

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ НАН УКРАЇНИ

ФЕДІЧКІНА РАЇСА АНДРІЇВНА

УДК 612.17 + 577.23

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

03.00.13 – фізіологія людини та тварини

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис

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

Науковий керівник:

член-кор. НАНУ, д.м.н., професор

Сагач Вадим Федорович

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

завідувач відділу фізіології кровообігу

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор

Янчук Петро Іванович

професор кафедри фізіології людини і тварин

ННЦ «Інститут біології та медицини»,

Київського національного університету ім. Тараса Шевченка

доктор біологічних наук, професор

Коваленко Станіслав Олександрович

професор кафедри анатомії, фізіології та фізичної реабілітації

Черкаський національний університет імені Богдана Хмельницького

Захист відбудеться: « 21 » вересня 2021 року о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

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

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

Автореферат розіслано «20» серпня 2021 року

Вчений секретар

Спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01

кандидат біологічних наук

О.П.Любанова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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

Найпоширенішими серцево-судинними патологіями є інфаркт та ішемічна хвороба серця. За даними ВООЗ на ішемічну хвороба серця припадає більше половини всіх смертей в європейському регіоні [6]. Ішемічна хвороба призводить до кисневого голодування тканин, що може мати наслідком структурні порушення, аритмії, погіршення скоротливої функції серця, некроз кардіоміоцитів. Відсутність повноцінного кровообігу утруднює не лише постачання поживних речовин, а й виведення метаболітів з клітин. Часткова або повна ішемія тканин та органів зустрічається не лише під час патологій, але й в надзвичайних ситуаціях, при операціях з трансплантування тощо [7]. Реперфузія – відновлення кровопостачання і надходження кисню в ішемізовані тканини. Це часто призводить до різкого зростання утворення вільних радикалів, накопичення активних форм кисню (АФК) та ще більшого пошкодження клітин через активацію перекисного окиснення ліпідів, білків, ацидозу, пошкодження ДНК та мембран органел клітини, в першу чергу

мітохондрій [8,9]. Швидка наробка АФК є результатом неефективного кисневого метаболізму, а пошкодження цілісності мембран мітохондрій призводить до масового відкриття мітохондріальних пор транзиторної проникності і активації апоптозу або некрозу. У відповідь на збільшення концентрації АФК активуються антиоксидантні системи, однак при тривалих ішемічних епізодах та інфаркті спостерігається знижена активність каталази, супероксиддисмутази, глутатіон редуктази та виснаження пулів відновленого глутатіона [10,11]. Тому пошук шляхів активації антиоксидантного захисту та інгібування відкриття мітохондріальних пор є важливим медико-біологічним завданням.

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

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

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в межах наукової тематики відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Вивчення ролі мітохондрій в реакціях серцево-судинної системи при різних функціональних станах організму» (2010-2013, № держ.реєстрації 0109U005359), «Дослідження ролі сигнальних сполук сірки в реакціях серцево-судинної системи щурів при різних станах організму» (2014-2018, № держ. реєстрації 0113U007276), «Дослідження ролі систем сірководню і глутатіону в серцево-судинній реактивності в нормі і патології» (2019-2023, № держ. реєстрації 0118U007352).

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

Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

1. Дослідити вплив L-цистеїну та модуляції шляхів його метаболізму шляхом введення інгібіторів синтезу сірководню та глутатіону на реакцію серця на навантаження об'ємом.

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

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

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

Методи дослідження: перфузія коронарних судин ізольованого серця щурів за методом Лангендорфа та реєстрація скоротливої активності лівого шлуночка в умовах навантаження серця об'ємом та моделювання ішемії-реперфузії; вимірювання парціального тиску кисню, розрахунок артеріо-венозної різниці, споживання кисню і кисневої вартості роботи серця; спектрофотометричне дослідження відтікаючих від ізольованого серця розчинів; спектрофотометричне визначення показників оксидативного та нітрозативного стресу, а також вмісту H_2S в тканинах серця; кількісне визначення вмісту глутатіонів відновленого та окисненого в тканинах серця за допомогою кінетичної реакції, статистичний аналіз результатів.

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

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

Ми показали, що введення препарату екзогенного глутатіону підчас реперфузії зменшувало постішемичне порушення функції серця, а стимуляція ендogenous синтезу глутатіону шляхом модуляції метаболізму L-цистеїну можливе та має

великий науковий та клінічний потенціал в умовах ішемічного пошкодження міокарду.

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

Особистий внесок здобувача.

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

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

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

У
о
и
п
g

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

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

t
s
.

P
1-

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури окреслено сучасні уявлення про синтез та метаболізм амінокислоти L-цистеїну, її функції в організмі. Описано роль двох продуктів метаболізму L-цистеїну, сірководню та глутатіону, в функціонуванні серцево-судинної системи загалом та в умовах ішемії-реперфузії зокрема.

Методичні підходи. В даній роботі було використано фізіологічні та біохімічні методи досліджень, що дозволило отримати комплексну інформацію про внесок різних шляхів метаболізму L-цистеїну в реакціях серця на навантаження об'ємом і відновлення його функції в умовах ішемії-реперфузії. В роботі вивчали залежність розвинутого тиску від об'єму в лівому шлуночку ізольованого серця як модель функціонального навантаження і будували відповідні криві (закон Франка-Старлінга). Моделювали ішемію-реперфузію міокарда і реєстрували скоротливу функцію серця, його кисневий обмін, оцінювали ступінь проникності мітохондріальних мембран, генерацію АФК та показники оксидативного і нітрозативного стресу, вміст глутатіону.

Експериментальні тварини. Експерименти проводили у відповідності до Директиви 2010/63/EU Європейського парламенту про захист тварин, що використовуються для наукових цілей (22.09.2010) та Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (редакція від 13.02.20). Використовували дорослих (6 місяців) самців щурів лінії Wistar.

Протокол дослідження. На першому етапі вивчали вплив різних шляхів метаболізму L-цистеїну на реалізацію закону Франка-Старлінга. Для цього вводили L-цистеїн (121 мг/кг) як попередник синтезу глутатіону та H_2S ; блокували синтез H_2S цистатіонін- γ -ліази пропаргілгліцином (PAG, 11,3 мг/кг); а синтез глутатіону de novo бутатіонінсульфоксиміном (BSO, 22,2 мг/кг) - інгібітором гама-глутамілцистеїнліази. Хімічні речовини, розчинені в 0,4 мл води для ін'єкцій, вводили внутрішньочеревинно. Дослідних тварин розподілили на групи: 1) інтактні, 2) PAG за 40 хв до декапітації, 3) PAG+L-цистеїн за 40 та 30 хв відповідно, 4)BSO за 40 хв, 5) BSO+PAG+L-цистеїн відповідно за 41, 40 та 30 хв і досліджували показники скоротливої активності міокарда за умови дозованого збільшення об'єму в лівому шлуночку.

На другому етапі в аналогічних групах тварин вивчали функцію ізольованого серця в умовах ішемії-реперфузії. Для третього етапу тканини сердець для біохімічних досліджень забирали до та на 10 хвилині реперфузії.

На четвертому етапі вивчали вплив екзогенного глутатіону (Гепавал, Україна) на ступінь відновлення функції серця в умовах ішемії-реперфузії. Глутатіон 10 мг/л розчиняли в перфузуючому розчині і подавали в коронарні судини в період реперфузії. Для вивчення накопичення екзогенного глутатіону в тканинах розчин глутатіону в дозі 52 мг/кг вводили внутрішньоочеревинно за 10 хв та 30 хв до декапітації.

У тканинах сердець досліджували зміни рівнів супероксидного аніон-радикалу ($O_2^{\cdot-}$), $\cdot OH$ -радикалу, пероксиду водню (H_2O_2) і малонового діальдегіду як маркерів окисного стресу. Визначали активність конститутивної та індукційної NOS, аргінази та нітратредуктази, концентрації відновленого та окисленого глутатіонів.

Перфузія коронарних судин за методом Лангендорфа і реєстрація показників кардіодинаміки ізольованого серця. Перфузію коронарних судин здійснювали ретроградно в умовах постійного тиску (75-80 мм рт.ст.) при температурі $37^{\circ}C$ і аерації карбогеном (95% O_2 і 5% CO_2) розчином наступного складу (у мМ): NaCl – 118; KCl – 4,7; $MgSO_4$ – 1,2; $NaHCO_3$ – 24; KH_2PO_4 – 1,2; глюкоза – 10; $CaCl_2$ – 2,5. Тиск у порожнині лівого шлуночка ($T_{лшл}$) та швидкість його зміни dP/dt_{max} і dP/dt_{min} , кінцевий діастолічний тиск (КДТ) вимірювали за допомогою латексного балончика, введеного в порожнину лівого шлуночка та з'єднаного з тензодатчиком 746 („Мінгограф-82”, Elema, Швеція). Реєстрація даних параметрів здійснювалась за допомогою програмного забезпечення Global Lab у вигляді кривих тиску в лівому шлуночку та його першої похідної. В легеневий стовбур вставляли катетер і вимірювали коронарний потік (КП) за допомогою мірних пробірок. Підраховували частоту серцевих скорочень (ЧСС).

Для оцінки кисневих показників роботи серця реєстрували напругу кисню у пробах розчину, що притікав і відтікав від серця, за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk-2 Radiometer, Copenhagen. Розраховували споживання кисню як добуток артеріо-венозної різниці і КП, кисневу вартість роботи серця (КВ) за рівнянням Нілі [Neely J.R. 1972], інтенсивність скоротливої функції серця (ІСФ) як добуток тиску у лівому шлуночку на ЧСС.

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

Моделювання ішемії–реперфузії здійснювали шляхом повного припинення перфузії коронарних судин протягом 20 хв. Зміни досліджуваних показників реєстрували протягом 40 хв. подальшої реперфузії.

Вміст окисненого і відновленого глутатіонів в тканинах сердець оцінювали з використанням реактиву Еллмана [Rahman I. 2006]. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі.

Вивчення показників окисного метаболізму в тканинах серця. Інтенсивність окисного метаболізму у гомогенатах сердець щурів оцінювали за зміною швидкості генерації нестабільних активних форм кисню – супероксидного аніон-радикалу ($O_2^{\cdot-}$) і $\cdot OH$ -радикалу, за рівнем присутності пероксиду водню (H_2O_2) і кінцевого продукту перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) – малонового діальдегіду.

Оцінка показників, що характеризують систему синтезу оксиду азоту. Інтенсивність de novo генерації NO оцінювали за активністю кальційнезалежної (iNOS) та кальційзалежної (cNOS) NO-синтаз, вмістом нітрит-аніону (NO_2^-) і нітрат-аніону (NO_3^-). Інтенсивність реутилізаційного синтезу NO оцінювали, визначаючи

нітратредуктазну активність за змінами вмісту нітрат-аніону в інкубаційному середовищі в присутності надлишку NADH. Аргіназну активність визначали спектрофотометричним методом. Цитрулін, що є маркером генерації NO, визначали спектрометричним методом.

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

Результати досліджень та їх обговорення

Вплив L-цистеїну та модуляції його метаболізму на реакцію серця на навантаження. Приймаючи до уваги, що донор H_2S NaHS значно покращує реалізацію закону Франка-Старлінга [Shymans`ka T.V. 2012], ми припустили, що L-цистеїн, як попередник синтезу H_2S і глутатіону, буде мати стимулюючий ефект на скоротливу активність міокарда за умов навантаження об'ємом. Для визначення цього щурам вводили L-цистеїн, інгібітор CSE – PAG [Gadalla M.M. 2010], або їх комбінацію.

L-цистеїн змінював реакцію серця на навантаження об'ємом – збільшував здатність міокарду до розслаблення і подовжував плато кривої тиску, що розвиває лівий шлуночок зі збільшенням об'єму (Рис.1А). Ми припустили, що цей ефект може бути наслідком впливу сірководню або глутатіону, попередником синтезу яких є L-цистеїн. Для визначення цього ми вводили L-цистеїн на фоні блокаторів синтезу сірководню – PAG і глутатіону – BSO у різних комбінаціях.

Для виявлення ефекту L-цистеїну, незалежного від продукції H_2S , вводили блокатор синтезу сірководню PAG у комбінації з L-цистеїном. Це супроводжувалось як потужною інотропною стимуляцією і довшим плато кривої тиску, що розвивав лівий шлуночок, так і повільним, порівняно з контролем, зростанням кінцево-діастолічного тиску (Рис. 1.Б). $T_{\text{лшл}}$ зростав до $154 \pm 5,2$ мм рт.ст. починаючи з 135 мкл до 170 мкл доданого об'єму балончика ($133,6 \pm 6,7$ мм рт.ст. у контролі, $P < 0,01$) і залишався таким до 235 мкл ($108 \pm 3,4$ мм рт.ст. у контролі, $P < 0,001$). Подальше збільшення об'єму балончика не давало приросту сили скорочення.

Істотних змін кривих КДТ між усіма групами не спостерігалось; однак серця з групи PAG + L-цистеїну демонстрували меншу жорсткість – найменший приріст КДТ під час навантаження об'ємом. Таким чином, комбінація PAG та L-цистеїну продемонструвала кумулятивний інотропний ефект обох сполук, збільшуючи приріст $T_{\text{лшл}}$ на початку навантаження об'ємом лівого шлуночка та розширюючи плато кривої $T_{\text{лшл}}$ в кінцевій точці.

Введення самого блокатору без L-цистеїну не мало такого тривалого ефекту (Рис.1А), а інгібування перетворення L-цистеїну на глутатіон за допомогою BSO скасовувало попередні позитивні ефекти (PAG+L- цистеїну).

Для оцінки ролі глутатіону у відповіді серця на навантаження шурам вводили BSO, інгібітор першого ферменту синтезу глутатіону [Griffith O.W. 1982]. У групі, з попереднім введенням BSO, Тлшл не суттєво відрізнявся від контрольних значень і становив в середньому $142 \pm 10,0$ мм рт.ст. при 135 мкл доданого об'єму (Рис. 2). Однак крива КДТ різко зростала зі збільшенням об'єму: при 135 мкл об'єму балончика КДТ в середньому становив $85,4 \pm 6,0$ мм рт. Це свідчило про втрату еластичності міокардом в умовах інгібування синтезу глутатіону.

Введення PAG + L-цистеїну на тлі BSO показало значне покращення функції серця порівняно з групою BSO. Реєстрували не тільки подовження плато кривої Тлшл але й збереження ефективності розслаблення. Ці дані підтверджують припущення про збільшення еластичності міокарда після введення PAG + L-цистеїну.

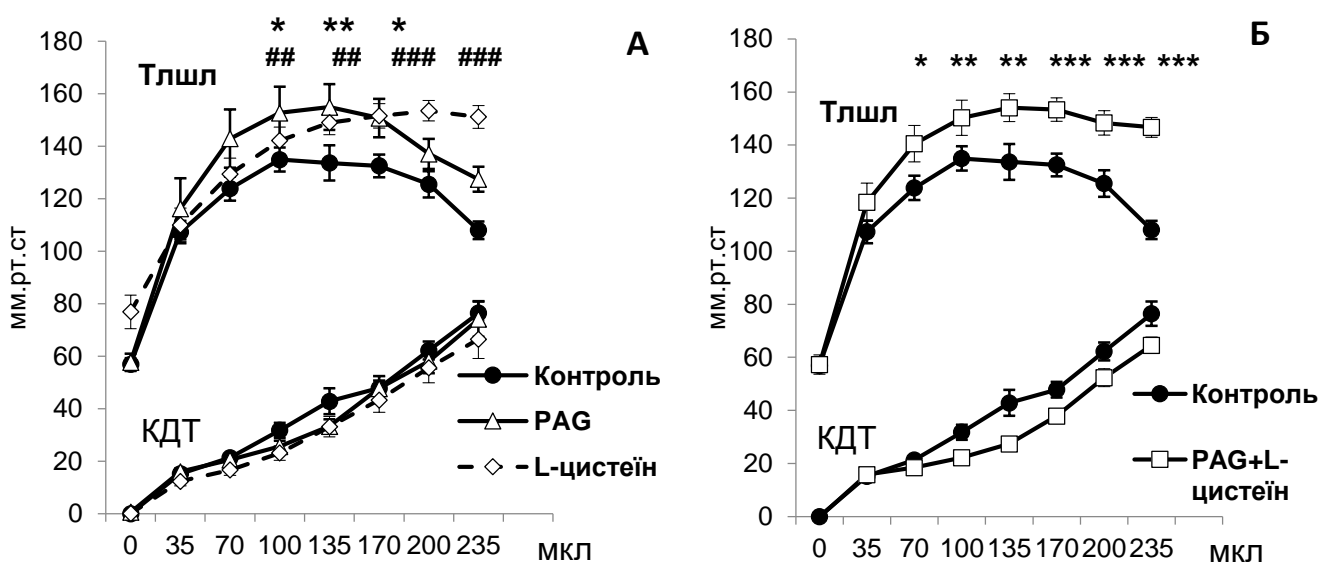


Рис. 1. Вплив навантаження об'ємом на тиск, що розвиває лівий шлуночок (Тлшл) та кінцевий діастолічний тиск (КДТ) ізолюваного серця шурів. А – з попереднім введенням PAG, L-цистеїну або Б – PAG + L-цистеїну. Тут і надалі дані представлені як середні значення \pm DS. Порівняння між групами проводили за допомогою тесту Крускала-Воліса. * різниця порівняно з контролем, # різниця між L-цистеїном та контрольною групою.

Наші результати показали, що комбіноване введення PAG та L-цистеїну істотно збільшувало функціональні резерви міокарда у відповідь на дозоване навантаження об'ємом. Фермент CSE є цитоплазматичним джерелом H_2S у клітині, але не єдиним. Іншим ферментом, що продукує H_2S , є MPST, що працює в парі з CAT. Ми припустили, що в наших експериментах PAG інгібував шлях CSE утилізації L-цистеїну та збільшував біодоступність L-цистеїну для CAT, що, в свою чергу, активувало MPST. З іншої сторони, інгібування CSE за допомогою PAG також

спрямовувало L-цистеїн на шлях виробництва глутатіону. Можливим механізмом його впливу є як пряма здатність GSH до усунення АФК, так і глутатіоніювання кальцієвих каналів. Активація синтезу глутатіону супроводжувалася потужним антиоксидантним ефектом, який був обумовлений підвищенням активності конститутивної NO-синтази на фоні пригнічення утворення АФК в тканинах серця.

Цей висновок ми перевіряли на моделі потужного оксидативного стресу, яким виступає ішемія-реперфузія міокарда.

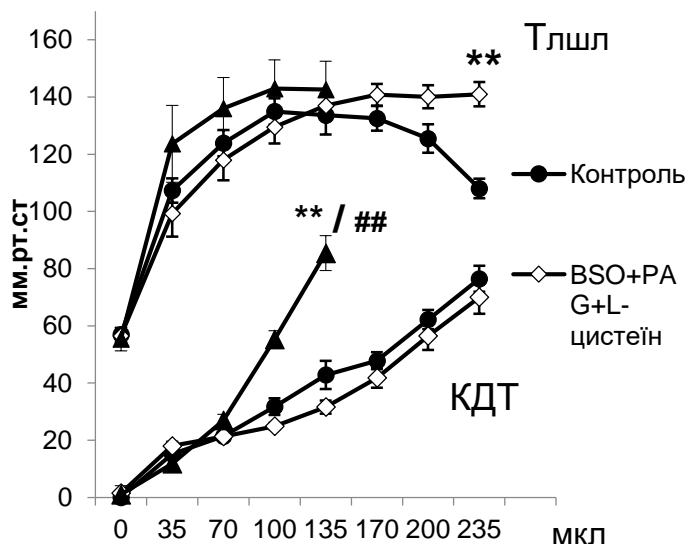


Рис.2. Криві зміни розвинутого ($T_{лшл}$) та кінцево-діастолічного тиску (КДТ) ізолюваного серця щурів при дозовому розтягуванні лівого шлуночка.

($n \geq 5$ на групу, ** $P < 0,01$ порівняно з контролем, ## $P < 0,01$ порівняно з BSO + PAG + L-цистеїновою групою)

Вплив L-цистеїну та модуляції шляхів його метаболізму на відновлення функції серця та зміну кисневих показників міокарда в умовах ішемії-реперфузії. Одним з рушіїв реперфузійного пошкодження серця є вибухоподібне зростання концентрації АФК в клітинах. Відомо, що як L-цистеїн [Tang L.D. 1991], так і H_2S та GSH мають антиоксидантні властивості. Нашою метою було виявлення антиоксидантного впливу різних метаболітів L-цистеїну та ступеню їх внеску у відновлення функції серця в умовах ішемії-реперфузії.

В контрольній серії дослідів 20 хв ішемія та наступна реперфузія спричинювали істотне пригнічення скоротливої функції серця та погіршення здатності міокарду до розслаблення (Рис.3.А). Зокрема, на 15 хв ішемії відмічали зростання КДТ, який в кінці ішемічного період становив в середньому 45 мм рт.ст., що вказує на сильний пошкоджуючий ефект ішемії, ймовірно, через перевантаження Ca^{2+} . Група з введенням PAG+L-цистеїн демонструвала відсутність контрактири та повне відновлення тиску, що розвивав лівий шлуночок і здатності до розслаблення в реперфузійний період (Рис.3.Б). Цей позитивний вплив повністю відмінявся попереднім введенням інгібітора синтезу глутатіону BSO (Рис.3.В).

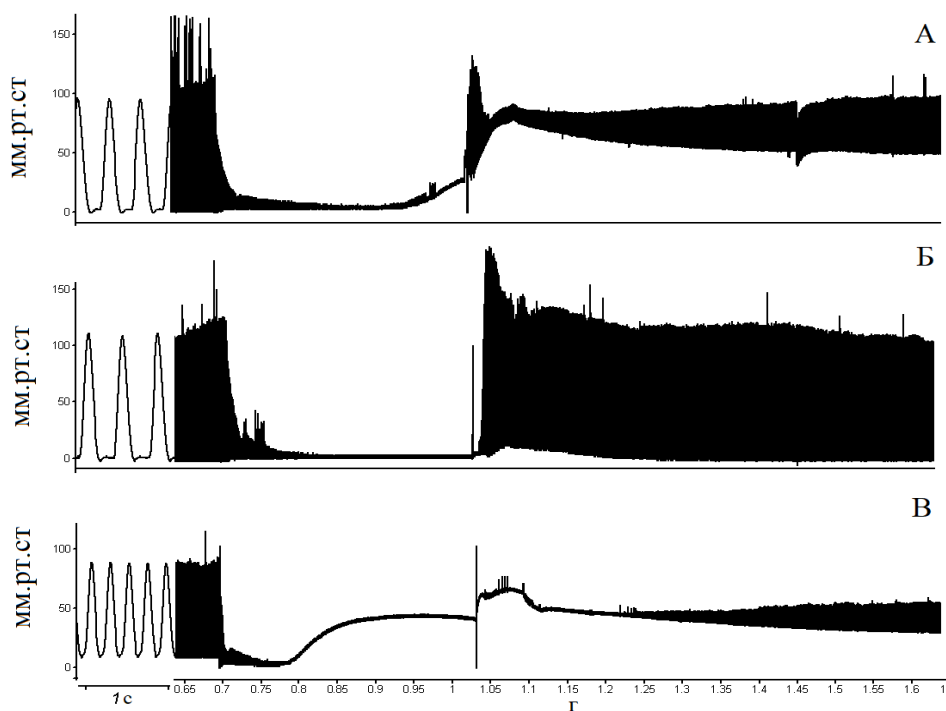


Рис. 3. Вплив ішемії-реперфузії на зміни розвинутого тиску в лівому шлуночку ізольованого серця щурів.

А – контрольний експеримент,

Б – з введенням PAG+L-цистеїну,

В – з введенням BSO+PAG+L-цистеїну.

Для оцінки здатності функції серця до відновлення під час реперфузії, дані були перераховані у відсотках відносно початкової точки кожного експерименту. В контрольній групі до 40-ї хв реперфузії $T_{\text{шлл}}$, а також коронарний потік відновлювались лише до 59% (Рис. 4.А,Г), а величини швидкості скорочення та розслаблення міокарда dP/dt зменшились удвічі (Рис. 4. В). Це свідчить про втрату серцем здатності виконувати свою функцію. Постішемичні порушення функції серця супроводжувались змінами метаболізму кисню в тканинах міокарда. На 10-й хв реперфузії КВ збільшилась до $238,9\% \pm 11,7\%$ (рис.4.Г), що свідчило про неефективне використання кисню міокардом. Попереднє введення L-цистеїну у вибраній дозі (121 мг/кг) виявило тенденцію до поліпшення відновлення серцевої діяльності в умовах ішемії-реперфузії. Значення $T_{\text{шлл}}$ на 10-й хв реперфузії становило $52,5\% \pm 15,5\%$, а на 40-й хв зростало до $61,6\% \pm 6,5\%$ (рис. 3.4.А). L-цистеїн суттєво покращував КДТ (рис. 3.4.Б). Значення КВ на 10-тій хв реперфузії становило $216,1\% \pm 23,5\%$ з подальшим зменшенням до $133,0\% \pm 6,8$ на 40-й хв реперфузії (рис.4.Г).

Наші експерименти показали, що ішемічна контрактура не спостерігалася в жодному з експериментів групи з введенням PAG + L-цистеїну (рис.4.А-В). Введення цієї комбінації препаратів попереджало розвиток реперфузійних порушень усіх досліджуваних параметрів функції серця. На 10-й хв реперфузії $T_{\text{шлл}}$ відновився до $106\% \pm 3,8\%$ порівняно з $42,7\% \pm 21,3\%$ у контрольній групі ($P < 0,01$) (Рис. 4А), а величина КДТ в реперфузійний період не відрізнялась від початкового рівня. Скоротлива активність міокарду була значно кращою, ніж в контролі протягом всього періоду реперфузії. На 10-й хв dP/dt_{max} становив $104,0\% \pm 3,0\%$, а dP/dt_{min} - $93,5\% \pm 4,0\%$ порівняно з $42,8\% \pm 20,7\%$ та $38,8\% \pm 24,2\%$ відповідно у контрольній групі ($P < 0,01$) (рис. 4.Г). На 10-й хв реперфузії КВ роботи серця збільшилась лише на 34% ($P < 0,03$).

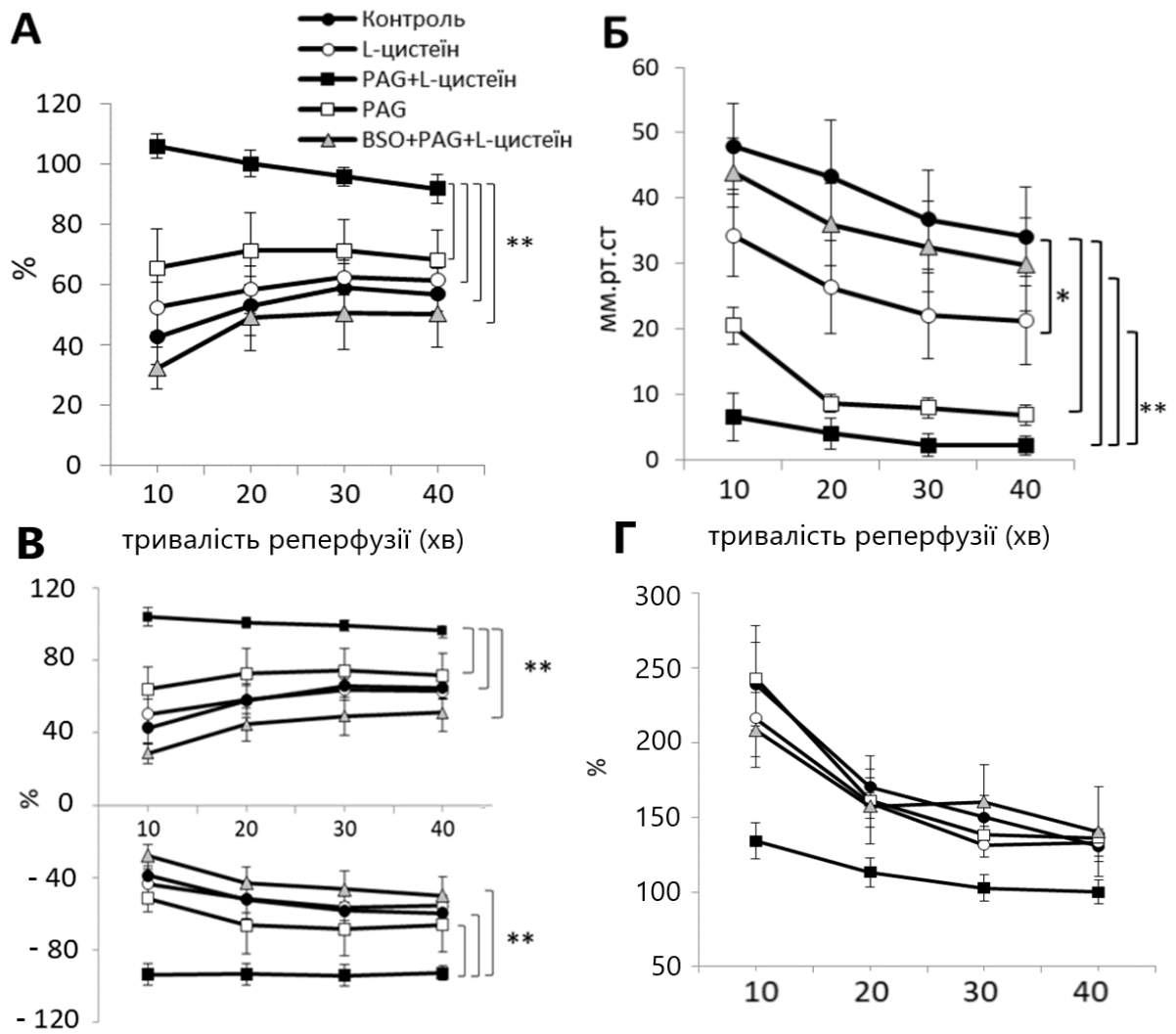


Рис. 4. Зміни показників кардіодинаміки та кисневої вартості роботи ізольованого серця щурів в умовах ішемії-реперфузії. А – тиск, що розвивав лівий шлуночок, Б – кінцево-діастолічний тиск, В – швидкість розслаблення та скорочення міокарду, Г – киснева вартість роботи серця. ** $P < 0,01$ порівняно з контролем, ## $P < 0,01$ порівняно з BSO + PAG + L-цистеїновою групою)

Ці дані вказують на більш ефективне використання кисню серцевими тканинами у випадку попереднього введення PAG + L-цистеїну порівняно з контрольною групою. Кисень, поглинутий тканинами серця, використовувався електрон-транспортним ланцюгом та клітиною в цілому для реалізації функції ферментів, акцепції електронів з формуванням молекули води, а не для утворення АФК. Таким чином, застосування L-цистеїну на тлі інгібування синтезу сірководню за допомогою PAG перед ішемією чинило потужний кардіопротекторний вплив, що дозволяв серцю з легкістю справлятися з руйнівними наслідками реперфузії.

Нещодавно Хуанг та співавт. продемонстрували кардіопротекторні властивості S-пропаргіл-цистеїну як нового модулятора ендогенного H_2S [Huang C. 2013]. Вважається, що S-пропаргіл-цистеїн є субстратом для CSE, що збільшує H_2S і зменшує розмір інфаркту та покращує серцеву функцію у моделі серцевої

недостатності щурів [Huang C. 2013, Kan J. 2011]. Ми припустили, що один із можливих способів кардіопротекторного ефекту комбінації PAG та L-цистеїну в наших експериментах може бути зумовлений залученням L-цистеїну в *de novo* утворення глутатіону. Ми провели експерименти з інгібітором синтезу глутатіону *de novo*, BSO, щоб перевірити це припущення. Механізм клітинного виснаження глутатіону через вплив BSO - це регулювання рівня глутатіону S-трансферази та інгібування глутамат-цистеїн-лігази [Masubuchi Y. 2011]. Наші результати показали, що кардіопротекторний ефект комбінації PAG+L-цистеїн повністю скасовувався додаванням BSO (Рис.4.А-В). Таким чином, глутатіон, виступав основним пусковим механізмом кардіопротекції, опосередкованої PAG + L-цистеїном.

Перевантаження мітохондріального Ca^{2+} з подальшим відкриттям мітохондріальних пор транзиторної проникності (МРТР), набуханням мітохондрій, вивільненням цитохрому С, апоптозом та некрозом кардіоміоцитів є фактором, що викликає порушення функції серцево-судинної системи [Halestrap A.P. 2010, Del Re D.P. 2019]. Раніше наші колеги продемонстрували, що утворення МРТР супроводжується збільшенням оптичної щільності перфузуючого розчину, зібраного протягом першої хвилини реперфузії ізольованого серця, в ультрафіолетовій ділянці спектру [Nadtochiy S.M. 1994]. Ця суміш речовин має мітохондріальне походження, оскільки їх вивільнення інгібується циклоспорином А, що блокує відкриття МРТР або ішемічним попереднім кондиціонуванням [Nadtochiy S.M. 1994, Hoshovs'ka IV 2011, Shimanskaia TV 2013]. На Рис.5 показано, що оптична щільність розчину, зібраного протягом 1-ї хв. реперфузії, була максимальною при 250 нм у всіх групах, а в групі з L-цистеїном істотно не відрізнялася від такої в контрольній групі ($0,586 \pm 0,069$ ум. од.). PAG+L-цистеїном суттєво зменшив пік оптичної щільності ($0,423 \pm 0,023$ ум. од. проти $0,529 \pm 0,034$ ум. од. у контрольній групі, $P < 0,05$), що корелювало з його величинами в групі з попереднім введенням PAG ($0,448 \pm 0,056$ ум. од.). Однак цей ефект був відсутній у групі BSO+ PAG+L-цистеїн ($0,528 \pm 0,026$ ум. од.).

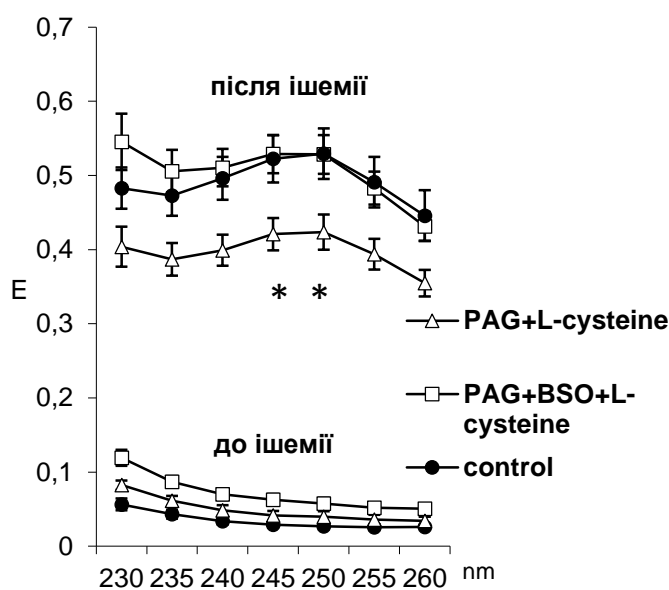


Рис.5. Зміни оптичної густини відтікаючих від серця на 1-й хв. реперфузії перфузуючих розчинів.

* $P < 0,05$ порівняно з контролем

Таким чином, PAG+L-цистеїн створює фармакологічну передумову кардіопротекції інгібуючи відкриття МРТР. Можливим механізмом такого впливу є стимулювання роботи антиоксидантних систем, а саме глутатіонової системи. Ріст КДТ, падіння Тлшл, підвищення оптичної щільності відтікаючих розчинів, що спостерігалось при блокаді синтезу глутатіону BSO, вказує на порушення кальцієвого гомеостазу, розвиток окисного стресу та

порушення цілісності мітохондрій. Тоді як стимуляція ендogenous синтезу глутатіону повністю попереджала розвиток реперфузійних порушень міокарда та зберігала функціональну здатність мітохондрій.

Вплив L-цистеїну та модуляції шляхів його метаболізму на окисно-відновний стан тканин міокарда в нормі та за умов ішемії-реперфузії. Кардіопротекторна дія L-цистеїну на тлі блокади синтезу сірководню була виявлена вже з раннього періоду реперфузії. Це підтверджувалося величинами біохімічних показників оксидативного та нітрозативного стресу, які ми вимірювали у тканинах серця.

Ішемія-реперфузія серця призводила до розвитку окисного стресу (табл. 1).

Спостерігалось значне збільшення швидкості утворення гідроксильних (OH-) радикалів та супероксидних аніонів (O_2^-), збільшення вмісту дієнових кон'югатів в 2,4 рази свідчило про посилення переокисного окиснення ліпідів в тканинах серця після моделювання ішемії-реперфузії. Примітно, що рівні H_2S були значно підвищені завдяки збільшенню активності H_2S -синтази (CSE + CBS). Крім того, негативні зміни спостерігались у системі NO. Активність конститутивного синтезу NO, що відображує активність обох конститутивних синтаз нейрональної та ендотеліальної (cNOS = nNOS + eNOS), зменшилась у 5,5 разів. Як результат, зниження NO (рівні NO_2) супроводжувалося порушенням релаксації міокарда та помітним підвищенням КДТ під час ішемії. Одночасне збільшення активності iNOS та швидкості утворення супероксидного аніона (O_2^-) призвело до подвійного збільшення кінцевого продукту розкладання пероксинітриту - нітратного аніона (NO_3^-). Таким чином, наші результати свідчили про розвиток індукованого ішемією-реперфузією окислювального та нітрозативного стресу внаслідок істотного збільшення швидкості утворення OH- та O_2^- радикалів, підвищення рівня H_2S на фоні зменшення конститутивного синтезу NO.

Ймовірно, в умовах інгібування синтезу H_2S , екзогенний та/або ендogenous L-цистеїн стає більш доступним для синтезу глутатіону. Завдяки цьому процесу співвідношення між окисленою та відновленою формою глутатіону повинно змінюватися, збільшуючи рівні відновленого глутатіону. Це може активувати антиоксидантний захист та сприяти спряженню cNOS [Chen C.-A. 2010]. Дійсно, активність cNOS була підвищена в групі з попереднім введенням PAG+L-цистеїну, що, ймовірно, сприяло підтримці рівня NO навіть в реперфузійний період (таблиця 1). При цьому ми не відзначили збільшення активності iNOS, і відповідно не було підвищення рівня NO_3^- . Важливо зазначити, що NO який виробляється cNOS інгібує відкриття MPTP [Shimanskaia T.V. 2009], що надзвичайно важливо в умовах ішемії-реперфузії. Таким чином, механізми кардіопротекції, опосередкованої PAG+L-цистеїну полягали в ефективній профілактиці утворення АФК та збереженні синтезу NO шляхом інгібування роз'єднання cNOS індукованого ішемією-реперфузією.

Таблиця 1

Вплив L-цистеїну на фоні інгібування синтезу H₂S на біохімічні показники тканин серця в контрольних умовах та при ішемії-реперфузії.

	Контроль (n=8)	I/R ₁₀ (n=10)	PAG+L-cysteine (n=5)	PAG+L-cysteine+I/R ₁₀ (n=7)
·O ₂ ⁻ , нмоль мГ ⁻¹ хв ⁻¹	2.63±0.08	8.72±0.57***	1.61±0.05***	2.37±0.11###
·OH ⁻ , ум.од.	2.28±0.28	8.87±0.53***	2.02±0.02	3.76±0.12###
H ₂ O ₂ , пікомоль мГ ⁻¹	0.79±0.04	2.27±0.26***	0.69±0.02	1.15±0.11##
Дієнові коньюгати, нг мГ ⁻¹	3.59±0.25	8.84±0.48***	0.92±0.12***	5.24±0.63###
Активність cNOS, пікомоль мГ ⁻¹ хв ⁻¹	7.51±0.19	1.36±0.09***	8.57±0.30*	2.38±0.34##
Активність iNOS, пікомоль мГ ⁻¹ хв ⁻¹	2.64±0.15	7.07±0.20***	1.68±0.04***	3.86±0.26###
NO ₂ ⁻ , пікомоль мГ ⁻¹	361.86±17.94	131.59±12.29***	440.19±5.28**	343.4±5.17###
NO ₃ ⁻ , наномоль мГ ⁻¹	10.92±0.21	22.27±0.88***	5.24±0.13***	9.95±0.40###
H ₂ S, пікомоль мГ ⁻¹	17.56±1.26	96.80±7.90***	14.56±0.77	29.23±0.86###
Активність (CSE+CBS), пікомоль H ₂ S мГ ⁻¹ хв ⁻¹	8.80±0.22	30.15±2.95***	7.71±0.11**	16.48±0.81##

Контрольні серця перфузували за методом Лангендорфа 15-20 хв. *P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 vs контроль ## P<0.01, ### p<0.001 vs I/R за результатами тесту ANOVA з поправкою Тукі.

Попереднє введення інгібітора синтезу глутатіону BSO повністю відміняло антиоксидантний ефект PAG+L-цистеїн (Рис.6).

Ішемія-реперфузія при введенні L-цистеїну на фоні інгібування обох шляхів його метаболізму супроводжувалась розвитком окисного стресу на рівні з показниками контрольної ішемії-реперфузії міокарда. Деяко меншою була лише кількість пероксиду водню, на рівні з групою з введенням лише PAG+L-цистеїну (Рис.6.). Гідроксильний радикал та супероксидний аніон на фоні введення BSO+PAG+L-цистеїн досягли значень реперфузійного періоду контрольної групи, так само як і продукти переокисного окиснення ліпідів – МДА та ДК.

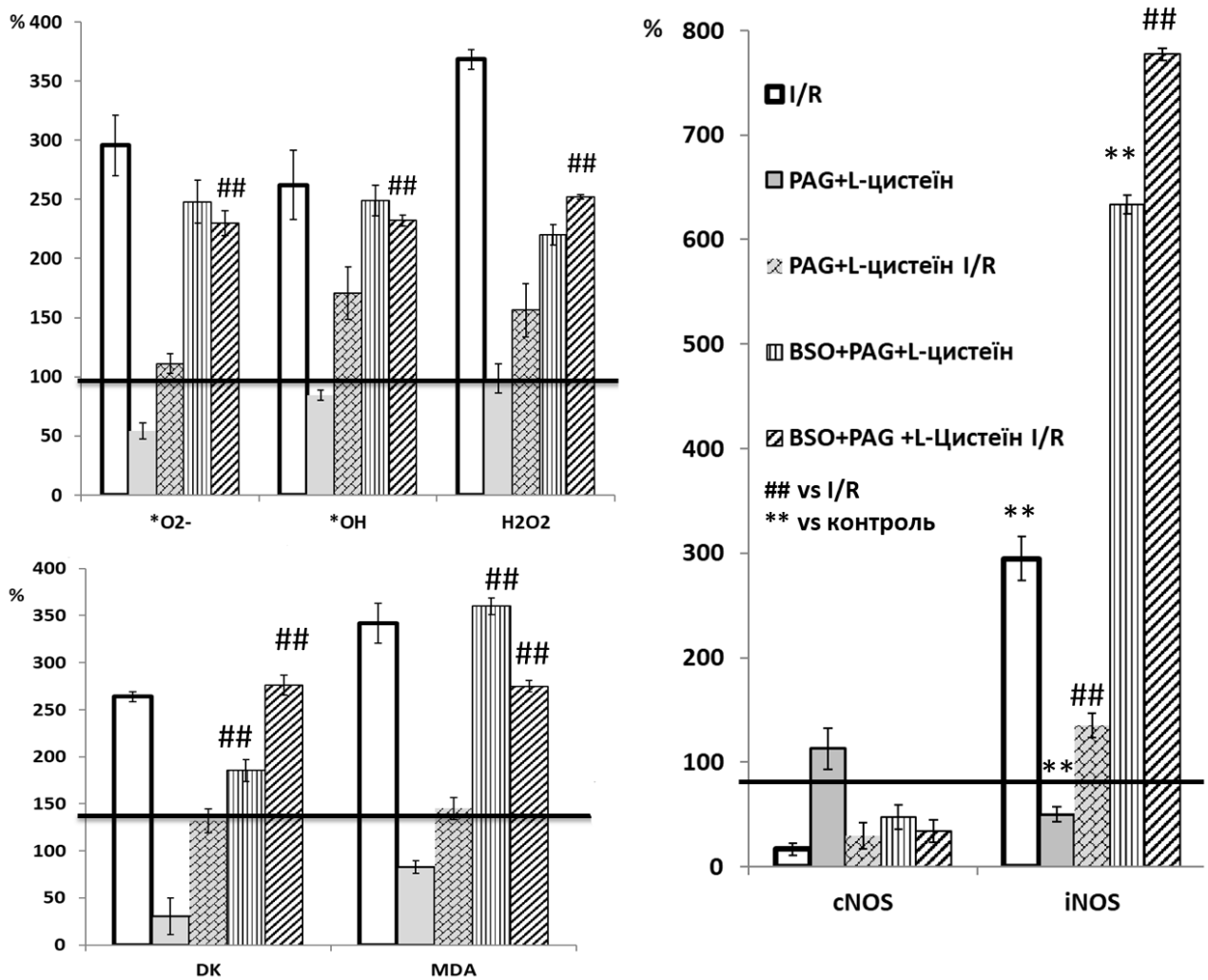


Рис. 6. Вплив інгібування синтезу H₂S та GSH з L-цистеїну на показники окисного стресу та рівень H₂S в тканинах серця щурів до та після моделювання ішемії-реперфузії. Дані переведено в відсотки відносно показників контрольної ішемії-реперфузії.

Цікаво, що зросли рівні H₂S в тканинах серця як до, так і після ішемії. Вірогідно, це пов'язано з тим, що присутність доданого екзогенного L-цистеїну стимулювала синтез H₂S мітохондріальними ферментами. Але кількість була недостатньою для забезпечення кардіопротекторного механізму. При цьому активність cNOS стала близькою до реперфузійного рівню контрольної групи, а рівень активності iNOS зріс в 2,5 і 3 рази до і після ішемії відповідно. Це свідчить про порушення в синтезі NO і може бути причиною розвитку реперфузійної контрактури міокарду.

Таким чином дані наших біохімічних досліджень свідчали, що кардіопротекторний ефект введення L-цистеїну на тлі блокаді синтезу H₂S супроводжувався попередженням розвитку окисного стресу і перекисного окиснення ліпідів, стимуляцією активності cNOS та інгібуванням iNOS в реперфузійний період.

Логічно припустити, що тригером всіх позитивних змін, які ми спостерігали, було істотне збільшення глутатіону, що синтезувався з L-цистеїну.

Зміни глутатіону відновленого та окисненого в умовах модуляції метаболізму L-цистеїну в нормі та за умов ішемії-реперфузії. Ми показали, що введення PAG+L-цистеїну різко підвищувало вміст відновленого та окисненого глутатіону в 2,5 рази відносно контрольних значень (Рис.7). Ми вважаємо, що саме істотне збільшення пулу глутатіонів дозволило міокарду відновити свою роботу в період реперфузії повністю внаслідок відсутності розвитку окисного і нітрозотативного стресів.

Наші результати свідчали, що в групі з введенням PAG + L-цистеїну значно зростали пули GSH та GSSG (Рис.7).

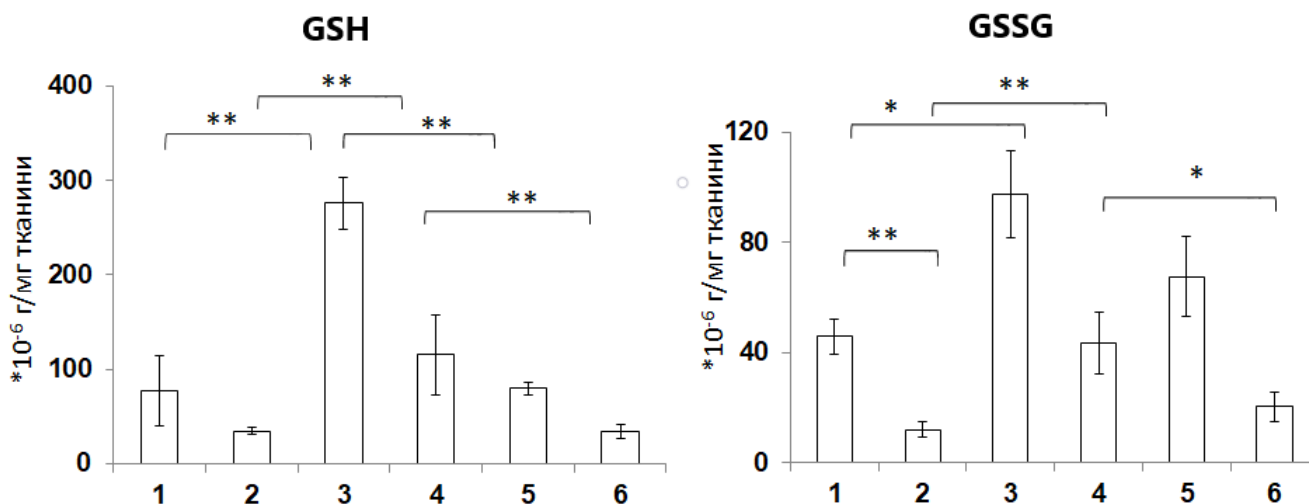


Рис. 7. Зміна рівнів відновленого та окисненого глутатіонів в тканинах серця за умов модуляції метаболізму L-цистеїну до та після ішемії. 1 – контроль, 2 – I/R, 3 – PAG+L-цистеїн, 4 - PAG+L-цистеїн+I/R, 5 – BSO+PAG+L-цистеїн, 6 - BSO+PAG+L-цистеїн+ I/R *P<0.05, **P≤0.01, ***P≤0.001

Додавання BSO до цієї комбінації повертало концентрацію глутатіонів до значень співставних з контрольними, що цілком корелює з даними наших фізіологічних експериментів на моделі ізольованого за Лангендорфом серця та зниженням показників окисного стресу в тканинах серця. GSH надзвичайно реакційно здатний антиоксидант, молекула може приєднуватись до білків по -SH групам – аглутатіонілювати їх. Відомо, що глутатіонілювання інгібує активність оксидаз, таким чином знижуючи наробку АФК в реперфузійний період і захищає ферменти, в тому числі АТФ-азу, від окисного пошкодження.

Глутатіонілювання каналів SERCA [Adachi T. 2004, Pol A. van der, 2019] підвищує активність транспорту Ca²⁺ з цитоплазми в саркоплазматичний ретикулум, таким чином запобігаючи перевантаженню кальцієм клітини. Якщо кількість глутатіонілюваних каналів зменшується, результатом стане порушення здатності до розслаблення, швидкого зростання КДТ, що демонструють серця групи з введенням комбінації BSO + PAG + L-цистеїну. Взаємодія GSH з АФК безпосередньо регулює окисно-відновний баланс в клітині, що в умовах ішемічно-реперфузійного пошкодження функції серця має кардіопротекторний ефект.

Таким чином, результати наших досліджень напряду підтвердили, що блокада синтезу сірководню на фоні введення L-цистеїну спричиняло потужний кардіопротекторний ефект за рахунок посиленої продукції глутатіону, 3-х кратний рівень якого дозволяв запобігти розвитку окисного стресу при ішемії-реперфузії та успішно зберегти функцію серця.

Вплив посткондиційного введення екзогенного глутатіону на функцію ізольованого серця.

Ранній період реперфузії має визначальне значення для динаміки відновлення функції серця, оскільки саме в цей час до ішемізованих тканин надходить кисень та поживні речовини. Саме тому введення потенційних кардіопротекторних засобів одразу на реперфузії може бути експериментальним тестом, що наближений до реальних клінічних умов. Відомо, що введення донорів глутатіону має кардіопротекторний ефект. Так, введення N-ацетил-L-цистеїну допомагає в відновленні тиску при гіпертензії [Tang L.D. 1991], відновлює вміст GSH на фоні інфаркту міокарда та серцевої недостатності мишей [Adamy C. 2007, Pol A. van der, 2019]. В мітохондріях сердець, підданих впливу ішемії-реперфузії, знижується вміст GSH, що може сприяти окисненню цитохром-оксидази C і розвитку мітохондріальної дисфункції [Anderson M.F. 2002]. Існують свідчення що препарат комбінації попередників глутатіону «Елтацин» підвищує вміст GSH в крові, а Гепавал пригнічує запальний процес [Звягинцева Т.Д. 2017, Заславская Р.М. 2007]. Препарат Гепавал містить відновлену форму глутатіону, а коригування зниженого вмісту GSH важливе впродовж початкового періоду реперфузії, що може забезпечити нормальне відновлення функції серця після ішемії.

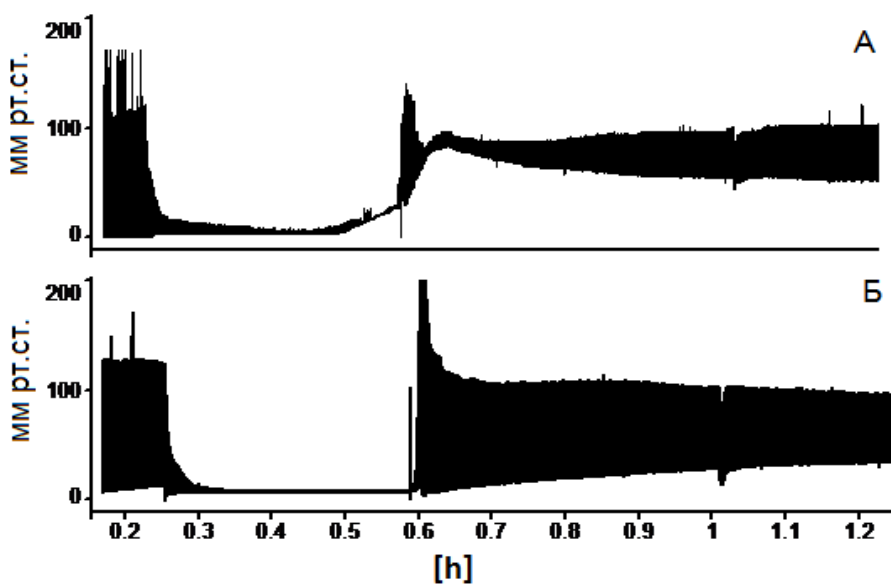


Рис.8. Нативні криві зміни тиску у лівому шлуночку за умов ішемії та 40 хв реперфузії.

А – контрольний експеримент

Б – з введенням препарату відновленого глутатіону

Ми спостерігали захисну дію екзогенного глутатіону на міокард при його посткондиційному застосуванні (Рис.8 Б). Вводили глутатіон з перфузуючим

розчином з початку перфузії серця після ішемії. Функція міокарда при цьому відновлювалася значно краще ніж в контрольній групі, особливо у начальному періоді (Рис.9). Тиск в лівому шлуночку на 40-й хв реперфузійного періоду становив 56% від вихідних величин порівняно з 30,9% у контрольній серії ($P < 0.05$) (Рис.9.А).

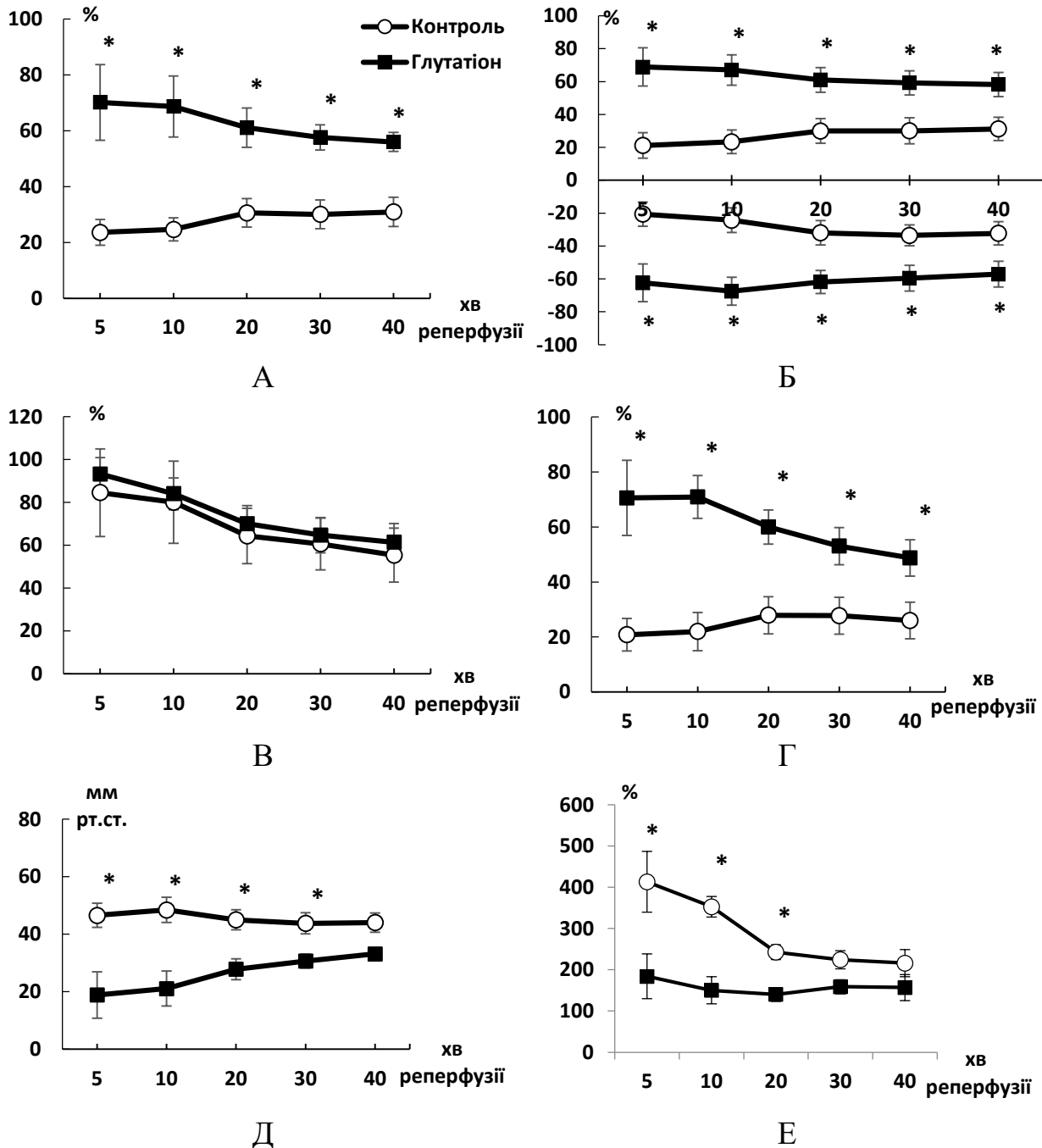


Рис.9. Вплив посткондиціювання препаратом глутатіону на показники кардіодинаміки ізолюваного серця щурів під час реперфузії: А – тиск у лівому шлуночку, Б – швидкість скорочення та розслаблення міокарду, В – коронарний потік, Г – інтенсивність скоротливої функції, Д – кінцево-діастолічний тиск, Е – киснева вартість роботи міокарда. * $P < 0.05$

Швидкість скорочення і розслаблення міокарда та ефективність споживання кисню міокардом були вищими у дослідних серцях, а КДТ зростав неістотно порівняно з контрольною групою. Ці дані підтверджують внесок глутатіону в

оптимізацію процесів розслаблення і більш ефективну продукцію енергії в міокарді серця, оскільки зростання КДТ і погіршення дилатації розвиваються внаслідок перевантаження кардіоміоцитів кальцієм і неможливістю відкачування його у внутрішньоклітинні депо через дефіцит АТФ.

Додатковим підтвердженням позитивної дії препарату глутатіону було значне зниження вивільнення мітохондріального фактора від ішемізованого серця (Рис.10). Отже, одним із механізмів реалізації кардіопротекторної дії глутатіону може виступати інгібування утворення МПТП.

Таким чином, введення екзогенного глутатіону мало кардіопротекторний вплив і попереджувало розвиток реперфузійного порушення скоротливої функції і кисневого метаболізму міокарда ізолюваного серця щурів. Це було обумовлено поліпшення дилатаційних властивостей, процесів спряження окислення і синтезу АТФ, реалізацією антиоксидантної дії препарату гепавал.

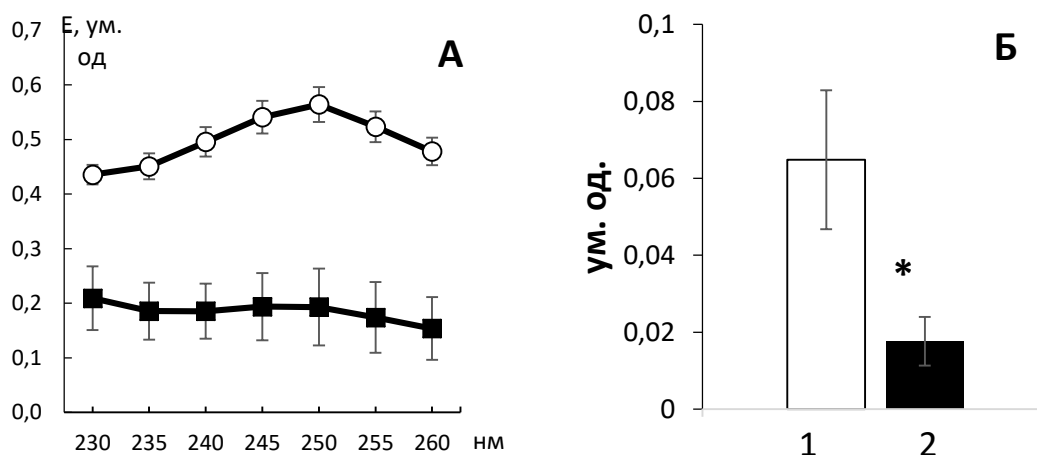


Рис.10. Оптичні щільності розчинів (А), що відтікали від ізолюваного серця та рівень мітохондріального фактора (Б) після ішемії в контрольній серії (1) та при постішемічному введенні глутатіону (2). * $P < 0.05$

З метою перевірки чи накопичується екзогенний глутатіон тканинами серця *in vivo* препарат глутатіону вводили в концентрації 52 мг/кг. Рівень GSH достовірно зростав в 1,5 рази через 30 хв після введення препарату ($P < 0,05$) (Рис.11А). Це дає підстави вважати, що препарат із крові поглинається органами, в тому числі і міокардом.

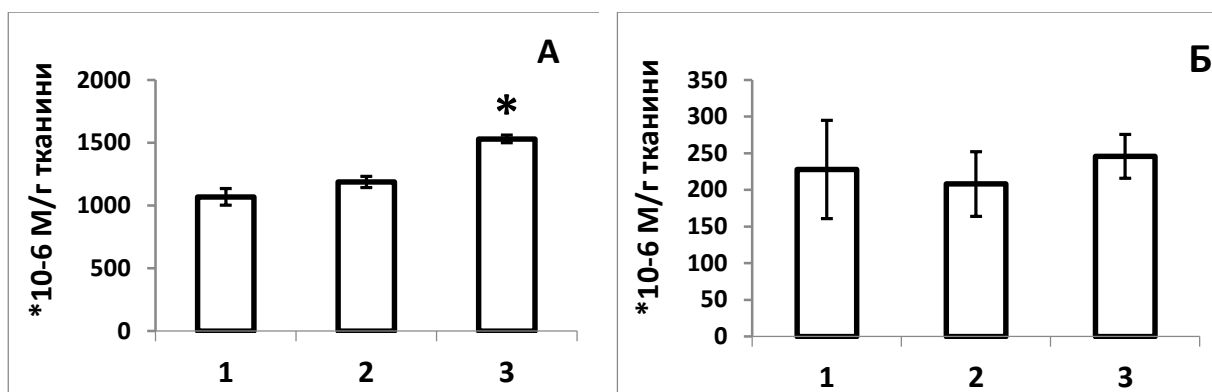


Рис.11. Вміст відновленої (А) та окисленої (Б) форми глутатіону в тканинах серця контрольних щурів (1), після введення препарату глутатіону за 10 хвилин (2) та за 30 хвилин (3) до деканітації. * $P < 0,05$ проти контролю

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

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено вплив модуляції метаболізму L-цистеїну на реакцію серця дорослих статевозрілих щурів на навантаження. Було досліджено вплив блокаторів перетворення L-цистеїну на H₂S та GSH окремо та разом на реалізацію закону Франка-Старлінга та на відновлення функції серця в умовах ішемії-реперфузії. Було проведено біохімічні дослідження для з'ясування змін в активності ензимів, вмісту АФК, GSH та GSSG.

1. Спрямовування перетворення L-цистеїну по шляху синтезу глутатіону за допомогою введення PAG блокатору H₂S-синтезуючого ферменту CSE в 2,5 рази підвищувало ендogenous синтез глутатіону. Це істотно збільшувало функціональні резерви міокарда в умовах навантаження серця об'ємом, що супроводжувалося потужним антиоксидантним ефектом, обумовленим підвищенням активності конститутивної NO-синтази на фоні пригнічення утворення АФК в тканинах серця.
2. Введення L-цистеїну на фоні блокади альтернативного шляху його перетворення у сірководень за допомогою PAG, супроводжувалося потужним кардіопротекторним ефектом при ішемії-реперфузії, що проявлявся в повному відновленні скоротливої активності міокарда, збільшенні ефективності утилізації спожитого кисню, пригніченні утворення МРТР, яке обумовлювало збереження функції мітохондрій.

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

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

В яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Sagach VF, Shimanskaya TV, Goshovska YV, **Dobrovolska RA** Effects of Stimulation and Blockade of Endogenous Hydrogen Sulfide Synthesis in Myocardial Ischemia-Reperfusion // International Journal of Physiology Pathophysiology – 2014. – v5. – І 3. – p. 221-230.
2. **Добровольська Р.А.**, Гошовська Ю.В., Шиманська Т.В., Сагач В.Ф. Вплив різних шляхів метаболізму L-цистеїну на резистентність міокарда до ішемії-реперфузії // Вісник ВНМУ.- 2014.- 18 , №2.- С. 372-375.
3. **Raisa A. Fedichkina**, Yulia V. Goshovska, Vadym F. Sagach Cardioprotective effect of H₂S and glutathione synthesis modulation is mediated by inhibition mitochondrial permeability transition pore opening // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2020; 83:74–82. <https://doi.org/10.30970/vlubs.2020.83.09>
4. **Р.А. Федічкіна**, Ю.В. Гошовська, К.І. Войтко, В.Ф. Сагач Вплив екзогенного глутатіону на кардіодинаміку і відкривання мітохондріальної пори при ішемії-реперфузії серця щурів // Фізіол. журн. 2021; 67(1):3-12. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz67.01.003>
5. **Р.А. Федічкіна**, Ю.П. Коркач, І.Ю. Охай, Ю.В. Гошовська, В.Ф. Сагач Вплив модулювання синтезу сірководню та глутатіону на окисно-нітрозативний метаболізм міокарду в умовах ішемії реперфузії // Вісник Київського Національного університету ім.Т.Г.Шевченка. Біологія. 2021; 84(1):43-47. DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.43–47

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

Патенти

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

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Dobrovolska R.A.**, Goshovska YV, Shimanskaya TV Cardioprotective potencial of L-cysteine against cardiac ischemia-reperfusion Mat.of III Conf.of young scientists. Physiology: from molecules to organism” Kyiv. - 2013. – P. 56.
2. Шиманська Т.В., Гошовська Ю.В., **Добровольська Р.А.**, Сагач В.Ф. Вплив стимуляції та блокади синтезу ендogenous сірководню на реакції серця при навантаженні об’ємом З’їзд Українського Фізіологічного Товариства, 2014, Львів, Україна;
3. Y Goshovska, T Shymanska, **R Dobrovolska**, A Kotsuruba, V Sagach Inhibition of H₂S synthesis form L-cysteine induces glutathione mediated cardioprotection against ischemia/reperfusion in rats Федічкіна Р.А. Conference for Young Scientists “CYS-2015”, 21-25 вересня, 2015, Київ, Україна;
4. Y. Goshovska, T. Shimanskaya, **R. Dobrovolska**, V. Sagach Glutathione as possible mediator of the paradoxical synergy between inhibition and stimulation of H₂S synthesis in terms of cardioprotection 2016 (Florence)
5. **Fedichkina R**, Goshovska Y.V., Shymanska T.V. Sagach V.F. Role of H₂S in Frank-Starling law realization in rat heart FEPS, Париж, Франція, 2016
6. **R Fedichkina**, Y Goshovska, V Sagach Directing L-cysteine to glutathione synthesis provides cardioprotection from ischemia-reperfusion injury: physiological and biochemical evidence. Young Researchers in Biosciences, Клуж-Напока, Румунія, 2016
7. **Федічкіна Р.А.** Гошовська Ю.В. Сагач В.Ф. Корекція ішемічних порушень міокарда шляхом впливу на систему сірководню. Збірник тез «Патофізіологія і фармація: Шляхи інтеграції». VII Національний конгрес патофізіологів України. 2016. ст. 238 Харків, Україна, 2016.
8. **Fedichkina R.**, Goshovska Y., Sagach V. Cardioprotective effect of PAG administration // Ukr. Biochem. J., 2017. – V. 89. – № 3. – P. 116. Київ, Україна, 2017
9. **Fedichkina RA**, Goshovska YV, Sagach VF. Stimulation of endogenous glutathione synthesis prevent postreperfusion NOS uncoupling, oxidative nitrosative stress and cardiodynamic disturbances in rats. 2018 Відень, Австрія

10. Goshovska Y, **Fedichkina R**, Sagach V. Crosstalk between H₂S and glutathione in cardioprotection against ischemia/reperfusion in rats Abstracts of the 52nd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, Barcelona 2018
11. I Okhai, Y Goshovska, **R Fedichkina**, V Sagach Inhibition of CSE inhibits H⁺-leak in myocardial mitochondria induced by ischemia-reperfusion // 53d ESCI Meeting, 2019, Коїмбра, Португалія
12. **R Fedichkina**, Y Goshovska, V Sagach Effect of H₂S synthesis modulators at I/R induced MPTP opening in rat heart. 53d ESCI Meeting, 2019, Коїмбра, Португалія
13. **Р.А. Федічкіна**, Ю.В. Гошовська, В.Ф.Сагач Вплив модуляції метаболізму L-цистеїну на реалізацію закону Франка-Старлінга XX З'їзд Українського Фізіологічного Товариства, Київ, Україна, 2019

АНОТАЦІЯ

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

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

Дисертаційна робота присвячена дослідженню ролі двох шляхів метаболізму L-цистеїну в реалізації функції серця в умовах навантаження об'ємом та ішемії-реперфузії. Застосовували пропаргілгліцин (PAG) - інгібітор цитоплазматичної синтази сірководню (H₂S), інгібітор синтезу глутатіону (бутіонінсульфоксимін, BSO) та попередник їх синтезу L-цистеїн. Показано, що інгібування синтезу H₂S в комбінації з додаванням L-цистеїну значно підвищувало функціональні резерви серця. Потужний інотропний ефект комбінації PAG+L-цистеїн нівелювався додаванням BSO. Це свідчить, що стимуляція ендогенного синтезу глутатіону надзвичайно важлива для реалізації закону Франка-Старлінга та відповіді міокарда на навантаження.

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

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

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

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

Summary

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

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

The dissertation is devoted to research of the role of two ways of L-cysteine metabolism in the realization of cardiac function under volume load and reperfusion injury. The inhibitor of cytoplasmic hydrogen sulfide (H_2S) synthase propargylglycine (PAG) and the inhibitor of glutathione synthesis buthionine sulfoximine (BSO) were used together with their precursor L-cysteine. Inhibition of H_2S synthesis in combination with the addition of L-cysteine has been shown to increase cardiac functional reserves and potent cardioprotective effect. The powerful inotropic effect of the combination of PAG + L-cysteine was abolished by the addition of BSO. This suggests that stimulating endogenous glutathione synthesis is extremely important in heterometric regulation of the heart function.

Stimulation of glutathione synthesis from L-cysteine had a potent cardioprotective effect in the model of ischemia-reperfusion of isolated rat heart. Restoration of cardiac function in reperfusion conditions with the addition of PAG + L-cysteine reached 95%, the efficiency of myocardial oxygen consumption was significantly higher than in the control, and all these effects were also reversed by previous administration of BSO. Biochemical studies have shown that in the group pretreated with PAG + L-cysteine significantly reduced the rate of generation of superoxide, hydroxyl radicals and hydrogen peroxide in the heart

tissues under ischemia-reperfusion. Decreased levels of malonic dialdehyde and diene conjugates under the action of the combination of PAG + L-cysteine indicate a lower degree of lipid peroxidation induced by ischemia. The content of reduced and oxidized glutathione increased two and a half times in group with PAG + L-cysteine and was significantly higher in reperfusion period. These data suggest that the stimulation of endogenous glutathione synthesis by switching L-cysteine metabolism from hydrogen sulfide formation has a powerful cardioprotective potential. Such activation of antioxidant systems preserved the integrity of mitochondrial membranes and inhibited the formation of mitochondrial permeability transition pores (MPTP), as evidenced by less release of mitochondrial factor into the effluent from isolated rat heart. In addition, post-conditioning with reduced glutathione has been shown to restore isolated heart function, reduce oxygen demand, and prevent MPTP formation during reperfusion, indicating the importance of high glutathione levels during the reperfusion period.

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

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

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК	активні форми кисню
АФН	активні форми нітрогену
ІСФ	інтенсивність скоротливої функції серця
К _{АТФ} канали	калієві АТФ-залежні канали
КДТ	кінцево-діастолічний тиск
КП	коронарний потік
Тлшл	тиск, що розвиває лівий шлуночок
ЧСС	частота серцевих скорочень
dP/dt _{max}	максимальна швидкість скорочення міокарда
dP/dt _{min}	максимальна швидкість розслаблення міокарда
ВН ₄	тетрагідробіоптерин
BSO	бутатіонін сульфоксимін

CAT	цистеїн-аміно-трансфераза
CBS	цистатіон-β-синтаза
cNOS	конститутивні синтази оксиду нітрогену
CSE	цистатіон-γ-ліаза
MPTP	мітохондріальна пора
MPST	меркаптопіруват сульфуртрансфераза
GSH	відновлена форма глутатіону
GSSG	окиснена форма глутатіону
NO	оксид азоту
NOS	синтаза оксиду азоту
PAG	пропаргілцистеїн
H ₂ S	сірководень
SERCA	Ca ²⁺ АТФ-аза саркоплазматичного ретикулума