

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

ДРАЧУК КОСТЯНТИН ОЛЕГОВИЧ

УДК 543.272.55:616.13:616.12-008.1:612.67

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

14.03.04 – патологічна фізіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Київ-2016

Дисертацією є рукопис

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

Науковий керівник: член-кор. НАН України, доктор медичних наук, професор **Сагач Вадим Федорович**, завідувач відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор **Соловйов Анатолій Іванович**, завідувач відділу експериментальної терапії Інституту фармакології та токсикології НАМН України

доктор медичних наук, професор **Шатило Валерій Броніславович**, заступник директора з науково-лікувальної роботи, головний науковий співробітник відділу клінічної фізіології та патології внутрішніх органів Державної установи "Інститут геронтології імені Д. Ф.Чеботарьова НАМН України",

Захист відбудеться « 31 » січня 2017 року о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології імені О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4 та на сайті інституту <http://biph.kiev.ua/>

Автореферат розіслано « 19 » грудня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Однією з найбільш значних соціальних тенденцій XXI сторіччя є старіння населення. За даними ВООЗ з 2000 до 2050 рр. частка населення світу віком понад 60 років збільшиться вдвічі (приблизно з 11 до 22%). Очікується, що абсолютна кількість таких людей зросте за цей період з 605 млн до більше ніж 1,5 млрд. Головним фактором, що погіршує якість життя людей похилого віку є прогресивне зниження функціональних резервів серцево-судинної системи, що підвищує ризик розвитку таких захворювань, як атеросклероз, артеріальна гіпертензія, ішемічна хвороба серця, діабетична ангіопатія тощо, і ризик смерті від них. Дані численних експериментальних і клінічних досліджень вказують на те, що при старінні в серці насамперед порушується діастолічна функція, а у судинах послаблюється ендотелійзалежне розслаблення (El Assar M. et al., 2012; Kotsis V. et al., 2011; Ткаченко М.М. та ін., 2002; Коркушко О.В. та ін. 2001; Schulman S.P. et al., 1992). Однією із ключових патофізіологічних ланок вказаних функціональних змін у процесі старіння є розвиток окислювального стресу, який призводить до пошкодження мітохондрій і зниження продукції АТФ (Moslehi J. et al., 2012; Asakura M., 2009; Brink T.C. et al., 2009; Marín-García J., 2008; Zahn J.M. et al., 2007). Наслідком цього є порушення енергозалежного процесу транспорту іонів Ca^{2+} із міоплазми в саркоплазматичний ретикулум та позаклітинне середовище, зниження швидкості актин-міозинової дисоціації і розвиток діастолічної дисфункції (Dai D.F. et al., 2009; Schmidt U. et al., 2005; Taffet G.E. et al., 1993). В основі порушення ендотелійзалежного розслаблення судин при старінні лежить також зменшення біодоступності основного ендогенного вазорелаксанта – оксиду азоту (NO) – через послаблення синтезу і, одночасно, посилення його деградації, зокрема, при окислювальному стресі в результаті збільшення утворення супероксидного радикалу ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (El Assar M. et al., 2012).

Останнім часом з'являється все більше даних про те, що інший газоподібний медіатор сірководень (H_2S) забезпечує кардіо- та васкулопротекторні впливи, зокрема при інфаркті міокарду, ішемії-реперфузії, порушеннях ритму серця, гіпертрофії міокарду, атеросклерозі, артеріальній гіпертензії тощо (Shen Y. et al., 2015; Сагач В.Ф. та ін., 2013; Струтинська Н.А. та ін., 2013; Шиманська Т.В. та ін., 2012; Yang G. et al., 2008; Mirhadi S. A. et al., 1990). Показано, що даний вплив обумовлений антиоксидантними, антиапоптичними та протизапальними властивостями цього медіатора, його здатністю викликати розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) судин (Meng G. et al., 2015; Shen Y. et al., 2015; Sun W.H. et al., 2012; Семенихіна О.М. та ін., 2011; Pan L.L. et al., 2011; Hu L.F. et al., 2007; Oh G.S. et al., 2006).

Як вже вказувалося, H_2S разом з NO і CO належить до групи газових трансмітерів. Ці три молекули можуть проникати через клітинні мембрани та викликати певні біологічні ефекти у малій концентрації та токсичний ефект при високих дозах. В серцево-судинній системі H_2S синтезується за участі двох ферментів – 3-меркаптопіруват-сульфуртрансферази (3MST) і цистатіонін-γ-ліази (CSE) (Kimura H., 2014; Shibuya N. Et al., 2009). Інгібітором останнього є

пропаргілгліцин (ПГ). Останні дані вказують на те, що 3MST-залежний H_2S здатен збільшувати тривалість життя (Qabazard B. et al., 2014).

Слід проте визнати, що роль H_2S у порушенні функцій серця і судин при старінні до кінця не з'ясована. Отже відповідне коло питань є цілком актуальними і перспективними, зокрема, в аспекті можливості розробки профілактичних засобів, спрямованих на зниження поширюваності захворювань серцево-судинної системи з віком. Це і послужило підставою для виконання нашої роботи в експериментах на лабораторних тваринах (щурах) різного, в тому числі старечого, віку.

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

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

Завдання дослідження:

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

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

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

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

Об'єкт дослідження: Функції серця і судин при старінні та механізми їх порушень.

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

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

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше проведено комплексне дослідження оксидативного/нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в

тканинах серця і аорти при старінні. Отримані дані свідчать про участь як оксидативного, так і нітрозативного стресу у розвитку порушень ендотелійзалежного розслаблення ГМ і діастолічної функції серця при старінні. Встановлено, що розвиток оксидативного і нітрозативного стресу полегшується при зниженні синтезу сірководню, обумовленого зменшенням активності ферменту 3-меркаптопіруват-сульфуртрансфери.

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

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

Запропоновано індекс для оцінки стану спряження конститутивної NO-синтази.

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

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

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

Апробація результатів дисертації. Результати дослідження та основні теоретичні положення були представлені та обговорені на наступних з'їздах та конференціях: V міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених (Вінниця, 2014); VIII міжнародній науково-практичній конференції «Дисфункція ендотелія: експериментальні та клінічні дослідження» (Вітебськ, 2014); III International Conference on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine (Kyoto, 2014);

Frontiers in Cardiovascular Biology (Barcelona, 2014); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасної патоморфології та патофізіології» (Запоріжжя, 2015); XIX з'їзді українського фізіологічного товариства з міжнародною участю (Львів, 2015); International student congress of (bio)medical sciences ISCOMS 2015 (Groningen, 2015); Науково-практичній конференції «Ендотеліальна дисфункція при вік-залежній патології: діагностика, профілактика, лікування» (Київ, 2015); Frontiers in Cardiovascular Biology (Florence, 2016).

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

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

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили на 140 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 230-370 г, що утримувались на стандартному раціоні та в стандартних умовах віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (рис. 1). Серед досліджуваних тварин 45 щурів були дорослими молодими (6-8 міс.) і 95 – старими (22-24 міс). Експерименти проведені з дотриманням вимог Європейської конвенції щодо роботи з лабораторними тваринами (Страсбург, 1986).

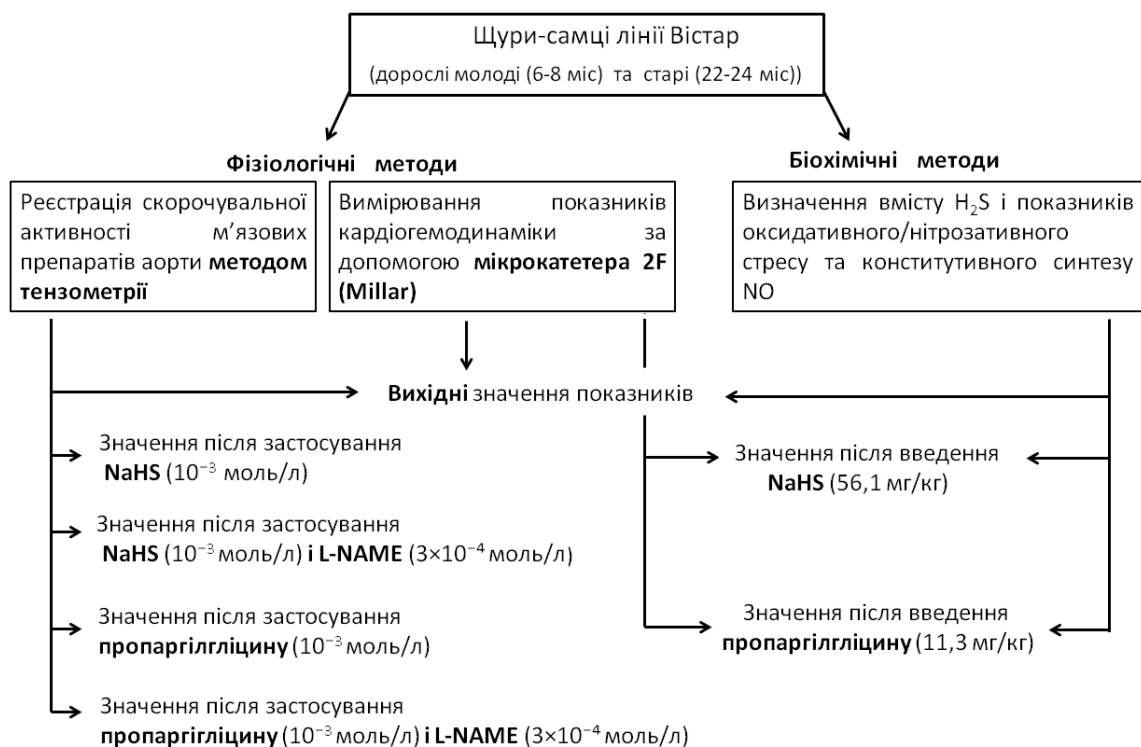


Рис. 1. Загальна схема проведених експериментів

Реєстрація скорочувальної активності м'язових препаратів аорти.

Реєстрацію скорочувальної активності м'язових препаратів грудного відділу аорти проводили методом тензометрії. 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 ацетилхоліну (АХ, 10^{-5} моль/л, "Sigma", США) (Soloviev A.I. et al., 1993). Донор сірководню NaHS (10^{-3} моль/л, "Sigma", США) додавали у розчин, в якому інкубували кільцеві препарати аорти (30 хв), а також в перфузійні розчини. Вибір концентрації базувався на результатах раніше проведених досліджень (Rashid S. et al., 2013; Семенихіна О.М. та ін., 2011; Teague B. et al., 2002), у яких максимальне розслаблення ГМ при прямому впливі NaHS досягалося при концентрації останнього 10^{-3} моль/л. Активність ферментів CSE та конститутивної NO-синтази (cNOS) пригнічували за допомогою пропаргілгліцину (ПГ, 10^{-3} моль/л, "Sigma", США) та N-Нітро-L-аргінін-метилестергідрохлориду (L-NAME, 3×10^{-4} моль/л, "Sigma", США), відповідно, шляхом інкубації препаратів аорти впродовж 30 хв і додавання блокаторів в перфузійні розчини.

Дослідження показників кардіогемодинаміки у щурів *in vivo*. Вимірювання показників кардіогемодинаміки у щурів *in vivo* проводилося з використанням мікрокатетера 2F (Millar Instruments, США) і Millar Pressure-Volume System. Щурів наркотизували за допомогою уретану (1,25 г/кг, внутрішньоочеревинно), фіксували і препарували праву сонну артерію. Ультрамніатюрний катетер 2F вводили через праву сонну артерію ретроградно у лівий шлуночок (ЛШ) серця, що дозволяло одночасно реєструвати сигнали тиску і об'єму ЛШ з візуалізацією кривих залежності цих величин протягом серцевого циклу (Pacher P. et al., 2008; Burkhoff D. et al., 2005). Реєстрували наступні показники кардіогемодинаміки: кінцево-сistolічний тиск, кінцево-діастолічний тиск (КДТ), максимальну швидкість наростання тиску, максимальну швидкість падіння тиску (dp/dt_{min}), кінцево-сistolічний об'єм ЛШ, кінцево-діастолічний об'єм ЛШ, ударний об'єм, частоту серцевих скорочень, хвилинний об'єм крові, ефективну артеріальну жорсткість, константу активного розслаблення (Tau g). Для визначення здатності міокарда до розтягнення (кінцево-діастолічна жорсткість, КДЖ) здійснювали невеликий розріз нижче мечоподібного відростку і проводили реєстрацію параметрів під час оклюзії черевної порожнистої вени в умовах зниженого притоку крові до серця (Pacher P. et al., 2008; Burkhoff D. et al., 2005).

Донор сірководню NaHS ("Sigma", США) вводили внутрішньоочеревинно в концентрації 56,1 мг/кг за 30 хв до реєстрації показників кардіогемодинаміки. Пропаргілгліцин (ПГ, "Sigma", США) вводили також внутрішньоочеревинно (11,3 мг/кг). Вказані дози препаратів дозволяли (за нашими розрахунками) досягти в плазмі крові концентрації NaHS і ПГ 10^{-3} моль/л, які відповідали тим, що використовувались у дослідженнях на препаратах ГМ аорти.

Визначення ендогенних пулів H_2S і біохімічних показників, що характеризують інтенсивність окисного (оксидативного і нітрозативного) стресу та конститутивного синтезу NO. В дослідженнях на тканинах аорти,

препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця дорослих та старих щурів визначали стаціонарні показники, що характеризують вміст H_2S , інтенсивність оксидативного/нітрозативного стресу, стан спряження cNOS та конститутивний синтез NO, а також скоординовані зміни даних показників після введення старим щурам NaHS (56,1 мг/кг) і ПГ (11,3 мг/кг), внутрішньоочеревинно, за 30 хв до декапітації.

Для визначення активності NO-синтаз використовували комбінацію класичного метода та його модифікацію, пристосовану до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції L-цитруліну (Chin S.Y. et al., 1999; Salter M. et al., 1991). Вміст останнього визначали високочутливим колориметричним методом (Boyde J.R., 1980). Індекс спряження (coupling) cNOS розраховували як відношення активності cNOS до швидкості генерації $\text{O}_2^{\cdot-}$. Вміст нітрит-аніону (NO_2^-) визначали в безбілкових аліквотах проб в колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна (Green L.L. et al., 1982). Вміст нітрат-аніону (NO_3^-) визначали бруциновим методом в безбілкових аліквотах проб спектрофотометричним методом (Tsukahara H. et al., 1996). Визначення нітратредуктазної активності проводили в умовах насичуючої концентрації субстрату (NO_3^-) в присутності надлишку NADH (Li H., 2001). Вміст сечової кислоти визначали колориметричним методом в аліквотах проб за допомогою добірки реактивів фірми «Філіст-Діагностика» (м. Дніпро, Україна) Швидкість утворення $\text{O}_2^{\cdot-}$ визначали за відновленням цитохрому C (McCord J.M., 1982). Вміст H_2O_2 визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 353 нм, використовуючи розчин йодиду калію із надлишком лактопероксидази (Huwiler M., 1984). Швидкість утворення $\cdot\text{OH}$ -радикалу визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 532 нм, після попередньої інкубації проб з розчином дезоксирибози (Halliwell B. et al., 1988). Вміст ейкозаноїдів – тромбоксану B2 (TxB2) та лейкотриєну C4 (LTC4) – визначали в спиртових екстрактах проб, за допомогою радіоімунного методу (Sharipov R.R. et al., 2015). Вміст дієнових кон'югатів (ДК) визначали за методом Гаврилова В.Б. та співавт. (1988), а пули малонового діальдегіду (МДА) – за методом Conte D. et al (1996). Вміст загального білка в пробах визначали методом Bradford M.M. (1976). Вміст H_2S визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 670 нм, використовуючи розчини N,N-диметилпарафеніл-ендіаміну та FeCl_3 (Svenson A. A., 1980). Активність CSE визначали за приростом вмісту сульфід-аніону в інкубаційному середовищі, у якому до аліквот проб додавали субстрат (L-цистеїн, $6,0 \times 10^{-3}$ моль/л, “Sigma”, США) і кофактор (піридоксальфосфат, $1,34 \times 10^{-3}$ моль/л, “Sigma”, США). Активність 3MST визначали за приростом концентрації сульфід-аніону, аналогічно попередній методиці, з додатковим внесенням в інкубаційне середовище субстрату, α -кетоглутарату (Заїчко Н. В. та ін., 2013).

Методи статистичного аналізу. Отримані результати оброблені з використанням стандартних методів варіаційної статистики та програм Excel (MS Office XP) та Origin 8.5 (Microcall Inc., США). Міжгрупові різниці між показниками визначали за допомогою Т-критерію Ст'юдента (різниця вважалась достовірною при $P < 0,05$), а також використовували тест ANOVA. Відповідність розподілів даних нормальному закону перевіряли за критеріями Колмогорова-Смірнова.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Рівень ендотелійзалежного розслаблення ГМ аорти у старих щурів. Досліди на ізольованих препаратах аорти показали, що додавання АХ (10^{-5} моль/л) завжди викликало типове розслаблення преактивованих НА (10^{-5} моль/л) ГМ аорти дорослих молодих щурів. Нормована амплітуда розслаблення становила в середньому $64,9\% \pm 3,5\%$ ($n=10$) (рис. 2). У старих щурів аналогічний показник АХ-індукованого розслаблення був суттєво нижчим і становив $7,5\% \pm 1,4\%$ ($P < 0,05$; $n=10$) у групі тварин, у яких в подальшому досліджували вплив NaHS, і $7,5\% \pm 1,8\%$ ($P < 0,05$; $n=10$) у тварин з подальшим визначенням впливу ПГ. Отримані результати свідчили про суттєве порушення ендотелійзалежного розслаблення ГМ аорти у старих щурів.

Вплив донору сірководню NaHS на ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти старих щурів. Додавання до перфузуючого розчину донора сірководню NaHS (10^{-3} моль/л) і інкубація в ньому препарату ГМ аорти старих щурів впродовж 30 хв збільшували амплітуду АХ-індукованого розслаблення більш ніж у 6 разів ($48,8\% \pm 1,9\%$ проти $7,5\% \pm 1,4\%$ у старих тварин до дії NaHS) ($P < 0,05$; $n=10$) (рис. 2). Одночасне додавання до перфузуючого розчину NaHS і L-NAME (блокатора синтезу NO) багаторазово зменшувало амплітуду (від $48,8\% \pm 1,9\%$ до $2,5\% \pm 1,4\%$) ($P < 0,05$; $n=10$), що свідчить про реалізацію ефекту NaHS за участю NO.

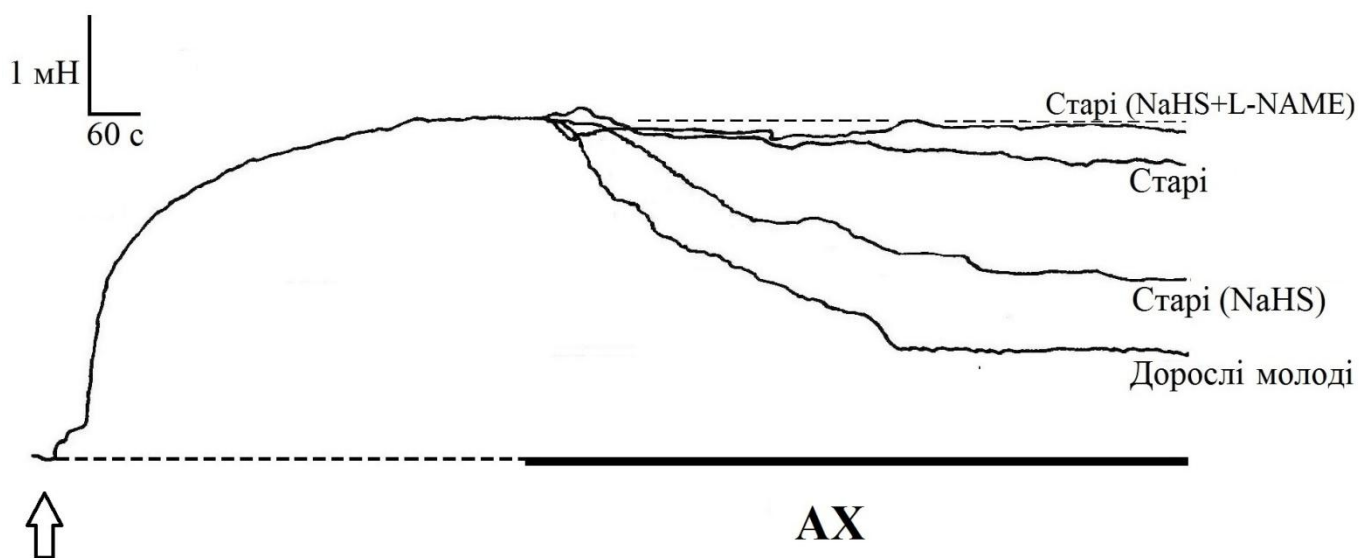


Рис. 2. Нативні криві впливу NaHS на ацетилхолін(АХ-) індуковане розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти старих щурів. Абсциса – час; ордината – напруження розвинуте препаратом, мН. Темна лінія під кривими – тривалість дії АХ (10^{-5} моль/л), переривчаста – вихідний рівень (внизу) тонічного напруження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

Вплив інгібітора CSE-залежного шляху утворення H_2S пропаргілгліцину (ПГ) на ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти старих щурів. Враховуючи результати попереднього етапу дослідження, ми очікували, що застосування ПГ, тобто інгібітора CSE-залежного шляху утворення H_2S , призведе до зменшення

ендотелійзалежного розслаблення ГМ аорти у старих щурів. Проте ми отримали протилежний нашим очікуванням результат. Додавання до перфузуючого розчину ПГ (10^{-3} моль/л) і інкубація в ньому препарату ГМ аорти старих щурів впродовж 30 хв призводили до збільшення амплітуди АХ-індукованого розслаблення (майже у 6 разів) ($44,5\% \pm 3,2\%$ проти $7,5\% \pm 1,8\%$ у старих тварин до дії ПГ) ($P < 0,05$; $n=10$) (рис. 3). На фоні одночасного застосування ПГ та L-NAME спостерігалось значне зменшення амплітуди АХ-індукованого розслаблення ГМ аорти (від $44,5\% \pm 3,2\%$ до $4,0\% \pm 1,6\%$) ($P < 0,05$; $n=10$).

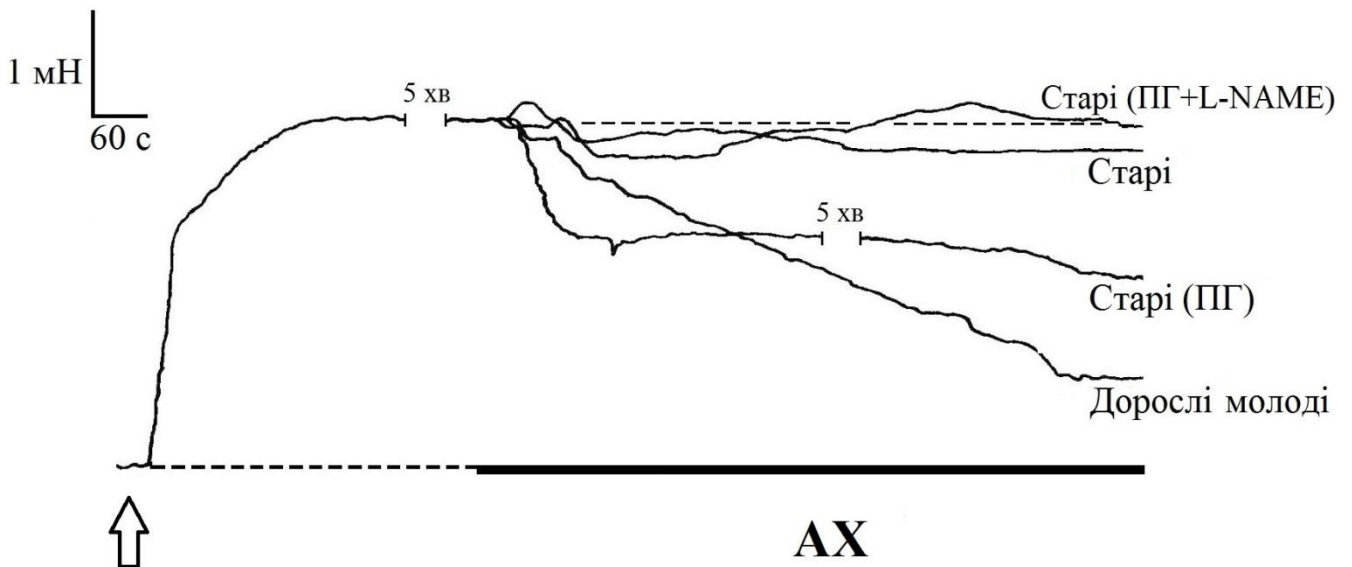


Рис. 3. Нативні криві впливу пропаргілгліцину (ПГ) на ацетилхолін(АХ-) індуковане розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти старих щурів. Абсциса – час; ордината – напруження розвинуте препаратом, мН. Темна лінія під кривими – тривалість дії АХ (10^{-5} моль/л), переривчаста – вихідний рівень (внизу)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

Таким чином, як NaHS, так і ПГ істотною мірою відновлювали ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти старих щурів, реалізуючи свій вплив через посилення продукції NO.

Вплив NaHS на показники оксидативного/нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в тканинах аорти старих щурів. Як видно з рис. 4, в тканинах аорти старих щурів розвивався оксидативний стрес. Так, сумарна швидкість генерації $O_2^{\cdot-}$ (основного ініціюючого чинника оксидативного стресу) перевищувала контрольні (у дорослих молодих особин) значення в 5,8 разів. Дисмутація нестабільного радикала $O_2^{\cdot-}$ у відносно стабільний пероксид водню була більшою в 4,3 рази. Швидкість продукції найбільш активного радикалу кисню $\cdot OH$, основного ініціатора перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), була вищою майже в 12 разів. Більший вміст продуктів ПОЛ – ДК і МДА, у 4,4 і 6,5 разів відповідно, вказував на високу інтенсивність ПОЛ в тканинах аорти старих щурів. Дослідження інтенсивності основних шляхів утворення $O_2^{\cdot-}$ показало, що вміст сечової кислоти був більшим у 8,3 рази, а LTC4 – у 2,7 рази ніж у дорослих молодих особин, що

свідчить про посилену активність ксантиноксидазного- і ліпооксигеназного шляхів утворення $O_2^{\cdot-}$ відповідно. Пули TxB_2 , маркера циклооксигеназного шляху утворення радикалу, не відрізнялися від значення у дорослих молодих тварин.

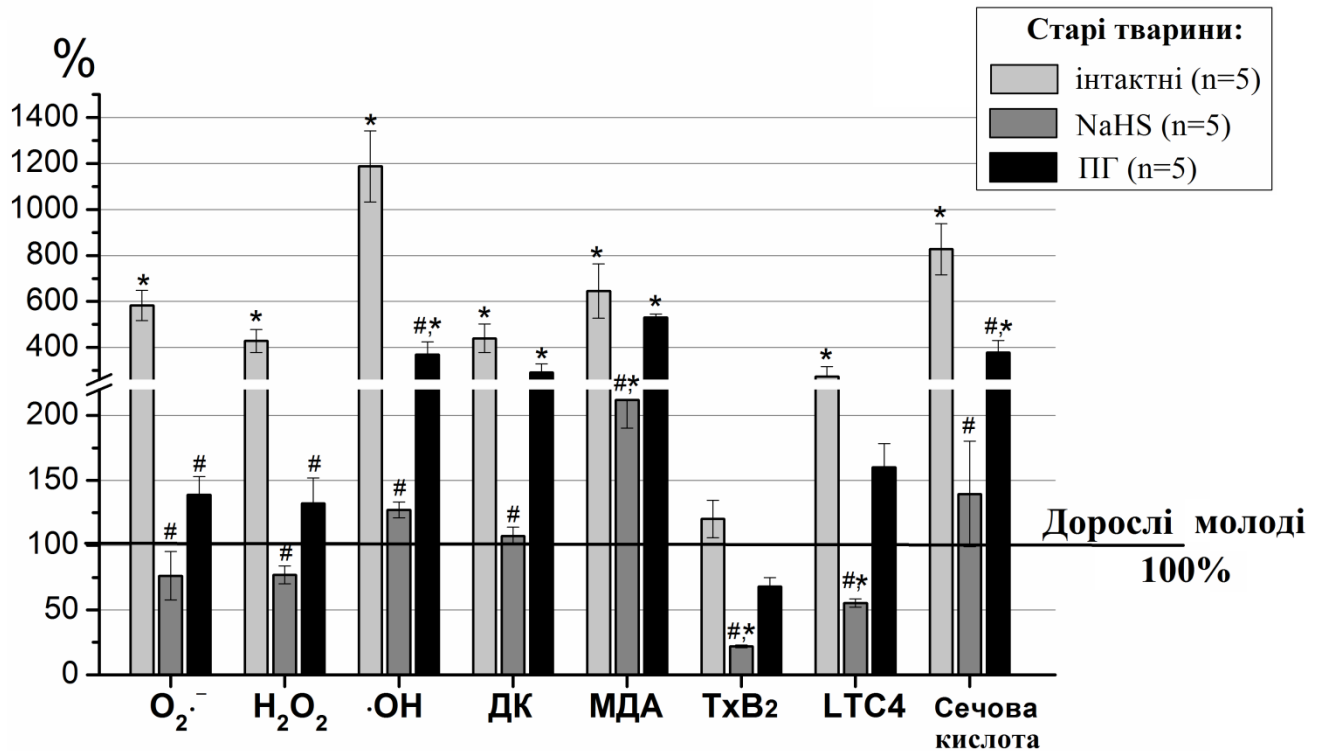


Рис. 4. Вплив NaHS і пропаргілгліцину (ПГ) на нормовані величини (%) показників оксидативного стресу в тканинах аорти старих щурів: швидкість утворення $O_2^{\cdot-}$, вміст H_2O_2 , швидкість утворення $\cdot OH$ -радикалу, вміст дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА), пули тромбоксану B2 (TxB_2), лейкотриєну C4 (LTC_4), сечової кислоти; * $P < 0,05$ відносно показників у дорослих молодих щурів (контроль), рівні яких прийнято за 100%, # $P < 0,05$ відносно показників у старих інтактних щурів.

Одночасно із оксидативним стресом і ПОЛ, в тканинах аорти старих щурів розвивався і нітрозативний стрес (рис. 5). Про це свідчило значне підвищення надлишкового синтезованого *de novo* NO, що було зумовлено підвищенням активності індукцйбельної NO-синтази (iNOS) в 3,8 разів, і посиленням реутилізаційного синтезу – підвищення активності нітратредуктази (ензима, що забезпечує відновлення метаболітів NO – NO_3^- і NO_2^-) в 9,8 разів. Одночасне надмірне утворення NO і $O_2^{\cdot-}$ створює умови для їх взаємодії між собою із утворенням високотоксичного радикалу – пероксинітриду ($ONOO^{\cdot-}$), продуктом розпаду якого є NO_3^- (Pryor W. A., 1995), вміст якого у старих тварин був вищим у 5,6 раз. Нітрозативний стрес супроводжувався порушенням конститутивного синтезу NO. Про це свідчило зниження активності cNOS (в 3 рази) і зменшення пулів NO_2^- , маркера конститутивного синтезу NO, в 1,7 разів у порівнянні з аналогічними показниками у дорослих молодих тварин. Причиною порушення конститутивного синтезу NO могла бути не спряженість стану (uncoupling) cNOS, на

що вказувало зниження майже у 20 разів величини розрахованого нами індексу спряження cNOS.

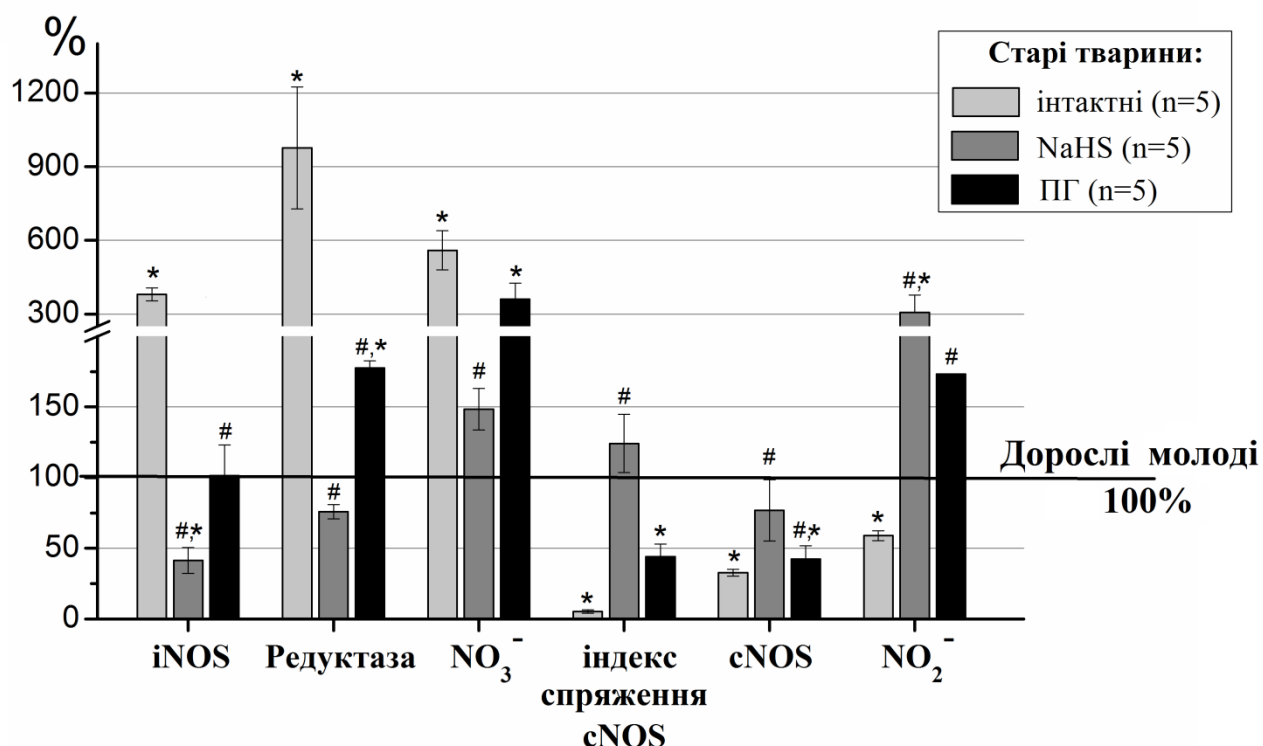


Рис. 5. Вплив NaHS і пропаргілгліцину (ПГ) на нормовані величини (%) показників нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в тканинах аорти старих щурів: активність індукційної NO-синтази (iNOS), нітратредуктази, вміст NO₃⁻-аніонів, активність конститутивної NO-синтази (cNOS), вміст NO₂⁻-аніонів. *P<0,05 відносно показників у дорослих молодих щурів (контроль), рівні яких прийнято за 100%, #P<0,05 відносно показників у старих інтактних щурів.

Окремо слід відмітити меншу величину ендогенних пулів H₂S в 1,6 разів (13,53 ± 1,47 нмоль/мг білка у старих щурів проти 22,1 ± 2,93 нмоль/мг у дорослих молодих, P<0,05), регулятора конститутивного синтезу NO і потужного кардіо- і васкулопротектора.

Введення старим тваринам в умовах *in vivo* NaHS (56,1 мг/кг) значно збільшувало в аорті пули H₂S (26,33 ± 2,67 нмоль/мг білка проти 13,53 ± 1,47 нмоль/мг у старих інтактних щурів, P<0,05). Це супроводжувалось суттєвим зниженням швидкості утворення O₂^{•-} (рис. 4). Причиною цього могло стати зменшення активності циклооксигеназного (оскільки пули TxV2 були меншими в 5,5 разів), ліпооксигеназного (пули LTC4 менше в 5 разів) і ксантиноксидазного (вміст сечової кислоти менше майже в 6 разів) шляхів утворення O₂^{•-}. Також за дії донора H₂S ставала зниженою швидкість утворення [•]ОН-радикалу (у 9,3 разів) і меншими пули H₂O₂ (у 5,5 разів). Логічним наслідком пригнічення утворення [•]ОН-радикалу було зниження інтенсивності ПОЛ, про що свідчив менший вміст ДК (у 4 рази) і МДА (у 3 рази).

Введення старим щурам NaHS супроводжувалось також обмеженням нітрозативного стресу (рис. 5), через зменшення надлишкового утворення NO і його

високотоксичного похідного ONOO^- . Так, активність iNOS і нітратредуктази ставала нижчою у 9,2 і 12,9 разів, відповідно, а пули NO_3^- — у 3,8 рази. Одночасно із пригніченням нітрозативного стресу спостерігалось відновлення спряженого стану sNOS і посилення конститутивного синтезу вазорелаксуючого агента — NO . Так, індекс спряження sNOS збільшувався майже у 24 рази, активність sNOS — у 2,3 рази, а пули NO_2^- — у 5,2 рази.

Таким чином, введення старим щурам донора NaHS у використаній дозі призводило до збільшення в тканинах аорти рівня сірководню. Це супроводжувалось пригніченням оксидативного/нітрозативного стресу, відновленням спряженого стану sNOS і покращенням конститутивного синтезу NO . Наслідком цього було майже повне відновлення ендотелійзалежного розслаблення ГМ аорти у старих тварин.

Вплив інгібітора CSE-залежного шляху утворення H_2S пропаргілгліцину (ПГ) на показники оксидативного/нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в тканинах аорти старих щурів. Введення старим тваринам ПГ (11,3 мг/кг) не змінювало в тканинах аорти вміст H_2S . Однак, як і у випадку із NaHS , введення ПГ супроводжувалось послабленням оксидативного стресу (див. рис. 4). Так, ставала значно нижчою швидкість утворення $\text{O}_2^{\bullet-}$, що могло бути наслідком зменшення активності ксантиноксидазного (вміст сечової кислоти зменшувався майже в 2,2 разів) шляху генерації $\text{O}_2^{\bullet-}$. Ліпідні оксигенази на введення ПГ не реагували. Дія ПГ супроводжувалась практично повною нормалізацією вмісту H_2O_2 (пули зменшились у 3,2 рази) і суттєвим зниженням швидкості утворення $^{\bullet}\text{OH}$ -радикалу (у 3,2 рази). Проте зниження утворення $^{\bullet}\text{OH}$ -радикалу не супроводжувалось послабленням інтенсивності ПОЛ, про що свідчила незмінність пулів ДК і МДА.

Введення старим тваринам ПГ супроводжувалося частковим обмеженням нітрозативного стресу (див. рис. 5) через зменшення надлишкового de novo -і реутилізаційного синтезу NO . Так, активності iNOS і нітратредуктази знижувались у 3,8 і 5,5 разів, відповідно. Однак цього було недостатньо для достовірного зменшення пулів NO_3^- . Одночасно відбувалося збільшення у 8,5 разів індексу спряження sNOS і збільшення у 3 рази пулів NO_2^- , окисного метаболіту NO . Однак активність sNOS при цьому не змінювалась.

Таким чином, введення старим щурам ПГ пригнічувало розвиток в тканинах аорти оксидативного і, частково, нітрозативного стресу, наслідком чого було відновлення спряженого стану sNOS і посилення ендотелійзалежного розслаблення ГМ аорти.

Особливості кардіогемодинаміки у старих щурів *in vivo*. Встановлено, що показники насосної і скорочувальної функції серця у інтактних старих щурів достовірно не відрізнялись від зазначених показників у дорослих молодих тварин. При вивченні показників діастолічної функції ЛШ було виявлено зниження максимальної швидкості зниження тиску (dP/dt_{\min}) на 27,4% (-5466 ± 391 мм рт. ст./с порівняно з -8131 ± 308 мм рт. ст./с. у дорослих молодих) ($P < 0,05$; $n=7$). При цьому, константа активного розслаблення міокарду (Tau g) у старих щурів була більшою в 1,4 рази ($15,8 \pm 0,5$ мс проти $11,0 \pm 0,2$ мс у дорослих молодих) ($P < 0,05$). Крім того,

у старих щурів кінцево-діастолічний тиск (КДТ) був вище в 3,1 рази ($10,6 \pm 0,7$ мм рт. ст. порівняно з $3,5 \pm 0,4$ мм рт. ст. у дорослих молодих) ($P < 0,05$), а також відмічалися більші значення кінцево-діастолічної жорсткості (КДЖ) у 2,1 рази (у старих $0,23 \pm 0,05$ мм рт.ст./мкл, у дорослих молодих – $0,11 \pm 0,03$ мм рт.ст./мкл) ($P < 0,001$). Таким чином, зниження dP/dt_{\min} , при збільшенні КДЖ і Tau g та при підвищенні КДТ в ЛШ свідчить про діастолічну дисфункцію ЛШ і порушення процесу розслаблення серця у старих щурів.

Вплив донора NaHS на показники кардіогемодинаміки у старих тварин. Під дією NaHS ($56,1$ мг/кг) відчутно нормалізувалося розслаблення ЛШ у старих щурів. Так, dP/dt_{\min} достовірно збільшувалась на 20% (-6534 ± 348 мм рт. ст./с порівняно з -5466 ± 391 мм рт. ст./с у старих тварин без дії NaHS) ($P < 0,05$; $n=7$), а Tau g зменшувалась на 13% ($13,8 \pm 0,4$ мс порівняно з $15,8 \pm 0,5$ мс у старих тварин без дії NaHS) ($P < 0,05$) (рис. 6). В той же час введення NaHS не викликало зміни показників насосної функції і скорочувальної активності серця.

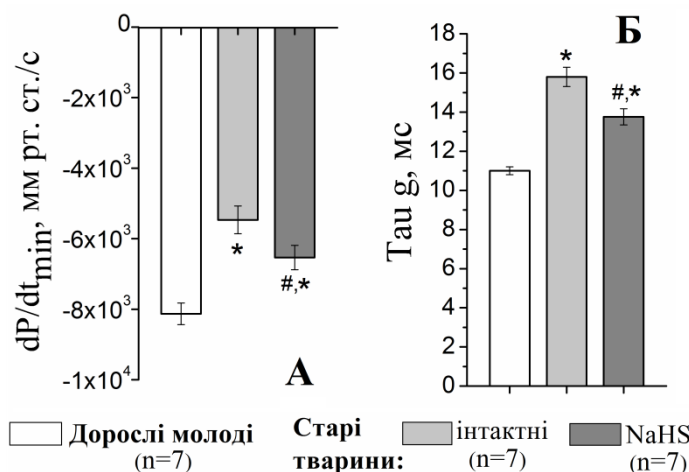


Рис. 6. Вплив NaHS на показники максимальної швидкості зниження тиску (dP/dt_{\min}) (А) та константи активного розслаблення міокарду (Tau g) (Б) у старих щурів. * $P < 0,05$, відносно показників у дорослих молодих (контроль), # $P < 0,05$ відносно показників у старих інтактних щурів.

Вплив ПГ на показники кардіогемодинаміки у старих тварин. Виявлено, що введення старим тваринам ПГ ($11,3$ мг/кг) також супроводжувалось відчутною нормалізацією діастолічної функції серця. У той же час даний вплив був обумовлений зміною двох інших показників кардіогемодинаміки. Так, КДЖ зменшувалась на 52% і становила $0,11 \pm 0,035$ мм рт.ст./мкл ($P < 0,05$; $n=7$), а КДТ знижувався на 19% і становив $8,6 \pm 0,7$ мм рт.ст. ($P < 0,05$) (рис. 7).

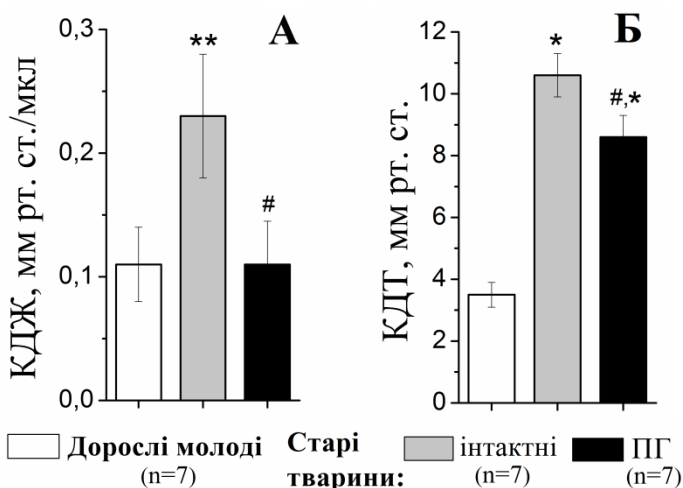


Рис. 7. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на показники кінцево-діастолічної жорсткості (КДЖ) (А) та кінцево-діастолічного тиску (КДТ) (Б) у старих щурів. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$ відносно показників у дорослих молодих (контроль), # $P < 0,05$ відносно показників у старих інтактних щурів.

Таким чином, як донор NaHS, так і ПГ суттєво відновлювали розслаблення міокарду і діастолічну функції серця у старих щурів.

Вплив NaHS на показники оксидативного/нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в препаратах мітохондрій та гомогенаті тканин серця старих щурів. В тканинах серця старих щурів розвивається оксидативний стрес, про що свідчили вища швидкість утворення $O_2^{\cdot-}$ в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця (в 3,9 і 3,7 рази, відповідно) і $\cdot OH$ -радикалу (2,7 і 4,1 рази), а також більший вміст H_2O_2 (в 2,1 і 1,4 рази). Одночасно була високою інтенсивність ПОЛ. Так, пули ДК були більшими у 9,2 і 8,4 разів, а пули МДА – у 2,7 і 7,3 рази, ніж у дорослих молодих тварин. Високий вміст сечової кислоти (у 9 і 2,6 разів) свідчив про збільшену інтенсивність ксантиоксидазного шляху утворення $O_2^{\cdot-}$ у старих щурів.

Крім оксидативного стресу в досліджуваних тканинах серця старих щурів мав місце і нітрозативний стрес. Так, активність iNOS була вищою в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів (в 2,4 і 8,9 разів, відповідно), ніж у дорослих молодих, активність нітратредуктази – в 3,2 і 4,9 рази, а пули NO_3^- були більшими лише в гомогенаті серця (в 6,4 рази). Одночасно із розвитком нітрозативного стресу в тканинах серця старих щурів був нижчим конститутивний синтез NO і меншим вміст його вазорелаксуючої фракції. Так, активність cNOS була нижчою в 2,1 і 2 рази, а пули NO_2^- зменшувалися в 3,1 і 1,6 рази. Причиною зниження активності cNOS міг бути неспряжений стан cNOS (синтез $O_2^{\cdot-}$ замість NO), на що вказувало зниження розрахованого нами індексу спряження у 8 і 7,5 разів.

Окремо слід відмітити менші величини ендогенних пулів H_2S в (1,9 рази), як в препаратах мітохондрій, так і в гомогенаті тканин серця. Це супроводжувалося різноспрямованою зміною активності ферментів синтезу H_2S . Так, активність CSE була вищою в 3,6 і 3,5 рази, натомість, активність 3MST – нижчою в 3,7 і 2,2 рази (рис. 8). Отже, можна зробити висновок, що саме 3MST є основним ферментом синтезу H_2S в тканинах серця, а пригнічення активності цього ензиму спричиняє відчутне зменшення вмісту сірководню в досліджуваних тканинах.

Таким чином, як в препаратах мітохондрій, так і в гомогенаті тканин серця старих щурів, був низьким рівень H_2S , розвивався оксидативний/нітрозативний стрес і порушувалося спряження cNOS. Наслідком цього було зниження інтенсивності конститутивного синтезу дилататорного агента (NO) і порушення діастолічної функції серця.

Введення старим тваринам *in vivo* NaHS (56,1 мг/кг) зумовлювало значне збільшення (у 4,1 рази) пулів H_2S в препаратах мітохондрій і повністю їх відновлювало в гомогенаті тканин серця (рис. 8).

Це супроводжувалось зниженням в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця швидкості утворення $O_2^{\cdot-}$ (у 6,7 і 7,5 рази, відповідно), пулів H_2O_2 (у 4,1 і 3,4 рази) і швидкості продукції $\cdot OH$ -радикалу (в 1,7 і 4,3 рази). Причиною обмеження швидкості утворення $O_2^{\cdot-}$ могло бути зменшення активності ксантиоксидазного (пули сечової кислоти зменшились у 3,5 і 3,3 рази), циклооксигеназного (пули TxV2 зменшились в 6,4 і 4 рази) і ліпоксигеназного (пули

LTC₄ зменшилися в 4,5 і 3,4 рази) шляхів генерації даного радикалу. Зниження швидкості утворення $\cdot\text{OH}$ -радикалу (ініціатора ПОЛ) супроводжувалось зменшенням пулів ДК (первинного продукту ПОЛ) в 25,6 і 4,2 рази і МДА (вторинного продукту ПОЛ) у 4,3 і 3,7 рази.

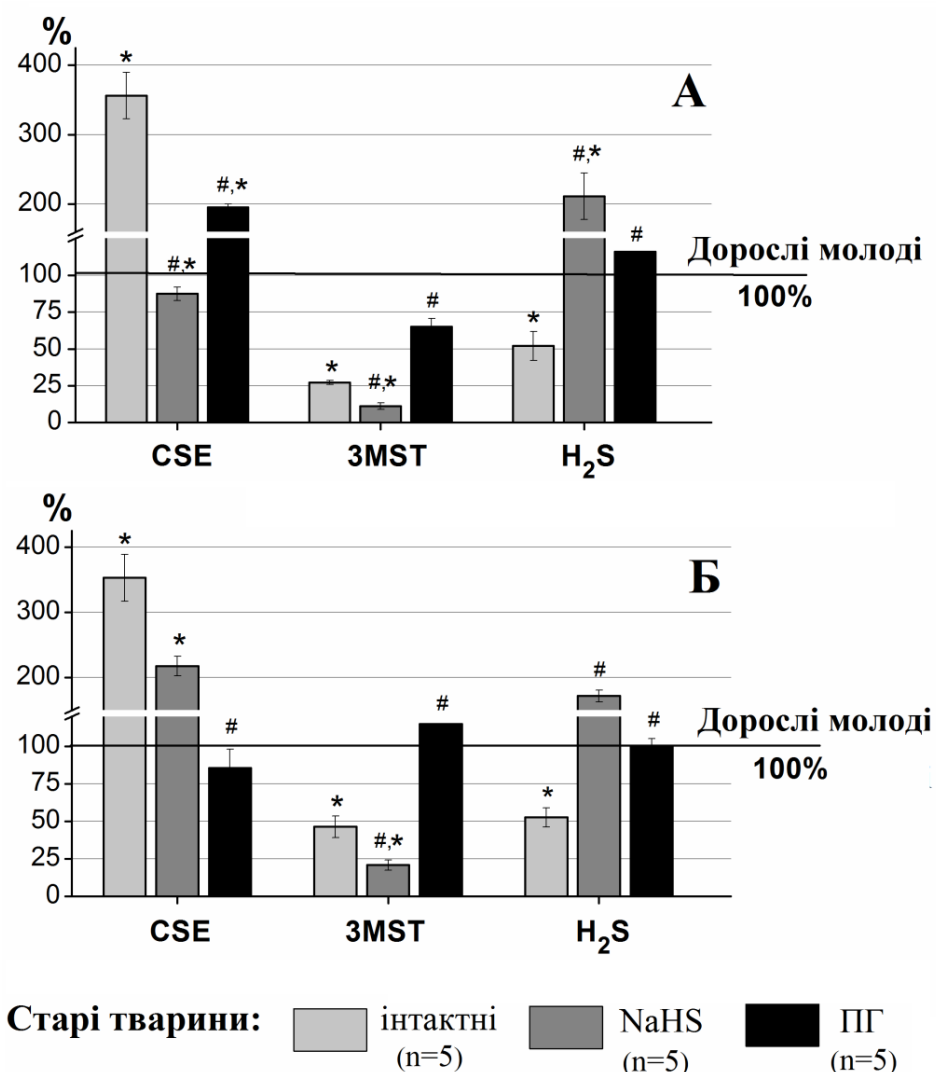


Рис. 8. Вплив NaHS і пропаргілгліцину (ПГ) на нормовані величини (%) пулів H₂S і активність ферментів синтезу сірководню: цистатіонін-γ-ліази (CSE) та 3-меркаптопіруват-сульфуртрансфери (3MST), в препаратах мітохондрій (А) і гомогенаті тканин (Б) серця старих щурів. *P<0,05 відносно дорослих молодих (контроль), рівні яких прийнято за 100%, #P<0,05 відносно старих інтактних щурів.

Введення NaHS старим тваринам супроводжувалося суттєвим обмеженням нітрозативного стресу в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця через зменшення надлишкового утворення NO і його високотоксичного похідного – радикала ONOO⁻. Так, активність iNOS у цих препаратах знижувалась у 2,6 і 4,1 рази, активність нітратредуктази – у 5,4 і 3,8 рази, а величина пулів NO₃⁻ – у 4,7 і 4,5 рази. В результаті пригнічення оксидативного/нітрозативного стресу істотно відновлювалось sprzęження cNOS і посилювався конститутивний синтез NO. Про це

свідчило зростання індексу спряження (в 48,5 і 19 разів), підвищення активності cNOS (у 7,3 і 2,5 рази) і збільшення пулів NO_2^- (у 4,1 і 3,8 рази).

Таким чином, донор NaHS збільшував пули H_2S в мітохондріях і гомогенаті серця старих щурів, що супроводжувалось пригніченням оксидативного/нітрозативного стресу, відновленням спряженого стану cNOS і посиленням конститутивного синтезу NO. Наслідком цього стало покращення у таких тварин діастолічної функції серця.

Вплив інгібітора CSE-залежного шляху утворення H_2S , пропаргілгліцину (ПГ) на показники оксидативного/нітрозативного стресу і конститутивного синтезу NO в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів. Введення старим щурам ПГ (11,3 мг/кг) збільшувало вміст H_2S , як в препаратах мітохондрій (у 2,2 рази), так і в гомогенаті тканин (у 1,9 рази) серця, причому такий феномен був значною мірою парадоксальним. При цьому, активність CSE (специфічним блокатором якої є ПГ) істотно знижувалась (в 1,8 і 4,1 рази), а активність 3MST зростала (у 2,4 і 2,5 рази) (рис. 8). Можна припустити, що в умовах зниження активності CSE компенсаторно збільшується активність 3MST, наслідком чого є збільшення вмісту H_2S . Останній зумовлює пригнічення оксидативного стресу. Даний ефект був більш виражений в мітохондріях серця, в яких спостерігали зниження швидкості утворення $\text{O}_2^{\cdot-}$ і $\cdot\text{OH}$ -радикалу, зменшення вмісту H_2O_2 , TxV2, LTC4, ДК та МДА. Зростання активності 3MST та синтезу H_2S призводило до послаблення нітрозативного стресу і відновлення конститутивного синтезу NO в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів.

Таким чином, введення старим щурам ПГ супроводжувалося збільшенням в мітохондріях і гомогенаті серця вмісту H_2S за рахунок зростання активності 3MST. Наслідком цього було пригнічення оксидативного/нітрозативного стресу, відновлення спряження cNOS і посилення конститутивного синтезу NO. Результатом даних біохімічних змін стало покращення діастолічної функції серця у старих тварин.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Таким чином, отримані результати свідчили про зниження вмісту сірководню в тканинах аорти, препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів. В тканинах серця, при цьому, спостерігалися різноспрямовані зміни активності H_2S -синтезуючих ферментів: активність CSE була підвищеною, натомість 3MST – зниженою. Знижений вміст сірководню супроводжувався розвитком як оксидативного (посилення утворення $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2), так і нітрозативного стресу (збільшення активності iNOS, нітрат-редуктази і пулів NO_3^-). Наслідком цього ставало неспряження cNOS (синтез $\text{O}_2^{\cdot-}$ замість NO) і зниження рівня конститутивного синтезу NO (зниження активності cNOS і пулів NO_2^-). Результатом подібних біохімічних змін ставало порушення ендотеліязалежного розслаблення ГМ аорти і розвиток діастолічної дисфункції серця у старих щурів.

Згідно з літературними даними головною причиною порушення ендотеліязалежного розслаблення судин при старінні є зменшення біодоступності основного ендогенного вазорелаксанта – NO – через послаблення синтезу і, навпаки,

інтенсифікацію його деградації, зокрема при оксидативному стресі в результаті збільшення утворення $O_2^{\cdot-}$ (El Assar M. et al., 2012). Пригнічення синтезу NO може бути обумовлено неспряженням cNOS (El Assar M. et al., 2012). Останній фактор виникає в умовах оксидативного і нітрозативного стресу, при окисненні радикалом $O_2^{\cdot-}$ 1) тетрагідробіоптерину – кофактора cNOS (Vasquez-Vivar J. et al., 2003) і 2) глутатіону, із наступним глутатіонуванням молекули cNOS (Galougahi K. K. et al., 2014). Неспрямлена cNOS індукує синтез $O_2^{\cdot-}$ замість NO (Brandes R. P. et al., 2005), що, з одного боку, призводить до зниження продукції NO, а з іншого – до появи хибного (само підсилюючого) кола утворення $O_2^{\cdot-}$ і посилення оксидативного стресу (рис. 9).

Головною причиною діастолічної дисфункції є порушення енергозалежного процесу транспорту Ca^{2+} із міоплазми в саркоплазматичний ретикулум за участі – Ca^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикулума (SERCA) (Taffet G.E., 1993) (рис. 6). Зниження ефективності роботи SERCA спостерігається в умовах пригнічення утворення в мітохондріях АТФ. Останнє має місце, зокрема, при пошкодженні мітохондрій в результаті ПОЛ. Ініціаторами останнього процесу є $\cdot OH$ і $ONOO^-$ (Dai D.F. et al., 2009; Асуїа-Castroviejo D. et al., 2001; Radi R. et al., 1994). Другою причиною діастолічної дисфункції при старінні може бути знижена біодоступність NO в тканинах серця і викликана цим підвищена чутливості міофіламентів міокарда до іонів Ca^{2+} (Pfitzer G. et al., 1982).

У наших дослідженнях як донор NaHS, так і ПГ (останній – неочікувано) істотно відновлювали ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти. Встановлений односпрямований ефект був обумовлений здатністю цих агентів пригнічувати оксидативний/нітрозативний стрес, відновлювати спряження cNOS і посилювати конститутивний синтез NO (рис. 9).

Відомо, що антиоксидантні властивості H_2S ґрунтуються на його здатності пригнічувати утворення активних форм кисню і активних форм азоту (Muzaffar S. et al., 2008), очищувати від них внутрішньоклітинне середовище – виступати у якості “скавенджера” (Al-Magableh M.R. et al., 2014) – та збільшувати активність ендогенних антиоксидантних ферментів (Benetti L.R. et al., 2013). Дані щодо впливу ПГ на оксидативний/нітрозативний стрес дуже обмежені, однак нещодавно з’явилися перші докази про здатність цієї сполуки зменшувати утворення $O_2^{\cdot-}$, знижувати інтенсивність ПОЛ (Dam V.P., 2012), а також посилювати активність ендогенного антиоксиданту, гем-оксигенази-1 (Oosterhuis N.R., 2015).

Введення NaHS і ПГ старим щурам відновлювало також і діастолічну функцію серця. Це було обумовлено збільшенням вмісту H_2S , що супроводжувалось пригніченням оксидативного/нітрозативного стресу, відновленням спряження cNOS і посиленням конститутивного синтезу NO. Особливої уваги заслуговує факт збільшення вмісту H_2S під дією ПГ. Даний ефект був, очевидно, опосередкований пригніченням активності CSE (специфічним блокатором якої є ПГ) і зростанням (можливо компенсаторно), активності другого H_2S -синтезуючого ферменту – 3MST. Цікаво, що згідно з певними даними саме 3MST-залежний H_2S здатен зумовлювати збільшення тривалості життя (Qabazard B. et al., 2014).

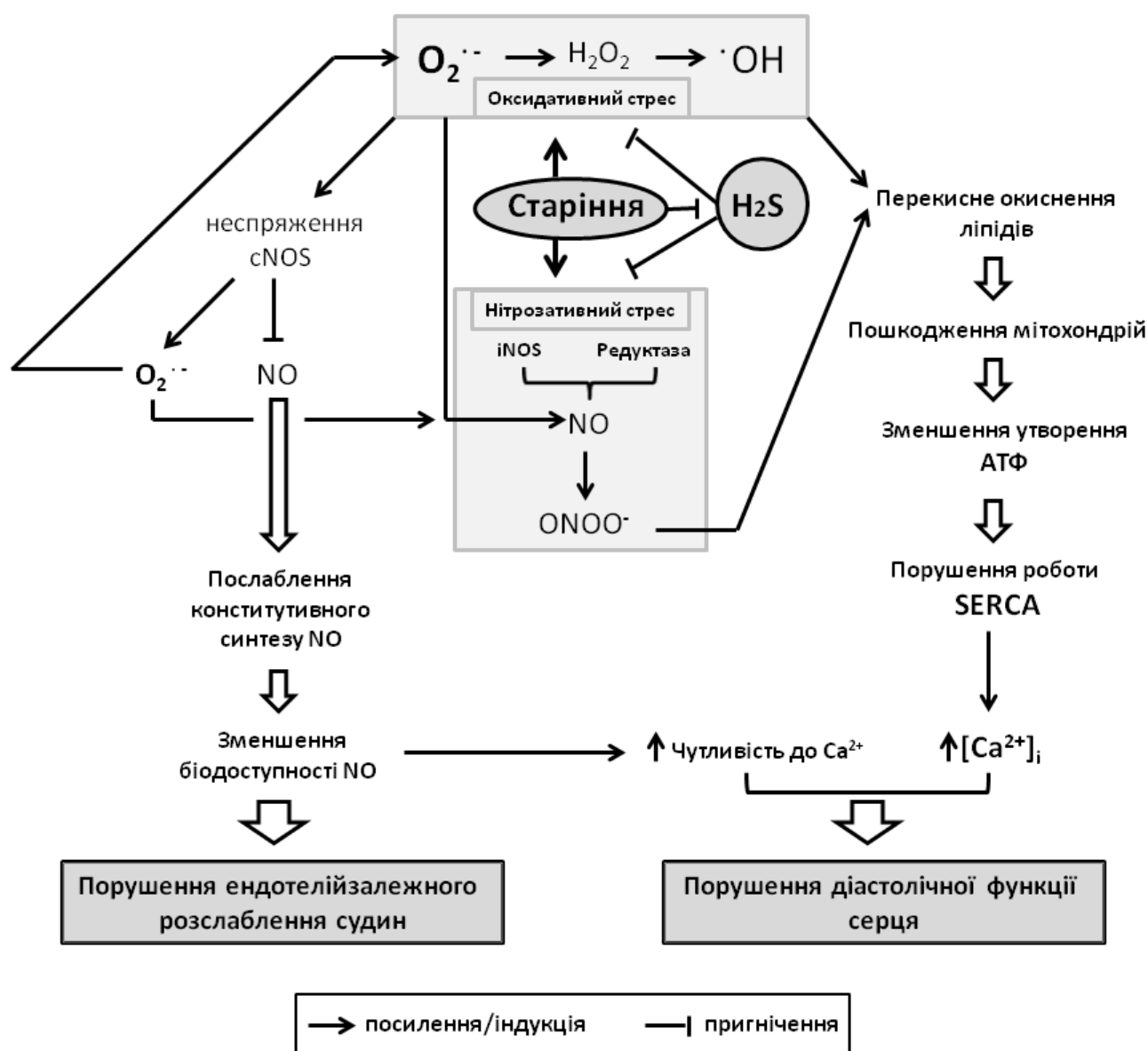


Рис. 9. Механізми порушення ендотелійзалежного розслаблення судин і діастолічної функції серця при старінні та вплив сірководню (H₂S)

ВИСНОВКИ

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

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

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

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

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

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

6. Вплив NaHS і пропаргілгліцину на діастолічну функцію серця обумовлений їх здатністю збільшувати в препаратах мітохондрій і гомогенаті тканин серця старих щурів вміст ендогенного H_2S , пригнічувати оксидативний/нітрозативний стрес, відновлювати спряжений стан cNOS і посилювати конститутивний синтез NO.

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

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

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ СТАТТІ:

1. Bondarenko A.I. N-Arachidonoyl glycine suppresses Na^+/Ca^{2+} exchanger-mediated Ca^{2+} entry into endothelial cells and activates BK(Ca) channels independently of GPCRs / A.I. Bondarenko, K. Drachuk, O. Panasiuk, V. Sagach, A.T. Deak, R. Malli, W.F. Graier. // Br. J. Pharmacol. – 2013. – V. 169. – № 4. – P. 933-48. (Особисто дисертантом проведені фізіологічні дослідження, аналіз літератури та оформлення результатів дослідження).

2. Драчук К.О. Пропаргілгліцин відновлює ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти у старих щурів / К.О. Драчук, А. В. Коцюруба, О.В. Базілюк, Л.Г. Степаненко, В.Ф. Сагач // Фізіол. журн. – 2014. – Т. 60 – № 4. – С. 3-11. (Особисто дисертантом проведені фізіологічні дослідження, статистичний аналіз, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).

3. Дорофєєва Н.О. Кардіогемодинаміка та ефективність механізму Франка-Старлінга у щурів за умов старіння / Н.О. Дорофєєва, К.О. Драчук, В.Ф. Сагач // Фізіол. журн. – 2014. – Т. 60. – № 6. С. 22-27. (Особисто дисертантом проведені фізіологічні дослідження, аналіз літератури, інтерпретація отриманих результатів та підготовка статті до друку).

4. Drachuk K.O. Propargylglycine Restores Endothelium-Dependent Relaxation of Aortic Smooth Muscle in Old Rats / K.O. Drachuk, A.V. Kotsuruba, O.V. Bazilyuk, L.G. Stepanenko, V.F. Sagach // *Int. J. Phys. Pathophysiol.* – 2015. – V. 6. – I. 3. – P. 203-212. (Особисто дисертантом проведені фізіологічні дослідження, аналіз літератури, інтерпретація отриманих результатів, формулювання висновків та підготовка статті до друку).

5. Dorofeyeva N.A. Cardiohemodynamics and Efficiency of Frank-Starling Mechanisms in Aging / N.A. Dorofeyeva, K.O. Drachuk, V.F. Sagach // *Int. J. Phys. Pathophysiol.* – 2015. – V. 6. – I. 4. – P. 1-12. (Особисто дисертантом проведені фізіологічні і біохімічні дослідження, аналіз літератури та інтерпретація отриманих результатів).

6. Драчук К.О. Вплив модуляції синтезу H₂S пропаргілгліцином на показники кардіогемодинаміки у старих щурів / К.О. Драчук, Н.О. Дорофєєва, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач // *Фізіол. журн.* – 2015. – Т. 61. – № 4. – С. 35-40. (Особисто дисертантом проведені фізіологічні і біохімічні дослідження, статистичний аналіз, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).

7. Драчук К.О. Донор сірководню NaHS відновлює конститутивний синтез NO та ендотелійзалежне розслаблення в аорті старих щурів / К.О. Драчук, Н.О. Дорофєєва, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач // *Фізіол. журн.* – 2015. – Т. 61. – № 6. – С. 3-11. (Особисто дисертантом проведені фізіологічні і біохімічні дослідження, статистичний аналіз, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).

8. Drachuk K.O. Propargylglycine as A Possible Factor of The Diastolic Function Restoration in Old Rats / K.O. Drachuk, N.A. Dorofeyeva, A.V. Kotsuruba, V.F. Sagach // *Int. J. Phys. Pathophysiol.* – 2016. – V.7. – I. 3. – P. 213-220. (Особисто дисертантом проведені фізіологічні і біохімічні дослідження, статистичний аналіз, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).

9. Drachuk K.O. Effect of Sodium Hydrosulfide (NaHS) on Oxidative/Nitrosative Stress and Endothelium-Dependent Relaxation in Old Rats / K.O. Drachuk, A.V. Kotsuruba, V.F. Sagach // *Int. J. Phys. Pathophysiol.* – 2016. – V.7. – I. 4. – P. 321-329. (Особисто дисертантом проведені фізіологічні і біохімічні дослідження, статистичний аналіз, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).

10. Drachuk K.O. The role of hydrogen sulfide in diastolic function restoration during aging / K.O. Drachuk, N.A. Dorofeyeva, V.F. Sagach // *Fiziol Zh.* – 2016. – Т. 62. – № 6. (Особисто дисертантом проведені фізіологічні і біохімічні дослідження, статистичний аналіз, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).

ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ:

1. Драчук К.О. Дослідження кардіогемодинаміки та гетерометричної регуляції серця у старих щурів *in vivo* / К.О. Драчук, Н.О. Дорофєєва, В.Ф. Сагач // *Матеріали V міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених – Вінниця.* – 2014. – С.13-14.

2. Драчук К.О. Ингибирование цистатионин-γ-лиазы увеличивает эндотелийзависимое расслабление гладких мышц аорты старых крыс / К.О. Драчук, А.В. Коцюруба, Ф.В. Добровольский, Сагач В.Ф. // *Материалы VIII международной*

научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования». – Витебск. – 2014. – С.207-209.

3. Дорофеева Н.О. Вплив тривалого фізичного навантаження на показники кардіогемодинаміки щурів зі спонтанною гіпертензією / Н.О. Дорофеева, С.О. Таланов, К.О. Драчук, В.Ф. Сагач // XIX з'їзд українського фізіологічного товариства з міжнародною участю. – Львів. – Фізіол. журн. – 2014. – 60(3, додаток). – С.86-87.

4. Драчук К.О. Парадоксальні ефекти інгібітора синтезу сірководню / К.О. Драчук, А.В. Коцюруба, Н.А. Струтинська, В.Ф. Сагач // XIX з'їзд українського фізіологічного товариства з міжнародною участю. – Львів. – Фізіол. журн. – 2014. – 60(3, додаток). – С.89.

5. Drachuk K.O. Inhibition of cystathionine gamma-lyase increases endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscles in old rats / K.O. Drachuk, A.V. Kotsjuruba, V.F. Sagach // 3rd International Conference on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine. – Kyoto. – Nitric Oxide. – 2014. – 39. – P.35–36.

6. Drachuk K. Blockade of cystathionine gamma-lyase increases endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscles in old rats / K. Drachuk, A. Kotsjuruba, V. Sagach // Frontiers in Cardiovascular Biology. – Barcelona. – Cardiovasc. Res. –2014. – V. 103. – Suppl. 1.

7. Drachuk K.O. Effect of blocking of the CSE-associated hydrogen sulfide synthesis pathway on cardiohemodynamics in old rats / K.O. Drachuk, N.A. Dorofeyeva, A.V. Kotsjuruba, V.F. Sagach // International student congress of (bio)medical sciences ISCOMS 2015. – Groningen. – 2015.

8. Грицюк І. Вплив фізичних тренувань на ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів грудної аорти у спонтанно гіпертензивних щурів / І. Грицюк, К.О. Драчук, Н.О. Дорофеева // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції Актуальні проблеми сучасної патоморфології та патофізіології. – Запоріжжя. – 2015. – С.43.

9. Драчук К.О. Вплив донора сірководню (NaHS) на ендотелійзалежне розслаблення старих щурів / К.О. Драчук, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач // Матеріали науково-практичної конференції «Ендотеліальна дисфункція при вік-залежній патології: діагностика, профілактика, лікування». – Київ. – Кровообіг та гемостаз. – №1-2. – С.78-79.

10. Sagach V.F. Hydrogen sulfide donor inhibits oxidative and nitrosative stress, cardiohemodynamics disturbances and restores cNOS coupling in old rats / V.F. Sagach, N.A. Dorofeyeva, K.O. Drachuk // Frontiers in Cardiovascular Biology 2016. – Florence. – 2016.

АНОТАЦІЯ

Драчук К.О. Роль сірководню в порушенні функцій серця і судин при старінні. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04. – патологічна фізіологія. – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2016.

Дисертація присвячена встановленню ролі сірководню у розвитку порушення функцій серця і судин при старінні. Встановлено, що у старих щурів порушені ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти, а також – діастолічна функція серця, про що свідчило зниження максимальної швидкості розслаблення (в середньому на 27,4%), збільшення кінцево-діастолічної жорсткості (в 2,1 рази), константи активного розслаблення (в 1,4 рази) міокарду і кінцево-діастолічного тиску (в 3,1 рази) в ЛШ. Дані функціональні зміни супроводжувалися зниженням в препаратах мітохондрій, гомогенаті тканин серця і тканинах аорти вмісту H_2S , розвитком оксидативного/нітрозативного стресу, наслідком чого було неспряження (uncoupling) стану cNOS та послаблення конститутивного синтезу NO.

Застосування за умов старіння NaHS, донора сірководню і пропаргілгліцину, блокатора CSE-залежного шляху синтезу H_2S , в значній мірі відновлювало ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти (ефект був обумовлений дією ендогенного NO) та діастолічну функцію серця.

В основі фізіологічного ефекту NaHS і ПГ на функцію судин лежить їх здатність збільшувати в досліджуваних тканинах вміст H_2S (за виключенням дії пропаргілгліцину в тканинах аорти), пригнічувати оксидативний/нітрозативний стрес, відновлювати спряжений стан cNOS і посилювати конститутивний синтез NO. Пропаргілгліцин збільшував вміст H_2S в тканинах серця старих щурів через компенсаторне підвищення активності 3MST.

Ключові слова: старіння, сірководень, пропаргілгліцин, оксид азоту, оксидативний/нітрозативний стрес, неспряження cNOS, ендотелійзалежне розслаблення, діастолічна функція.

АНОТАЦІЯ

Драчук К.О. Роль сероводорода в нарушении функций сердца и сосудов при старении. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04. – патологическая физиология. – Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена исследованию роли сероводорода в нарушении функции сердца и сосудов при старении. Сократительную активность гладких мышц аорты регистрировали тензометрическим методом, а показатели кардиогемодинамики *in vivo* – с помощью микрокатетера 2F (Millar Instruments, США), который вводили через правую сонную артерию ретроградно в левый желудочек, что позволяло одновременно регистрировать сигналы давления-объема, с визуализацией кривых зависимости этих величин на протяжении сердечного цикла. В тканях аорты, препаратах митохондрий и гомогенате тканей сердца определяли содержание H_2S , показатели, характеризующие интенсивность оксидативного- (скорость образования $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ -радикала, пулы H_2O_2 , диеновых конъюгатов, тромбксана В2, лейкотриена С4, мочевого, арахидоновой кислоты), нитрозативного стресса (активность iNOS, нитрат-нитрит редуктазы, аргиназы, пулы NO_3^-), конститутивного синтеза NO (активность cNOS, пулы NO_2^-), состояние

сопряжения cNOS (по индексу сопряжения – активность cNOS/скорость образования $O_2^{\cdot-}$).

Было установлено, что у старых крыс (22-24 мес) по сравнению со взрослыми молодыми (6-8 мес) существенно нарушено как эндотелийзависимое расслабление гладких мышц аорты (амплитуда снижена в 5 раз), так и диастолическая функция сердца. На последние указывало снижение максимальной скорости расслабления (на 27,4%), увеличение конечно-диастолической жесткости (в 2,1 раз), константы активного расслабления (в 1,4 раз) миокарда и конечно-диастолического давления (в 3,1 раз) в левом желудочке. Данные функциональные изменения сопровождались снижением в препаратах митохондрий, гомогенате тканей сердца и тканях аорты содержания сероводорода, развитием оксидативного/нитрозативного стресса, следствием чего было несопряжение cNOS и угнетение конститутивного синтеза NO.

Как донор сероводорода (NaHS) так и блокатор CSE-зависимого пути его синтеза (пропаргилглицин) существенно улучшали эндотелийзависимое расслабление аорты и диастолическую функцию сердца старых крыс.

В основе физиологического эффекта NaHS и пропаргилглицина на функцию сердца и сосудов была их способность увеличивать в исследуемых тканях содержание H_2S (за исключением действия пропаргилглицина в тканях аорты), существенно угнетать оксидативный/нитрозативный стресс, восстанавливать состояние сопряжения cNOS и усиливать конститутивный синтез NO. Пропаргилглицин увеличивал содержание H_2S в препаратах митохондрий и гомогенате тканей сердца путем компенсаторного повышения активности 3MST.

Ключевые слова: старение, сероводород, пропаргилглицин, оксид азота, оксидативный/нитрозативный стресс, несопряжение cNOS, эндотелийзависимое расслабление, диастолическая функция.

SUMMARY

K.O. Drachuk. Role of the hydrogen sulfide on heart- and blood vessels dysfunction during aging. – Manuscript.

Thesis for a candidate of medical science degree by speciality 14.03.04. – pathological physiology. – Bogomoletz Institute of Physiology of the NAS of Ukraine, Kyiv, 2016.

The thesis is devoted to the study of the impacts of hydrogen sulfide on heart- and blood vessels dysfunction during aging. It was found that old rats have impairment both endothelium-dependent relaxation of smooth muscles and diastolic function of the heart. The last was confirmed by a decrease in the maximum rate of left ventricle pressure decline (dp/dt_{min}) by 27,4%, an increase in end-diastolic stiffness (by 2,1 times), an increase in the time constant of left ventricular relaxation (Tau_g) by 1,4 times and an increase in left ventricular end-diastolic pressure (by 3,1 times). These functional disorders were accompanied by a decrease of H_2S pools in the mitochondria-, homogenate of the heart and aorta tissue. It has been also revealed that a combined oxidative and nitrosative stress develops in the heart of old rats, leading to cNOS uncoupling and decline of the constitutive NO synthesis.

It was found that both NaHS, H₂S donor and propargylglycine (PAG), cystathionine-γ-lyase-dependent pathway of H₂S synthesis inhibitor, largely improves endothelium-dependent relaxation of smooth muscles (via NO action) and diastolic function in old rats. The molecular mechanisms of NaHS and PAG action include the increase of H₂S pools (excepting PAG action in the aorta tissue), inhibition of the oxidative/nitrosative stress, restoration of the cNOS coupling and reduction of the constitutive NO synthesis. PAG increased H₂S level in the heart tissue via compensatory stimulation of the other H₂S synthesizing enzyme – 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АХ – ацетилхолін;
ГМ – гладенькі м'язи;
ДК – дієнові кон'югати;
КДЖ – кінцево-діастолічна жорсткість;
КДТ – кінцево-діастолічний тиск;
ЛШ – лівий шлуночок;
МДА – малоновий діальдегід;
НА – норадреналін;
ПГ – пропаргілглїцин;
cNOS – конститутивна NO-синтаза;
CSE – цистатіонін-γ-ліаза;
dP/dt_{min} – максимальна швидкість зниження тиску;
H₂O₂ – гідрогену пероксид;
H₂S – сірководень;
iNOS – індукцйбельна NO-синтаза;
L-NAME – та N-Нітро-L-аргїнін-метилестергїдрохлорид;
LTC₄ – лейкотрієн C₄;
3MST – 3-меркаптопіруват-сульфуртрансфераза;
NO – оксид азоту;
O₂·⁻ – супероксидний радикал;
·OH – гідроксильний радикал;
ONOO⁻ – пероксинїтрит;
SERCA – Ca²⁺-АТФ-аза саркоплазматичного ретиулулу;
Tau g – константа активного розслаблення міокарду;
TxB₂ – тромбоксан B₂

ДЛЯ НОТАТОК