

# Донор сірководню NaHS відновлює конститутивний синтез NO та ендотелійзалежне розслаблення в аорті старих щурів

К.О. Драчук, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: 8701dk@ukr.net

*Вивчали вплив донора сірководню NaHS на показники окисного (як оксидативного, так і нітрозативного) стресу, стан спряження конститутивних NO-синтаз (сNOS) та ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) у аорті старих щурів. Встановили розвиток оксидативно-нітрозативного стресу у старих тварин, які не отримували NaHS. Наслідком цього в аорті викликався неспряжений (uncoupling) стан сNOS і зниження конститутивного синтезу NO. Результатом цих біохімічних процесів було порушення ацетилхолініндукованого розслаблення ГМ аорти, амплітуда якого становила у старих тварин  $7,5 \pm 1,4\%$  порівняно з  $64,9 \pm 3,5\%$  в контрольній групі дорослих тварин. Показано, що NaHS суттєво пригнічував оксидативний і нітрозативний стрес, відновлював спряжений стан сNOS та збільшував конститутивний синтез NO. Це сприяло поліпшенню ацетилхолініндукованого розслаблення ГМ аорти, амплітуда якого у старих тварин, що отримували NaHS, збільшувалася до  $48,8 \pm 1,9\%$ .*

*Ключові слова: старіння; ендотеліальна дисфункція; оксидативний стрес; нітрозативний стрес; неспряження сNOS; сірководень; оксид азоту.*

## ВСТУП

Оксид азоту (NO) – ключовий фактор, що забезпечує нормальну реалізацію ендотелійзалежного розслаблення. Основним шляхом його синтезу в судинах є окисний метаболізм L-аргініну під дією кальційзалежних конститутивних NO-синтаз (сNOS=eNOS+nNOS). Синтезований в ендотелії NO дифундує в гладенькі м'язи (ГМ), активує розчинну гуанілатциклазу (рГЦ) і збільшує утворення циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ). В результаті активується цГМФ-залежна протеїнкіназа, яка зменшує вміст внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$ , що викликає розслаблення ГМ [1]. Існують докази і про прямий релаксуючий вплив NO на ГМ, при якому відбувається рГЦ/цГМФ-незалежна активація  $Ca^{2+}$ -АТФази саркоплазматичного ретикула і зменшення цитозольного  $Ca^{2+}$  [2]. Також показана здатність NO викликати

релаксацію ГМ судин не зменшенням внутрішньоклітинного вільного  $Ca^{2+}$ , а через зниження спорідненості до нього скоротливих білків [3].

Основа порушення ендотелійзалежного розслаблення судин при старінні становить зниження вмісту NO, яке зумовлене такими патофізіологічними механізмами, як окисний стрес, зростання активності реніна-гіотензинової системи, неспряження сNOS, підвищення активності вазоконстрикторних факторів тощо [4].

Однією із речовин, вплив яких стимулює утворення NO, пригнічує окисний стрес і активність реніна-гіотензинової системи є сірководень ( $H_2S$ ) [5–7]. Особливої уваги потребує питання взаємодії  $H_2S$  і NO. Згідно з останніми даними,  $H_2S$  може збільшувати синтез NO як через фосфорилування сNOS за PI3K/Akt-сигнальним механізмом, так і незалежно від нього [5, 8]. Також відомо, що

© К.О. Драчук, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач

сірководень здатен пригнічувати фосфодіестеразу, фермент, що розщеплює цГМФ у клітині, і пролонгувати цим самим дію NO на ГМ [9–11]. Це дає можливість припустити, що  $H_2S$  відновлює порушену при старінні ендотеліальну функцію судин, покращує NO-залежне розслаблення, його можна розглядати як фактор профілактики таких асоційованих зі старінням захворювань, як артеріальна гіпертензія, атеросклероз, діабетична ангіопатія тощо.

Метою нашої роботи було дослідити в аорті старих щурів вплив донора  $H_2S$ , NaHS на конститутивний синтез NO, ендотеліозалежне розслаблення ГМ, показники оксидативно-нітрозативного стресу та спряження cNOS.

## МЕТОДИКА

Ендотеліозалежне розслаблення ГМ проводили на ізольованих препаратах грудної аорти щурів-самців лінії Вістар віком 8 міс (дорослі,  $n=10$ ) та 22–24 міс (старі,  $n=20$ ), масою 300–370 г з дотриманням усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами (міжнародна конвенція, Страсбург, 1986).

У щурів виділяли грудну аорту, нарізали на кільцеві препарати і за загальноприйнятою методикою в режимі, наближеному до ізотонічного, реєстрували скоротливу активність ГМ [12]. Для активації ГМ аорти до перфузуючого розчину додавали норадреналін ( $10^{-5}$  моль/л, “Sigma”, США). Стійкий рівень залежного від цієї речовини скорочення («плато») приймали за 100 %. Від нього проводили розрахунки зміни амплітуди ендотеліозалежних скоротливих реакцій ГМ аорти на ацетилхолін ( $10^{-5}$  моль/л, “Sigma”, США). Вплив модулятора ендогенного сірководню вивчали за допомогою екзогенного донора  $H_2S$  – NaHS ( $10^{-3}$  моль/л, “Sigma”, США), у якому інкубували кільцеві препарати аорти (30 хв), а також його додавали в перфузійні розчини. Для пригнічення утворення NO *in vivo* використовували метиловий ефір NG-нітро-L-аргініну (L-NAME,  $3 \times 10^{-4}$  моль/л,

“Sigma”, США), інгібітор активності cNOS.

У цільних препаратах аорти визначали біохімічні показники, які є маркерами оксидативного стресу: швидкість генерації супероксидного ( $^*O_2^-$ ) і гідроксильного ( $^*OH$ ) радикалів, пули пероксиду водню ( $H_2O_2$ ). Для встановлення шляхів генерації супероксиду визначали його утворення за дії циклооксигенази (маркер тромбоксан  $B_2$  ( $TxB_2$ )) та ліпоксигенази (маркер лейкотрієн  $C_4$  ( $LTC_4$ )), а також потужної пуринової ксантинооксидази (маркер сечова кислота). Маркерами вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) були пули дієнових кон'югатів (ДК) та малонового діальдегіду (МДА) [13]. Крім того, визначали активність конститутивного синтезу NO, оцінюючи кальційзалежну активність cNOS і показники нітрозативного стресу: надлишкового *de novo* синтезу NO, оцінюючи кальційнезалежну активність індукцибельної NO-синтази (iNOS), реутилізаційного (salvage) синтезу NO — визначаючи активність нітрат-редуктази, а його декомпозиційного синтезу — оцінюючи пули низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ). Утворення пероксинітриду оцінювали за допомогою визначення пулів стабільного метаболіту NO – нітрат-аніона ( $NO_3^-$ ) – продукту нерадикального розпаду пероксинітриду. Визначали також пули нітрит-аніона ( $NO_2^-$ ) як маркера оксигенації аорти та пули ендогенного  $H_2S$ , що може бути, згідно з нашою гіпотезою [12, 14], регулятором спряжено-неспряженого стану cNOS [15]. Активність cNOS-залежного шляху утворення  $^*O_2^-$  оцінювали за зміною індексу спряження cNOS, який розраховували через відношення активності cNOS до швидкості генерації  $^*O_2^-$  [16]. Крім стаціонарних пулів у контрольних дорослих і старих тварин, визначали також зміни цих показників за підвищення ендогенного вмісту  $H_2S$  за допомогою введення *in vivo* NaHS (56 мг/кг, внутрішньоочередово за 30 хв до декапітації). Отримані результати представлені у відсотках відносно значення показників у дорослих тварин, які приймали за 100 %.

Результати обробляли методами варіаційної статистики з використанням програм Excel (MS Office XP) та Origin 8,5 (Microcall Inc., США). Значення  $P < 0,05$  вважали статистично достовірними.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показано, що додавання ацетилхоліну ( $10^{-5}$  моль/л) до перфузійного розчину завжди призводило до типового розслаблення преактивованих норадреналіном ГМ грудної аорти. У дорослих щурів середнє значення амплітуди становило  $64,9 \pm 3,5, \%$ ,  $P < 0,05$  ( $n=10$ ). У старих щурів амплітуда розслаблення ГМ була майже в 9 разів меншою за контроль. Середнє її значення становило  $7,5 \pm 1,4, \%$ ,  $P < 0,05$  ( $n=10$ ). Додавання до перфузійного розчину

NaHS і інкубація в ньому препарату ГМ аорти старих щурів впродовж 30 хв збільшувало амплітуду розслаблення на ацетилхолін більш ніж у 6 разів. Середнє її значення становило  $48,8 \pm 1,9, \%$ ,  $P < 0,05$  ( $n=10$ ; рис 1).

Ми припустили, що NaHS відновлює ацетилхолініндуковане розслаблення ГМ аорти старих щурів внаслідок збільшення секреції ендотеліальними клітинами конститутивного NO. Для підтвердження цього у наступній серії дослідів NaHS додавали одночасно із блокатором синтезу NO – L-NAME. На фоні NaHS та L-NAME спостерігалось значне зменшення амплітуди розслаблення ГМ аорти старих щурів у відповідь на ацетилхолін. Середнє значення його амплітуди було  $2,5 \pm 1,4, \%$ ,  $P < 0,05$  ( $n=10$ ).

Для встановлення можливих механізмів

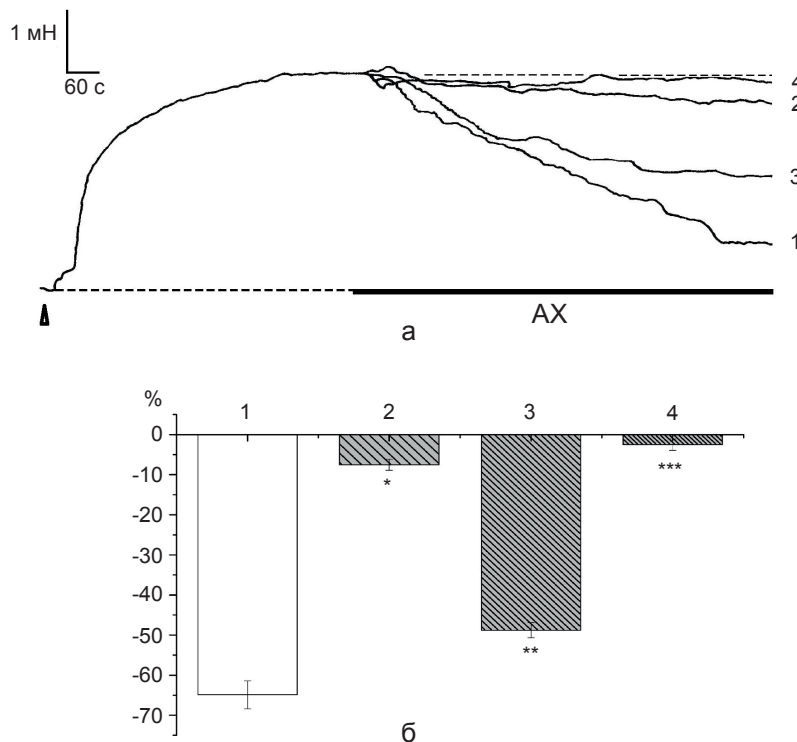


Рис. 1. Вплив NaHS на ацетилхолін (AX)-індуковане розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) аорти старих щурів: а – нативна крива, б – стовпчикова діаграма; 1 – дорослі (контроль), 2 – старі, 3 – старі після введення в перфузійний розчин NaHS, 4 – старі при одночасному введенні в перфузійний розчин NaHS та L-NAME. Темна лінія під кривими – тривалість дії AX. 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. \*  $P < 0,05$  відносно значення у дорослих тварин, \*\*  $P < 0,05$  відносно значення у старих тварин, яким не вводили NaHS; \*\*\*  $P < 0,05$  відносно значення у старих тварин при дії NaHS

впливу NaHS на ендотелійзалежне розслаблення ми провели серію біохімічних дослідів. Як видно з рис. 2, в аорті старих щурів розвивається оксидативний стрес. Так, сумарна швидкість генерації  $^*O_2^-$  перевищувала контрольні (у дорослих) значення в 5,8 разів. Дисмутація нестабільного радикала  $^*O_2^-$  в стабільний  $H_2O_2$  перевищувала контрольні значення в 4,3 раза. Швидкість утворення найбільш активного радикала кисню  $^*OH$ , який утворюється із  $H_2O_2$  в реакції Фентона, була збільшена майже в 12 разів. Як відомо,  $^*OH$ -радикал ініціює ПОЛ, первинними і вторинним продуктами якого є ДК і МДА відповідно [17]. Пули ДК були збільшені у 4,4, а МДА – у 6,5 разів, що є свідченням високої інтенсивності ПОЛ в аорті старих тварин. Ми дослідили також інтенсивність декількох основних шляхів утворення  $^*O_2^-$  (ініціатора оксидативного стресу) в цільних гомогенатах аорти щурів різних експериментальних груп. Так, пули  $LTSC_4$ , які характеризують активність ліпоксигеназного генератора  $^*O_2^-$  і пули сечової кислоти, які характеризують активність ксантинооксидази і одночасно є

маркером гіпоксії та деградації АТФ, перевищували контрольні значення у 2,7 і 8,3 разів відповідно. Вірогідно не відрізнявся від контролю лише вміст  $TxB_2$ , який є маркером циклооксигеназного шляху генерації супероксиду (див. рис. 2).

Одночасно з розвитком оксидативного стресу і ПОЛ в аорті старих щурів спостерігали і нітрозативний стрес (рис. 3). Про це свідчить значне підвищення надлишкового *de novo* синтезу NO (підвищення активності іNOS), його реутилізаційного (підвищення активності нітратредуктази) і декомпозиційного синтезу (зниження пулів НМНТ). Результати також показали, що розвиток оксидативно-нітрозативного стресу і значна інтенсифікація вільнорадикального процесу ПОЛ в аорті старих тварин призводила до зниження активності сNOS у 3 рази, що може свідчити про дефіцит вазорелаксуючої фракції NO – конститутивного NO через порушення його конститутивного синтезу ферментами сNOS. Причиною останнього може бути неспряжений стан сNOS (синтез ним більшою мірою  $^*O_2^-$  замість NO), на що

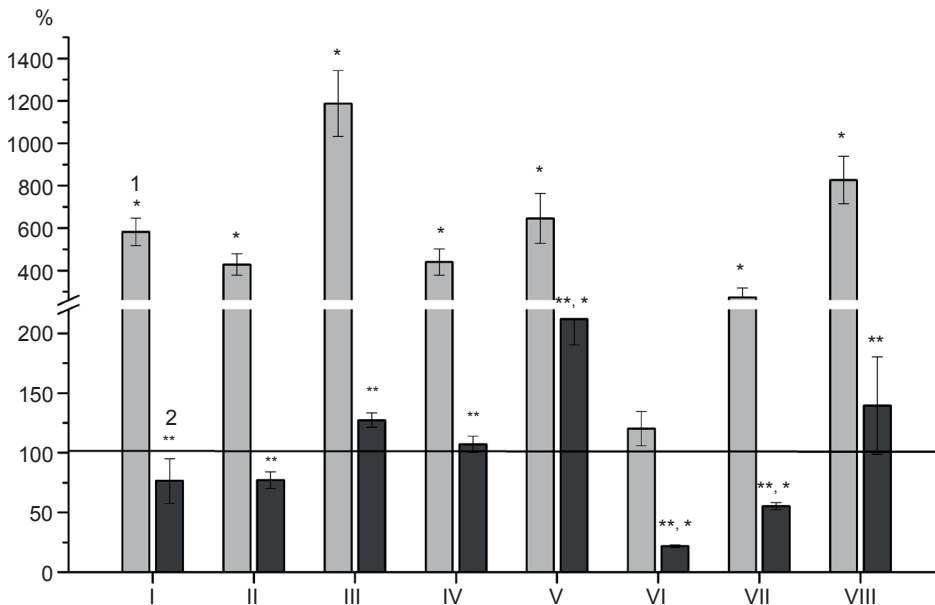


Рис. 2. Відносні значення показників оксидативного стресу в аорті старих щурів перед (1) та після (2) дії NaHS : I – швидкість генерації  $^*O_2^-$ ; II – вміст  $H_2O_2$ , III – швидкість генерації  $^*OH$ , IV – вміст дієнових кон'югатів, V – вміст малонового діальдегіду, VI – вміст тромбоксану  $B_2$ , VII – вміст лейкотрієну  $C_4$ , VIII – вміст сечової кислоти. \*P<0,05 відносно значення у дорослих тварин (100 %). \*\* P<0,05 відносно значення у старих щурів, яким не вводили NaHS

вказує зниження майже у 20 разів розрахованого нами індексу спряження cNOS (рис 4). Неспряження cNOS може розвиватися внаслідок зменшення пулів субстрату синтезу NO de novo L-аргініну через посилення аргіназної активності в аорті старих щурів у 3,4 раза, (див. рис. 3) або зниження пулів кофактора cNOS — тетрагідробіоптерину ( $BH_4$ ), в результаті його окиснення радикалом  $^*O_2^-$  або пероксинітридом ( $ONOO^-$ ) [4]. Нами було встановлено достовірне посилення генерації супероксиду (див. рис.2), і утворення пероксинітриду, про що свідчить вірогідне (майже в 6 разів) підвищення пулів нітрат-аніона — продукту нерадикального розпаду пероксинітриду (див. рис. 3) в аорті старих щурів. Так що обидві вищезгадані причини неспряження cNOS можуть спостерігатися при старінні, призводячи, з одного боку до підвищення генерації супероксиду неспряженою cNOS в аорті старих тварин, з іншого — до зниження синтезу конститутивного NO цими ферментами, тим самим зменшуючи ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти цих тварин (див. рис. 1).

Таким чином, підвищення декомпозиції НМНТ у старих тварин є компенсаторною реакцією на зниження конститутивного de novo синтезу вазодилаторного NO ферментами cNOS. У наших дослідженнях пули НМНТ були достовірно зниженими майже у 2 рази (див. рис. 3). У свою чергу надлишковий, недилаторний NO (синтезований de novo ферментом iNOS, або реутилізацією нітрат-нітрид-аніонів відповідними редуктазами в гіпоксичних умовах) при взаємодії з  $^*O_2^-$  утворює пероксинітрид ( $ONOO^-$ ) із широким спектром пошкоджувальної дії – від ПОЛ, інактивації ферментів і іонних каналів до інгібування мітохондріального дихання [18–20]. Продуктом нерадикального розпаду  $ONOO^-$  (після його протонування) є  $NO_3^-$ , пули якого в аорті старих тварин перевищували контрольні значення в 5,6 рази (див. рис. 3). Продуктами радикального розпаду протонowanego пероксинітриду є ОН-радикал і радикал діоксиду азоту ( $\cdot NO_2$ ) — обидва радикали – ініціатори ПОЛ.

Окремо слід відмітити в аорті старих тварин достовірно зниження (в 1,6 разів)

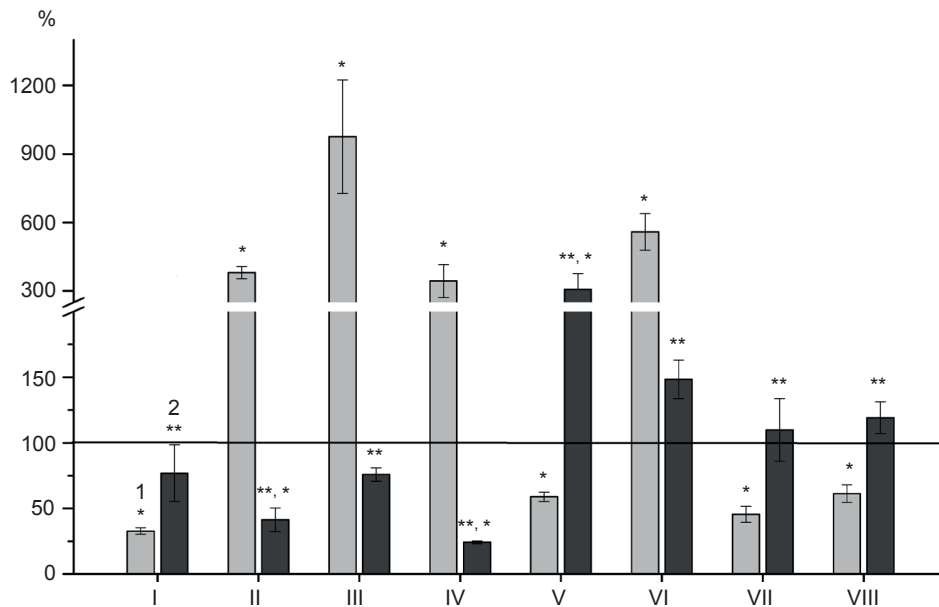


Рис. 3. Відносні значення показників нітрозативного стресу, конститутивного синтезу дилаторного NO та  $H_2S$  в аорті старих щурів перед (1) та після (2) дії NaHS: I – активність cNOS, II – активність iNOS, III – нітратредуктазна активність, IV – аргіназна активність, V – вміст  $NO_2^-$ , VI – вміст  $NO_3^-$ , VII – вміст низькомолекулярних нітрозотіолів, VIII – вміст  $H_2S$ . \* $P < 0,05$  відносно дорослого контролю (100 %); \*\* $P < 0,05$  відносно значення у старих щурів



ендогенних пулів  $H_2S$ , регулятора спряжено-неспряженого стану cNOS, тобто конститутивного синтезу дилататорного NO і потужного кардіо- і васкулопротектора (див. рис. 3, 4).

Таким чином, в аорті старих тварин в результаті окисного стресу і неспряження cNOS знижується конститутивний синтез дилататорного NO і збільшується утворення високотоксичного пероксинітриду. Наслідок цих процесів – глибоке порушення ендотелій-залежного розслаблення ГМ аорти у старих тварин.

Введення *in vivo* NaHS старим тваринам значно збільшувало ендогенні пули  $H_2S$  в аорті (див. рис. 3). Це супроводжувалося суттєвим пригніченням як окисного стресу, в результаті інгібування генерації  $^*O_2^-$  (див. рис.2), так і нітрозативного стресу (див. рис. 3) через зменшення надлишкового утворення NO і його високотоксичного похідного ONOO $^-$ . Одночасно відновлювався спряжений стан cNOS і посилювався конститутивний синтез

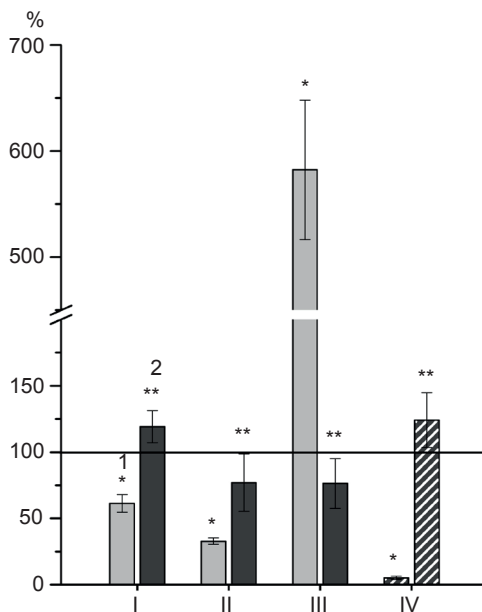


Рис. 4. Відносні значення індексу спряження конститутивних NO-синтаз та пов'язаних з ним показників в аорті старих щурів перед (1) та після (2) дії NaHS: I – вміст  $H_2S$ , II – активність cNOS, III – швидкість генерації  $^*O_2^-$ , IV – індекс спряження. \*P<0,05 відносно дорослих щурів (контроль, 100%); \*\*P<0,05 відносно старих щурів

вазорелаксуючого NO (див. рис. 4). Останнє покращувало ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти у старих тварин після введення в організм донора сірководню. Ці результати підтверджують нашу гіпотезу [12, 14, 15] про важливу роль сірководню у відновленні спряженого стану cNOS і конститутивного синтезу дилататорного NO (такі речовини називають декаплерами (decapler). Таким чином, результати нашої роботи свідчать про те, що сірководень – потужний декаплер, як в умовах *in vivo*, так і *in vitro*.

## ВИСНОВКИ

1. У старих тварин значно порушується ендотелійзалежне ацетилхолініндуковане розслаблення гладеньких м'язів аорти.

2. Введення *in vitro* донора сірководню (NaHS) в перфузійний розчин підвищувало ендотелійзалежне розслаблення ГМ аорти старих щурів, яке знижувалося при введенні в перфузійний розчин інгібітора конститутивного синтезу дилататорного NO – L-NAME.

3. В ГМ і ендотеліальних клітинах аорти старих щурів знижуються ендогенні пули  $H_2S$ , розвивається оксидативний і нітрозативний стрес, наслідком якого є розвиток неспряженого стану cNOS, за якого ці ферменти (eNOS і nNOS) кальційзалежного конститутивного *de novo* синтезу NO більшою мірою генерують  $^*O_2^-$  замість дилататорного NO.

4. NaHS (донор  $H_2S$ ), введений *in vivo* в організм старих тварин, пригнічував оксидативний і нітрозативний стрес, відновлював спряжений стан cNOS та збільшував конститутивний синтез дилататорного NO.

K.O. Drachuk, A.V. Kotsjuruba, V.F. Sagach

## HYDROGEN SULFIDE DONOR, NAHS, RECOVERS CONSTITUTIVE NO SYNTHESIS AND ENDOTHELIUM-DEPENDENT RELAXATION OF ISOLATED AORTA IN OLD RATS

The objective of this study was to show the effect of  $H_2S$  donor, NaHS on the endothelium-dependent vasorelaxation, free

radical state and cNOS uncoupling in old rats. In the aorta of old rats a combined oxidative and nitrosative stress develops that leads to cNOS uncoupling and decreased constitutive synthesis of the NO. That biochemical changes correlate with lowering of the endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscles ( $7,5 \pm 1,4\%$ , compared with  $64,9 \pm 3,5\%$  in adults). It was found that, due to the combined inhibition of oxidative and nitrosative stress, NaHS restores constitutive de novo synthesis of NO by restoring cNOS coupling. Additionally, NaHS improves endothelium-dependent vasorelaxation by increasing (by 6,5 times) Ach-induced relaxation of aortic smooth muscles.

Key words: aging; endothelial dysfunction; oxidative stress; nitrosative stress; cNOS uncoupling; hydrogen sulfide; nitric oxide.

**К.О. Драчук, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач**

### **ДОНОР СЕРОВОДОРОДА НАHS ВОССТАНАВЛИВАЕТ КОНСТИТУТИВНЫЙ СИНТЕЗ NO И ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМОЕ РАССЛАБЛЕНИЕ В АОРТЕ СТАРЫХ КРЫС**

Изучали влияния донора эндогенного сероводорода, NaHS на показатели окислительного (как оксидативного, так и нитрозативного) стресса, состояние сопряжения конститутивных NO-синтаз (cNOS) и эндотелийзависимое расслабление гладких мышц (ГМ) аорты у старых крыс. Установили развитие оксидативного и нитрозативного стресса у животных, которые не получали NaHS, следствием чего было несопряжение (uncoupling) состояния cNOS и снижение конститутивного синтеза NO. В результате данных биохимических сдвигов нарушалось ацетилхолиндуцированное расслабление ГМ аорты, амплитуда которого  $7,5 \pm 1,4\%$  по сравнению с  $64,9 \pm 3,5\%$  в контрольной группе взрослых животных. Показано, что NaHS существенно угнетал оксидативный и нитрозативный стресс, восстанавливал сопряжение cNOS и увеличивал конститутивный синтез NO. Это способствовало улучшению ацетилхолиндуцированного расслабления ГМ аорты, амплитуда которого у старых животных, получавших NaHS, увеличивалась до  $48,8 \pm 1,9\%$ .

Ключевые слова: старение; эндотелиальная дисфункция; оксидативный стресс; нитрозативный стресс; несопряжение cNOS; сероводород; оксид азота.

#### **REFERENCES**

- Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev.* 2010;62(3):525-63.
- Van Hove CE, Van der Donckt C, Herman AG, Bult H, Franssen P. Vasodilator efficacy of nitric oxide depends on mechanisms of intracellular calcium mobilization in mouse aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2009; 158(3):920-30.
- Soloviev A, Lehen'kyi V, Zelensky S, Hellstrand P. Nitric oxide relaxes rat tail artery smooth muscle by cyclic GMP-independent decrease in calcium sensitivity of myofilaments. *Cell Calcium.* 2004;36(2):165-73.
- El Assar M, Angulo J, Vallejo S, Peiró C, Sánchez-Ferrer CF, Rodríguez-Mañas L. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. *Front Physiol.* 2012;28;3:132.
- 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.
- Streeter E, Ng HH, Hart JL. Hydrogen sulfide as a vasculoprotective factor. *Med Gas Res.* 2013;3(1):9.
- Qiao WL, Yang WX, Liu L, Shi Y, Cui J, Liu H, et al. Exogenous hydrogen sulfide reduces vascular aging in D-galactose-induced subacute aging rats. *Sheng Li Xue Bao.* 2014;66(3):276-82.
- 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 U S A.* 2014;111(8):3182-7.
- Bucci M, Papapetropoulos A, Vellecco V, Zhou Z, Pyriochou A, Roussos C, et al. Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(10):1998-2004.
- Coletta C, Papapetropoulos A, Erdelyi K, Olah G, Módis K, Panopoulos P, et al. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(23):9161-6.
- Beltowski J, Jamroz-Wiśniewska A. Hydrogen sulfide and endothelium-dependent vasorelaxation. *Molecules.* 2014; 19(12):21183-99.
- Drachuk KO, Kotsjuruba AV, Bazilyuk OV, Stepanenko LG, Sagach VF. Propargylglycine restores endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscle in old rats. *Fiziol Zh.* 2014; 60(4):3-10. [Ukrainian].
- Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'iak BS, Sahach VF. Induction of oxidative stress in heart mitochondria in brain focal ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone. *Fiziol Zh.* 2014; 60(3):11-7. [Ukrainian].
- Dorofeyeva NA, Kotsuruba AV, Kopjak BS, Sagach VF. Physical exercise training cancels constitutive nos uncoupling and induced violations of cardiac hemodynamics in hypertension (part III). *Fiziol Zh.* 2015; 61(4):11-21 [Ukrainian].
- Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'iak BS, Sahach VF. Induction of nitrosative stress in mitochondria of rats hearts in experimental ischemia-reperfusion of the brain and its correction by ecdysterone. *Fiziol Zh.* 2014; 60(5):3-13. [Ukrainian].
- Kotsiuruba AV, Dorofeyeva NA, Sagach VF. NOS uncoupling is accompanied with induction of the oxidative stress and the cardiohemodynamics disturbances in hypertension. *Fiziol Zh.* 2015; 61(3):3-10. [Ukrainian].

17. Sergent O, Morel I, Cogrel P, Chevanne M, Padeloup N, Brissot P, et al. Simultaneous measurements of conjugated dienes and free malondialdehyde, used as a micromethod for the evaluation of lipid peroxidation in rat hepatocyte cultures. *Chem Phys Lipids*. 1993; 65(2):133-9.
18. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996; 271(5):1424-37.
19. Szabó C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock*. 1996; 6(2):79-88.
20. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol*. 1995;268(5):699-722.

*Матеріал надійшов  
до редакції 07.05.2015*