-$ -радикалів.

У старих тварин вірогідно не відрізнялися від контрольних значень пули тромбоксану B_2 , які характеризують активність циклооксигеназного метаболічного шляху продукції $\cdot\text{O}_2^-$ та пули ейкозаноїдів пептидолейкотриєну C_4 , як маркера утворення $\cdot\text{O}_2^-$ ліпоксигеназою із залученням потужного антиоксиданта глутатіону. Пули сечової кислоти, як кінцевого продукту обміну пуринів, які характеризують активність ксантиноксидази в мітохондріях зростали на порядок, що засвідчує інтенсифікацію вільнорадикальних процесів (табл. 3.2). Введення PLP знижувало у 3,3 раза пули LTC_4 і в 2,3 раза (порівняно зі значенням у старих тварин) пули сечової кислоти, які характеризують активність ксантиноксидази і одночасно є маркером гіпоксії та деградації АТФ. Вміст TxB_2 знижувався у 4,3 раза за дії кофактора синтезу H_2S . Зменшення продукції LTC_4 і TxB_2 може свідчити про пригнічення активності ферментів

ліпооксигенази, циклооксигенази і, як результат, призводити до зниженого утворення супероксид-аніона.

Таблиця 3. 2.

Зміни пулів маркерів ферментативного утворення $\cdot\text{O}_2^-$ в мітохондріях серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP) ($M \pm m$, $n=9$).

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
Тромбоксан B_2 , $\mu\text{моль/мг білка}$	$2,37 \pm 0,16$	$2,62 \pm 0,33$	$0,62 \pm 0,13\#$
Лейкотрієн C_4 , $\mu\text{моль/мг білка}$	$1,26 \pm 0,12$	$1,35 \pm 0,15$	$0,41 \pm 0,08\#$
Сечова кислота, $\mu\text{моль/мг білка}$	$1,19 \pm 0,26$	$14,18 \pm 1,27^*$	$6,03 \pm 0,47\#$

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

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

Таким чином, стимуляція ендогенного синтезу сірководню за допомогою PLP призводить до пригнічення оксидативного стресу і ПОЛ у мітохондріях серця старих тварин.

3.3.2. Визначення впливу піридоксаль-5-фосфату на показники оксидативного стресу в тканинах серця старих щурів.

Встановлено, що більшість показників оксидативного стресу в тканинах серця у старих щурів були також вищими від контрольних значень, що свідчить про посилення у серці вільнорадикальних процесів (табл. 3.3). Так, швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$ в гомогенаті серця при старінні була вищою у 4 рази від контрольних значень, а після застосування PLP показник знижувався

утричі відповідно до значень у старих тварин. Дисмутація нестабільного радикала $\cdot\text{O}_2^-$ в стабільний H_2O_2 при старінні перевищувала контрольні значення у 1,4 раза, а за дії PLP ці значення знижувалися до контрольних. Вміст $\cdot\text{OH}$ -радикала в тканинах серця старих щурів порівняно з контролем був у 4 рази вищим, ніж у дорослих тварин, а після активації ендогенного синтезу H_2S PLP цей показник знижувався в 1,8 раза.

Таблиця 3. 3.

Маркери оксидативного стресу в тканинах серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP) ($M \pm m$, $n=9$).

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
Швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$, ум. од.	$3,49 \pm 0,59$	$12,98 \pm 2,02^*$	$4,19 \pm 0,75^\#$
Пули H_2O_2 , нмоль/мг білка	$2,79 \pm 0,35$	$3,96 \pm 0,36$	$2,55 \pm 0,69$
Швидкість генерації $\cdot\text{OH}$, ум. од.	$0,87 \pm 0,09$	$3,54 \pm 0,52^*$	$1,9 \pm 0,34^\#$
Дієнові кон'югати, нг/мг білка	$3,4 \pm 0,47$	$28,52 \pm 2,28^*$	$7,8 \pm 0,5^\#$
Малоновий діальдегід, нмоль/мг білка	$3,75 \pm 0,43$	$27,23 \pm 1,86^*$	$13,8 \pm 2,25^\#$
Тромбоксан B_2 , нмоль/мг білка	$2,25 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,46$	$1,46 \pm 0,18^\#$
Лейкотрієн C_4 , нмоль/мг білка	$0,9 \pm 0,02$	$0,98 \pm 0,16$	$0,62 \pm 0,29^\#$
Сечова кислота, нмоль/мг білка	$1,98 \pm 0,38$	$5,12 \pm 0,5^*$	$2,82 \pm 0,97^\#$

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

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

Про обмеження оксидативного стресу при старінні за дії PLP можуть свідчити також зміни вмісту продуктів неферментативного (ДК та МДА) та ферментативного (LTC_4 і TxV_2) окиснення ліпідів (табл. 3.3). У тканинах серця при старінні ми отримали достовірне збільшення ДК та МДА порівняно з контролем. Водночас введення PLP достовірно зменшувало пули ДК у 3,7 разів, а вміст МДА – вдвічі, що свідчить про потужну антиоксидантну дію H_2S та інгібування утворення ініціаторів ПОЛ – $\cdot\text{OH}$ та $\cdot\text{NO}_2$ радикалів. Застосування PLP, що сприяє відновленню вмісту H_2S , чинить виражену антиоксидантну дію, інгібуючи у тканинах серця активність ліпооксигенази (зниження вмісту LTC_4 до рівня нижче контрольних значень) та циклооксигенази (зниження вмісту TxV_2), за активації яких утворюється супероксиданіон. Це може бути одним із важливих біохімічних механізмів кардіопротекторної дії сірководню при старінні. Більше того, LTC_4 , так TxV_2 за ішемії мають коронароконстрикторну та аритмогенну дію, а лейкотрієни ще і прооксидантну (Strutyns'kyi et al., 2013).

Отже, стимуляція ендogenous синтезу сірководню сприяла зниженню оксидативного стресу в тканинах серця старих щурів.

3.3.3. Показники оксидативного стресу в тканинах аорти старих щурів в умовах дії піридоксаль-5-фосфату.

Як показано у табл. 3.4, швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$ значно збільшилася майже в 6 разів у аорті старих щурів порівняно з дорослими, а курсове введення PLP знизило цей показник у старих тварин у 2,2 рази. Також при старінні спостерігали збільшення стабільного H_2O_2 у 4,3 рази та швидкості утворення $\cdot\text{OH}$ -радикала (ініціатора ПОЛ) майже у 12 разів. Проте, за умов активації ендogenous синтезу H_2S після застосування PLP ці показники зменшувались у 3,2 та 2,1 рази відповідно.

Суттєве збільшення пулів ранніх продуктів перекисного окиснення ліпідів – ДК та МДА, що є маркерами інтенсивності окисного стресу, також

вказує на розвиток цього окисного процесу у тканинах аорти зокрема при старінні. PLP зменшував вміст ДК та МДА в аорті у 1,6 та 1,5 раза відповідно (табл. 3.4).

Таблиця 3. 4.

Швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ -радикалів і пули стабільного H_2O_2 та маркерів перекисного окиснення ліпідів в тканинах аорти старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP) ($M \pm m$, $n=9$)

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі +PLP
Швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$, ум.од.	4,58±0,77	26,67±3,01*	12,29±1,98#
Пули H_2O_2 , нмоль/мг білка	3,2±0,6	13,7±1,6*	4,3±1,59#
Швидкість генерації $\cdot\text{OH}$, ум. од.	0,33±0,03	3,92±0,51*	1,85±0,43#
Дієнові кон'югати, нг/мг білка	7,42±0,94	32,64±4,61*	19,81±1,83
Малоновий діальдегід, нмоль/мг білка	1,74±0,06	11,24±2,05*	7,31±1,79

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

Обмеження окисного стресу після курсового введення PLP також виявлялося зменшенням утворення LTC_4 , TxV_2 та сечової кислоти, які є основними шляхами генерації $\cdot\text{O}_2^-$ -радикала та зниженню показників ПОЛ. (табл. 3.5).

Таблиця 3. 5.

Зміни пулів маркерів ферментативного утворення $O_2^{\cdot-}$ в тканинах аорти старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP) ($M \pm m$, $n=9$).

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
Тромбоксан B_2 , $\mu\text{моль/мг білка}$	$1,88 \pm 0,32$	$2,26 \pm 0,27$	$1,28 \pm 0,21\#$
Лейкотрієн C_4 , $\mu\text{моль/мг білка}$	$0,65 \pm 0,05$	$1,78 \pm 0,28^*$	$1,22 \pm 0,2$
Сечова кислота, $\mu\text{моль/мг білка}$	$5,16 \pm 0,83$	$42,7 \pm 5,75^*$	$23,62 \pm 3,4\#$

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

Отримані результати свідчать про те, що застосування коензима H_2S -синтезуючих ферментів – PLP чинить відновлення ендogenous синтезу сірководню, що в свою чергу сприяє зниженню оксидативного стресу, а саме пригніченню утворення пулів $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 і OH^{\cdot} в тканинах аорти старих щурів.

3.3.4. Дослідження впливу піридоксаль-5-фосфату на показники нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в мітохондріях серця старих щурів.

Як видно з табл. 3.6, при старінні в мітохондріях серця розвивається не лише оксидативний, а також і нітрозативний стрес. Показано зростання активності iNOS (кальційнезалежний *de novo* синтез NO) та нітратредуктази. Натомість знижувалася активність cNOS, яку ідентифіковано як мітохондріальну NOS (mtNOS) чи nNOS (кальційзалежний *de novo* синтез NO), пули NO_2^- і низькомолекулярних нітрозотіолів.

Зростання активності нітратредуктази – НАДН-залежного ензиму, що відновлює нітрати до нітритів, може свідчити про компенсаторне підвищення реутилізаційного синтезу NO. Відомо, що NO трансформується в такі стабільні метаболіти, як нітрит- та нітрат-аніони (Bachmann and Mundel, 1994). Вміст цих метаболітів відображає стан окисного обміну аргініну в кардіоміоцитах. Спонтанним продуктом окиснення NO за фізіологічних умов при нормальній оксигенації (нормоксії) є NO_2^- . Встановлено, що в мітохондріях серця старих щурів пули NO_2^- , що є маркером доступності кисню для спонтанного неферментативного окиснення NO, знижуються втричі. При цьому пули NO_3^- що є маркером утворення і розпаду пероксинітриту, не змінювалися. Це свідчить про підвищення в умовах окисного стресу утилізації NO, що посилено синтезувався ферментом iNOS, не на спонтанне окиснення молекулами кисню до аніонів нітриту, а на утворення пероксинітриту і його вільнорадикальний розпад, на що вказує відсутність достовірного підвищення мітохондріальних пулів аніонів нітрату.

Стимуляція ендогенного синтезу H_2S кофактором PLP призводила до підвищення активності cNOS у мітохондріях серця у 1,9 раза порівняно із такими у старих тварин (табл. 3.6). Також, в умовах дії PLP, пригнічувався синтез NO *de novo* через зниження активності iNOS у 4,3 раза. Активність нітратредуктази, ферменту, що забезпечує відновлення метаболітів NO – NO_3^- і NO_2^- , знижувалася у 4,3 раза і, як результат, зменшувалася в 1,8 раза концентрація NO_3^- . Вміст NO_2^- , який утворюється спонтанно при окисненні NO лише в оксигенованих розчинах, зростав при курсовому введенні PLP у 3,6 раза порівняно зі значеннями у старих тварин.

Пули НМНТ у мітохондріях старих тварин знижувалися вдвічі. Цей комплекс включає три компоненти: нітрозильовану амінокислоту L-цистеїн, що є попередником *de novo* синтезу H_2S , нітрозоглутатіон (GSNO), що містить у своєму складі L-цистеїн, і нітрозильований сірководень (HSNO). НМНТ беруть участь у транспортуванні і депонуванні NO з вивільненням останнього в процесі декомпозиції. Зниження цих пулів характеризує

зменшення інтенсивності процесів нітрозилування (включення NO) і декомпозиції (вивільнення NO). За дії PLP пули НМНТ збільшувалися в мітохондріях у 3,2 раза (табл. 3.6).

Таблиця 3.6.

Маркери нітрозативного стресу та активність ферментів синтезу NO в мітохондріях серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP) ($M \pm m$, $n=9$).

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
cNOS, <i>нмоль/хв. мг білка</i>	3,64±0,27	1,71±0,12*	3,28±1,15#
iNOS, <i>нмоль/хв. мг білка</i>	1,5±0,06	3,66±0,62*	0,84±0,11#
Нітратредуктаза, <i>нмоль/хв. мг білка</i>	0,86±0,05	2,77±0,45*	0,64±0,11#
Аргіназа, <i>нмоль/хв. мг білка</i>	2,11±0,17	8,78±1,05*	3,02±0,9#
NO ₂ ⁻ , <i>нмоль/мг білка</i>	488,2±60,3	159,33±30,68*	575,88±83,01#
NO ₃ ⁻ , <i>нмоль/мг білка</i>	76,3±4,1	83,41±11,72	45,33±4,07#
Низькомолекулярні нітрозотіюли, <i>нмоль/мг білка</i>	735,24±84,9	375,66±26,03*	1210,18±72,96#

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

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

Також нами було показано, що у мітохондріях серця в умовах старіння суттєво знижувалися значення індексу спряження cNOS (рис. 3.4). У результаті застосування PLP спостерігалось відновлення спряження cNOS, що супроводжується пригніченням оксидативно-нітрозативного стресу у мітохондріях серця старих щурів. Про це свідчить зростання розрахованого

нами індексу спряження до значень $0,73 \pm 0,38$ ум.од. порівняно зі $0,083 \pm 0,02$ ум.од у старих тварин ($P \leq 0,01$).

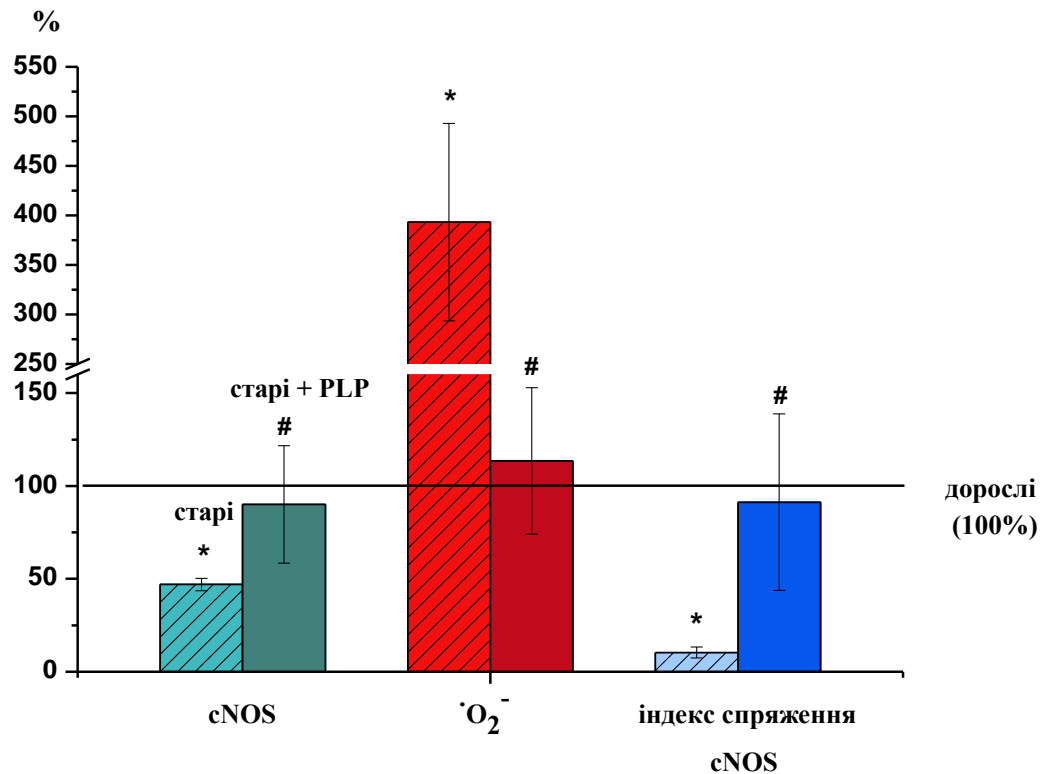


Рис. 3.4. Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на нормовані величини (%) індексу спряження cNOS і пов'язані з ним показники в мітохондріях серця старих щурів: активність конститутивної NO-синтази (cNOS), швидкість утворення O_2^- . * $P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно показників у дорослих щурів, значення яких прийнято за 100%; # $P < 0,01$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Цей індекс характеризує наявність субстратів (L-аргінін, O_2) і кофактора тетрагідробіоптерину для утворення NO, а не O_2^- при окисному метаболізмі L-аргініну. Вважається (Paravicini and Touyz, 2006), що будь-яке підвищення генерації O_2^- (мітохондріями, ксантиноксидазою чи НАДФН-оксидазою) спричиняє неспряження cNOS. Внаслідок цього ізоферменти конститутивного *de novo* синтезу NO (eNOS і nNOS) продукують O_2^- замість

NO, тим самим утворюючи замкнуте коло взаємопідсилення окисного стресу і неспряження cNOS. Отже, старіння характеризується неспряженим станом cNOS на тлі окисного і нітрозотивного стресу. Таке неспряження конститутивних NO-синтаз було показано при гіпертензії, що супроводжувалося порушення кардіогемодинаміки (Kotsuruba et al., 2015).

Ми припустили, що причиною відновлення спряженого стану cNOS стало не лише пригнічення окидативного стресу, але й збільшення біодоступності L-аргініну, субстрату синтезу NO, у результаті зниження активності аргінази в 2,9 раза порівняно зі старими тваринами (табл. 3.6).

Отримані результати свідчать про те, що у разі стимуляції синтезу ендогенного H_2S пригнічувався нітрозативний стрес, одночасно відновлювався спряжений стан cNOS і конститутивний синтез оксиду азоту у мітохондріях старих щурів.

3.3.5. Показники нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в тканинах серця старих щурів при дії піридоксаль-5-фосфату.

В тканинах серця (табл. 3.7) старих щурів також спостерігали подібні зміни: підвищення активності iNOS, нітратредуктази, аргінази, пулів NO_3^- , а також зниження активності cNOS (eNOS і nNOS), пулів NO_2^- та НМНТ. Результати наших досліджень показали, що в тканинах серця старих тварин вдвічі знижується такий важливий показник, як швидкість сумарного конститутивного Ca^{2+} -залежного синтезу оксиду азоту (cNOS), який свідчить про кардіопротекторні властивості фермента. І, навпаки, після застосування PLP показники активності цього ферменту зростає у 3,4 раза, порівняно зі такими у старих тварин. Натомість активність ферменту Ca^{2+} -незалежної iNOS при старінні зростає у 8,8 раза порівняно з дорослими тваринами, а курсове ведення PLP знижувало ці показники у 1,7 раза.

Таблиця 3.7.

Маркери нітрозативного стресу та активність ферментів синтезу NO в тканинах серця старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP) ($M \pm m$, $n=9$).

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
cNOS, <i>нмоль/хв. мг білка</i>	6,99±1,11	3,37±0,45*	11,57±2,66#
iNOS, <i>нмоль/хв. мг білка</i>	1,78±0,26	15,88±1,18*	9,08±1,51#
Нітратредуктаза, <i>нмоль/хв. мг білка</i>	0,49±0,05	2,42±0,32*	0,9±0,22#
Аргіназа, <i>нмоль/хв. мг білка</i>	1,07±0,1	4,23±0,31*	0,84±0,35#
NO ₂ ⁻ , <i>нмоль/мг білка</i>	354,4±22,6	214,88±30,6	343,88±61,85
NO ₃ ⁻ , <i>нмоль/мг білка</i>	11,72±0,64	75,45±8,28*	30,35±8,45#
Низькомолекулярні нітрозотіоли, <i>нмоль/мг білка</i>	178,52±16,36	67,84±7,12*	126,15±15,74#

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

Також після застосування PLP відбувається зменшення активності у досліджуваних об'єктах ферменту нітратредуктази – НАДН-залежного ензиму, що відновлює нітрати до нітритів. Нітратредуктазна активність у тканинах серця при старінні перевищувала контрольні значення у 2,6 раза. А застосування PLP суттєво знижувало рівень цього показника, що свідчить про значне зниження надлишкового реутилізаційного синтезу NO та про пригнічення нітрозативного стресу за цих умов при старінні. Оскільки значне підвищення за старіння активності неокисних ферментів – нітратредуктази,

як і активності ферменту *de novo* синтезу оксиду азоту iNOS, може бути доказом регуляторної ролі не лише АФК, але і АФА в тканинах серця.

При старінні посилюється також неокисна деградація L-аргініну ферментом аргіназою, що за рахунок обмеження пулів спільного субстрату (L-аргініну) створює умови для одночасної генерації $\cdot\text{O}_2^-$ і оксиду азоту всіма ізоферментами NOS і, тим самим, утворення ONOO^- , реалізації його пошкоджувальної дії в кардіоміоцитах і порушення роботи серця в цілому (Strutyns'kyi et al., 2013). Стимуляція ендогенного синтезу сірководню у старих тварин призводила до зниження у 5 разів активності цього ферменту у аорті.

Досліджуючи прояви нітрозативного стресу у тканинах серця старих щурів за дії PLP, ми також визначали зміни пулів стабільних метаболітів NO: нітрит (NO_2^-)- і нітрат (NO_3^-)-аніони (табл. 3.7), та продуктів нітрозилювання активних форм азоту НМНТ, в основному це нітрозилований глутатіон. Відомо, що NO трансформується в такі стабільні метаболіти, як NO_2^- і NO_3^- (Bachmann and Mundel, 1994). Встановлено, що в тканинах серця старих щурів пули NO_2^- , що є маркером доступності кисню для спонтанного неферментативного окиснення NO, знижуються майже вдвічі. Водночас введення PLP призводило до повернення цих значень до контрольного рівня. При цьому пули NO_3^- , що є маркером утворення і розпаду пероксинітриту, при старінні суттєво зростали у серці у 6,4 раза. Стимуляція синтезу сірководню нормалізувала вміст цих пулів. Це може свідчити про те, що надлишок синтезованого ферментом iNOS NO іде на спонтанне окиснення молекулами кисню до аніонів нітриту, а не на утворення пероксинітриту і його вільнорадикальний розпад.

У дослідженнях вмісту НМНТ у тканинах серця показано, що при старінні спостерігається зниження значень цього показника у 2,6 раза відповідно до контролю. Проте, суттєве збільшення цих тіолів, майже удвічі,

відбувається після застосування кофактора H_2S -синтезуючих ферментів – PLP.

Внаслідок розвитку нитрозативного стресу в тканинах серця в умовах старіння суттєво знижувалося значення індексу спряження cNOS (рис. 3.5), про що свідчать зниження активності cNOS (удвічі) і зменшення пулів NO_2^- (табл. 3.7).

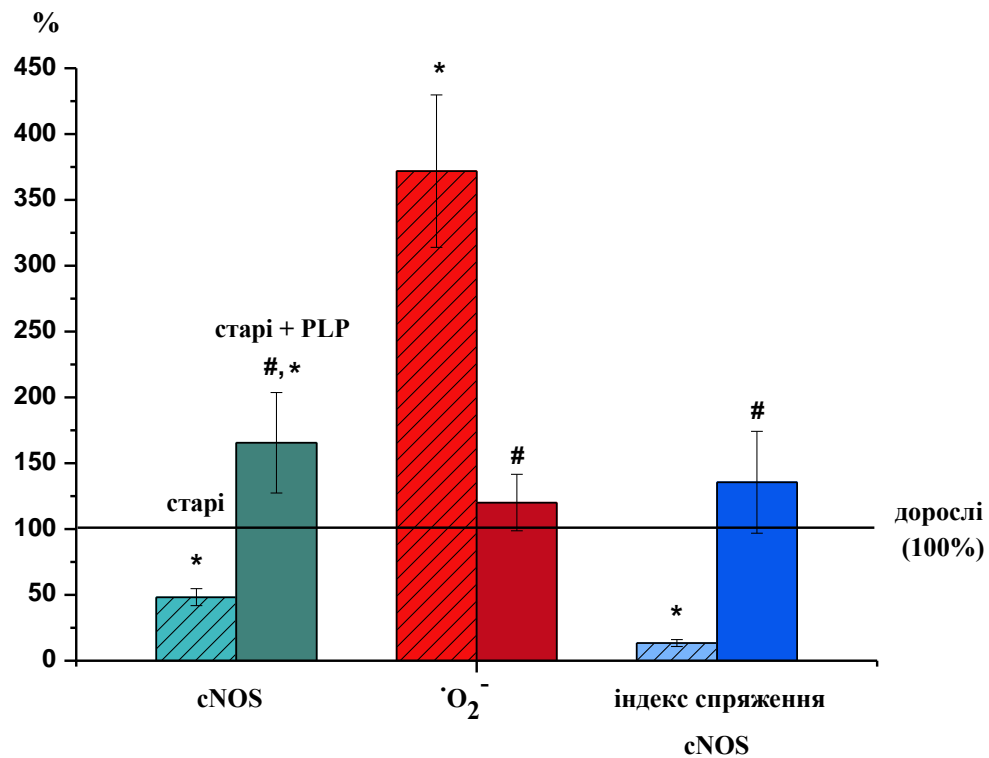


Рис. 3.5. Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на нормовані величини (%) індексу спряження cNOS і пов'язані з ним показники в тканинах серця старих щурів: активність конститутивної NO-синтази (cNOS), швидкість утворення $\cdot\text{O}_2^-$. * $P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно показників у дорослих щурів, значення яких прийнято за 100%; # $P < 0,01$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Нітрит-аніон є стабільним метаболітом оксиду азоту, та є маркером конститутивного синтезу NO (Kleinbongard, 2003). Причиною порушення

конститутивного синтезу NO міг бути неспряжений стан cNOS. Активація ендogenous синтезу сірководню PLP призводила до пригнічення нітрозативного стресу та відновлення спряженого стану cNOS, що супроводжувалось посиленням конститутивного синтезу NO.

Таким чином, одним із можливих кардіопротекторних механізмів дії H_2S можна вважати відновлення спряженого стану cNOS та збільшення нею продукції оксиду азоту.

3.3.6. Визначення впливу піридоксаль-5-фосфату на показники нітрозативного стресу та конститутивного синтезу NO в тканинах аорти старих щурів.

Одночасно з розвитком оксидативного стресу спостерігається і нітрозативний стрес у тканинах аорти старих тварин (табл. 3.8). Показано значне зниження активності cNOS, зростання активностей iNOS та нітратредуктази (шлях реутилізаційного синтезу NO) і зниження пулів НМНТ (шлях декомпозиційного синтезу NO).

Активність cNOS знижується утричі, а активність Ca^{2+} -незалежної індукцибельної NO-синтази (iNOS) та нітратредуктазна активність навпаки зростали у 3,8 та 9,8 рази відповідно.

Важливим наслідком стимуляції ендogenous синтезу сірководню, за умов застосування PLP при старінні є підвищення активності cNOS удвічі та зниження у 1,9 та 4,6 рази активності iNOS та нітратредуктази відповідно. Аргіназна активність у тканинах аорти при старінні перевищувала контрольні значення у 3,4 рази. Введення PLP суттєво знижувало активність даного ферменту.

Таблиця 3.8.

Маркери нітрозативного стресу та активність ферментів синтезу NO в тканинах аорти старих щурів за дії піридоксаль-5-фосфату (PLP) ($M \pm m$, $n=9$).

Показники	дорослі щурі	старі щурі	старі щурі + PLP
cNOS, <i>нмоль/хв. мг білка</i>	53,12±6,66	17,43±1,29*	36,04±6,19#
iNOS, <i>нмоль/хв. мг білка</i>	8,98±0,64	34,18±2,35*	18,03±1,69#
Нітратредуктаза, <i>нмоль/хв. мг білка</i>	0,58±0,07	5,66±1,44*	1,23±0,28#
Аргіназа, <i>нмоль/хв. мг білка</i>	2,73±0,43	9,38±1,98*	6,42±1,08
NO ₂ ⁻ , <i>нмоль/мг білка</i>	522,4±60,9	307,75±17,99*	491,73±25,14#
NO ₃ ⁻ , <i>нмоль/мг білка</i>	29,57±5,45	165,5±23,71*	46,95±12,16#
Низькомолекулярні нітрозотіоли, <i>нмоль/мг білка</i>	1499,66±188,2	681,93±92,45*	1287,28±312,51#

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

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

Було встановлено, що пули NO₂⁻ зменшені майже вдвічі в тканинах аорти старих щурів. Курсове введення PLP відновлювало ці значення до рівня контролю. Водночас пули NO₃⁻ значно збільшились у 5,6 раза у старих щурів, проте PLP нормалізував вміст цих пулів. Крім того, у тканинах аорти старих щурів спостерігалось зменшення вмісту НМНТ у 2,2 раза порівняно з контролем. Однак активація ендogenous синтезу сірководню у старих тварин за умов застосування PLP призводила до збільшення НМНТ майже вдвічі (табл. 3.8).

Про обмеження окисного стресу при старінні за умов дії PLP може свідчити також тенденція до відновлення спряженого стану cNOS, індекс

спряження зростав майже у 4 рази відносно старих тварин (рис. 3.6). Тоді як у старих тварин він був у 15,3 раза нижчим ніж у дорослих щурів.

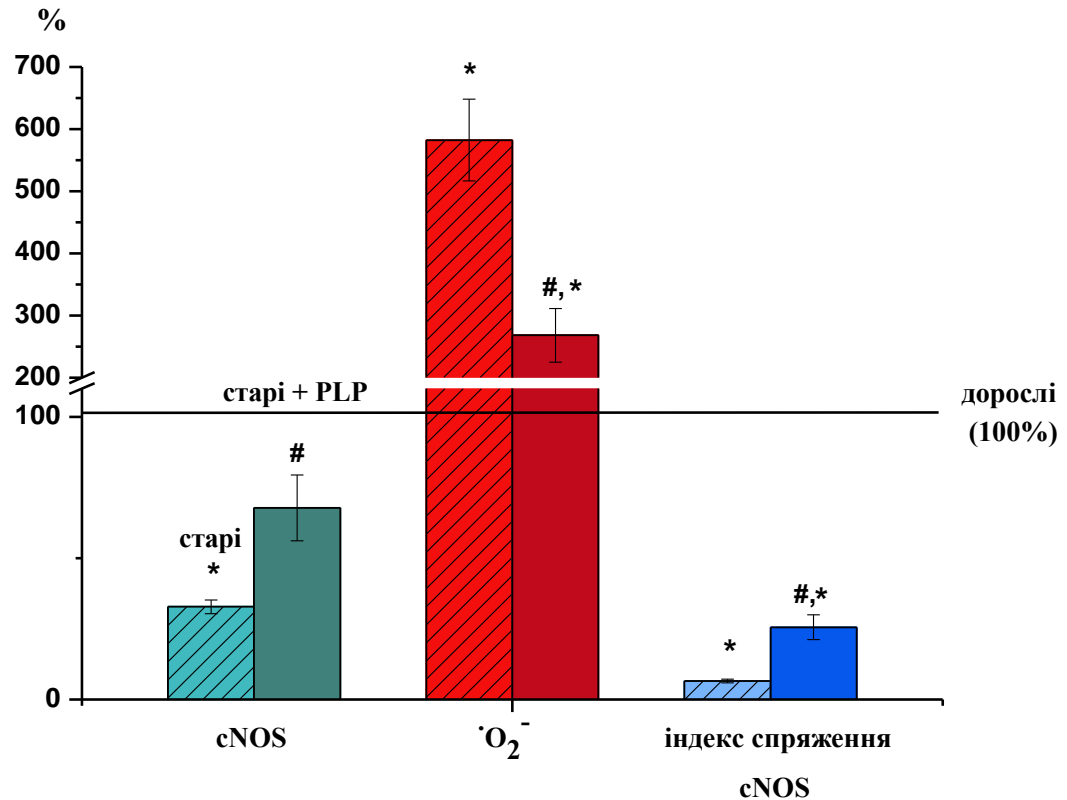


Рис. 3.6. Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на нормовані величини (%) індексу спряження cNOS і пов'язані з ним показники в тканинах аорти старих щурів: активність конститутивної NO-синтази (cNOS), швидкість утворення $\bullet\text{O}_2^-$. * $P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно показників у дорослих щурів, значення яких прийнято за 100%; # $P < 0,01$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Таким чином, отримані нами результати свідчать про те, що застосування коензиму H_2S -синтезуючих ферментів PLP, відновлюючи рівень сірководню у старих тварин, сприяє пригніченню нітрозативного стресу, а також відновлює спряжений стан cNOS і конститутивний синтез

NO. Отже, H_2S виступає як регулятор системи NO, що свідчить про важливу роль цього газового трансмітера в патології серцево-судинної системи.

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

Відомо, що в основі захворювань серця при старінні лежить дисфункція мітохондріальних внутрішніх механізмів, яка найчастіше викликана формуванням неселективної МП транзиторної провідності, що супроводжується оксидативно-нітрозативним стресом, пригніченням активності cNOS та зниженим вмістом H_2S тощо (Kwong and Molkentin, 2015; Li and Forstermann, 2013; Strutynska et al., 2011). Встановлено, що відкриття високопровідної МП між зовнішньою і внутрішньою мембранами органел викликає колапс мітохондріального потенціалу, що призводить до втрати енергоутворювальної функції органел (синтезу АТФ) і індукції клітинної смерті – апоптозу (Halestrap and Richardson, 2015). Тим не менше існує МП, яка характеризується низькою провідністю і оборотністю, вона відіграє фізіологічну роль, вивільняючи кальцій і АФК з органел, тим самим регулюючи кальцієвий і енергетичний гомеостаз клітини.

Пошук системи захисту мітохондрій від впливу вільнорадикальних процесів займає вагомe місце у сучасних дослідженнях. На сьогодні показано протекторні механізми дії H_2S , які за даними різних авторів неоднозначні і можуть бути пов'язані як з активацією АТФ-залежних K^+ -каналів, відновленням конститутивного Ca^{2+} -залежного синтезу NO (cNOS), пригніченням окисного стресу, так і впливом на внутрішньоклітинні структури, а саме неспецифічний мегаканал – МП (Roe and Ren, 2012; Strutynska et al., 2011). Раніше нами було показано, що екзогенне введення донора сірководню – NaHS та попередника його біосинтезу – L-цистеїну пригнічувало Ca^{2+} -індуковане відкриття МП, що свідчило про його

протекторну дію на пороутворення у серці дорослих та старих щурів (Strutynska et al., 2011).

Метою нашої роботи було оцінити вплив стимуляції ендогенно синтезованого сірководню на чутливість МП до її природного індуктора Ca^{2+} у мітохондріях серця старих тварин.

3.4.1. Дослідження впливу піридоксаль-5-фосфату на Ca^{2+} -індуковане 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 дослідах *in vitro* на ізольованих мітохондріях реєстрували відкриття МП у серці щурів, використовуючи природний її індуктор Ca^{2+} у концентрації 10^{-4} моль/л (рис. 3.7). Показано, що зміна амплітуди набухання мітохондрій ($\Delta D_{520} \cdot 10^2$) у безкальцієвому середовищі становила 6,3 та 11,3 од.екст. у дорослих та старих тварин відповідно (рис. 3.7, а). За умов навантаження органел кальцієм у концентрації 10^{-4} моль/л цей показник при старінні зростає до 22,5 од.екст. порівняно зі значеннями у дорослих тварин (17,3 од.екст.) (рис. 3.7, б).

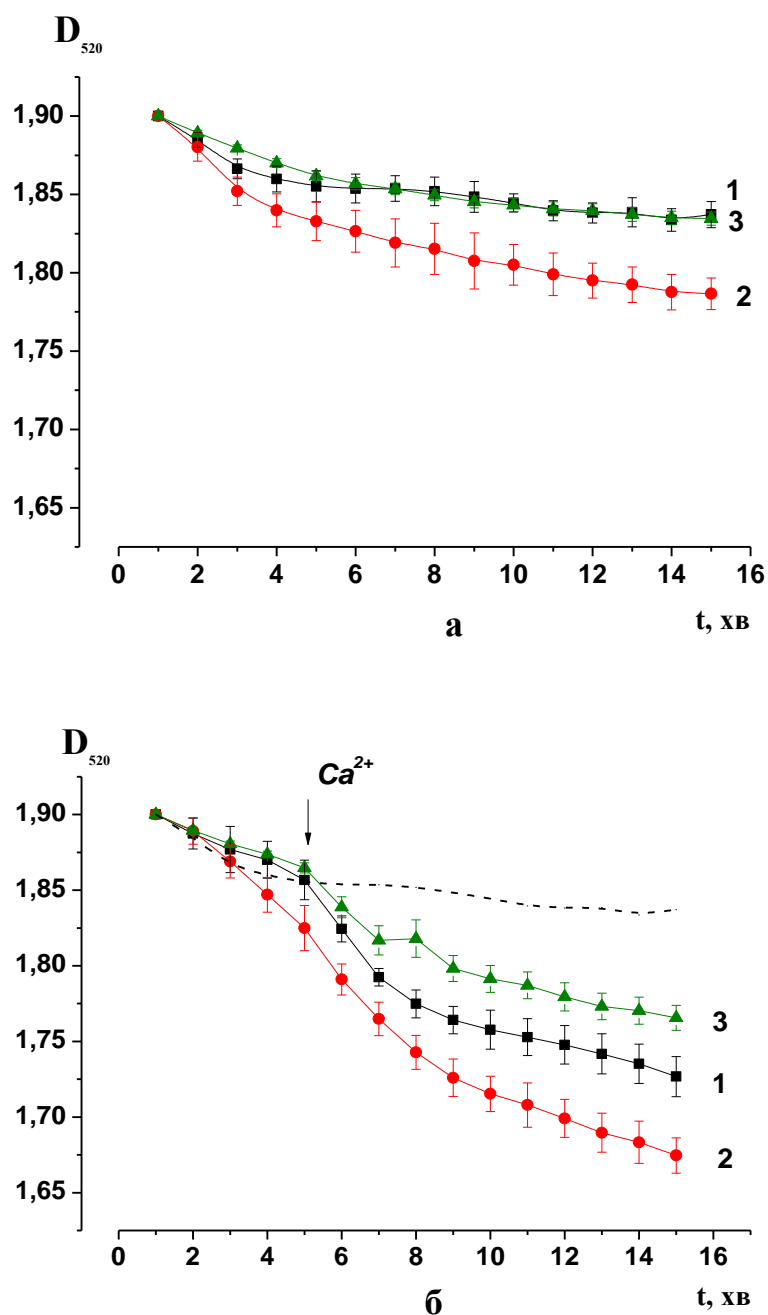


Рис. 3.7. Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на відкривання кальційіндукованої мітохондріальної пори у серці старих щурів: а – набухання мітохондрій серця у безкальцієвому середовищі; б – набухання мітохондрій серця за дії Ca^{2+} (10^{-4} моль/л). 1 –дорослі щури; 2 – старі щури; 3 – старі щури після введення PLP. Пунктирною лінією позначено набухання мітохондрій серця дорослих щурів у безкальцієвому середовищі.

Як відомо, однією з ключових ланок процесів старіння організму є накопичення та тривала дія вільних радикалів, які є індукторами МП. Для

з'ясування захисного впливу кофактора H_2S -синтезуючих ферментів – PLP щодо відкриття МП досліджували дію Ca^{2+} у концентрацій 10^{-4} моль/л (рис. 3.7, б). Виявили, що використання цього модулятора зменшувало амплітуду набухання мітохондрій у безкальцієвому середовищі (рис. 3.7, а) у 1,8 раза порівняно зі старими тваринами, відновлюючи цей показник до рівня контрольних тварин. При застосуванні індуктора кальцію амплітуда набухання мітохондрій серця старих тварин після дії PLP була меншою у 1,7 раза відносно старих щурів, що як показано на рис.3.7, б призвело до зниженої здатності пороутворення. Таким чином, застосування PLP попереджало Ca^{2+} -індуковане відкриття МП.

Цілком можливо, що захисна дія PLP на пороутворення у старих тварин реалізується за рахунок збільшення експресії *3-MST* (рис. 3.3). Виявлено, що H_2S , який синтезується ферментом *3-MST*, що локалізована головним чином у мітохондріях, зменшує генерацію АФК в цих органелах (Kimura H., 2011).

Для з'ясування участі сірководню у механізмах протекторної дії PLP у процесах пороутворення ми застосували інгібітор *3-MST* – О-СМН. Ми показали, що введення О-СМН старим тваринам після дії PLP призводило до посилення у 1,7 раза амплітуди спонтанного набухання мітохондрій (контроль у безкальцієвому середовищі, рис. 3.8, а) та у 2,1 раза амплітуди кальційіндукованого набухання органел відносно старих щурів, яким вводили лише PLP (рис. 3.8, б).

Отже, збільшення амплітуди набухання мітохондрій у старих щурів яким вводили О-СМН на тлі дії PLP порівняно зі старими тваринами, яким вводили лише PLP відбувалося внаслідок інгібування ендогенного синтезу H_2S у мітохондріях серця старих щурів і свідчить про те, що PLP діє саме на ферменти синтезу H_2S .

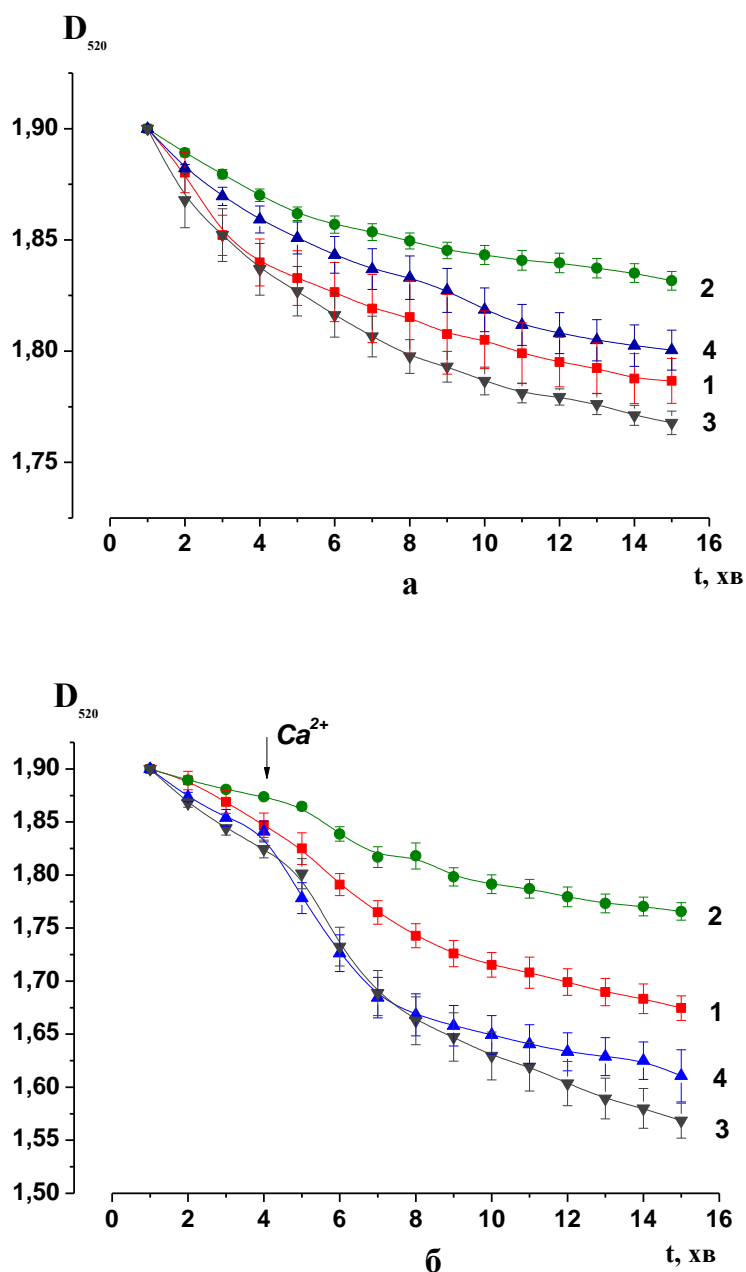


Рис. 3.8. Дія піридоксаль-5-фосфату (PLP) та інгібітора синтезу H_2S О-карбоксиметилгідроксиламіну (О-СМН) на відкриття кальційіндукованої мітохондріальної пори у серці старих щурів: а – набухання мітохондрій серця старих щурів у безкальцієвому середовищі; б – набухання мітохондрій серця старих щурів за дії Ca^{2+} (10^{-4} моль/л). 1 – старі щури; 2 – старі щури після введення PLP; 3 – старі щури після дії *in vivo* О-СМН; 4 – старі щури після введення PLP та дії *in vivo* О-СМН.

Також спостерігали посилення процесів пороутворення у старих тварин при застосуванні О-СМН, на тлі зниженого вмісту у них H_2S .

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

3.4.2. Дослідження чутливості МП до дії Ca^{2+} в серці старих щурів в умовах дії *in vivo* піридоксаль-5-фосфату.

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. 3.9).

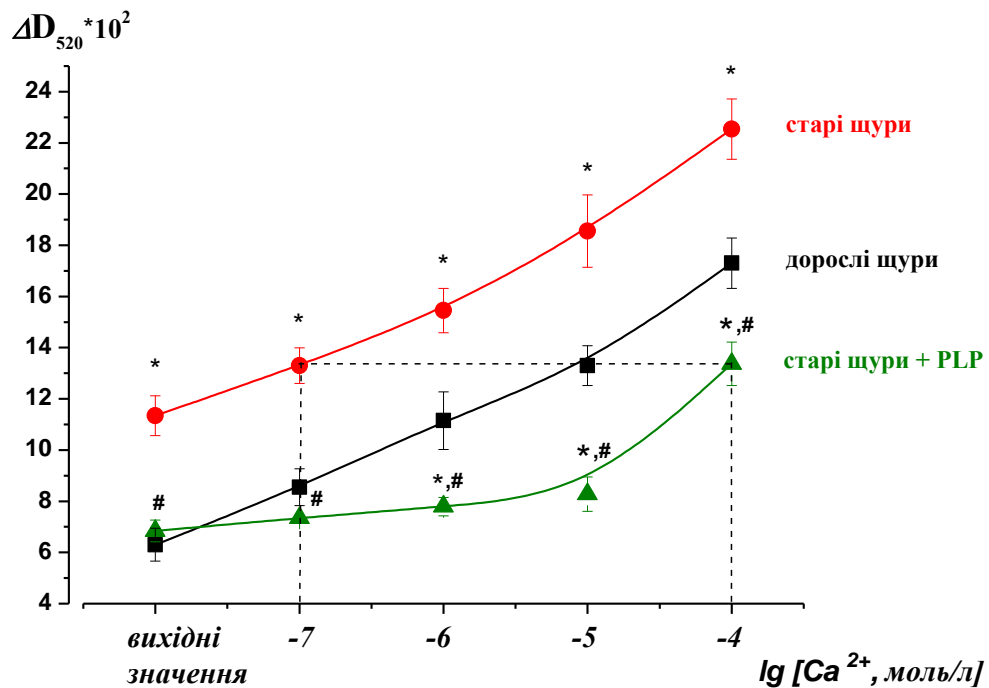


Рис. 3.9. Зміна чутливості мітохондріальної пори до її індуктора кальцію у серці старих щурів за умов дії піридоксаль-5-фосфату (PLP). * $P < 0,05$ статистично достовірною різницею відносно значень у дорослих щурів; # $P < 0,05$ статистично достовірною різницею відносно значень у старих щурів.

Поріг чутливості відповідав найменшій концентрації Ca^{2+} , яка викликала набухання мітохондрій у серці. Як видно з рис. 3.9, 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. Варто зазначити, що зниження порога дії кальцію, що індукує відкривання МП, корелювало із зниженням значень біохімічних індексів спряження cNOS у мітохондріях і тканинах серця (рис. 3.4 та 3.5).

Показано, що використання модулятора синтезу H_2S (застосування коензиму H_2S -синтезуючих ферментів PLP) зменшувало амплітуду набухання мітохондрій за дії всіх використаних концентрацій індуктора порівняно з цим показником у старих тварин (рис. 3.9). Рівень набухання мітохондрій за дії кальцію у концентрації 10^{-4} моль/л після курсового введення PLP дорівнював такому набуханню, викликала яке спостерігали при дії індуктора у концентрації 10^{-7} моль/л у старих тварин. 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. 3.10).

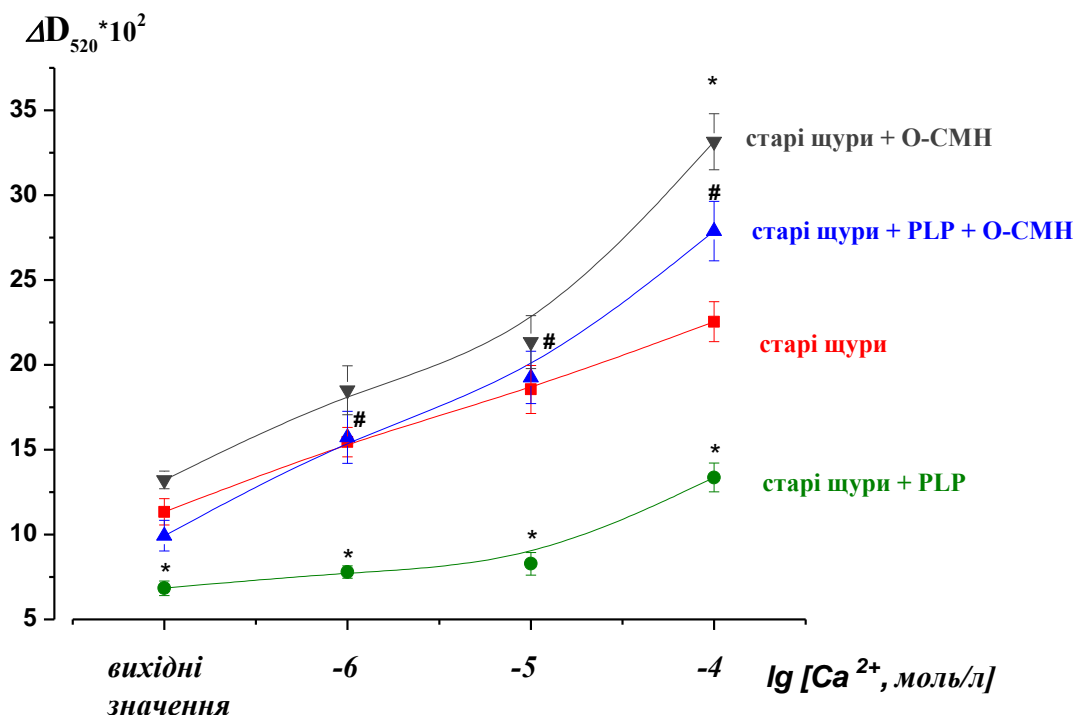


Рис. 3.10. Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) та інгібітора H_2S О-карбоксиметилгідроксиамін (О-СМН) на динаміку набухання мітохондрій. * $P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів;

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

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.

Курсове введення PLP з вищезгаданим інгібітором О-СМН підвищувало амплітуду набухання мітохондрій як у безкальцієвому середовищі (рис. 3.11, стовпчики 1), так за його наявності (рис. 3.11,

стовпчики 2) у 1,3 та 1,2 раза порівняно з старими тваринами, яким вводили лише О-СМН, відповідно. 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+} .

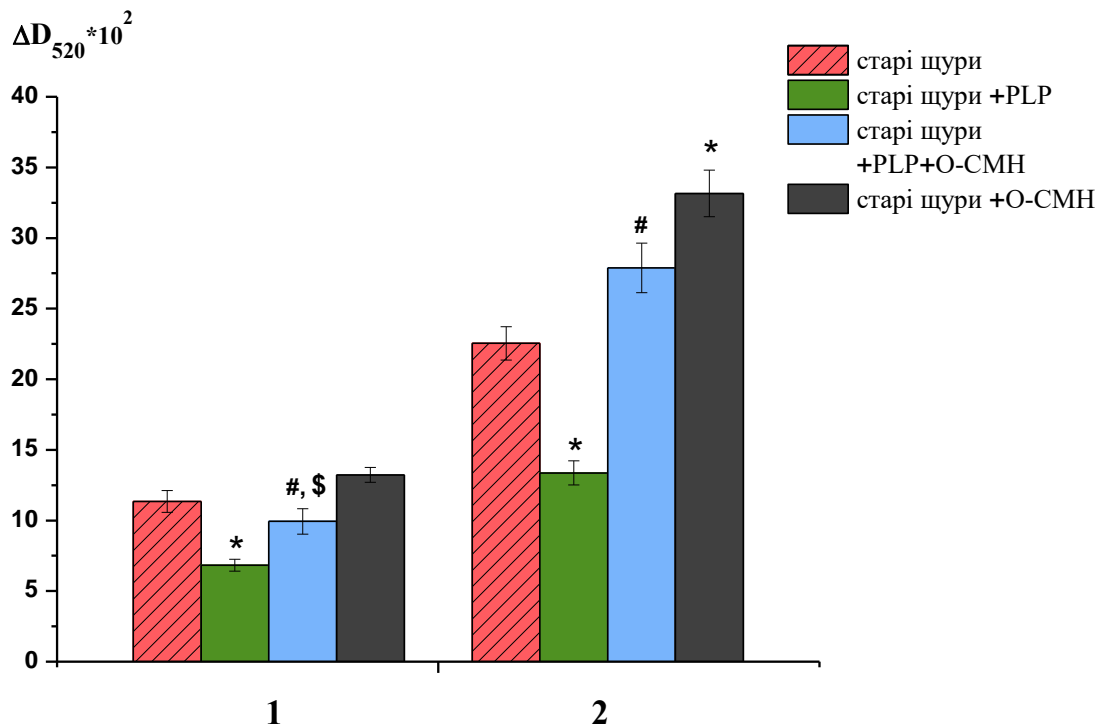


Рис. 3.11. Зміна чутливості мітохондріальної пори до її індуктора кальцію у серці старих щурів за умов дії піридоксаль-5-фосфату (PLP) та інгібітора H_2S О-карбоксиметилгідроксиламін (О-СМН): 1 – набухання мітохондрій серця старих щурів у безкальцієвому середовищі; 2 – набухання мітохондрій серця старих щурів за дії Ca^{2+} (10^{-4} моль/л). * $P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів; # $P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів після введення PLP; \$ $P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів після введення О-СМН.

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.

Досліджуючи механізми формування і регуляції пороутворення у серці за старіння, раніше було показано зростання експресії генів двох основних структурних компонентів МП – потенціалзалежного аніонного каналу і транспортера аденінових нуклеотидів (Chorna et al., 2010), що сприяло утворенню більшої кількості цих мегаканалів. Також було встановлено, що екзогенне введення газових медіаторів – NO і H_2S , пригнічує кальційіндуковане відкривання МП, що свідчить про їх протекторний вплив на пороутворення у серці (Strutynska et al., 2011; Akopova et al., 2005).

Недостатній ендогенне вироблення оксиду азоту та сірководню при старінні, може бути одним з можливих факторів, що призводить до підвищення чутливості МП до кальцію і вказувати на NO - і H_2S -залежні механізми регуляції пороутворення у серці. А відновлення вмісту H_2S після курсового введення PLP є більш природним шляхом пригнічення Ca^{2+} -індукованого відкривання МП та зменшення її чутливості до Ca^{2+} у мітохондріях серця старих щурів.

3.5. 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 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 ізольованого серця.

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 дослідах запобігало розвитку значних ішемічно-реперфузійних порушень функції серця (рис. 3.12).

Відновлення кардіодинаміки після 20 хвилин ішемії і протягом всієї реперфузії було значно кращим, ніж у старих щурів, яким не вводили PLP.

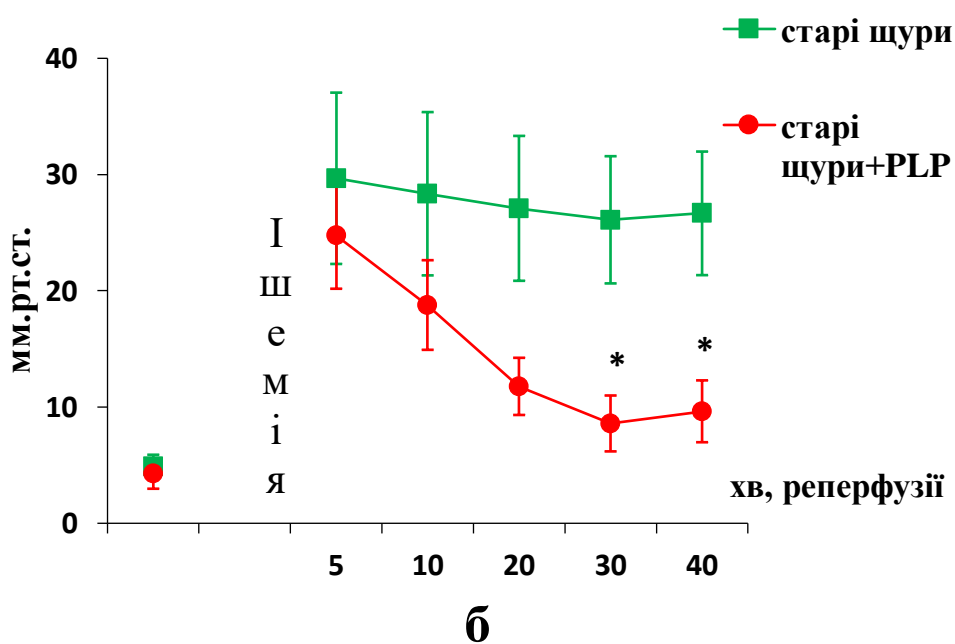
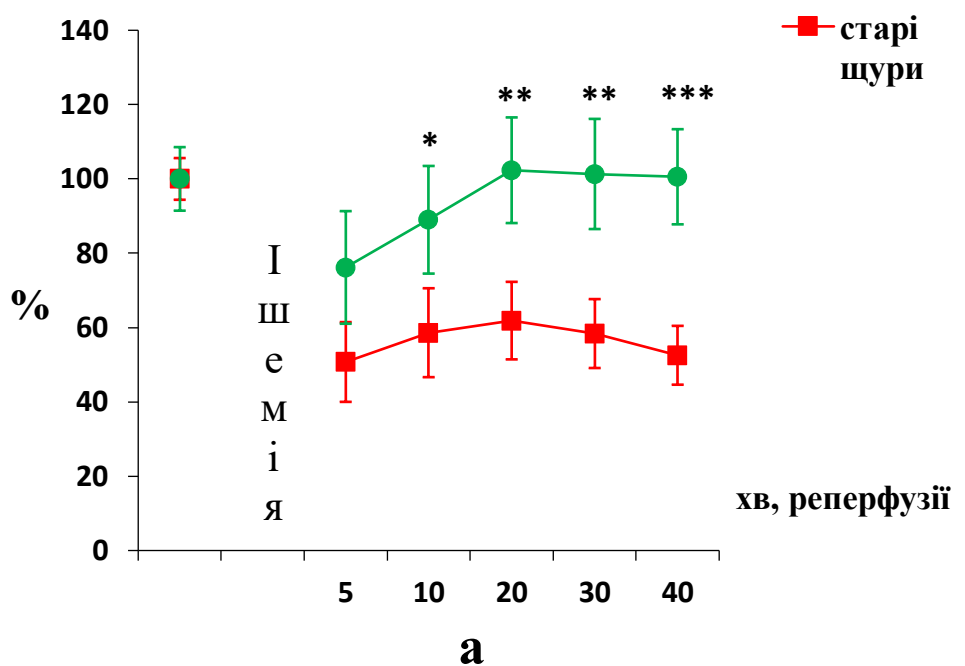


Рис. 3.12. Вплив ішемії-реперфузії на зміни тиску, що розвивається у лівому шлуночку (а) і кінцево-діастолічного тиску (б) ізолюваного серця старих щурів в умовах дії піридоксаль-5-фосфату (PLP). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ та *** $P < 0,001$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

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 (рис. 3.12).

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. 3.12, 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. 3.12, б).

Показники швидкості скорочення та розслаблення міокарда в умовах курсового введення PLP також були значно кращими, ніж у контрольних тварин (рис. 3.13).

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-ій хвилині реперфузії (рис. 3.13). 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. 3.13).

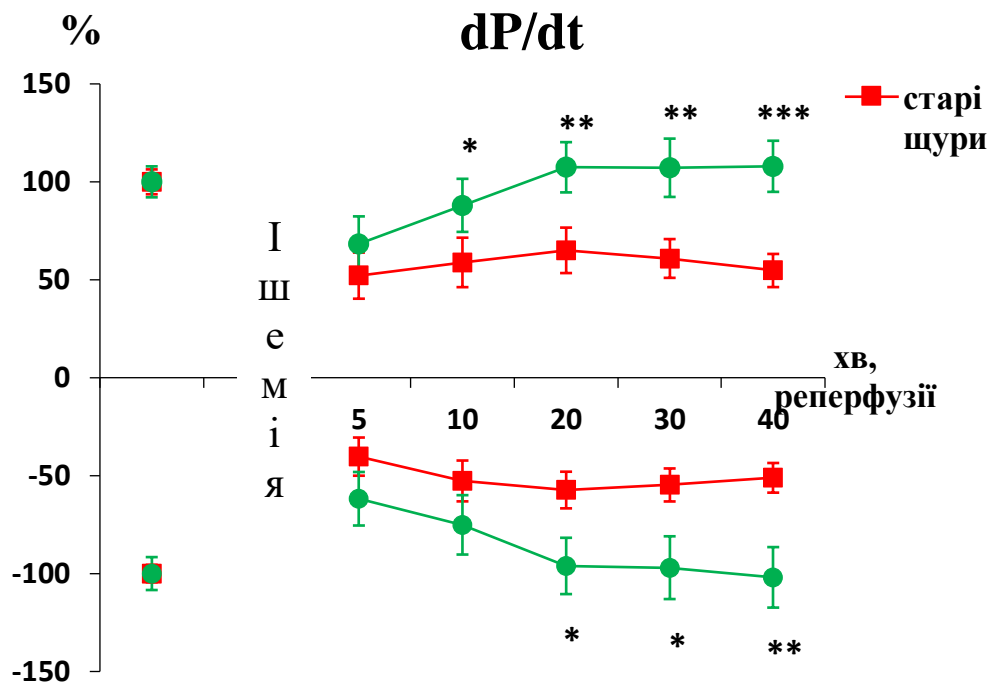


Рис. 3.13. Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на зміни швидкості скорочення та розслаблення міокарда (dP/dt) ізолюваного серця старих щурів при ішемії-реперфузії. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ та *** $P < 0,001$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Крім того, PLP збільшував величину коронарного потоку порівняно з контрольними старими щурами (рис. 3.14). Отже, введення PLP сприяло зменшенню ішемічно-реперфузійних порушень роботи ізолюваного серця, старих щурів.

При ішемічно-реперфузійному пошкодженні міокарда швидка нормалізація рН та перевантаження Ca^{2+} , а також утворення великої кількості АФК/АФА під час реперфузії призводять до відкривання МП (Yellon and Hausenloy, 2007; Halestrap, 2010). Crompton та співавт. першими зафіксували МП як критичну детермінанту смерті кардіоміоцитів в умовах гострої ішемії-реперфузії, показавши, що виснаження АТФ, перевантаження мітохондрій кальцієм, окисний стрес і високий вміст фосфатів були ключовими

чинниками відкривання МП, яка інгібується CsA (Crompton et al., 1987; 1988). Потім Griffiths та Halestrap у 1995 році зробили важливий висновок, що МП залишався закритою протягом ішемічного періоду і відкривався лише в перші 2-3 хв реперфузії (Griffiths and Halestrap, 1995).

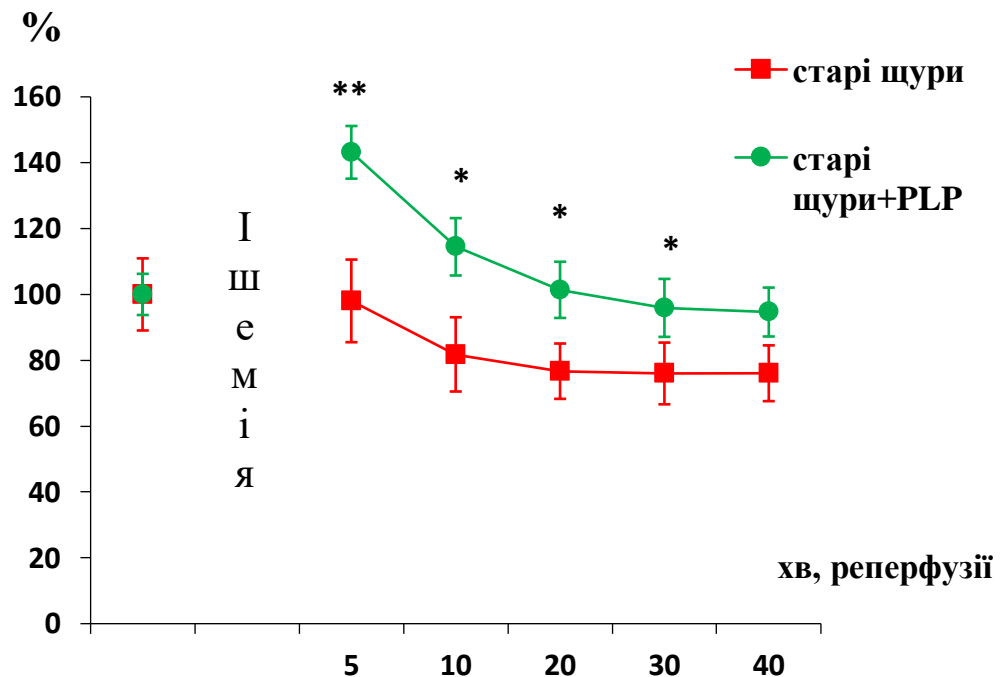


Рис. 3.14. Вплив піридоксаль-5-фосфату (PLP) на зміни коронарного потоку ізолюваного серця старих щурів при ішемії-реперфузії. * $P < 0,05$ та ** $P < 0,01$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів.

Пізніше було підтверджено, що відкривання МП відбувається головним чином на початку реперфузії, а введення CsA виключно на початку реперфузії міокарда обмежує розмір інфаркту міокарда (Hausenloy et al., 2002). Кардіопротекторні ефекти інгібування МП були повністю відмінені, якщо інгібітор МП вводили після закінчення перших 15 хв реперфузії міокарда (Hausenloy et al., 2003). Дані результати свідчать про важливість втручання в перші кілька хвилин реперфузії, щоб запобігти відкриванню МП (Hausenloy et al., 2013).

Раніше нами було показано, що застосування L-цистеїну, як попередника синтезу ендogenous сірководню зменшувала ступінь реперфузійних порушень функції серця порівняно з контрольними щурами (Sahach et al., 2013). І одним із механізмів цього захисту є зменшення проникності мітохондріальних мембран. Оскільки, використання L-цистеїну запобігало Ca^{2+} -індукованому відкриванню МП.

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

3.6. Вплив активації ендogenous 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, що сірководень викликає вазорелаксацію в тканинах аорти щурів, подібно до NO (Zhao and Wang, 2002). 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; Sun et al. 2012; Drachuk et al., 2015). Ми припустили, що судинна дисфункція, що пов'язана з віком, може виникнути через недостатнє вироблення ендogenous 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. 3.15, а, б).

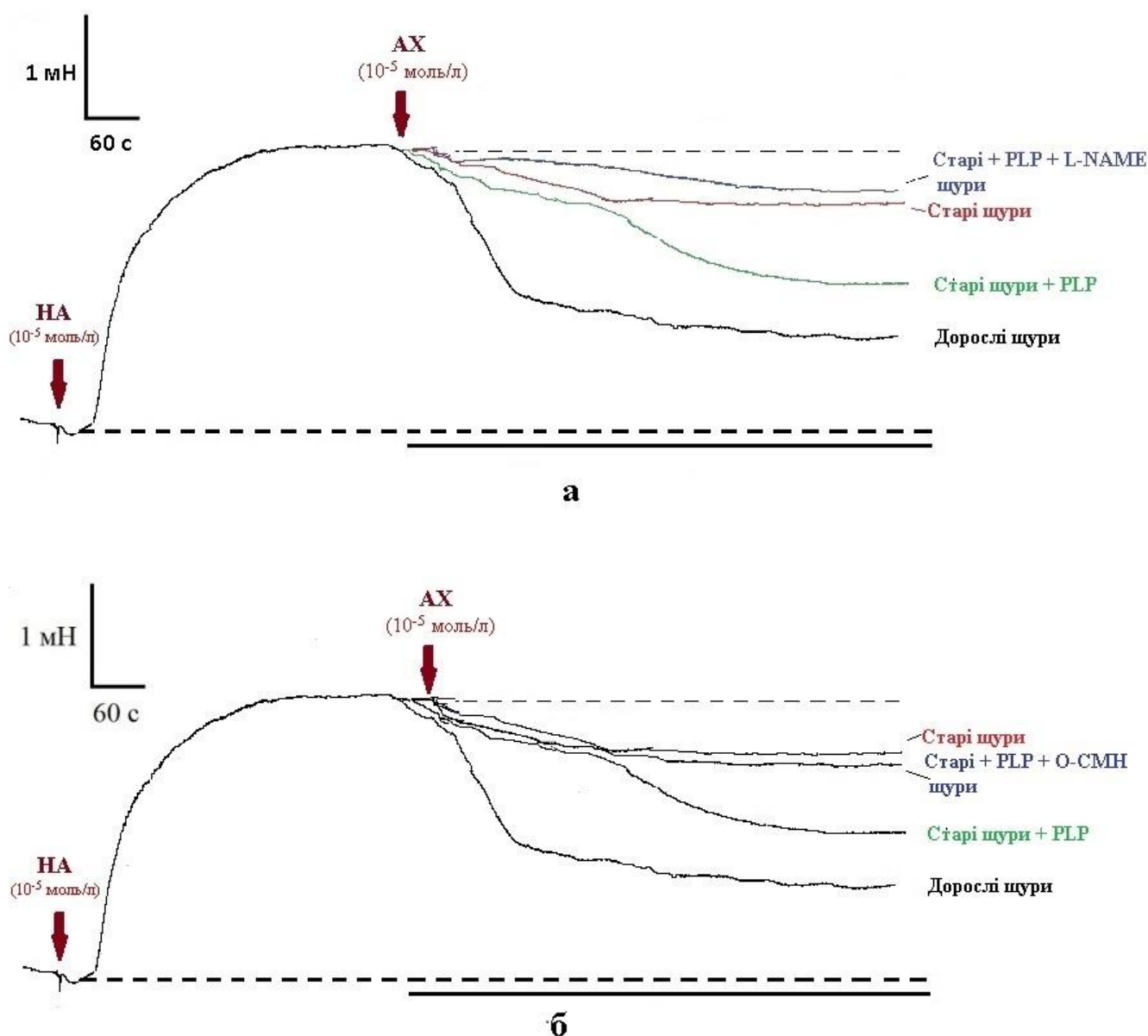


Рис. 3.15. Нативні криві впливу курсового введення піридоксаль-5-фосфату (PLP) на ацетилхолініндуковане розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти старих щурів: а – на тлі дії блокатора синтезу NO синтезу – L-NAME; б – на тлі дії блокатора 3-MST – O-CMN. Абсциса – час; ордината – напруження розвинуте 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%.

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 рази. 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. 3.15).

Механізм дії H_2S на розслаблення судин має два різні шляхи (Liu Y. et al., 2012). Більшою мірою це ендотелійнезалежний (прямий вплив на ГМ судин) та меншою – ендотелійзалежний механізм вазорелаксації (Zhao et al., 2001). Ендотелійнезалежний механізм, за допомогою якого H_2S здійснює свої судинорелаксуючі ефекти, включає активацію K^+ -каналів (Zhao et al., 2001) зниження внутрішньоклітинного рН (Liu Y. et al., 2012) та пригнічення метаболізму. Ендотелійзалежний механізм включає вивільнення NO та ендотелійзалежного гіперполяризуючого фактора (Gheibi et al., 2018).

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. 3.15, 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. 3.16).

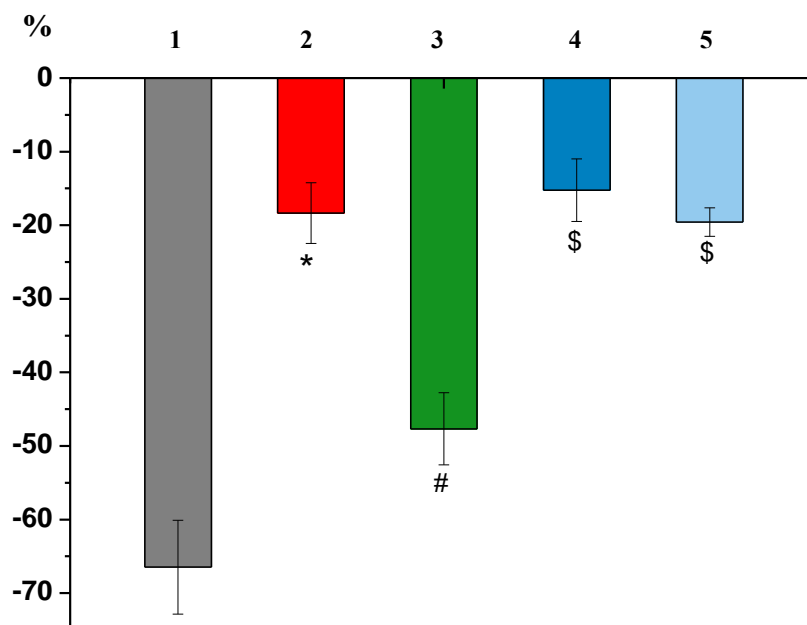


Рис. 3.16. Вплив курсового введення піридоксаль-5-фосфату (PLP) на ацетилхолініндуковане розслаблення гладеньких м'язів аорти старих щурів: 1 – дорослі щури, 2 – старі щури, 3 – старі щури + PLP, 4 – старі щури після введення PLP та дії *in vivo* L-NAME, 5 – старі щури після введення PLP та дії *in vivo* O-CMH. * $P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у дорослих щурів; # $P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів; \$ $P < 0,05$ статистично достовірна різниця відносно значень у старих щурів, яким вводили PLP.

Для розуміння механізму залучення H_2S у процес вазорелаксації ми застосували інгібітор ферменту 3-MST – O-CMH *in vivo* у дозі 50 мг/кг за 30 хв до декапітації. У старих тварин, яким вводили PLP та O-CMH спостерігали зменшення амплітуди АХ-індукованого розслаблення ГМ аорти (рис. 3.15, 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 О-СМН, середнє значення амплітуди релаксації аорти у відповідь на ацетилхолін становило $6,88 \pm 1,02\%$ (рис. 3.16).

Таким чином, активація H_2S -синтезуючих ферментів PLP сприяла поліпшенню пригніченого у старих тварин ендотелійзалежного розслаблення ГМ аорти, яке обмежувалося при застосуванні інгібіторів NO-синтази та 3-MST.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Старіння організму – складний фізіологічний процес, що характеризується послабленням функцій всіх органів та систем, зокрема, серцево-судинної, та підвищенням їх чутливості до дії стресових факторів (Lakatta, 2015). Останнім часом з'являється все більше даних про те, що такий газовий трансмітер як сірководень має кардіопротекторні властивості. (Kimura H., 2015; Donnarumma et al., 2017). Однак механізми дії H_2S залишаються не до кінця з'ясованими.

Відомо, що за старіння порушується обмін сірководню, діастолічна функція серця та погіршується ендотелійзалежне розслаблення судин. Співставлення результатів досліджень вказують на те, що дія газового медіатора H_2S може реалізуватися шляхом запобігання розвитку оксидативного стресу (Xie et al. 2016; Yetik-Anacak et al. 2016). Про це свідчить той факт, що зниження синтезу сірководню у тканинах супроводжується посиленням вільнорадикальних процесів, а відновлення його вмісту через застосування екзогенного сірководню (донорів H_2S) пригнічує оксидативний стрес і попереджає розвиток функціональних порушень при патологічних процесах та старінні (Drachuk et al., 2015; Yang et al. 2017; Huang et al. 2016). Тому ми припустили, що відновлення ендогенного синтезу H_2S може мати коригуючий ефект на порушення функції серця та судин при старінні.

Досліджували вплив курсового введення PLP, коензиму H_2S -синтезуючих ферментів, на вміст сірководню у старих щурів. Було показано, що застосування PLP сприяло відновленню ендогенного вмісту сірководню у серцево-судинній системі старих тварин. І це відновлення відбувалось внаслідок збільшення експресії генів *CSE* та *3-MST* у тканинах серця старих щурів за умов дії PLP.

Згідно з літературними даними, у розвитку таких хвороб похилого віку як гіпертензія, діабет, атеросклероз, серцева недостатність тощо вирішальна роль відводиться вільнорадикальним процесам (Dikalov and Dikalova, 2016). Особливістю розвитку оксидативно-нітрозативного стресу в тканинах старих тварин є зниження конститутивного синтезу оксиду азоту (сNOS) та значне збільшення продукції супероксидного радикала. Така ситуація може бути зумовлена як надлишковою активністю супероксидсинтезуючих процесів внаслідок підвищеної активності ксантиноксидази, цикло- і ліпоксигенази, NADPH-оксидази, а також збільшенням виходу супероксидного аніона з мітохондрій. Причиною таких змін редокс-статусу тканин може бути зниження активності (експресії) ферментів, що забезпечують антиоксидантний захист, а саме, супероксиддисмутази, каталази, пероксидази та ін. (Ziegler et al., 2015; Barja, 2014). Оскільки H_2S має сильні відновні властивості, було зроблено припущення, що протекторні ефекти цієї сигнальної молекули можуть бути пов'язані з захистом тіолових груп білків від окиснення, реакції з активними формами кисню і азоту, пригнічення індукційної NO-синтази, що запобігає неспряженому стану сNOS тощо. Це забезпечує регулювання низки функцій клітини, що свідчить про важливість цього газового медіатора для життєздатності клітин.

Виявлено, що введення PLP, кофактора H_2S -синтезуючих ферментів, зменшувало рівень окисного стресу у мітохондріях і тканинах серця та аорти у старих щурів. За цих умов суттєво знижувалися такі показники як – швидкість генерації супероксидного ($\cdot\text{O}_2^-$) у 3 і 2,2 раза і гідроксильного ($\cdot\text{OH}$) аніон-радикалів у 1,8 та 2,2 раза відповідно у тканинах серця та аорти порівняно з суттєво підвищеним значенням цих показників у тканинах старих тварин. Про обмеження оксидативного стресу при старінні за умов стимуляції ендогенного синтезу H_2S свідчать також зниження вмісту продуктів неферментативного (ДК та МДА) та ферментативного (сечова кислота, пептидолейкотрієн C_4 – LTC_4 і тромбоксан B_2 – TxB_2) окиснення ліпідів. Важливим наслідком стимуляції ендогенного синтезу сірководню при

старінні є зниження показників нітрозативного стресу, а саме активності індукцибельної NO-синтази та нітратредуктази, а також відновлення активності конститутивної NO-синтази, що свідчить про важливу роль цього газового трансмітера у серцево-судинній системі. 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.

Перевантаження мітохондрій іонами Ca^{2+} , що відбувається при окисному стресі, призводить до зміни проникності мітохондріальних мембран та відкривання МП у внутрішній мембрані мітохондрій. Утворення великої кількості МП стимулює опосередковану мітохондріями загибель клітин шляхом апоптозу та некрозу залежно від концентрації АТФ у клітині (Halestrap et al., 2004). Безперечно, що такі порушення у функціонуванні мітохондрій призводять до погіршення функціональних показників діяльності серця за старіння.

Нині відомо, що відкривання МП в стані високої провідності модулюється різними чинниками ендогенного та екзогенного походження. Деякі з цих модуляторів, активуючи чи інгібуючи пороутворення, можуть відігравати важливу роль у формуванні та регулюванні МП. Так, окисний стрес, високий вміст матричного Ca^{2+} та неорганічного фосфату, зростання рН тощо сприяють відкриванню цього комплексу, в той час як аденінові нуклеотиди (АТФ і АДФ), циклоспорин А і сангліферин А запобігають цьому процесу (Halestrap and Richardson, 2015). Відомо також, що пороутворення може відбуватися без збільшення концентрації Ca^{2+} в органелах, якщо один з індукторів змінюється відповідним чином. Наприклад, під час реперфузії ішемізованого серця, за якого спостерігається окисний стрес, виснаження аденінових нуклеотидів і підвищення концентрації фосфатів та рівнів рН. На різних експериментальних моделях було показано, що такі інгібітори відкривання МП як циклоспорин А і сангліферин, забезпечують захист від реперфузійних пошкоджень і зменшують тим самим розмір інфаркту

міокарда. Зміна мітохондріального потенціалу може також регулювати відкритий стан МП, незалежно від поглинання органелами Ca^{2+} (Halestrap and Richardson, 2015).

Раніше було показано (Strutynska et al., 2011), що екзогенний сірководень у фізіологічних концентраціях попереджав кальційіндуковане відкривання МП, що забезпечувало цитопротекторний ефект цього медіатора. За умов стимуляції ендогенного синтезу сірководню при використанні коензиму H_2S -синтизуючих ферментів спостерігали пригнічення Ca^{2+} -індукованого відкривання МП та зменшення її чутливості до Ca^{2+} у мітохондріях серця старих щурів. Застосування інгібітора O-CMN на тлі дії PLP призводило до збільшення амплітуди набухання мітохондрій старих тварин, що має негативний вплив на протекторні ефекти PLP щодо відкривання МП у серці старих щурів і свідчить про вплив PLP на ферменти синтезу сірководню.

Розуміння механізмів виникнення мітохондріальної дисфункції при старінні дасть можливість попередити чи усунути їх розвиток. Так, можна зробити висновок, що мітохондріальна дисфункція, яка спостерігається за старіння, реалізується через неспряження cNOS на тлі зростання вмісту АФК та АФА, порушення кальцієвого гомеостазу, зниження рівня ендогенного синтезу сірководню, що призводить до індукції високопровідної МП внаслідок зростання її чутливості до кальцію. Тому для усунення мітохондріальної дисфункції за старіння, на нашу думку, необхідним є відновлення спряженого стану cNOS з одночасним максимальним послабленням окисидативно-нітрозативного стресу і підвищенням активності cNOS та відновлення пулів сірководню, що дасть змогу знизити чутливість МП до індуктора у серці при старінні і, можливо, попередити розвиток патологічних станів організму в цілому. І як показали наші дослідження, PLP може бути використаним для досягнення таких ефектів захисту серцево-судинної системи при старінні.

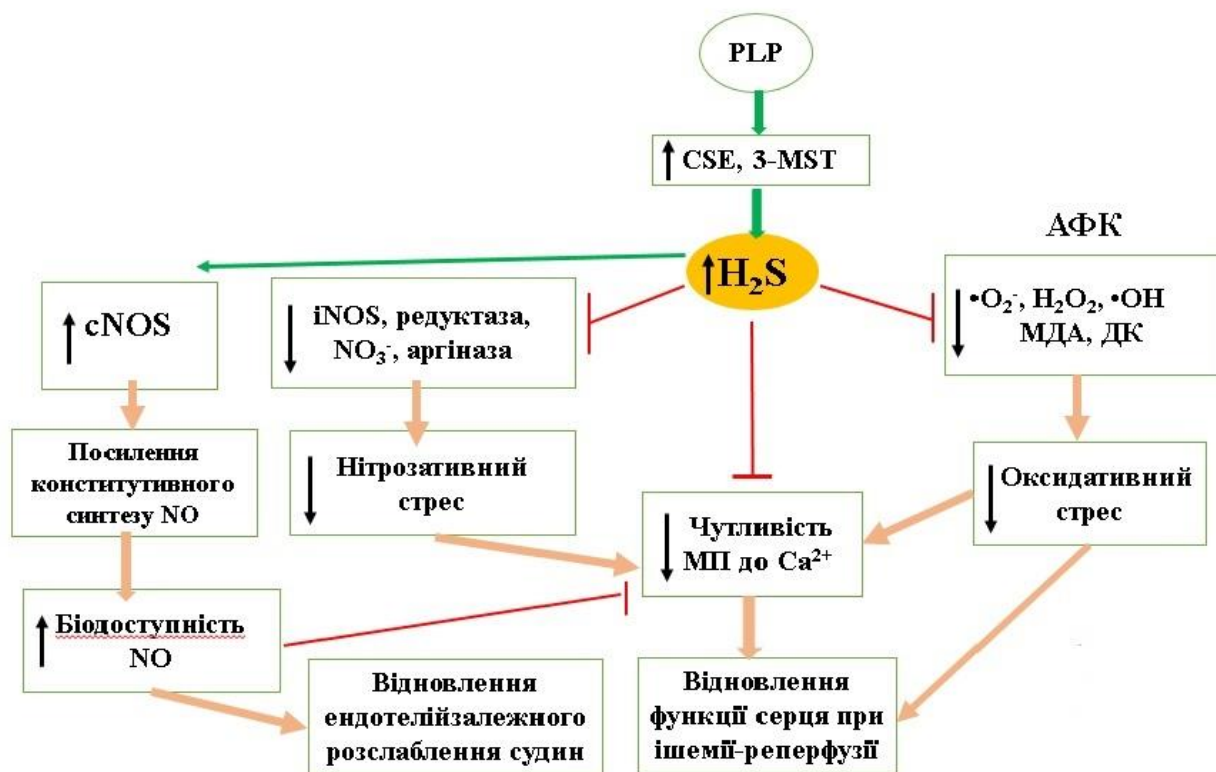
Окисний стрес та дефіцит АТФ під час ішемічно-реперфузійного пошкодження призводять до структурних та функціональних змін міокарда (Ibanez et al., 2015). Під час такого пошкодження відбувається збільшення концентрації Ca^{2+} та АФК у цитозолі та мітохондріях. Відомо, що сірководень разом з оксидом азоту відіграє важливу роль у попередженні розвитку порушень діяльності серця при ішемії-реперфузії. Виявлено, що застосування PLP попереджало реперфузійні порушення усіх досліджуваних показників функціонального стану ізольованого серця. Ми спостерігали достовірну різницю у відновленні тиску і скорочувальної активності міокарда протягом періоду реперфузії. Водночас кінцево-діастолічний тиск під час всього періоду реперфузії при впливі PLP був значно нижчим, ніж в контролі. Позитивна динаміка спостерігалась і відносно першої похідної від тиску (dP/dt). Крім того, PLP збільшував величину коронарного потоку порівняно з контрольними старими щурами. Отже, курсове введення PLP сприяло відновленню функції серця старих тварин після ішемії-реперфузії, здійснюючи кардіопротекторний вплив на його роботу.

Недавні дослідження також вказують на те, що NO взаємодіє з H_2S , який у свою чергу, здатний відновити активність синтезуючих NO ферментів та підвищити біодоступність NO (Szabo, 2017). Тісно взаємодіючи з системою оксиду азоту, сірководень як фізіологічний медіатор бере участь у регуляції судинного тонуусу, ангіогенезу, кардіопротекції, нейромодуляції (Kimura H., 2015) тощо. Отримані нами результати свідчать про те, що за умов стимуляції синтезу ендogenous H_2S відновлювався спряжений стан конститутивної ізоформи NO-синтази, при цьому пригнічувалася активність індукцйбельного синтезу оксиду азоту, важливим наслідком чого було попередження функціональних порушень діяльності серцево-судинної системи.

Раніше було показано, що ацетилхолініндуковане розслаблення ГМ аорти щурів сильно погіршується при старінні через зменшення вмісту NO та

активності cNOS (Tkachenko et al. 2002) Відновлення синтезу ендogenous H_2S PLP сприяє поліпшенню пригніченого у старих тварин ендотелійзалежного розслаблення гладеньких м'язів аорти і цей ефект скасовується за допомогою інгібіторів NO-синтази та 3-меркаптопіруват-сульфуртрансфери

Отримані результати дослідження можуть бути представлені у вигляді схеми, яка характеризує вазо- та кардіопротекторні механізми дії H_2S при стимуляції його ендogenous 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 раза 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.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Adhikari S., and Bhatia M. 2008. H₂S-induced pancreatic acinar cell apoptosis is mediated via JNK and p38 MAP kinase. *J Cell Mol Med.* 12(4): 1374-83. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00318.x.
- Akopova O.V., Kotsiuruba A.V., Tkachenko Yu.P., Sagach V.F. 2005. Nitric oxide suppresses permeability transition pore opening and enhances calcium uptake in mitochondria in vivo. *Fiziol. Zh.* 51(3): 3-11.
- Alavian K.N., Beutner G., Lazrove E., Sacchetti S., Park H.A., et al. 2014. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F₁FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(29): 10580-5. doi: 10.1073/pnas.1401591111.
- Alikulov Z.A., L'vov N.P. and Kretovich V.L. 1980. Nitrate and nitrite reductase activity of milk xanthine oxidase. *Biokhimiia.* 45(9): 1714-8. PMID: 6894704.
- Badiei A., Chambers S. T., Gaddam R. R., Bhatia M. 2016 Cystathionine-γ-lyase gene silencing with siRNA in monocytes/ macrophages attenuates inflammation in cecal ligation and puncture-induced sepsis in the mouse. *J Biosci.* 41(1): 87-95. DOI: 10.1007/s12038-016-9598-9. PMID: 26949091.
- Bachmann S., and Mundel P. 1994. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. *Amer J Kidney Diseases.* 1994; 24:112–29
- Baines C.P., Kaiser R.A., Sheiko T., Craigen W.J., Molkentin J.D. 2007. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol.* 9(5): 550-5. doi: 10.1038/ncb1575.
- Barja G. 2014. The mitochondrial free radical theory of aging. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 127: 1-27.

Barsukova A., Komarov A., Hajnoczky G., Bernardi P., Bourdette D., Forte M. 2011. Activation of the mitochondrial permeability transition pore modulates Ca^{2+} responses to physiological stimuli in adult neurons. *Eur J Neurosci.* 33(5): 831-42. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07576.x.

Baskar R., Li L., and Moore P.K. 2007. Hydrogen sulfide-induces DNA damage and changes in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells. *FASEB J.* 21(1): 247-55. doi: 10.1096/fj.06-6255com.

Beltowski J., and Jamroz-Wisniewska A. 2014. Hydrogen Sulfide and Endotheliumdependent Vasorelaxation. *Molecules.* 19(12): 21183-99. doi: 10.3390/molecules191221183.

Bernardi P., Rasola A., Forte M., Lippe G. 2015. The mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology. *Physiol Rev.* 95: 1111-55.

Bhattacharyya S., Saha S., Giri K., Lanza I. R., Nair K. S., Jennings N. B., Rodriguez-Aguayo C. et al. 2013. Cystathionine beta-synthase (CBS) contributes to advanced ovarian cancer progression and drug resistance. *PLoS One.* 8(11): e79167. DOI: 10.1371/journal.pone.0079167. PMID: 24236104.

Bibli S.I., Yang G., Zhou Z., Wang R., Topouzis S., Papapetropoulos A. 2015. Role of cGMP in hydrogen sulfide signaling. *Nitric Oxide.* 46: 7-13. doi: 10.1016/j.niox.2014.12.004.

Bonora M., Bononi A., De Marchi E., Giorgi C., Lebiedzinska M., et al. 2013. Role of the c subunit of the F_0 ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle.* 12(4): 674-83. doi: 10.4161/cc.23599.

Boyde J.R., and Rahmotullah M. 1980. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal Biochem.* 107(2): 424-31. DOI:10.1016/0003-2697(80)90404-2. PMID: 7435971.

- Bryan J., Calvaresi E., Hughes D. 2002. Short-term folate, vitamin B₁₂ or vitamin B₆ supplementation slightly affects memory performance but not mood in women of various ages. *J Nutr.* 132(6): 1345-56. doi: 10.1093/jn/132.6.1345.
- Cabrini L., Bergami R., Florentini D., Marchetti M., Landi L., Tolomelli B. 1998. Vitamin B₆ deficiency affects antioxidant defences in rat liver and heart. *Biochem Mol Biol Int.* 46(4): 689-97. doi: 10.1080/15216549800204222.
- Calvert J.W., Jha S., Gundewar S., Elrod J.W., Ramachandran A., Pattillo C.B. et al. 2009. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ Res.* 105(4): 365-74. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.199919. PMID: 19608979.
- Canton J., Neculai D., and Grinstein S. 2013. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol.* 13(9): 621-34. doi: 10.1038/nri3515. PMID: 23928573.
- Cao X., Wu Z., Xiong S., Cao L., Sethi G., Bian J.S. 2018. The role of hydrogen sulfide in cyclic nucleotide signaling. *Biochem Pharmacol.* 149: 20-28. doi: 10.1016/j.bcp.2017.11.011.
- Caprnda M., Qaradakh T., Hart J.L., Kobyliak N., Opatrilova R., Kruzliak P., et al. 2017. H₂S Causes Contraction and Relaxation of Major Arteries of the Rabbit. *Biomed Pharmacother.* 89: 56-60. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.057. Epub 2017 Feb 17.
- Chen K. Y., and Morris J. C. 1972. Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by oxygen. *Environmental Science & Technology*, 6(6): 529–537. DOI:10.1021/es60065a008.
- Choi S.W., and Friso S. 2012. Vitamins B₆ and cancer. *Subcell Biochem.* 56: 247-264. PMID: 22116703. DOI: 10.1007/978-94-007-2199-9_13.

Chorna S.V., Dosenko V.Ie., Strutyns'ka N.A., Vavilova H.L., Sahach V.F. 2010. Increased expression of voltage-dependent anion channel and adenine nucleotide translocase and the sensitivity of calcium-induced mitochondrial permeability transition opening pore in the old rat. *Fiziol. Zh.* 56(4): 19-25. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz56.04.019>.

Clayton P.T. 2006. B₆-responsive disorders: A model of vitamin dependency. *J Inherit Metab Dis.* 29(2-3): 317-326. PMID: 16763894. DOI: 10.1007/s10545-005-0243-2.

Coletta C., Papapetropoulos A., Erdelyi K., Olah G., Modis K., Panopoulos. P, et al. 2012. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(23): 9161-6. doi: 10.1073/pnas.1202916109.

Crompton M., Costi A., and Hayat L. 1987. Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J.* 245: 915–918.

Crompton M., Ellinger H., and Costi A. 1988. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J.* 255: 357–360.

Crompton M, Virji S, Ward JM. 1998. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem.* 258(2):729-35. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2580729.x.

Cuevasanta E., Denicola A., Alvarez B., Möller M.N. 2012. Solubility and permeation of hydrogen sulfide in lipid membranes. *PLoS One.* 7(4): e34562. DOI: 10.1371/journal.pone.0034562. PMID: 22509322.

Dai D.-F., Chiao Y., Marcinek D. J., Szeto H. H., and Rabinovitch P. S. 2014. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longev Healthspan*. 3(1): 6. doi: 10.1186/2046-2395-3-6. PMID: 24860647.

Dai L., Qian Y., Zhou J., Zhu C., Jin L., Li S. 2019. Hydrogen Sulfide Inhibited L-Type Calcium Channels (CaV1.2) via Up-Regulation of the Channel Sulfhydration in Vascular Smooth Muscle Cells. *Eur J Pharmacol*. 858: 172455. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172455.

Dikalov S.I., and Dikalova A.E. 2016. Contribution of mitochondrial oxidative stress to hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2016;25(2):73-80

Dominy J. E., Stipanuk M. H. 2004 New roles for cysteine and transsulfuration enzymes: production of H₂S, a neuromodulator and smooth muscle relaxant. *Nutr Rev*. 62(9): 348-53. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2004.tb00060.x. PMID: 15497768.

Donnarumma E., Bhushan S., Bradley J. M., et al. 2016. Nitrite therapy ameliorates myocardial dysfunction via H₂S and nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf₂)-dependent signaling in chronic heart failure. *J Am Heart Assoc*. 5(8): e003551. doi: 10.1161/JAHA.116.003551.

Donnarumma E., Trivedi R. K., and Lefer D. J. 2017. Protective Actions of H₂S in Acute Myocardial Infarction and Heart Failure. *Compr Physiol*. 7(2): 583-602. doi: 10.1002/cphy.c160023. PMID: 28333381.

Doring H.J. 1990. The isolated perfused heart according to Langendorff technique—function application. *Physiol Bohemoslov*. 39(6): 481-504. PMID: 2103635.

Drachuk K.O., Kotsjuruba A.V., and Sagach V.F. 2015. Hydrogen sulfide donor, NAHS, recovers constitutive NO synthesis and endothelium-dependent relaxation of isolated aorta in old rats. *Fiziol Zh*. 61(6): 3-10. PMID: 27025039.

Du J., Yan H., and Tang C. 2003. Endogenous H₂S is involved in the development of spontaneous hypertension. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 35(1):102. PMID: 12920821.

Eberhardt M., Dux M., Namer B., Miljkovic J., Cordasic N., Will C., et al. 2014. H₂S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nat Commun.* 5: 4381. doi: 10.1038/ncomms5381.

Ellis J.M., and Mc Cully K.S. 1995. Prevention of myocardial infarction by vitamin B₆. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 89(2): 208-20. PMID: 8556275.

Elrod J. W., Calvert J. W., Morrison J., Doeller J. E., Kraus D. W., Tao L., et al. 2007. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(39): 15560-5. doi: 10.1073/pnas.0705891104. PMID: 17878306

Elrod J.W, and Molkentin J.D. 2013. Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore. *Circ J.* 77(5): 1111-22. doi: 10.1253/circj.cj-13-0321.

Eltzschig H. K., and Eckle T. 2011. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med.* 17(11) :1391-401. DOI: 10.1038/nm.2507. PMID: 22064429.

Elsej D.J., Fowkes R., and Baxter G.F. 2010. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H₂S) cell biochemistry and function. *Cell Biochem Funct.* 28(2): 95 – 106. DOI: 10.1002/cbf.1618.

Fedde K.N., and Whyte M.P. 1990. Alkaline phosphatase (tissue nonspecific isoenzyme) is a phosphoethanolamine and pyridoxal-5'-phosphate ectophosphatase: Normal and hypophosphatasia fibroblast study. *Am J Hum Genet.* 47(5): 767-775. PMID: 2220817

Fisher C.D., Augustine L.M., Maher J.M., Nelson D.M., Slitt A.L., Klaassen C.D., et al. 2007. Induction of drug-metabolizing enzymes by garlic and allyl sulfide compounds via activation of constitutive androstane receptor and nuclear factor E2-related factor 2. *Drug Metab Dispos.* 35(6): 995-1000. doi: 10.1124/dmd.106.014340. PMID: 17353348.

Fletcher R.H., and Fairfield K.M. 2002. Vitamins for chronic disease prevention in adults: clinical applications. *JAMA.* ;287(23): 3127-9. doi: 10.1001/jama.287.23.3127.

Ford A., Al-Magableh M., Gaspari T.A., and Hart J.L. 2013. Chronic NaHS Treatment Is Vasoprotective in High-Fat-Fed ApoE(-/-) Mice. *Int J Vasc Med.* 2013: 915983. DOI: 10.1155/2013/915983. PMID: 23864951.

Fransen M., Nordgren M., Wang B., Apanasets O. 2012. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochim Biophys Acta.* 1822(9): 1363-73. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.12.001. PMID: 22178243.

Fräsdorf B., Radon C., Leimkühler S. 2014 Characterization and interaction studies of two isoforms of the dual localized 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase TUM1 from humans. *J Biol Chem.* 289(50): 34543-56. DOI: 10.1074/jbc.M114.605733. PMID: 25336638.

Friso S., Jacques P.F., Wilson P.W., Rosenberg I.H., Selhub J. 2001. Low circulating vitamin B₆ is associated with elevation of the inflammation marker C-reactive protein independently of plasma homocysteine levels. *Circulation.* 103(23): 2788-91. doi: 10.1161/01.cir.103.23.2788.

Friso S., Lotto V., Corrocher R., and Choi S.W. 2012. Vitamin B₆ and cardiovascular disease. *Subcell Biochem* 56: 265-290. PMID: 22116704. DOI: 10.1007/978-94-007-2199-9_14.

Fu M., Zhang W., Wu L., Yang G., Li H., Wang R. 2012 Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(8): 2943-8. DOI: 10.1073/pnas.1115634109. PMID: 22323590.

Furne J., Springfield J., Koenig T., DeMaster E., and Levitt, M. D. 2001. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochem Pharmacol*. 62(2) :255-9. DOI: 10.1016/s0006-2952(01)00657-8. PMID: 11389886.

Galluzzi L., Vacchelli E., Michels J., Garcia P., Kepp O., Senovilla L., et al. 2013. Effects of vitamin B6 metabolism on oncogenesis, tumor progression and therapeutic responses. *Oncogene*. 32(42): 4995-5004, PMID: 23334322. DOI: 10.1038/onc.2012.623.

Ganesan S., Faris A.N., Comstock A.T., Sonstein J., Curtis J.L., Sajjan U.S. 2012. Elastase/LPS-exposed mice exhibit impaired innate immune responses to bacterial challenge: role of scavenger receptor A. *Am J Pathol*. 180(1): 61-72. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.09.029. PMID: 22079429.

Gavrilov V.B., Gavrilova A.R., and Khmara N.F. 1988. Measurement of diene conjugates in blood plasma using the UV absorption of heptane and isopropanol extracts. *Lab Delo*. (2): 60-4. PMID: 2452294.

Geng B., Chang L., Pan C., Qi Y., Zhao J., Pang Y., et al. 2004. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun*. 318(3): 756-63. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.04.094. PMID: 15144903.

Geng B., Cui Y., Zhao J., et al. 2007. Hydrogen sulfide downregulates the aortic L-arginine/nitric oxide pathway in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 293(4): R1608-18. doi: 10.1152/ajpregu.00207.2006.

Geng B., Yang J., Qi Y., Zhao J., Pang Y., Du J., and Tang, C. 2004. H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochem Biophys Res Commun.* 313(2): 362-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.130. PMID: 14684169.

Gero D., Torregrossa R., Perry A., Waters A., Le-Trionnaire S., Whatmore J. L., et al. 2016. The novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide (H₂S) donors AP123 and AP39 protect against hyperglycemic injury in microvascular endothelial cells in vitro. *Pharmacol Res.* 113(Pt A): 186-198. doi: 10.1016/j.phrs.2016.08.019.

Gheibi S., Jeddi S., Kashfi K., and Ghasemi A. 2018. Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H₂S: Implications in hypertension. *Biochem Pharmacol.* 149: 42–59. doi: 10.1016/j.bcp.2018.01.017.

Giorgio V, Bisetto E, Soriano ME, et al. 2009. Cyclophilin D modulates mitochondrial F₀F₁-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J Biol Chem.* 284: 33982-8.

Gimbrone M.A., and Garcia-Cardena G. 2016 Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res.* 118(4): 620–636. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.

Giuffre A., and Vicente J. B. 2018. Hydrogen Sulfide Biochemistry and Interplay with Other Gaseous Mediators in Mammalian Physiology. *Oxid Med Cell Longev.* 2018: 6290931. DOI: 10.1155/2018/6290931. PMID: 30050658.

Goshovska Y.V., Lisovyi O.O., Shimanskaya T.V., Sagach V. F. 2009. UCP₂ and UCP₃ genes expression, heart function and oxygen cost of myocardial work changes during aging and ischemia-reperfusion. *Fiziol zh.* 55(3):26-36.

Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., and Tannenbaum S.R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 126(1): 131-8. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90118-x. PMID: 7181105.

Griffiths E.J., and Halestrap A.P. 1995. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J.* 307 (Pt 1): 93–98.

Guo C., Liang F., Shah Masood W., Yan X. 2014. Hydrogen sulfide protected gastric epithelial cell from ischemia/reperfusion injury by Keap1 s-sulfhydration, MAPK dependent anti-apoptosis and NF- κ B dependent anti-inflammation pathway. *Eur J Pharmacol.* 725: 70-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.01.009.

Guzma M. A., Navarro M. A., Carnicer R., Sarriá A. J., Acín S., Arnal C. Et al. 2006. Cystathionine beta-synthase is essential for female reproductive function. *Hum Mol Genet.* 15(21): 3168-76. DOI: 10.1093/hmg/ddl393. PMID: 16984962.

Halestrap A.P. 2009. What is the mitochondrial permeability transition pore *J Mol Cell Cardiol.* 46(6): 821-31. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.02.021.

Halestrap A. P. 2010. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans.* 38(4): 841-60. doi: 10.1042/BST0380841.

Halestrap A.P, Clarke S.J, Javadov S.A. 2004. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 61(3): 372-85. doi: 10.1016/S0008-6363(03)00533-9.

Halestrap A.P., and Richardson, A.P. 2015. The mitochondrial permeability transition: A current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 78:129-41. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.08.018. PMID: 25179911.

Halliwell B., Grootveld M., and Gutteridge J.M. 1988. Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biomedical systems: deoxyribose degradation

and aromatic hydroxylation. *Methods Biochem Anal.* 33: 59-90. DOI: 10.1002/9780470110546.ch2. PMID: 2833681.

Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11(3): 298-300. DOI: 10.1093/geronj/11.3.298. PMID: 13332224.

Hausenloy D.J., Maddock H.L., Baxter G.F., Yellon D.M. 2002. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res.* 55(3): 534-43. doi: 10.1016/s0008-6363(02)00455-8.

Hausenloy D.J., Duchon M.R., Yellon D.M. 2003. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 60(3): 617-25. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.09.025.

Hausenloy D.J., Erik B.H., Condorelli G., Ferdinandy P., Garcia-Dorado D., Heusch G., et al. 2013. Translating cardioprotection for patient benefit: position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res.* 98(1): 7-27. doi: 10.1093/cvr/cvt004.

Haworth R.A., and Hunter D.R. 1979. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca^{2+} trigger site. *Arch. Biochem. Biophys.* 195: 460–467. DOI: 10.1016/0003-9861(79)90372-2.

Haworth R.A., Hunter D.R. 2000. Control of the mitochondrial permeability transition pore by high-affinity ADP binding at the ADP/ATP translocase in permeabilized mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 32(1): 91-6. doi: 10.1023/a:1005568630151.

Hedegaard E.R., Gouliaev A., Winther A.K., Arcanjo D.D., Aalling M., Renaltan N.S., et al. 2016. Involvement of Potassium Channels and Calcium-Independent

Mechanisms in Hydrogen Sulfide-Induced Relaxation of Rat Mesenteric Small Arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 356(1): 53-63. doi: 10.1124/jpet.115.227017.

Hoshovs'ka Iu.V., Lisovyi O.O., Shymans'ka T.V., Sahach V.F. 2009. UCP2 and UCP3 gene expression, heart function and oxygen cost of myocardial work changes during aging and ischemia-reperfusion. *Fiziol Zh.* 55(3): 26-36. PMID: 19526854.

Hosoki R., Matsuki N., and Kimura H. 1997. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 237(3) :527-531. DOI: 10.1006/bbrc.1997.6878

Hu L.F., Pan T.T., Neo K.L., Yong Q.C., Bian J.S. 2008. Cyclooxygenase-2 mediates the delayed cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning in isolated rat cardiomyocytes. *Pflugers Arch.* 455(6): 971-8. doi: 10.1007/s00424-007-0346-8.

Hua W., Chen Q., Gong F., Xie C., Zhou S., and Gao L. 2013. Cardioprotection of H₂S by downregulating iNOS and upregulating HO-1 expression in mice with CVB3-induced myocarditis. *Life Sci.* 93(24): 949-54. doi: 10.1016/j.lfs.2013.10.007.

Huang P., Shen Z., Liu J., Huang Y., Chen S., Yu W., et al. 2016. Hydrogen Sulfide Inhibits High-Salt Diet-Induced Renal Oxidative Stress and Kidney Injury in Dahl Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2016: 2807490. DOI: 10.1155/2016/2807490. PMID: 26823949.

Huwiler M., and Kohler H. 1984. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase / H₂O₂ / iodide system. *Eur J Biochem.* 141(1): 69-74. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1984.tb08158.x. PMID: 6723665.

Hurst S, Hoek J, Sheu S-S. 2017. Mitochondrial Ca^{2+} and Regulation of the Permeability Transition Pore. *Bioenerg Biomembr.* 49(1) :27-47.

Ibanez B., Heusch G., Ovize M., Van de Werf F. 2015. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol.* 65(14):1454-71. doi: 10.1016/j.jacc.2015.02.032.

Ishigami M, Hiraki K, Umemura K, Ogasawara Y, Ishii K, Kimura H. 2009. A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. *Antioxid Redox Signal.* 11(2): 205-14. DOI: 10.1089/ars.2008.2132. PMID: 18754702.

Jackson-Weaver O., Osmond J.M., Naik J.S., Gonzalez Bosc L.V., Walker B.R., Kanagy N.L. 2015. Intermittent Hypoxia in Rats Reduces Activation of Ca^{2+} Sparks in Mesenteric Arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 309(11): H1915–H1922. doi: 10.1152/ajpheart.00179.2015.

Jain S.K., and Lim G. 2001. Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and $(\text{Na}^+ \text{K}^+)\text{-ATPase}$ activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Radic Biol Med.* 30(3): 232-237. PMID: 11165869

Jiang H.L., Wu H.C., Li Z.L., Geng B., Tang C.S. 2005. Changes of the new gaseous transmitter H_2S in patients with coronary heart disease. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 25(8): 951-4. PMID: 16109547.

Jiang J., Chan A., Ali S., Saha F., Haushalter K.J., et al., 2016. Hydrogen Sulfide—Mechanisms of Toxicity and Development of an Antidote. *Sci Rep.* 6: 20831. doi: 10.1038/srep20831.

Jin S., Pu S.X., Hou C.L., Ma F.F., Li N., Li X.H., et al. 2015. Cardiac H_2S generation is reduced in ageing diabetic mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2015: 758358. DOI: 10.1155/2015/758358. PMID: 26078817.

Jonckheere A.I., Smeitink J.A., Rodenburg R.J. 2012. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis.* 35(2): 211-25. doi: 10.1007/s10545-011-9382-9.

Kabil O., Banerjee R. 2014 Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling. *Antioxid Redox Signal.* 20(5): 770-82. DOI: 10.1089/ars.2013.5339.

Karwi Q. G., Bornbaum J., Boengler K., Torregrossa R., Whitema, M., Wood M. E., et al. 2017. AP39, a mitochondria-targeting hydrogen sulfide (H₂S) donor, protects against myocardial reperfusion injury independently of salvage kinase signalling. *Br J Pharmacol.* 174(4): 287–301. doi: 10.1111/bph.13688.

Karwi Q. G., Whiteman M., Wood M. E., Torregrossa R., and Baxter G. F. 2016. Pharmacological postconditioning against myocardial infarction with a slow-releasing hydrogen sulfide donor, GYY4137. *Pharmacol Res.* 111: 442-451. doi: 10.1016/j.phrs.2016.06.028.

Kery V., Bukovska G. and Kraus J.P. 1994 Transsulfuration depends on heme in addition to pyridoxal 5'-phosphate. Cystathionine β-synthase is a heme protein *J Biol Chem.* 269(41): 25283-8. PMID: 7929220.

Kery V., Poneleit L., Meyer J.D., Manning M.C. and Kraus, J.P. 1999. Binding of pyridoxal 5'-phosphate to the heme protein human cystathionine β-synthase. *Biochemistry.* 38(9): 2716-24. DOI: 10.1021/bi981808n. PMID: 10052942.

Kida M., Sugiyama T., Yoshimoto T., and Y. Ogawa. 2013. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production with calciumdependent activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *Eur J Pharm Sci.* 48(1-2): 211-5. doi: 10.1016/j.ejps.2012.11.001.

Kimura H. 2011. Hydrogen sulfide: its production, release and functions. *Amino Acids.* 41(1): 113-21. doi: 10.1007/s00726-010-0510-x. PMID: 20191298.

Kimura H. 2014. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric Oxide*. 41: 4-10. DOI: 10.1016/j.niox.2014.01.002. PMID: 24491257.

Kimura H. 2015. Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 91(4): 131–159. doi: 10.2183/pjab.91.131. PMID: 25864468.

Kimura H. 2015. Signaling Molecules: Hydrogen Sulfide and Polysulfide. *Antioxid Redox Signal*. 22(5): 362–376. doi: 10.1089/ars.2014.5869

Kimura H. 2016. Hydrogen polysulfide (H₂S) signaling along with hydrogen sulfide (H₂S) and nitric oxide (NO). *J Neural Transm (Vienna)*. 123(11): 1235-1245. DOI: 10.1007/s00702-016-1600-z. PMID: 27484215.

Kimura Y., Dargusch R., Schubert D., Kimura H. 2006. Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 8(3-4): 661-70. doi: 10.1089/ars.2006.8.661. PMID: 16677109.

King A.L., Polhemus D.J., Bhushan S., Otsuka H., Kondo K., Nicholson C.K., et al. 2014. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(8): 3182-7. doi: 10.1073/pnas.1321871111.

Kleinbongard P. 2003. 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.

Klingenberg M. 2008. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim. Biophys. Acta*. 1778(10): 1978-2021. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.04.011.

Ko Y.H., Delannoy M., Hullihen J., Chiu W., Pedersen P.L. 2003. Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening

assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem.* 278(14): 12305-9. doi: 10.1074/jbc.C200703200.

Kobayashi H., Sakashita N., Okuma T., Terasaki Y., Tsujita K., Suzuki H., et al. 2007. Class A scavenger receptor (CD204) attenuates hyperoxia-induced lung injury by reducing oxidative stress. *J Pathol.* 212(1): 38-46. doi: 10.1002/path.2150.

Konukoglu D., and Uzun H. 2017 Endothelial dysfunction and hypertension. *Adv Exp Med Biol.* 956: 511-540. doi: 10.1007/5584_2016_90.

Kotsuruba AV, Dorofeyeva NA, Sagach VF. 2015. NOS Uncoupling is accompanied with Induction of the Oxidative Stress and the Cardiohemodynamics Disturbances in Hypertension. *Fiziol. Zh.* 2015; 61(3):3–10 [Ukraininan].

Kosir M. and Podbregar M. 2017. Advances in the Diagnosis of Sepsis: Hydrogen Sulfide as a Prognostic Marker of Septic Shock Severity. *EJIFCC.* 28(2): 134–141. PMID: 28757821.

Kubo S., Doe I., Kurokawa Y., Nishikawa H., and Kawabata A. 2007. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension. *Toxicology.* 232(1-2): 138-46. doi: 10.1016/j.tox.2006.12.023.

Kuo M. M., Kim D. H., Jandu S., Bergman Y., Tan S., Wang H., et al. 2016. MPST but not CSE is the primary regulator of hydrogen sulfide production and function in the coronary artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 310(1): H71-9. DOI: 10.1152/ajpheart.00574.2014. PMID: 26519030.

Kuthan H., Ullrich V., Estabrook R.W. 1982. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. *Biochem J.* 203(3): 551-8. DOI: 10.1042/bj2030551. PMID: 6288006.

Kwong J, and Molkentin J. 2015. Physiological and Pathological Roles of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in the Heart. *Cell Metabolism*. 2015; 21(2):206–14.

Lakatta EG. 2015. So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? *J Mol Cell Cardiol*. 83:1-13. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.04.005.

Levinn C.M., Cerda M.M., and Pluth M.D. 2019. Activatable Small-Molecule Hydrogen Sulfide Donors. *Antioxid Redox Signal*. 32(2): 96-109. DOI: 10.1089/ars.2019.7841. PMID: 31554416.

Li H, and Forstermann U. 2013. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opinion in Pharm*. 2013; 13:1–7.

Libiad M., Vitvitsky V., Bostelaar T., Bak D.W., Lee H.J., Sakamoto N., et al. 2019. Hydrogen sulfide perturbs mitochondrial bioenergetics and triggers metabolic reprogramming in colon cells. *J Biol Chem*. 294(32): 12077-12090. doi: 10.1074/jbc.RA119.009442.

Lima C.P., Davis S.R., Mackey .AD., Scheer J.B., Williamson J., Gregory J.F. 2006. Vitamin B₆ deficiency suppresses the hepatic transsulfuration pathway but increases glutathione concentration in rats fed AIN-76A or AIN93G diets. *J Nutr*. 136(8): 2141-7. doi: 10.1093/jn/136.8.2141.

Ling Q., Yu X., Wang T., Wang S.G. Ye Z.Q., Liu J.H. 2017. Roles of the Exogenous H₂S-Mediated SR-A Signaling Pathway in Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Regulating Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Autophagy in a Rat Model. PMID: 28472786. *Cell Physiol Biochem*. 41(6): 2461-2474. doi: 10.1159/000475915.

Liu J., Wu J., Sun A., Sun Y., Yu X., Liu N., et al. 2016. Hydrogen sulfide decreases high glucose/palmitate-induced autophagy in endothelial cells by the

Nrf2-ROS-AMPK signaling pathway. *Cell Biosci.* 6: 33. doi: 10.1186/s13578-016-0099-1. PMID: 27222705.

Liu N., Wu J., Zhang L., Gao Z., Sun Y., Yu M., et al. 2017 Hydrogen Sulphide modulating mitochondrial morphology to promote mitophagy in endothelial cells under high-glucose and high-palmitate. *J Cell Mol Med.* 21(12): 3190–3203. doi: 10.1111/jcmm.13223.

Liu Y.-H., Lu M., Hu L.-F., Wong P. T.-H., Webb G. D., and Bian, J.-S. 2012. Hydrogen Sulfide in the Mammalian Cardiovascular System. *Antioxid Redox Signal.* 17(1) :141-85. DOI: 10.1089/ars.2011.4005. PMID: 22304473.

Lo Faro M.L., Fox B., Whatmore J.L., Winyard P.G., Whiteman M. 2014. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide.* 41: 38-47. doi: 10.1016/j.niox.2014.05.014.

Lowry O., Rosebrough N., Farr A., and Randall R. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1): 265-75. PMID: 14907713.

Maiese K. 2015. New insights for oxidative stress and diabetes mellitus. *Oxid Med Cell Longev.* 2015: 875961. doi: 10.1155/2015/875961. PMID: 23746838.

Martial J., Zaldivar J., Bull P., Venegas A., and Valenzuela P. 1975. Inactivation of rat liver RNA polymerases I and II and yeast rna polymerase I by pyrodixal 5' phosphate. Evidence for the participation of lysyl residues at the active site. *Biochemistry.* 14(22): 4907-4911, PMID: 1101959.

Matsubara K., Komatsu S., Oka T., and Kato N. 2003. Vitamin B6- mediated suppression of colon tumorigenesis, cell proliferation, and angiogenesis (review). *J Nutr Biochem.* 14(5): 246-250. PMID: 12832027.

Matsubara K., Mori M., Matsuura Y., and Kato N. 2001. Pyridoxal 5'-phosphate and pyridoxal inhibit angiogenesis in serum-free rat aortic ring assay. *Int J Mol Med*. 8(5): 505-508, 2001. PMID: 11605018.

Mihara M. and Uchiyama M. 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 86(1): 271-8. DOI: 10.1016/0003-2697(78)90342-1. PMID: 655387.

Mikami Y, Shibuya N, Kimura Y, Nagahara N, Yamada M, and Kimura H. 2011. Hydrogen sulfide protects the retina from light-induced degeneration by the modulation of Ca^{2+} influx. *J Biol Chem*. 286(45): 39379-86. doi: 10.1074/jbc.M111.298208. PMID: 21937432.

Miller J.W., Green R., Mungas D.M., Reed B.R., Jagust W.J. 2002. Homocysteine, vitamin B6, and vascular disease in AD patients. *Neurology*. 58(10): 1471-5. doi: 10.1212/wnl.58.10.1471.

Miles E. W., and Kraus J. P. 2004. Cystathionine β -Synthase: Structure, Function, Regulation, and Location of Homocystinuria-causing Mutations. *J Biol Chem*. 279(29): 29871-4. DOI: 10.1074/jbc.R400005200. PMID: 15087459.

Miyamoto R., Otsuguro K., Yamaguchi S., Ito S. 2015 Neuronal regulation of expression of hydrogen sulfide-producing enzyme cystathionine β -synthase in rat spinal cord astrocytes. *Neurosci Res*. 97: 52-9. DOI: 10.1016/j.neures.2015.03.003. PMID: 25797494.

Modak M.J: 1976. Observations on the pyridoxal 5'-phosphate inhibition of DNA polymerases. *Biochemistry* 15(16): 3620-3626. PMID: 60130.

Módis K., Coletta C., Erdélyi K., Papapetropoulos A., Szabo C. 2013. Intramitochondrial hydrogen sulfide production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase maintains mitochondrial electron flow and supports cellular bioenergetics. *FASEB J*. 27(2): 601-11. doi: 10.1096/fj.12-216507.

Módis K., Ju Y., Ahmad A., Untereiner A.A., Altaany Z., Wu L., Szabo C., Wang R. 2016. S-Sulfhydration of ATP synthase by hydrogen sulfide stimulates mitochondrial bioenergetics. *Pharmacol Res.* 113(Pt A): 116-124. doi: 10.1016/j.phrs.2016.08.023.

Murphy B., Bhattacharya R., and Mukherjee P. Hydrogen sulfide signaling in mitochondria and disease. *FASEB J.* 33(12): 13098–13125. doi: 10.1096/fj.201901304R. PMID: 31648556.

Mustafa A.K., Sikka G., Gazi S.K., Steppan J., Jung S.M., Bhunia A.K., et al. 2011 Hydrogen Sulfide as Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor Sulfhydrates Potassium Channels. *Circ Res.* 109(11): 1259-68. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.240242. Epub 2011 Oct 6.

Nakagawa T., Shimizu S., Watanabe T., Yamaguchi O., Otsu K., Yamagata H. 2005. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature.* 434(7033): 652-8. doi: 10.1038/nature03317.

Naik J.S., Osmond J.M., Walker B.R., Kanagy N.L. 2016. Hydrogen Sulfide-Induced Vasodilation Mediated by Endothelial TRPV4 Channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 311(6): H1437–44. doi.org/10.1152/ajpheart.00465.2016.

Nicholls P., Marshall D.C., Cooper C.E., Wilson M.T. 2013. Sulfide inhibition of and metabolism by cytochrome c oxidase. *Biochem Soc Trans.* 41(5): 1312-6. doi: 10.1042/BST20130070.

Orlov S.N., Gusakova S.V., Smaglii L.V., Koltsova S.V., Sidorenko S.V. 2017. Vasoconstriction triggered by hydrogen sulfide: Evidence for Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransport and L-type Ca²⁺ channel-mediated pathway. *Biochem Biophys Rep.* 12:220-227. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.09.010.

Ozeki Y., Tsutsui H., Kawada N., Suzuki H., Kataoka M., Kodama T., et al. 2006. Macrophage scavenger receptor down-regulates mycobacterial cord factor-induced proinflammatory cytokine production by alveolar and hepatic macrophages. *Microb Pathog.* 40(4): 171-6. doi: 10.1016/j.micpath.2005.12.006. PMID: 16517114.

Palmieri F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch.* 447(5):689-709. doi: 10.1007/s00424-003-1099-7.

Pan T. T., Feng Z. N., Lee S. W., Moore P. K., and Bian J. S. 2006. Endogenous hydrogen sulfide contributes to the cardioprotection by metabolic inhibition preconditioning in the rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 40(1): 119-30. doi: 10.1016/j.yjmcc.2005.10.003.

Paravicini T.M., and Touyz R.M. 2006. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res.* 2006; 71(2):247-58

Percival M.D., Ouellet M., Campagnolo C., Claveau D., Li C. 1999. Inhibition of Cathepsin K by Nitric Oxide Donors: Evidence for the Formation of Mixed Disulfides and a Sulfenic Acid. *Biochemistry.* 38(41): 13574–13583. DOI:10.1021/bi991028u.

Petronilli V., Penzo D., Scorrano L., Bernardi P., Di Lisa F. 2001. The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem.* 276(15): 12030-4. doi: 10.1074/jbc.M010604200.

Percudani R., and Peracchi A. 2003. A genomic overview of pyridoxalphosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep* 4(9): 850-854, 2003. PMID: 12949584. DOI: 10.1038/sj.embor.embor914

Percudani R., and Peracchi A. 2009. The B₆ database: a tool for the description and classification of vitamin B₆-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. *BMC Bioinformatics*. 10: 273. DOI:10.1186/1471-2105-10-273. PMID: 19723314.

Roubenoff R., Roubenoff R.A., Selhub J., Nadeau M.R., Cannon J.G., Freeman L.M., et al. 1995. Abnormal vitamin B₆ status in rheumatoid cachexia. Association with spontaneous tumor necrosis factor alpha production and markers of inflammation. *Arthritis Rheum*. 38(1): 105-9. doi: 10.1002/art.1780380116.

Ping N.N., Li S., Mi Y.N., Cao L., Cao Y.X. 2015. Hydrogen sulphide induces vasoconstriction of rat coronary artery via activation of Ca⁽²⁺⁾ influx. *Acta Physiol (Oxf)*. 214(1): 88-96. doi: 10.1111/apha.12475.

Rimm E.B., Willett W.C., Hu F.B., Sampson L., Colditz G.A., Manson J.E., et al. 1998. Folate and vitamin B₆ from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA*. 279(5): 359-64. PMID: 9459468.

Roe N.D., and Ren J. 2012. Nitric oxide synthase uncoupling: A therapeutic target in cardiovascular diseases. *Vasc Pharm*. 2012; 57:168–72.

Rose P., Moore P.K., Zhu Y.Z. 2017. H₂S biosynthesis and catabolism: new insights from molecular studies. *Cell Mol Life Sci*. 2017; 74 (8):1391–1412.

Roth-Maier D.A., Kettler S.I., and Kirchgessner M. 2002. Availability of vitamin B₆ from different food sources. *Int J Food Sci Nutr*. 53(2): 171-179. PMID: 11939111.

Sagach V.F., Vavilova G.L., Strutynska N.A., Rudyk O.V. 2004. The aging increase in the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore opening to inductors in rat heart. *Fiziol Zh*. 50(2): 49-63. PMID: 15174206.

Saha S., Chakraborty P. K., Xiong X., et al. 2016. Cystathionine β -synthase regulates endothelial function via protein S-sulfhydration. *FASEB J.* 30(1): 441-56. DOI: 10.1096/fj.15-278648. PMID: 26405298.

Sahach V.F., Shymans'ka T.V., Hoshovs'ka Iu.V. 2013. Effects of stimulation and blockade of the synthesis of endogenous hydrogen sulfide at myocardial ischemia-reperfusion. *Fiziol. Zh.* 59(4): 8-15. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz59.04.008>.

Sbodio J. I., Snyder S. H., Paul B. D. 2019 Regulators of the transsulfuration pathway. *Br J Pharmacol.* 176(4): 583-593. DOI: 10.1111/bph.14446. PMID: 30007014.

Selhub J., Jacques P.F., Bostom A.G., 2000. Wilson P.W., Rosenberg I.H. 2000. Relationship between plasma homocysteine and vitamin status in the Framingham study population. *Public Health Rev.* 28(1-4): 117-45. PMID: 11411265.

Semenykhina O.M., Strutyns'ka N.A., Bud'ko A.Iu., Vavilova H.L., Sahach V.F. 2013. Effect of hydrogen sulfide donor NaHS on the functional state of the respiratory chain of the rat heart mitochondria. *Fiziol Zh.* 59(2):9-17. PMID: 23821932.

Shen X., Carlström M., Borniquel S., Jädert C., Kevil C. G., Lundberg J. O. 2013 Microbial regulation of host hydrogen sulfide bioavailability and metabolism. *Free Radic. Free Radic Biol Med.* 60 :195-200. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.024. PMID: 23466556.

Shibuya N., Koike S., Tanaka M., Ishigami-Yuasa M., Kimura Y., Ogasawara Y. et al. 2013. A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nat Commun.* 4: 1366. DOI: 10.1038/ncomms2371. PMID: 23340406.

Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, and Kimura H. 2009. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces

hydrogen sulfide. *J Biochem.* 146(5): 623-6. DOI: 10.1093/jb/mvp111. PMID: 19605461.

Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, Ishii K, and Kimura H. 2009. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid Redox Signal.* 11(4): 703-14. DOI: 10.1089/ars.2008.2253. PMID: 18855522.

Shymans'ka T.V., Hoshovs'ka Iu.V., Semenikhina O.M., Sahach V.F. 2012. Effect of hydrogen sulfide on isolated rat heart reaction under volume load and ischemia-reperfusion. *Fiziol. Zh.* 58(6): 57-66. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz58.06.057>.

Sojitra B., Bulani Y., Putcha U. K., et al. 2012. Nitric oxide synthase inhibition abrogates hydrogen sulfide-induced cardioprotection in mice. *Mol Cell Biochem.* 360(1-2): 61-9. doi: 10.1007/s11010-011-1044-6.

Strutynska N.A, Semenykhina O.M, Chorna S.V, Vavilova G.L, Sagach V.F. 2011. Hydrogen sulfide Inhibits Ca^{2+} -induced Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening in Adult and Old Rat Heart. *Fiziol Zh.* 2011; 57(6):3–13. [Ukrainian].

Strutyns'kyi R.B., Kotsiuruba A.V., Rovenets' R.A., Strutyns'ka N.A., Iagupols'kyi Iu.L., Sagach V.F., Moïbenko O.O. 2013. Biochemical mechanisms of the cardioprotective effect of the K(ATP) channels opener flocalin (medicinal form) in ischemia-reperfusion of myocardium. *Fiziol Zh.* 59(4): 16-27. PMID: 24175472.

Sun Q., Collins R., Huang S., Holmberg-Schiavone L., Anand G. S., Tan C. H. et al. 2009. Structural basis for the inhibition mechanism of human cystathionine gamma-lyase, an enzyme responsible for the production of H_2S . *J Biol Chem.* 284(5): 3076-85. DOI: 10.1074/jbc.M805459200. PMID: 19019829.

Shymans'ka T.V., Hoshovs'ka Iu.V., Semenikhina O.M., Sahach V.F. 2012. Effect of hydrogen sulfide on isolated rat heart reaction under volume load and ischemia-reperfusion]. *Fiziol Zh.* 58(6): 57-66. PMID: 23530414.

Szabo C. and Papapetropoulos A. 2017. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H₂S Levels: H₂S Donors and H₂S Biosynthesis Inhibitors. *Pharmacol Rev.* 69(4): 497–564. DOI: 10.1124/pr.117.014050. PMID: 28978633.

Szabo C. 2017. Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications. *Am J Physiol Cell Physiol.* 312(1): C3-C15. DOI: 10.1152/ajpcell.00282.2016. PMID: 27784679.

Szabo C., Coletta C., Chao C., Modis K., Szczesny B., Papapetropoulos A. et al. 2013. Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine- β -synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (30): 2474-9. DOI: 10.1073/pnas.1306241110. PMID: 23836652.

Tehlivets O. 2011. Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis: is its conversion to s-adenosyl-L-homocysteine the key to deregulated lipid metabolism. *J Lipids.* 2011: 702853. doi: 10.1155/2011/702853.

Theissen U., and Martin W. 2008. Sulfide: quinone oxidoreductase (SQR) from the lugworm *Arenicola marina* shows cyanide- and thioredoxin-dependent activity. *FEBS J.* 275(6): 1131-9. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06273.x.

Tkachenko M.M., Sahach V.F., Kotsiuruba A.V., Baziliuk O.V., Bukhanevych O.M., Mehed' O.F., et al. 2002. Endothelium-dependent contractile reactions of vascular smooth muscles and content of oxygen free radicals in aging rats. *Fiziol Zh.* 48(4): 3-13. PMID: 12226922.

Tsukahara H., Miura M., Tsuchida S., Hata I., Hata K., Yamamoto K. et al. 1996. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. *Am J Physiol.* 270(5 Pt 1): E840-5. PMID: 8967473. DOI: 10.1152/ajpendo.1996.270.5.E840.

Vanuzzo D., Pilotto L., Lombardi R., Lazzerini G., Carluccio M., Diviacco S., et al. 2007. Both vitamin B6 and total homocysteine plasma levels predict long-term atherothrombotic events in healthy subjects. *Eur Heart J.* 28(4): 484-91. DOI: 10.1093/eurheartj/ehl470. PMID: 17267459.

Venardos K.M., Perkins A., Headrick J., and Kaye D.M. 2007. Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review. *Curr Med Chem.* 14(14): 1539-49. doi: 10.2174/092986707780831078.

Vermeersch J.J., Christmann-Franck S., Karabashyan L.V., Femandjian S., Mirambeau G., Der Garabedian P.A. 2004. Pyridoxal 5'-phosphate inactivates DNA topoisomerase IB by modifying the lysine general acid. *Nucleic Acids Res.* 32(18): 5649-5657. PMID: 15494452. DOI: 10.1093/nar/gkh897

Wang H., Dwyer-Lindgren L., Lofgren K. T., Rajaratnam J. K., Marcus J. R., Levin-Rector A. et al. 2012. Age-specific and sex-specific mortality in 187 countries, 1970–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 380(9859): 2071-94. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61719-X. PMID: 23245603.

Wang J., Wang W., Li S., Han Y., Zhang P., Meng G. et al. 2018 Hydrogen sulfide as a potential target in preventing spermatogenic failure and testicular dysfunction. *Antioxid Redox Signal.* 28(16): 1447-1462. DOI: 10.1089/ars.2016.6968. PMID: 28537489.

Wang M., Hu Y., Fan Y., Guo Y., Chen F., Chen S., et al. 2016. Involvement of Hydrogen Sulfide in Endothelium-Derived Relaxing Factor-Mediated Responses in Rat Cerebral Arteries. *J Vasc Res.* 53(3-4): 172-185. doi: 10.1159/000448712.

Wang R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 2002; 16:1793–8.

Wang R. 2012. Physiological implication of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev.* 92(2): 791-896. DOI: 10.1152/physrev.00017.2011. PMID: 22535897.

Wang Y., Zhao X., Jin H., Wei H., Li W., Bu D., et al. 2009. Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29(2): 173-9. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179333.

Weydert C. J., and Cullen J. J. 2009. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc.* 5(1): 51-66. doi: 10.1038/nprot.2009.197. PMID: 20057381.

Whiteman M., Armstrong J.S., Chu S.H., Jia-Ling S., Wong B.S., Cheung N.S., et al. 2004. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? *J Neurochem.* 90(3): 765-8. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02617.x. PMID: 15255956.

Wittig I, and Schagger H. 2008. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* 1777(7-8): 592-8. doi: 10.1016/j.bbabbio.2008.04.027.

Wu D., Hu Q., Ma F., and Zhu Y. Z. 2016. Vasorelaxant effect of a new hydrogen sulfide-nitric oxide conjugated donor in isolated rat aortic rings through cGMP pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2016: 7075682. doi: 10.1155/2016/7075682.

Wu D., Hu Q., Xiong Y., Zhu D., Mao Y., and Zhu Y. Z. 2018. Novel H₂S-NO hybrid molecule (ZYZ-803) promoted synergistic effects against heart failure. *Redox Biol.* 15: 243-252. doi: 10.1016/j.redox.2017.11.020.

Wu D., Wang J., Li H., Xue M., Ji A., and Li, Y. 2015. Role of Hydrogen Sulfide in Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2015: 186908. DOI: 10.1155/2015/186908. PMID: 26064416.

Xie Y.H., Zhang N., Li L.F., Zhang Q.Z., Xie L.J., Jiang H. et. al. 2014. Hydrogen sulfide reduces regional myocardial ischemia injury through protection of mitochondrial function. *Mol Med Rep.* 10(4): 1907-14. DOI: 10.3892/mmr.2014.2391. PMID: 25198340.

Xie Z.Z., Liu Y., and Bian J.S. 2016. Hydrogen sulfide and cellular redox homeostasis. *Oxid Med Cell Longev.* 2016: 6043038. DOI: 10.1155/2016/6043038. PMID: 26881033.

Xu Z., Xu L., Li W., Jin X., Song X., Chen X., et al. 2017. Innate scavenger receptor-A regulates adaptive T helper cell responses to pathogen infection. *Nat Commun.* 8: 16035. doi: 10.1038/ncomms16035. PMID: 28695899.

Yan H., Du J., Tang Ch. 2004. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 313(1): 22-7. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.11.081. PMID: 14672692.

Yang J., Minkler P., Grove D., Wang R., Willard B., Dweik R. et al. 2019 Non-enzymatic hydrogen sulfide production from cysteine in blood is catalyzed by iron and vitamin B₆. *Commun Biol.* 2: 194. DOI: 10.1038/s42003-019-0431-5. PMID: 31123718.

Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K. et al. 2008. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science.* 322(5901):587-90. doi: 10.1126/science.1162667.

Yang R., Jia Q., Liu X.F., Wang Y.Y., and Ma S.F. 2017. Effects of hydrogen sulfide on inducible nitric oxide synthase activity and expression of cardiomyocytes in diabetic rats. *Mol Med Rep.* 16(4): 5277-5284. DOI: 10.3892/mmr.2017.7247. PMID: 28849194.

Yang W., Yang G., Jia, X. Wu, L., and Wang, R. 2005. Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *J Physiol.* 569(Pt 2): 519-31. doi: 10.1113/jphysiol.2005.097642. PMID: 16179362.

Yao L.L., Huang X.W., Wang Y.G., Cao Y.X., Zhang C.C., Zhu Y.C. 2010. Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by preventing GSK-3 β -dependent opening of mPTP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 298(5): H1310-9. doi: 10.1152/ajpheart.00339.2009.

Yellon D. M., and Hausenloy D. J. 2007. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 357(11): 1121-35. doi: 10.1056/NEJMra071667. PMID: 17855673.

Yetik-Anacak G., Sevin G., Ozzayım O., Dereli M.V., and Ahmed A. 2016. Hydrogen sulfide: A novel mechanism for the vascular protection by resveratrol under oxidative stress in mouse aorta. *Vascul Pharmacol.* 87: 76-82. DOI: 10.1016/j.vph.2016.08.003. PMID: 27538867.

Yong Q. C., Lee S. W., Foo C. S., Neo K. L., Chen X., and Bian J. S. 2008. Endogenous hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295(3): H1330-H1340. doi: 10.1152/ajpheart.00244.2008.

Zaorska E., Tomasova L., Koszelewski D., Ostaszewski R., Ufnal M. 2020. Hydrogen Sulfide in Pharmacotherapy, Beyond the Hydrogen Sulfide-Donors. *Biomolecules.* 10(2): 323. DOI: 10.3390/biom10020323. PMID: 32085474.

Zhang C., Hein T.W., Wang W., Chang C.I., Kuo L. 2001. Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide-mediated

vasodilatory function. *FASEB J.* 15(7): 1264-6. DOI: 10.1096/fj.00-0681fje. PMID: 11344108.

Zhang Y., Tang Z.-H., Ren Z., Qu S.-L., Liu M.-H., Liu L.-S. et al. 2013. Hydrogen Sulfide, the Next Potent Preventive and Therapeutic Agent in Aging and Age-Associated Diseases. *Mol Cell Biol.* 33(6): 1104–1113. DOI: 10.1128/MCB.01215-12. PMID: 23297346.

Zhao W, Wang R. 2002. H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283(2): H474-80. doi: 10.1152/ajpheart.00013.2002.

Zhao W., Zhang J., Lu Y., and Wang R. 2001. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO J.* 20(21): 6008-16. doi: 10.1093/emboj/20.21.6008.

Zhu H., Itoh K., Yamamoto M., Zweier J.L., Li Y. 2005. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: Protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett.* 579(14): 3029-36. doi: 10.1016/j.febslet.2005.04.058. PMID: 15896789.

Ziegler D.V., Wiley C.D., and Velarde M.C. 2015. Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell.* 14(1):1-7.

Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 94(3): 909-50. doi: 10.1152/physrev.00026.2013.

ДОДАТОК 1

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ

РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Струтинська Н.А., Коцюрuba А.В., Будько А.Ю., **Мись Л.А.**, Сагач В.Ф. Порухення 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.
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.
3. **Мись Л.А.**, Струтинська Н.А., Струтинський В.Р., Сагач В.Ф. Активація синтезу ендогенного сірководню пригнічує відкривання мітохондріальної пори та відновлює спряження конститутивної NO-синтази у серці старих щурів. Фізіол. журн. 2017; 63(3), с. 16-23.
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.
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.

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.

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Тези доповідей:

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 ендogenous 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 H_2S 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-posphate 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 Ca^{2+} 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.