

К.О. Драчук, А.В. Коцюруба, О.В. Базілюк, Л.Г. Степаненко, В.Ф. Сагач

Пропаргілгліцин відновлює ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти у старих щурів

Ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) судин забезпечує розвиток фундаментальних судинних реакцій, а його порушення лежить в основі асоційованих зі старінням серцево-судинних захворювань. Вивчали вплив блокади ферменту (de novo) синтезу сірководню – цистатіонін-γ-ліази (CSE) на ендотелійзалежне розслаблення ГМ грудної аорти старих щурів. Встановлено, що додавання до перфузату пропаргілгліцину (ПГ) – інгібітора активності CSE, відновлювало пригнічене у старих щурів ацетилхолініндуковане розслаблення ГМ аорти. Середнє значення його амплітуди збільшувалось з $13,4 \pm 1,3$ до $49,5 \pm 4,7\%$. Цей ефект знімався блокадою синтезу оксиду азоту (NO). Показано зменшення з віком вмісту внутрішньомітохондріальних пулів H_2S , NO_2^- серця та активності ферменту конститутивного синтезу NO – cNOS. Встановлено, що введення ПГ значною мірою відновлювало пули H_2S (збільшувалися на 112 %) та NO_2^- (збільшувалися на 162 %), а також стимулювало знижену активність конститутивної NO-синтази (збільшувалася майже втричі) у серці. Таким чином, ПГ здатен відновлювати пригнічене ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти старих щурів за допомогою стимуляції синтезу H_2S та NO.

Ключові слова: пропаргілгліцин, сірководень, цистатіонін-γ-ліаза, ацетилхолін, оксид азоту, ендотелій, гладенькі м'язи, аорта, старіння, окисний стрес.

ВСТУП

Відомо, що при старінні збільшується ризик розвитку серцево-судинних захворювань [1, 2]. Основною причиною цього є те, що з віком розвивається дисфункція ендотелію судин. Остання зумовлена, в т.ч. порушенням синтезу оксиду азоту (NO), що виникає через окисний стрес, якому належить провідна роль у процесі старіння. NO, крім вазодилаторного ефекту має багато інших важливих властивостей: модулює вивільнення вазоактивних медіаторів, пригнічує адгезію лейкоцитів, експресію прозапальних генів, адгезію та агрегацію тромбоцитів, інгібує міграцію та проліферацію гладеньких м'язів (ГМ) [3, 4]. Важливим механізмом порушення NO-синтезувальної функції ендотелію за умов старіння є зниження активності його конститутивної NO-синтази (cNOS) [5, 6].

Останнім часом у літературі з'являється все більше даних про кардіо- та васкулопротекторний вплив сірководню (H_2S) [7]. H_2S разом з NO і CO відносять до родини газових трансмітерів. Слід зазначити, що раніше вони розглядалися виключно, як токсичні молекули доки не стало відомо про їх ендогенну продукцію та біологічні ефекти в організмі. Унікальність газових трансмітерів полягає в тому, що вони легко проникають крізь клітинні мембрани, не зв'язуються ні з якими рецепторами на їх поверхні, взаємодіють безпосередньо з внутрішньоклітинними структурами. Молекулярними мішенями для H_2S є ферменти, фактори транскрипції та мембранні іонні канали [8]. Одним із ферментів de novo синтезу H_2S у судинній системі є цистатіонін-γ-ліаза (CSE), яка значною мірою, інгібується пропаргілгліцином (ПГ). Останні дослідження переконливо доводять, що кардіопротекція зумовлена

© К.О. Драчук, А.В. Коцюруба, О.В. Базілюк, Л.Г. Степаненко, В.Ф. Сагач

сірководнем, синтезованим в організмі саме CSE-залежним шляхом [9–11].

Великий інтерес викликає питання взаємодії H_2S і NO . Біохімічні її аспекти суперечливі і до кінця не визначені. Деякі автори вказують на стимулювальний вплив кожного із двох газотрансмітерів на продукцію та функцію іншого, а деякі роблять цілком протилежні висновки про їх взаємовплив [11–13].

Метою нашої роботи було дослідити роль CSE-залежного шляху синтезу H_2S у ендотелійзалежному розслабленні гладеньких м'язів (ГМ) судин у старих тварин та встановити особливості дії ПГ на мітохондріальний синтез сірководню та NO .

МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 10 дорослих віком 8 міс та 17 старих віком 22–24 міс щурах-самцях лінії Вістар масою 300–350 г з дотриманням усіх вимог щодо робіт з лабораторними тваринами (міжнародна конвенція, Страсбург, 1986).

Скоротливу активність ГМ аорти досліджували за допомогою спеціальної камери, яка складалася з комірки для перфузії, механоелектричного перетворювача 6MX1С, температурного датчика, нагрівальних елементів, системи перфузійних розчинів.

Для перфузії використовували розчин Кребса такого складу (ммоль/л): $NaCl$ – 133; KCl – 4,7; $NaHCO_3$ – 16,3; NaH_2PO_4 – 1,38; $MgCl_2$ – 1,05; глюкоза – 12; $CaCl_2$ – 2,5. Температура і рН розчинів відповідали фізіологічній нормі. Після декапітації грудну порожнину розтинали та виділяли сегмент грудної аорти довжиною 3–4 см. Його ретельно очищували від сполучної тканини та розрізали на кільцеві препарати товщиною 1–1,5 мм з урахуванням циркуляційної орієнтації гладеньком'язового шару (під кутом приблизно 45° від повздовжньої осі судини). Далі препарат поміщали у комірку для перфузії, фіксуючи за допомогою двох гачків, один

з'єднувався з механоелектричним перетворювачем, а другий – через блок до вантажу. Препарат аорти розтягували з силою 7–8 мН і залишали для стабілізації режиму роботи на 25–30 хв, перфузуючи його розчином Кребса.

Для активації ГМ аорти до перфузуючого розчину додавали норадреналін (10^{-5} моль/л, "Sigma", США). Стійкий рівень норадреналінзалежного скорочення («плато») приймали за 100 %. Від нього проводили розрахунки зміни амплітуди ендотелійзалежних скоротливих реакцій ГМ аорти на ацетилхолін (10^{-5} моль/л, "Sigma", США).

Активність ферментів CSE та NOS пригнічували за допомогою ПГ (10^{-3} моль/л, "Sigma", США) та L-NAME ($3 \cdot 10^{-4}$ моль/л, "Sigma", США) відповідно, через інкубацію препаратів аорти впродовж 30 хв і додавання блокаторів у перфузійні розчини.

Вивчали мітохондрії серця дорослих і старих щурів, у яких визначали зміни пулів H_2S , вмісту стабільного метаболіту NO – нітрит-аніона (NO_2^-) та активність ферменту конститутивного кальційзалежно синтезу NO – cNOS при внутрішньом'язовому введенні ПГ за 30 хв до декапітації тварин. Після цього у тварин з тканин серця виділяли мітохондрії послідовним центрифугуванням гомогенату. Осад мітохондрій суспендували у невеликому об'ємі середовища без додавання ЕДТА і зберігали при $4^\circ C$. Вміст загального білка в суспензії мітохондрій досліджували за методом Лоурі.

Для визначення вмісту H_2S до аліквот проб додавали 0,5 мл 1%-го розчину ацетату цинку, інкубували при $37,5^\circ C$ протягом 10 хв, далі додавали 0,5 мл 20 ммоль/л розчину N, N-DPD (диметил-п-фенілендіамін) та 0,5 мл 30 ммоль/л розчину $FeCl_3$. Після інкубації в темряві на холоді досліджували оптичну густину при $\lambda=670$ нм [14].

Вміст NO_2^- досліджували в безбілкових аліквотах мітохондрій серця в колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна в нашій модифікації. Реактив Гріса готували, змішуючи рівні частини

0,1%-го водного розчину нафтилетилендіаміндігідрохлориду ("Sigma", США) з 1%-м розчином сульфаніламіну ("Sigma", США) в 5 % H_3PO_4 (ч.д.а.) безпосередньо перед визначенням. Вміст NO_2^- розраховували за допомогою калібрувальної кривої, побудованої з використанням NaNO_2 (х.ч.).

Для визначення кальційзалежної активності NOS (використовували комбінацію класичного методу та сучасну його модифікацію, пристосовану до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції L-цитруліну. Вміст цитруліну досліджували за допомогою високочутливого колориметричного методу [15]. Активність ферменту cNOS виражали в пікомолях новоутвореного L-цитруліну за 1 хв у розрахунку на 1 мг загального білка в пробі [16, 17].

Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики з використанням програм Excel (MS Office XP) та Origin 6.0 (Microcal Inc., США). Значення $P < 0,05$ вважали статистично достовірними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Досліди показали, що додавання ацетилхоліну до буферного розчину Кребса завжди викликало типове розслаблення преактивованих норадреналіном ГМ грудної аорти дорослих щурів (рис. 1, 2). Середнє значення амплітуди становило $64,9 \pm 3,5$ % ($n=10$). Раніше проведені експерименти на деендотелізованих препаратах ГМ аорти встановили, що таке розслаблення залежить від ендотелію

[18, 19]. У старих щурів ацетилхолін тієї самої концентрації викликав розслаблення ГМ грудної аорти амплітудою майже в 5 разів меншою від контролю ($13,4 \pm 1,3$ %; $n=17$; див. рис. 1, 2).

Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що у старих щурів порушується ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти. Водночас відомо, що реакції ГМ аорти на агоністи незалежні від ендотелію, наприклад нітропрурид натрію, з віком не втрачаються і відтворюються майже без змін. Отже, порушується саме ендотелійзалежний компонент їх релаксації [18, 20].

Після додавання до буферного розчину ПГ і інкубації в ньому препараті ГМ аорти старих щурів впродовж 30 хв амплітуда розслаблення на дію ацетилхоліну достовірно збільшувалася майже у 4 рази порівняно з такими без блокатора ($49,5 \pm 4,7$ %; $n=10$; рис. 1, 2).

Нами було зроблено припущення, що в основі відновлення ацетилхолініндукованого розслаблення ГМ аорти старих щурів за умов H_2S -блокади лежить збільшення секреції ендотеліальними клітинами оксиду азоту. Для підтвердження цього ми провели серію дослідів з одночасним блокуванням синтезу H_2S і NO, а саме додаванням до буферного розчину ПГ та L-NAME (інкубація впродовж 30 хв препараті ГМ аорти старих щурів). При цьому ми спостерігали значне зменшення амплітуди розслаблення ГМ аорти у відповідь на ацетилхолін ($3,0 \pm 1,8$ %; $n=5$; див. рис. 1, 2; $P < 0,05$).



Рис. 1. Зміна ацетилхолініндукованого розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти під дією пропаргілгліцину (ПГ) та L-NAME: 1 – дорослі щури (контроль), 2 – старі щури, 3 – старі щури при дії ПГ, 4 – старі щури при дії ПГ і L-NAME. Темна лінія під кривими – тривалість дії ацетилхоліну (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

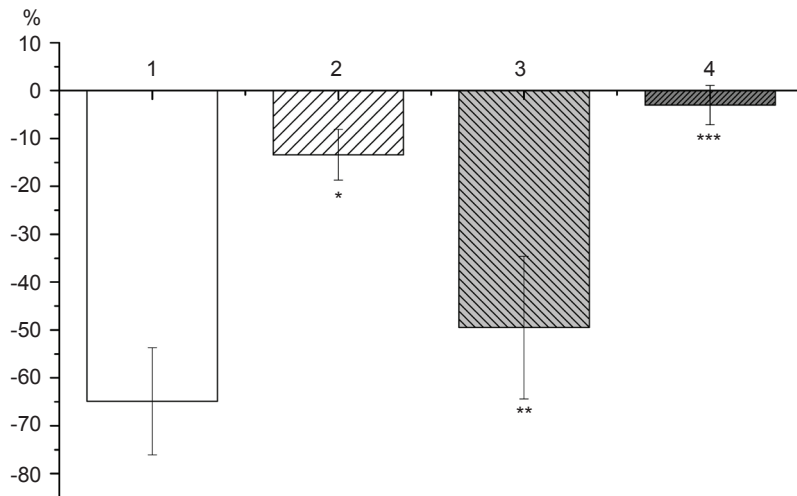


Рис. 2. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) та L-NAME на ацетилхолініндуковане розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти тварин різного віку: 1 – дорослі (контроль), 2 – старі щури (контроль), 3 – старі щури при дії ПГ, 4 – старі щури при одночасній дії ПГ та L-NAME. * $P < 0,05$ відносно контролю; ** $P < 0,05$ відносно старих тварин. *** $P < 0,05$ відносно старих тварин при дії ПГ

Для встановлення зміни пулів H_2S і NO та активності sNOS була проведена серія біохімічних дослідів. Показано, що в мітохондріях серця суттєво знижується вміст стаціонарних пулів H_2S ($2,35 \pm 0,25$ нмоль/мг білка, $P < 0,05$) Застосування ПГ (10^{-4} моль/л) у досліджах *in vivo* парадоксально змінило досліджувані біохімічні показники у мітохондріях серця. А саме транзиторні внут-

рішньомітохондріальні пули H_2S повністю нормалізувалися ($4,98 \pm 0,75$ нмоль/мг білка, $P < 0,05$) після короткочасного введення ПГ, а не ще більше знизилась, як того можна було очікувати (рис. 3). Зниження стаціонарних пулів H_2S у мітохондріях серця, які є місцем як його синтезу, так і, особливо, деградації, вказує як на можливе інгібування ендогенного біосинтезу, так і/або на активацію

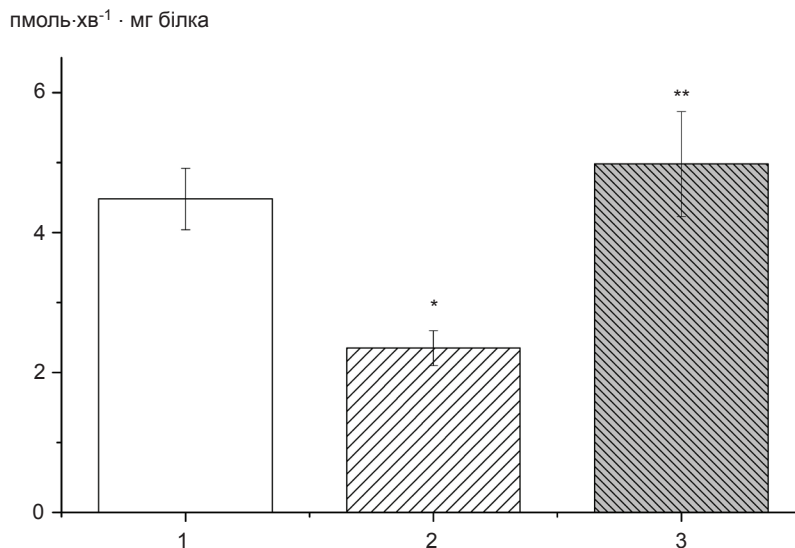


Рис. 3. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на внутрішньомітохондріальні пули сірководню (H_2S): 1 – дорослі щури (контроль), 2 – старі щури, 3 – старі щури після введення ПГ. * $P < 0,05$ відносно контролю. ** $P < 0,05$ відносно старих тварин

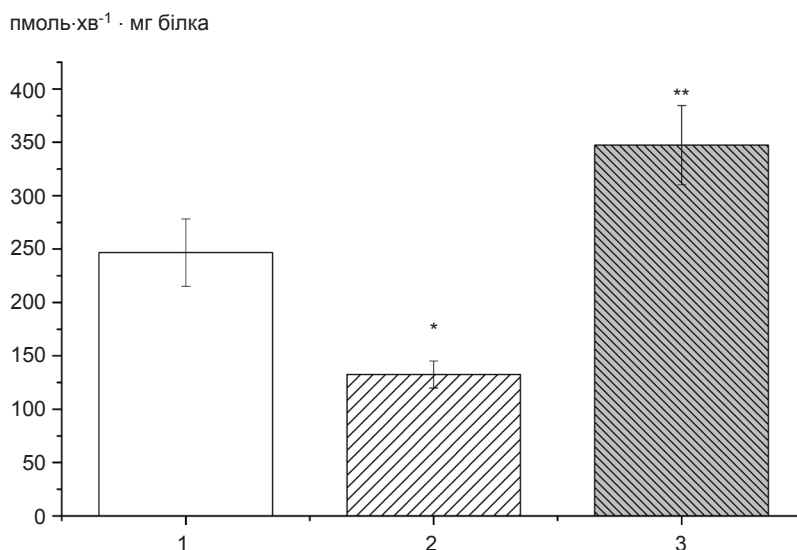


Рис. 4. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на пули NO₂⁻ в мітохондріях тварин різного віку: 1 – дорослі щури (контроль), 2 – старі щури, 3 – старі щури після введення ПГ. *P<0,05 відносно контролю. **P<0,05 відносно старих тварин

деградації (окиснення до іонів сульфату в мітохондріях ферментом сульфїтоксидазою). Дискусійним залишається питання про причину збільшення продукції H₂S при блокуванні одного з трьох ферментів його (de novo) синтезу в серцево-судинній системі. Можливо, активуються альтернативні шляхи синтезу сірководню або має значення антиоксидантна активність ПГ.

Також нами було показано, що в мітохондріях серця старих щурів знижується активність eNOS (1,84 ± 0,26 пмоль/хв · мг білка, P<0,05) та вміст пулів стабільного метаболіту NO – NO₂⁻ (132,4 ± 12,7 пмоль/мг білка, P<0,05; рис. 4, 5).

Введення ПГ старим тваринам стимулювало активність eNOS (5,44 ± 1,14 пмоль/хв · мг білка, P<0,05; див. рис. 5) та збільшувало внутрішньомітохондріальні пули NO₂⁻ (347,33 ± 37,2 пмоль/мг білка, P<0,05; див. рис. 4).

В основі пошкодження ендотеліоцитів і розвитку їх дисфункції при старінні є окисний стрес, який, очевидно, викликаний гіперпродукцією супероксид-аніона (O₂⁻). З віком у судинах збільшується його продукція та підвищується експресія компонентів НАДФН-оксидази – основного джерела

O₂⁻ в клітині [18, 21–24]. Відомо, що супероксид-аніон може взаємодіяти з NO з утворенням пероксинітриду (ONOO⁻) [25]. Останній є високореакційною сполукою, на відміну від O₂⁻, легко проникає у клітину та спричиняє окиснювальні модифікації макромолекул: ліпідів, білків, ДНК. Вплив пероксинітриду на білки відображає нітрозозин, що є маркером окисного стресу і вміст якого підвищується з віком в ендотеліальних клітинах [26].

Ми вважаємо, що ПГ відновлює ендотеліальну функцію у судинах старих щурів внаслідок збільшення продукції сірководню, яке насамперед зумовлене активацією альтернативних шляхів його синтезу. Двома іншими ферментами синтезу H₂S в організмі є 3-меркаптопіруват-сульфуртрансфераза та цистатіонін-β-синтаза. Відомо, що одним із головних механізмів кардіо- і васкулопротекторного ефекту сірководню є його антиоксидантний вплив. Вважають, що цей газ може пригнічувати продукцію, зв'язувати і нейтралізувати супероксид-аніон, пероксинітрид, пероксид водню [27–29]. Пригнічення утворення супероксиду в ендотеліальних і клітинах ГМ відбувається за допомогою інгібування сірководнем експресії та актив-

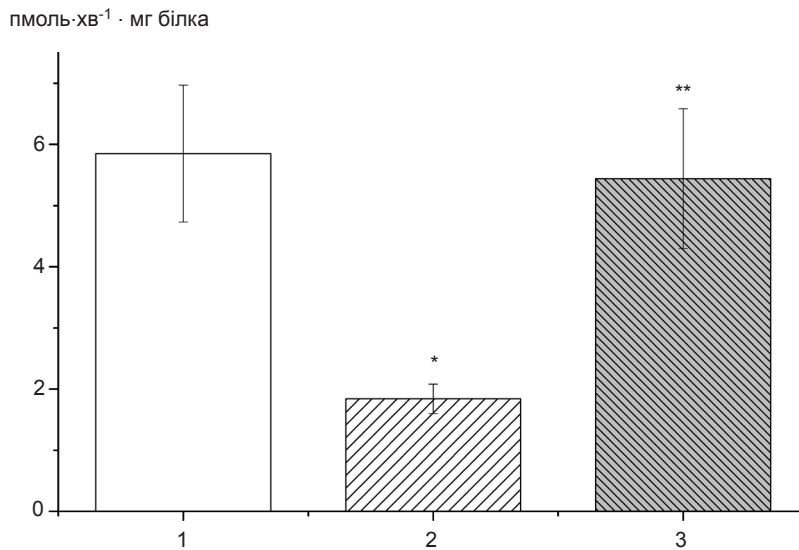


Рис. 5. Вплив пропаргілгліцину (ПГ) на активність ферменту (de novo) синтезу NO cNOS в мітохондріях серця тварин різного віку: 1 – дорослі щури (контроль), 2 – старі щури, 3 – старі щури після введення ПГ. *P<0,05 відносно контролю. **P<0,05 відносно старих тварин

ності НАДФН-оксидази [30]. З іншого боку, дослідження встановили, що захоплення та/чи утилізація супероксид-аніона значно поліпшували ендотеліальну функцію як у тварин, так і людей відновленням біодоступності NO [23, 24, 31]. Також показано, що H₂S підвищує активність таких власних ендогенних антиоксидантів, як супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза та глутатіонредуктаза [28, 29, 32].

Цікаво, що сірководень може відновлювати NO-синтезувальну функцію ендотелію не лише завдяки своїм антиоксидантним властивостям, але й внаслідок прямого впливу на ендотеліальні клітини чи безпосередньої активації cNOS. Нещодавно в літературі з'явилися дані про те, що H₂S стимулює фактор росту ендотелію судин. Останній активує в ендотеліальній клітині PI3K/Akt-сигнальний шлях, завдяки чому відбувається фосфорилування і активація ендотеліальної NOS зі збільшенням продукції NO [11]. Дані інших досліджень вказують на те, що CSE-синтезований H₂S може безпосередньо фосфорилувати cNOS і, як наслідок, збільшувати продукцію NO в ендотеліоцитах і відновлювати ендотеліальну функцію [33].

Ми вважаємо, що блокування CSE активує альтернативні шляхи синтезу H₂S, який у свою чергу завдяки власним антиоксидантним властивостям і за допомогою прямого впливу на ендотелій відновлює біодоступність NO і збільшує ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти старих щурів.

ВИСНОВКИ

1. Блокатор ферменту de novo синтезу сірководню CSE ПГ відновлював ушкоджене у старих щурів ацетилхолініндуковане розслаблення ГМ аорти.

2. Блокада ферменту синтезу оксиду азоту перешкоджала відновленню ацетилхолініндукованого розслаблення ГМ аорти старих щурів у відповідь на дію ПГ.

3. Застосування ПГ викликало збільшення знижених у старих тварин внутрішньомітохондріальних пулів H₂S та NO₂⁻.

4. Введення ПГ стимулювало знижену активність cNOS у старих щурів.

5. ПГ відновлював ендотеліальну функцію у старих щурів. В основі цих ефектів блокатора лежить збільшення вмісту H₂S та NO.

**К.О. Драчук, А.В. Коцюруба, О.В. Базилук,
Л.Г. Степаненко, В.Ф.Сагач**

ПРОПАРГИЛГЛИЦИН ВОССТАНАВЛИВАЕТ ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМОЕ РАССЛАБЛЕНИЕ ГЛАДКИХ МЫШЦ АОРТЫ У СТАРЫХ КРЫС

Изучали влияние блокады фермента (de novo) синтеза сероводорода (H_2S) цистатионин- γ -лиазы (CSE) на эндотелийзависимое расслабление гладких мышц (ГМ) грудной аорты старых крыс. Показано, что блокирование CSE пропаргилглицином (ПГ) восстанавливало поврежденное у старых крыс ацетилхолиндуцированное расслабление ГМ аорты. Данный эффект предотвращался блокадой синтеза оксида азота в эндотелиоцитах. Установлены возрастные изменения внутримитохондриальных пулов H_2S , NO_2^- сердца и активности фермента конститутивного синтеза NO – cNOS. Показано, что введение ПГ увеличивало редуцированные у старых животных внутримитохондриальные пулы H_2S (на 112 %) и NO_2^- (на 162 %) в сердце. Показано, что ПГ стимулировал сниженную у старых крыс активность cNOS. Полученные результаты дают основание полагать, что ПГ путем блокирования одного из трех ферментов (de novo) синтеза сероводорода в организме активизирует альтернативные пути его образования. А синтезированный таким образом сероводород благодаря стимуляции синтеза NO способен восстанавливать эндотелиальную функцию у старых крыс.

Ключевые слова: пропаргилглицин, сероводород, цистатионин- γ -лиаза, ацетилхолин, оксид азота, эндотелий, гладкие мышцы, аорта, старение, окислительный стресс.

**К.О. Drachuk, A.V. Kotsjuruba, O.V. Bazilyuk,
L.G. Stepanenko, V.F. Sagach**

PROPARGYLGLYCINE RESTORES ENDOTHELIUM-DEPENDENT RELAXATION OF AORTIC SMOOTH MUSCLES IN OLD RATS

In the study we investigated the effect of blockade cystathionine- γ -lyase (CSE), an enzyme of hydrogen sulfide (H_2S) (de novo) synthesis on the endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscle (SM) in old rats. It has been shown that an inhibition of CSE by propargylglycine (PAG) results in restoration of a decreased ACh-induced relaxation of aorta in old rats. This effect of PAG was removed by blocking nitric oxide (NO) synthesis in the endothelial cells. Age-related changes in the levels of H_2S , NO_2^- and enzyme activity of the constitutive synthesis of NO (cNOS) in the heart, were determined. It has been shown that PAG introduction elevates a decreased levels of H_2S , NO_2^- and stimulates the suppressed activity of cNOS in old rats. These results suggest that PAG activates alternative ways of H_2S synthesis and stimulates the constitutive synthesis of NO. These actions of PAG restore endothelial function in old rats.

Key words: propargylglycine, hydrogen sulfide, cystathionine-

γ -lyase, acetylcholine, nitrogen oxide, endothelium, smooth muscle, aorta, aging, oxidative stress.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation*. 2003; 107(2):346-54.
2. Rothwell PM, Coull AJ, Silver LE, Fairhead JF, Giles MF, Lovelock CE et al. Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *Lancet*. 2005; 366(9499):1773-83.
3. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*. 2000; 190(3): 244-54.
4. Kojda G. Mechanisms of inotropic effects induced by nitric oxide. *Ital Heart J*. 2001; 2 Suppl 3:48S-49S.
5. Sagach VF, Bazilyuk OV, Stepanenko LG, Korcach JuP, Kotsuruba AV. Ace inhibitor enalapril action on nitric oxide synthesis, oxidative metabolism and vascular tone of aging rat. *Fiziol Zh*. 2007; 53(4):15-26.
6. Cernadas MR, Sánchez de Miguel L, García-Durán M, González-Fernández F, Millás I, Montón M et al. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res*. 1998;83(3):279-86.
7. Lavu M, Bhushan S, Lefer DJ. Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*. 2011; 120(6):219-29.
8. Predmore BL, Lefer DJ, Gojon G. Hydrogen Sulfide in Biochemistry and Medicine. *Antiox Redox Signal*. 2012; 17(1):119-40.
9. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(39):15560-5.
10. Calvert JW, Elston M, Nicholson CK, Gundewar S, Jha S, Elrod JW, et al. Genetic and pharmacologic hydrogen sulfide therapy attenuates ischemia-induced heart failure in mice. *Circulation*. 2010; 122:11–19.
11. Kazuhisa Kondo, Shashi Bhushan, Adrienne L. King, Sumanth D. Prabhu, Tariq Hamid, Steven Koenig et al. H2S Protects Against Pressure Overload Induced Heart Failure via Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS). *Circulation*. 2013; 127(10):1116–1127.
12. Kondo K, Bhushan S, King AL, Prabhu SD, Hamid T, Koenig S et al. H2S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2013; 127:1116–1127.
13. Kubo S, Kurokawa Y, Doe I, Masuko T, Sekiguchi F, Kawabata A. Hydrogen sulfide inhibits activity of three isoforms of recombinant nitric oxide synthase. *Toxicology* 2007; 241:92–97.

14. Svenson A. A rapid and sensitive spectrophotometric method for determination of hydrogen sulfide with 2,2'-dipyridyl disulfide. *Anal Biochem.* 1980; 107:51-55.
15. Boyde JR, Rahmotullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal Biochem.* 1980; 107:424-431.
16. Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett.* 1991; 1:145-149.
17. Chin SY, Pandey KN, Shi SJ et al. Increased activity and expression of Ca²⁺-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. *Amer J Physiol.* 1999; 5:797-804.
18. Tkachenko MN, Sagach VF, Kotsjuruba AV, Baziljuk OV, Buchanevich AM, Meged EF et al. Endothelium-dependent contractile reactions of vascular smooth muscles and content of free radicals of oxygen of rats in aging. *Fiziol Zh.* 2002; 48(4):3-13.
19. Moibenko OO, Sahach VF, Shapoval LM, Soloviov AI, Baziliuk OV, Zhukova AV et al. The role of the endothelium and of biologically active substances of endothelial origin in regulating blood circulation and cardiac activity. *Fiziol Zh.* 1997; 43(1):3-18.
20. Sagach VF, Baziljuk OV, Kotsjuruba AV, Buchanevich AM. Disturbance of endothelium-dependent vascular responses, arginase and no-synthase pathways of l-arginine metabolism at spontaneously hypertensive rats. *Fiziol Zh.* 2000;46(3):3-13.
21. Fleenor BS, Seals DR, Zigler ML, Sindler AL. Superoxide-lowering therapy with TEMPOL reverses arterial dysfunction with aging in mice. *Aging Cell.* 2012; 11:269-276.
22. Rodriguez-Manas L, El-Assar M, Vallejo S, Lopez-Doriga P, Solis J, Petidier R et al. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell.* 2009;8:226-238.
23. Mayhan WG, Arrick DM, Sharpe GM, Sun H. Age-related alterations in reactivity of cerebral arterioles: role of oxidative stress. *Microcirculation.* 2008; 15:225-236.
24. Didion SP, Kinzenbaw DA, Schrader LI, Faraci FM. Heterozygous CuZn superoxide dismutase deficiency produces a vascular phenotype with aging. *Hypertension.* 2006; 48:1072-1079.
25. Yang Y-M, Huang A, Kaley G, Sun D. eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiol.* 2009; 297:H1829-H1836.
26. Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, Levy AS, Pierce GL, Gates PE, et al. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res.* 2007; 100:1659-1666.
27. Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS et al. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: An endogenous peroxynitrite scavenger? *J Neurochem.* 2004; 90: 765-768.
28. Yan SK, Chang T, Wang H, Wu L, Wang R, Meng QH. Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 351:485-491.
29. Lu M, Hu LF, Hu G, Bian JS. Hydrogen sulfide protects astrocytes against H₂O₂-induced neural injury via enhancing glutamate uptake. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45:1705-1713.
30. Muzaffar S, Shukla N, Bond M, Newby AC, Angelini GD, Sparatore A et al. Exogenous hydrogen sulfide inhibits superoxide formation, NOX-1 expression and Rac1 activity in human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res.* 2008; 45:521-528.
31. Wray DW, Nishiyama SK, Harris RA, Zhao J, McDaniel J, Fjeldstad AS et al. Acute reversal of endothelial dysfunction in the elderly after antioxidant consumption. *Hypertension.* 2012; 59:818-824.
32. Benetti LR, Campos D, Gurgueira SA, Vercesi AE, Guedes CE, Santos KL et al. Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice in vivo. *Eur J Pharmacol.* 2013; 698:463-469.
33. King AL, Polhemus DJ, Bhushan S, Otsuka H, Kondo K, Nicholson CK et al. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(8):3182-7.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: 8701dk@ukr.net

Матеріал надійшов до редакції 16.05.2014