Міністерство охорони здоров'я України
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

РЕВЕНКО ОЛЕГ ВІКТОРОВИЧ

УДК 612.339:612.014.484]-08:816-053

ДИСЕРТАЦІЯ

ВІКОВІ АСПЕКТИ ФІЗІОЛОГІЧНОЇ РОЛІ БРИЖІ ТА ЇЇ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ЗА УМОВ СТРЕСУ

(експериментальне дослідження)

222 – Медицина
22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.
_____ Ревенко О.В.

Науковий керівник: Заячківська Оксана Станіславівна, доктор медичних наук, професор

Львів-2022

АНОТАЦІЯ

Ревенко Олег Вікторович. Вікові аспекти фізіологічної ролі брижі та її жирової тканини за умов стресу (експериментальне дослідження). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина», галузь знань 22 «Охорона здоров'я». – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, Львів, 2022.

Дана робота присвячена вивченню фізіологічного значення брижі та її жирової тканини у віковому аспекті за умов висококалорійного високофруктозного харчування, індукції гострого стресу та їхнього комбінованого впливу, а також дослідженню біорегуляторного впливу сірководню (H_2S) у збережені цілісності брижі за умов моделювання пошкоджень різного ґенезу. Вперше вивчено вікові особливості ультрамікроскопічної структурної організації компонентів брижі у нормі та закономірностей її перебудови за умов індукції гострого стресу у щурів різного віку. При вивченні вікових відмінностей морфо-функціональної ультраструктурної організації брижі та її клітинних компонентів за допомогою електронномікроскопічного дослідження, виявлено, що у старих щурів в порівнянні до дорослих, наявні ознаки дегенеративних змін мезентеріальних адипоцитів, фрагментація великих ліпідних крапель, поява дефектних мітохондрій різної форми, а також виявлено ознаки ультраструктурних змін у мезентеріальних мікросудинах та присутність деструктивно змінених фібробластів.

Вперше проведено комплексні морфо-функціональні дослідження тканин брижі та її компонентів за допомогою електронномікроскопічного методу в аспекті встановлення особливостей вікових змін за умов поєднаного впливу 4-тижневого високофруктозного харчування та індукції гострого стресу. У тварин в моделях пошкоджень, викликаних 28-миденною

високофруктозною дієтою (HFD), виявлено цитолітичні зміни клітин брижі, що мали більш виражений характер у старих тварин порівняно до дорослих щурів. Характерними проявами даних змін була наявність дегенеративних змінених, гіпертрофічних та гіперпластичних мезентеріальних адипоцитів з пошкодженими мітохондріями різної форми, ознаки ендотеліальної дисфункції та дезорганізованої сполучної тканини. Вплив гострого стресу виявив вікові відмінності в адаптивно-компесаторних механізмах тканинних компонентів брижі з підвищенням її чутливості до цитолітичного впливу у старих щурів за умов перебування на HFD. При віковому порівнянні у старих тварин виявлено збільшення вмісту реактивних субстанцій тіобарбітурової кислоти (TBARS) у сироватці крові на 40% відповідно до дорослих щурів ($p<0,05$). За умов HFD визначено збільшення вмісту TBARS на 12-15% в обох вікових групах порівняно до аналогічних вікових груп на стандартній дієті ($p<0,05$). Дані результати свідчать про появу окисного стресу, що викликаний порушенням окисно-відновлювальної рівноваги та цитолітичним пошкодженням брижі та її компонентів. Дані зміни у подальшому можуть стати тригером для виникнення розладів у метаболічному здоров'ї.

Вперше проведено дослідження вікових відмінностей ролі H_2S в адаптаційно-компенсаторних реакціях тканини брижі щурів за умов 4-тижневої високофруктозної дієти, індукції гострого стресу та екзогенного введення донорів синтезу сірководню. Визначено вплив екзогенних донорів H_2S на вміст TBARS у сироватці крові та активність ензимів цистатіонін γ-ліази (CSE), цистатіонін β-синтази (CBS), сульфіт оксидази (SO) і тіосульфат-сульфуртрансферази (TST) у гомогенатах тканин брижі у щурів різного віку.

Нами з'ясовано особливості впливу екзогенних донорів синтезу сірководню: натрій гідросульфіду (NaHS) і гібридного H_2S-асоційованого аспірину (H_2S-аспірину, ATB-340) на баланс про- та антиоксидантних чинників у брижі щурів різного віку. Досліджено резистентність брижі та її жирової тканини у моделях вікових змін експериментального метаболічного ушкодження за допомогою гіперкалорійної 4-тижневої високофруктозної

дієти, індукції гострого стресу, за умов попереднього 9-тиденного введення екзогенних донорів синтезу H_2S: NaHS і H_2S-аспірину (АТВ-340) до індукції гострого пошкодження та проведено порівняння отриманих результатів з дією класичного аспірину. Вперше описано порівняльну характеристику впливу екзогенних донорів сірководню на зміни показників вмісту TBARS у сироватці крові і активність ензимів CBS, CSE, SO, TST у гомогенатах брижі у віковому аспекті та за умов високофруктозного харчування. Дослідження вікових відмінностей проявів адаптаційно-компенсаторних механізмів брижі за умов впливу гострого стресу та корекції ендогенного синтезу сірководню введенням екзогенних донорів H_2S виявило зменшення процесів перекисного окиснення ліпідів і важливість ендогенної активності ензимів CBS, CSE, SO і TST у забезпеченні резистентності брижі та її жирової тканини до пошкодження за рахунок дії біорегуляторного впливу H_2S.

Вперше описано особливості взаємозв'язку цитопротекції мезентеріальних адипоцитів та мікросудин і фібробластів за умов моделювання ендогенного синтезу H_2S та поєднаного впливу високофруктозного харчування і гострого стресу. З'ясовано особливості впливу екзогенних донорів H_2S на прикладі NaHS та H_2S-аспірину на забезпечення окисно-відновної рівноваги за замінами вмісту TBARS та активністю ензимів CBS, CSE, SO, TST у гомогенатах брижі щурів різного віку за умов поєднаного впливу стресу та високофруктозного харчування.

Виявлено, що ендогенний H_2S бере активну участь у забезпечені міжклітинної комунікації у мезентеріальній тканині, цитопротекції та механізмах регуляції окисно-відновної рівноваги, проявляючи антирадикальну дію та протекторну дію на мітохондрії мезентеріальних адипоцитів за умов стресу. Встановлено, що H_2S відіграє важливу роль у нормалізації мітохондріальної дисфункції мезентеріальних адипоцитів та відновленні окисно-відновної рівноваги за умов змін, викликаних високофруктозним харчуванням та старінням. Дані спостереження можна використати у перспективі для вироблення нових профілактичних і

терапевтичних стратегій для підтримки метаболічного здоров'я та лікування метаболічних розладів. Використання гібридного H_2S-асоційованого аспірину, як ендогенного донора синтезу H_2S є перспективним з огляду на залучення H_2S у клітинні механізми забезпечення редокс-рівноваги і природної резистентності брижі до дії цитолітичних пошкоджувальних чинників.

Виявлено вікові відмінності каталітичної активності ензимів ендогенного синтезу H_2S у дорослих і старих щурів, за умов індукції гострого стресу та HFD. Виявлено зменшення активності ензиму CBS у гомогенатах брижі щурів на 70% ($p<0,05$) за умов перебування на високофруктозному харчуванні. Застосування екзогенних донорів H_2S спричинило зменшення активності ензиму SO в гомогенатах брижі та зменшенням сироваткового вмісту TBARS, в обох вікових групах щурів, як за умов стандартного харчування, так і при високофруктозному харчуванні, що можна трактувати, як непрямий доказ нормалізації енергетичних та окисних процесів у тканинах брижі.

Виявлено, що зміни брижі та її тканинних компонентів – мезентеріальних адипоцитів, їхніх мітохондрій та мезентеріальної сполучної тканини можуть носити оборотний характер за умов застосування екзогенних донорів синтезу H_2S – NaHS та ATB-340, що опосередковано підтверджує цитопротекторні властивості ендогенного H_2S. Застосування екзогенних донорів H_2S – NaHS і ATB-340, які володіють властивостями збільшувати у тканинах ендогенний вміст H_2S, сприяє кращому зрозумінню механізмів формування вікових змін резистентності тканини брижі та розумінню значення ендогенного синтезу H_2S у протидії пошкоджувальним чинникам, що лежать в основі мезентеріальної патології. Отримані результати у перспективі можуть бути корисними для розробки науково обґрунтованих засад оптимальної профілактики та лікування патологій брижі та її компонентів.

Встановлено, що екзогенне введення NaHS для покращення ендогенного вмісту H_2S викликало зменшення вмісту TBARS у старих щурів за умов високофруктозної дієти та індукції гострого стресу, що може свідчити про зменшення інтенсивності окисного впливу на тлі введення NaHS.

Дослідження продемонстрували існування вікових відмінностей у активності ензимів CBS, CSE, TST брижі, а саме зменшення активності даних ензимів у щурів при старінні. Встановлено, що HFD викликає зменшення активності відповідних ензимів, тоді як введення екзогенних донорів H_2S спричиняє збільшення активності – CBS, CSE, TST, що свідчить про збільшення ендогенного синтезу H_2S, що проявляється його мультифункціональною дією через вазодилятаційний, антиокисний і протиапоптичний ефекти.

Результати комплексного морфо-функціонального дослідження брижі та біохімічного дослідження активності ензимів синтезу H_2S поглиблюють розуміння фізіологічних основ клітино-молекулярних механізмів функціонування брижі її клітинних компонентів та біорегуляторного впливу H_2S. Дослідження поглиблюють розуміння фізіологічного значення брижі та її жирової тканини за умов високовуглеводного харчування та стрес-індукованих пошкоджень. Встановлено значення брижі та її жирової тканини на стрес-резистентність організму за умов одинарного і поєднаного впливу гострого стресу та високофруктозного харчування у щурів різного віку.

Вивчення біомаркерів перекисного окиснення ліпідів на основі визначення вмісту TBARS у сироватці крові та активності ензимів CBS, CSE, SO і TST у гомогенатах брижі, що беруть участь у ендогенному синтезі H_2S, дозволило з’ясувати механізми впливу H_2S на брижу та мезентеріальні адипоцити у віковому аспекті та за умов експериментальних метаболічних пошкоджень, викликаних високофруктозним харчуванням. Результатами наших досліджень вперше продемонстровано, що H_2S-пов’язані шляхи регуляції є важливими для мезентеріальних цитопротекторних реакцій та забезпечують відновлення порушень окисно-відновної рівноваги. Виявлені

особливості цитопротекторних механізмів брижі за умов модифікації ендогенного вмісту H_2S вказують на перспективність доклінічних досліджень донорів сірководню, а саме гібридного нестероїдного протизапального препарату, H_2S-аспірину, як можливого безпечного терапевтичного засобу.

Ключові слова: брижа, адипоцити, ендотелій, вікові зміни, гідроген сульфід (H_2S), окисно-відновна система, високофруктозна дієта (HFD), CBS, CSE, TST, SO.

ABSTRACT

Oleh Viktorovych Revenko. Age-related aspects of the physiological role of the mesentery and its adipose tissue under stress (experimental study). – Qualifying scientific work as a manuscript.

A thesis for obtaining the scientific degree of a Doctor of Philosophy majoring in 222 *Medicine*, a field of study 22 *Healthcare*. – Danylo Halytsky Lviv National Medical University, MoH [Ministry of Health] of Ukraine, Lviv, 2022.

The thesis is devoted to the study of the physiological role of the mesentery and its adipose tissue in terms of age under a high-calorie high fructose diet, acute stress induction, and their combined impact, as well as to the study of the bioregulatory influence of hydrogen sulfide (H_2S) on the preservation of mesenteric intactness while modeling damages of various origin. The peculiarities of the ultramicroscopic structural organization of mesenteric elements within normal limits and patterns of its transformation when aging, and in terms of acute stress induction in rats of various ages were first studied. When studying the age-related differences of morphofunctional ultrastructural organization of mesentery and its cellular elements using electron microscopy, it has been determined that old rats as compared to adult rats presented signs of degenerative changes of mesenteric adipocytes, fragmentation of large lipid droplets, the occurrence of defect mitochondria of

various shape, and detected signs of ultrastructural changes in mesenteric microvessels and presence of destructively changed fibroblasts.

Complex morphofunctional studies of mesenteric tissue and its components through electron microscopy were first conducted in terms of determining the peculiarities of the age-related changes under conditions of a combined influence of a 4-week high fructose diet and acute stress induction. The animals with patterns of damage induced by a 28-day high fructose diet (HFD) developed the cytolytic changes of mesenteric cells, being more marked in old rats as compared to adult rats. The specific features of the mentioned changes were represented by degeneratively changed, hypertrophic, and hyperplastic mesenteric adipocytes with damaged mitochondria of various shapes, endothelial dysfunction and the presence of disorganized connective tissue. The influence of acute stress detected the age-related differences in adaptation and compensatory mechanisms of mesenteric tissue components with its increased sensitivity to cytolytic influence in old rats being on an HFD. The increased level of TBARS in blood serum for 40% was found in old rats as compared to adult rats ($p<0.05$) when conducting an age-based comparison. The increased level of TBARS for 12-15% was detected in both age groups being on an HFD as compared to similar age groups on a standard diet ($p<0.05$). The results evidence the development of the oxidative stress induced by impaired oxidation-reduction equilibrium and cytolytic damage to the mesentery and its components. The mentioned changes can subsequently trigger the impairment of metabolic health.

The age-related differences of H_2S role in adaptation and compensatory reactions of mesenteric tissue of rats under conditions of a 4-week high fructose diet, acute stress induction, and exogenous infusion of hydrogen sulfide synthesis donors were first studied. The influence of the exogenous H_2S donors on the level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in blood serum and activity of cystathionine γ-lyase enzyme (CSE), cystathionine β-synthase (CBS), sulfite oxidase (SO), and thiosulfate sulfurtransferase (TST) in mesenteric tissue homogenates in rats of various age has been determined.

We have determined the peculiarities of influence of exogenous hydrogen sulfide synthesis donors: sodium hydrosulfide (NaHS) and hybrid H_2S-associated aspirin (H_2S-aspirin, ATB-340) on a balance of pro- and antioxidant factors in the mesentery of rats of various ages. The resistance of mesentery and its adipose tissue was studied in patterns of age-specific changes of experimental metabolic damage using a hypercaloric 4-week high fructose diet, acute stress induction, upon the condition of a 9-day infusion of exogenous H_2S synthesis donors: NaHS and H_2S-aspirin (ATB-340) before acute damage induction, and the obtained findings were compared to the typical aspirin's effect. The comparative analysis of the exogenous H_2S donors' influence on the change of TBARS level in blood serum and CBS, CSE, SO, TST enzymes activity in mesenteric homogenates was first described in terms of age and under conditions of a high fructose diet. The study of mesenteric adaptation and compensatory mechanisms under conditions of acute stress impact and correction of hydrogen sulfide endogenous synthesis by infusion of exogenous H_2S donors demonstrated the reduced lipid peroxidation processes and the importance of the endogenous activity of CBS, CSE, SO, and TST enzymes in the provision of the resistance of mesentery and its adipose tissue to damage due to H_2S bioregulatory impact.

The peculiarities of the relationship of cytoprotection of mesenteric adipocytes and microvessels and fibroblasts during modeling of H_2S endogenous synthesis and combined influence of a high fructose diet and acute stress were first described. The peculiarities of H_2S exogenous donor's influence on oxidation-reduction equilibrium provision were determined using NaHS and H_2S-aspirin as based on change of TBARS level and CBS, CSE, SO, TST enzymes activity in mesenteric homogenates of rats of various age in terms of a combined impact of stress and high fructose nutrition.

It has been determined that the endogenous H_2S actively participates in the provision of intercellular communication in mesenteric tissue, cytoprotection, and mechanisms of oxidation-reduction equilibrium regulation, demonstrating the anti-radical and protective effect on mesenteric adipocytes mitochondria under stress. It

has been defined that H_2S plays an important role in the normalization of mitochondrial dysfunction of mesenteric adipocytes and restoration of oxidation-reduction equilibrium in terms of changes triggered by a high fructose diet and aging. The mentioned findings can be applied in the long term for developing new prevention and therapeutic approaches to the maintenance of metabolic health and treatment of metabolic disorders. Application of hybrid H_2S-associated aspirin as an endogenous donor of H_2S synthesis is advantageous considering H_2S involvement in the cellular mechanisms of redox balance provision and physiological resistance of the mesentery to influence cytolytic damaging factors.

The age-related differences in the catalytic activity of enzymes of H_2S endogenous synthesis in adult and old rats under conditions of acute stress induction and HFD were determined. Under conditions of being on a high fructose diet, the CBS enzyme activity was reduced by 70% ($p<0.05$) in mesenteric homogenates. The application of H_2S exogenous donors resulted in the reduced activity of SO enzyme in mesenteric homogenates and the decreased level of TBARS in serum in both age groups of rats, under conditions of being on a standard diet, as well as on a high fructose diet, which can be interpreted as indirect evidence of energy and oxidative processes normalization in mesenteric tissue.

It has been determined that changes of the mesentery and its tissue components – mesenteric adipocytes, their mitochondria, and mesenteric connective tissue – can be reversible under conditions of application of exogenous donors of H_2S synthesis – NaHS and ATB-340, which indirectly confirms the cytoprotective features of endogenous H_2S. The application of H_2S exogenous donors – NaHS and ATB-340, which can increase the level of endogenous H_2S in tissue, contributes to a better understanding of formation mechanisms of age-specific changes in mesenteric tissue resistance and understanding of H_2S endogenous synthesis significance in resistance to damaging factors, which are the basis for mesenteric pathology. The obtained findings can be useful for the future development of scientifically substantiated principles of adequate prevention and treatment of mesentery and its components pathology.

It has been defined that the exogenous infusion of NaHS for the improvement of H_2S level in tissue triggered the decrease of TBARS level in old rats under conditions of a high fructose diet and acute stress induction, which can evidence the reduced intensity of oxidative influence secondary to NaHS infusion.

The studies demonstrated the age-specific differences in the activity of CBS, CSE, TST mesenteric enzymes, namely the reduced activity of the mentioned enzymes in rats with aging. It has been defined that an HFD causes the reduced activity of the relevant enzymes, meanwhile, the infusion of H_2S exogenous donors results in the increased activity of – CBS, CSE, TST, which evidences the increased synthesis of H_2S, which is manifested by its multifunctional impact, vasodilatory, antioxidative and antiapoptotic effects.

The results of the complex morphofunctional study of the mesentery and biochemical study of the activity of H_2S synthesis enzymes provide a more profound understanding of the physiological basis of the cellular and molecular mechanisms of functioning of the mesentery and its cellular components, and the bioregulatory impact of H_2S. The research provides a more profound understanding of the physiological value of mesentery and its adipose tissue under conditions of a high carbohydrate diet and stress-induced damages. The influence of the mesentery and adipose tissue on body stress resistance under conditions of the single and combined impact of acute stress and high fructose diet in rats of various ages has been determined.

Study of lipid peroxidation biomarkers based on the determination of TBARS level in blood serum and CBS, CSE, SO, TST enzymes activity in mesenteric homogenates, which participate in H_2S endogenous synthesis, allowed for defining the mechanisms of H_2S influence on the mesentery and mesenteric adipocytes in terms of age and under conditions of experimental metabolic damages, induced by a high fructose diet. Our research findings first demonstrated that H_2S-associated means of regulation are important for mesenteric cytoprotective reactions and provide restoration of the impaired oxidation-reduction equilibrium. The determined peculiarities of mesenteric cytoprotective mechanisms in terms of modification of

endogenous H_2S denote the advantages of the preclinical studies of hydrogen sulfide donors, a namely hybrid non-steroidal anti-inflammatory drug, H_2S-aspirin, as a possible therapeutic agent.

Keywords: mesentery, adipocytes, endothelium, age-related changes, hydrogen sulfide (H_2S), redox system, high-fructose diet (HFD), CBS, CSE, TST, SO.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані результати дисертації:

1. **Ревенко ОВ**, Заячківська ОС. Вікові морфо-функціональні зміни структур брижі за умов стрес-індукованих пошкоджень і дії гідроген сульфіду. Клінічна та експериментальна патологія. 2018.Т.17,№3(65),ч.2. С. 104-108.
   (Дисертант провів фрагмент експериментального дослідження та здійснив аналіз отриманих результатів, їх статистичну обробку, підготував статтю до друку).
2. **Revenko O**, Zaichko N, Wallace J, Zayachkivska O. Hydrogen sulfide system attenuates injury by hyperglycemia and stress: The role of mesenteric adipocytes in ages animals. Праці НТШ Медичні науки. 2018, Т. 54, № 2. С. 115-124.
   (Дисертант виконав фрагмент експериментального дослідження, провів аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготував статтю до друку).
3. **Revenko O**, Zaichko N, Wallace J, Zayachkivska O. Exogenous hydrogen sulfide for the treatment of mesenteric damage associated with fructose-induced malfunctions via inhibition of oxidative stress. Ukr.Biochem.J. 2020; Volume 92, Issue 2, Mar-Apr, pp. 86-97.
   (Дисертант провів фрагмент експериментального дослідження та здійснив аналіз отриманих результатів, їх статистичну обробку, підготував статті до друку).
4. **Revenko O**, Kovalyshyn V, Yashchenko A, Wallace J, Zayachkivska O. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug ATB-340 treatment potentially reduces mesenteric metaflammation in the experimental age-and high fructose dietary-induced injury. Proceeding of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences. 2021 Jun 13;64(1), pp. 95-106.
   (Дисертант провів експериментальну частини роботи,

пов'язаної з вивченням впливу гідроген сульфід-спорідненого аспірину на тканину брижі та здійснив аналіз отриманих результатів, їх статистичну обробку, підготував статтю до друку).

5. **Revenko O**, Pavlovskiy Y, Savytska M, Yashchenko A, Kovalyshyn V, Chelpanova I, Varyvoda O, Zayachkivska O. Hydrogen sulfide prevents mesenteric adipose tissue damage, endothelial dysfunction, and redox imbalance from high fructose diet-induced injury in aged rats. Frontiers in Pharmacology. 2021 Aug 30;12:693100. *(Дисертант провів експериментальне дослідження та здійснив аналіз отриманих результатів, їх статистичну обробку, підготував статтю до друку).*
6. Була Н, Павловський Я, **Ревенко О.** Вплив сірководню на зміни цитопротекції за умов стресу. В: Сабо Ш., Сабо К., Заячківська О. Стрес: від Ганса Сельє до сьогодні. Львів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Наукове товариство ім. Шевченка; 2019. Розд.10, с.109-111. *(Дисертант представив результати експериментальної частини роботи, пов'язаної з вивченням фізіологічної ролі брижі за умов стресу, підготував матеріал до друку).*
7. Савицька МЯ, Суходольська НВ, Ковальчук ІМ, Була НС, **Ревенко ОВ**, Лис ОБ, Павловський ЯІ. Фізіологія травлення: навчальний посібник до практичних занять та самостійної роботи для студентів-магістрів медичного факультету. Львів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького; 2019. 102 с. *(Дисертант представив результати експериментальної частини роботи, пов'язаної з вивченням механізмів цитопротекторної дії сірководню на тканину брижі, підготував матеріал до друку).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію результатів дисертації:

8. Bula N, Pavlovsky Y, Student V, **Revenko O**, Wallace J, Zayachkivska O. Translational aspects of place of hydrogen sulfide-releasing non-sreriodal anti-inflammatory drugs on the tomorrow's landscape for stress-associated disorders. Proceedings of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences. 2017;49(1):21. *(Дисертант підготував тези до друку)*.
9. Pavlovskiy J, **Revenko O**, Grushka O, Zayachkivska O, Linking hydrogen sulfide (H_2S) effects with anti-inflammatory pathway is romising for resolution of stress-associated disorders. Всеукраїнська науково-практична конференція «Довкілля і здоров'я»: тези доп. Тернопіль, 2018. С. 45-46. *(Дисертант підготував тези до друку)*.
10. **Ревенко** ОВ. Морфо-функціональні особливості білого жиру очеревини за умов стресу. Всеукраїнська науково-практична конференція «Довкілля і здоров'я»: тези доп. Тернопіль, 2018. С. 51-52. *(Дисертант підготував матеріал для стендової доповіді, тези до друку)*.
11. **Revenko OV**, Pavlovskyi YI, Zayachkivska OS. The significance of crosstalk of Cystathionine-γ-lyase/Hydrogen Sulfide system and redox homeostasis under stress and hyperglycemia: Focus on mesenterial adipocytes. RECOOP ninth Annual Project Review Meeting, Bratislava, Slovak Republic. 2018:65. *(Дисертант підготував матеріал для стендової доповіді, тези до друку)*.
12. **Revenko O**, Zaichko N, Wallace J, Zayachkivska O. Targening hydrogen sulfide system treatment for mesenterial adiposity in rats submitted to fructose consumption. Фізіологічний журнал, 2019, Т. 65, № 3, С. 118-119. *(Дисертант підготував матеріал для стендової доповіді, тези).*
13. Zayachkivska O, Pavlovskiy Y, **Revenko O**, Yashchenko A. Physiological Basis For Novel Drug Hydrogen Sulfide-Related

Therapy Used To Treat Oxidative Stress In The Model Of Fructose-Induced Injury. The FASEB Journal. 2019 Apr;33(1):lb67-. *(Дисертант підготував тези до друку)*.

14. **Ревенко О**, Заячківська О. Відмінності функціонування мітохондрій жирової тканини брижі за умов надмірного споживання фруктози та екзогенного введення донорів сірководню. XVIII Конгрес СФУЛТ. Львів, 1-3 жовтня 2020. Матеріали міжнародного наукового конгресу, тези доп. Львів-Київ-Чикаго, 2020. С. 192-193. *(Дисертант підготував тези до друку)*.
15. Zayachkivska O, **Revenko O**, Bula N, Savytska M, Yaschenko A. Amelioration of metaflammation induced in rats by exogenous hydrogen sulfide: Focus on mesenteric adipocyte oxidative stress. The FASEB Journal. 2020 Apr 1;34(S1):1-. *(Дисертант підготував тези до друку)*.
16. **Revenko O**, Pavlovskiy Y, Savytska M, Zayachkivska O. Mitochondria in mesentery adipocytes are the key targets for NSAID-induced injury and H_2S cytoprotection during advanced age and metaflammation. 15th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation. Zagreb, Croatia. 2021 Oct 7-8; 14 *(Дисертант підготував матеріал для он-лайн презентації тези)*.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 20

ВСТУП 22

РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА ФІЗІОЛОГІЧНУ РОЛЬ БРИЖІ ТА ЇЇ КОМПОНЕНТІВ У ВІКОВОМУ АСПЕКТІ ТА ЗА УМОВ БІОРЕГУЛЯТОРНОГО ВПЛИВУ СІРКОВОДНЮ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Головні засади сучасних поглядів на функції брижі 31

1.2 Фізіологічні, молекулярні та клінічні аспекти функціонування жирової тканини 36

1.3 Особливості біорегуляторного впливу сірководню на жирову тканину та адипогенез 38

1.3.1 Вплив сірководню на регуляцію адипогенезу 40

1.3.2 Вплив H_2S на чутливість жирової тканини до інсуліну та засвоєння глюкози 43

1.3.3 Роль сірководню на регуляцію ліполізу 46

1.3.4 Роль H_2S за умов ожиріння 47

1.4 Роль H_2S і периваскулярної жирової тканини для регуляції судинних реакцій 48

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об’єкт, етапи та умови дослідження 54

2.2 Методика експериментального пошкодження тканин брижі за умов високофруктозної дієти 59

2.3 Методика індукції гострого стресу 59

2.4 Методика дослідження вікових особливостей ролі гідроген сульфідної модуляції та циклооксигенази у брижі та жировій тканині 60

2.5 Електронномікроскопічне дослідження тканин брижі щура 60

2.6 Дослідження біохімічними методами 61

2.6.1 Визначення вмісту реактивних речовин тіобарбітурової кислоти 62
2.6.2 Визначення ензимної активності цистатіонін-γ-ліази, цистатіонін-β-синтази та тіосульфат-сульфуртрансферази 62
2.6.3 Визначення активності сульфіт оксидази 63
2.7 Статистичне опрацювання результатів досліджень 64
РОЗДІЛ 3 ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ БРИЖІ У ВІКОВОМУ АСПЕКТІ ЗА УМОВ НОРМИ, ВИСОКОВУГЛЕВОДНОГО ХАРЧУВАННЯ ТА СТРЕСУ 65
3.1 Вікові особливості мікроструктурної організація брижі білого щура у нормі 66
3.2 Вікові відмінності ультраструктурної будови брижі щура за умов високовуглеводного харчування 69
3.3 Вікові особливості морфо-функціональних адаптаційних змін брижі щурів за умов високофруктозної дієти у поєднанні з індукцією стресу 72
3.4 Зміни резистентності адипоцитів та компонентів сполучної тканини брижі за умов модуляції активності циклооксигенази у щурів на HFD 75
3.5 Вплив гідроген сульфідної модуляції на структурно-функціональну організацію брижі у старих щурів за умов HFD у поєднанні з індукції стресу 79
Висновки до розділу 3 81
РОЗДІЛ 4 ВІКОВІ ВІДМІННОСТІ АКТИВНОСТІ ЕНЗИМІВ СИНТЕЗУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ БРИЖІ ЗА УМОВ ВИСОКОФРУКТОЗНОЇ ДІЄТИ, ІНДУКЦІЇ СТРЕСУ, ЗАСТОСУВАННЯ АСПІРИНУ ТА ДОНОРІВ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ 85
4.1 Вікові відмінності вмісту реактивних речовин тіобарбітурової кислоти у сироватці крові щурів за умов стандартної дієти чи

високофруктозного харчування, введення NaHS та індукції стресу 87
4.2 Вікові відмінності активності цистатіонін-γ-ліази (CSE) у гомогенаті брижі за умов стандартної і високофруктозної дієт, індукції гострого стресу та введення NaHS 90
4.3 Вікові відмінності активності цистатіонін-β-синтази (CBS) у гомогенаті брижі за умов стандартної та високофруктозної дієт, індукції гострого стресу та введення NaHS 92
4.4 Вікові відмінності активності тіосульфат-сульфуртрансферази (TST) у гомогенаті брижі за умов стандартної дієти і високофруктозного харчування, індукції стресу та введення NaHS 95
4.5 Вікові відмінності активності сульфіт-оксидази (SO) у гомогенаті брижі за умов HFD, індукції стресу та введення NaHS 97
4.6 Вікові відмінності активності цистатіонін-γ-ліази та цистатіонін-β-синтази у гомогенаті брижі після введення класичного та гібридного H_2S-аспірину за умов високофруктозної дієти та індукції гострого стресу 100
4.7 Порівняння активності тіосульфат-сульфуртрансферази та сульфітоксидази брижі під час застосування класичного та гібридного H_2S-аспірину у дорослих та старих щурів за умов високофруктозної дієти та стресу 103
Висновки до розділу 4 105
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ 109
ВИСНОВКИ 126
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 129
ДОДАТКИ 161
ДОДАТОК А Наукові праці, опубліковані за темою дисертації
ДОДАТОК Б Відомості про апробацію дисертації
ДОДАТОК В Акти впровадження

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

МА	мезентеріальні адипоцити
в/м	внутрішньом’язово
в/о	внутрішньоочеревинно
AOAA	амінооксіоцтової кислоти
H_2S	гідроген сульфід
SD	стандартна дієта
HFD	гіперкалорійна високофруктозна дієта, high fructose diet
PVAT	периваскулярна жирова тканина
TBARS	реактивні субстанції тіобарбітурової кислоти, thiobarbituric acid reactive substances
CSE	цистатіонін-γ-ліаза, cystathionineγ-lyase
CBS	цистатіонін-β-синтаза, cystathionine-β-synthase
TST	тіосульфат-сульфуртрансфераза, thiosulfate sulfurtransferase
SO	сульфіт оксидаза, sulfite oxidase
NaHS	натрій гідросульфід
cAMP	циклічний аденозинмонофосфат
CoA	ацетил-коензиму А
ATGL	тригліцеридліпаза адипоцитів, adipose triglyceride lipase
HSL	гормончутлива ліпаза, hormone-sensitive lipase
MGL	моногліцеридліпазою, monoacylglycerol lipase
CAT	цистеїн амінотрансфераза, cysteine-transaminase

MST	β-меркаптопіруват сульфуртрансфераза, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase
PAG	DL-пропаргілгліцин
BCA	β-циано-1-аланін
PPAR-γ	гамма-рецептор-активатор проліферації пероксисом
C/EBP α	зв'язувальний CCAT α-протеїн
SREBP-1	зв’язувальний регулятор стеролу-1
ChREBP	зв’язувальний білок вуглеводневої відповіді
FABP4	зв'язувального жирні кислоти протеїну-4
FAS	синтаза жирних кислот
ASA	аспірин (ацетилсаліцилова кислота), acetylsalicylic acid
CO	монооксид карбону
COX	циклооксигеназа, cyclooxygenase
IL-1β	інтерлейкін-1β
MDA	малоновий диальдегід, malonic dialdehyde
NO	оксид азоту
NSAIDs	нестероїдні протизапальні препарати, nonsteroidal anti-inflammatory drugs
SOCE	депо-керований вхід кальцію, store-operated calcium entry
vs	порівняно, versus

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Згідно сучасних уявлень брижа важливий окремий орган людського організму, який у світлі нових наукових поглядів потребує більш ґрунтовного дослідження для визначення його фізіологічної ролі в аспекті вікових особливостей та змін за умов ендогенних та екзогенних впливів, що можуть сприяти появі широкого спектру патологічних змін [18, 40, 55, 56]. Саме тому, нашим актуальним завданням було вивчити морфо-функціональну організацію брижі та мезентеріальних компонентів на ультраструктурному рівні, дослідити особливості вікових відмінностей брижі, нервово-судинних компонентів та жирової тканини брижі, їх адаптивні зміни за умов високофруктозного харчування та індукції гострого стресу, а також впливу ендогенного біорегулятора сірководню (H_2S).

Головними компонентами тканинної будови брижі є мезентеріальні адипоцити, лімфатичні і кровоносні судини, дендритні та нейрогліальні клітини. Популяції мезентеріальних адипоцитів є одним з найбільших депо вісцеральної жирової тканини та володіють широким спектром важливих біорегуляторних впливів, що проявляються за допомогою синтезу адипокінів та біологічно активних медіаторів небілкової природи і газотрансмітерів – оксиду азоту (NO), монооксиду карбону (CO) і H_2S [33, 101, 134, 140 192, 227]. Їхня плейотропна дія за умов змін нормальної секреції спричиняє розвиток метаболічних порушень, пов’язаних з ожирінням, цукровим діабетом 2 типу, шлунково-кишковими, серцево-судинними та онкологічними захворюваннями [126, 191, 200, 257].

Однією з основних проблем людства на даний час є надлишкова вага та ожиріння. За даними ВООЗ близько 39% населення землі старше 18 років мають надлишкову масу тіла або ожиріння [16]. Не дивлячись на значний прогрес медичної науки, остаточно не встановлено чинники та механізми, які

змінюють функціонування жирової тканини. Особливо стосовно жирової тканини брижі, яка дотепер залишається не до кінця вивченою.

Особливо гострою є проблема вісцерального ожиріння. Вісцеральний жир, до якого належить і мезентеріальна жирова тканина, відрізняється за типом адипоцитів та їх ендокринній активності, що на клітинному рівні володіють унікальною здатністю акумулювати та інтегрувати різні екзогенні впливи [40, 41].

Надмірна вага та ожиріння спричиняють метаболічні порушення, що стають основою для розвитку різноманітних хвороб. Пандемія коронавірусної хвороби (COVID-19) продемонструвала, що особи, які мають супутнє ожиріння, особливо похилого віку, набагато важче переносять коронавірусну хворобу [115, 173, 220,]. У даної групи пацієнтів захворювання на COVID-19 часто призводить до поліорганної дисфункції та фатальних наслідків, а частота виникнення постковідних мезентеріальних ускладнень має суттєво вищий рівень [43, 88].

За даними численних наукових досліджень газотрансмітер H_2S володіє сприятливою дією на цитопротекцію брижі, демонструючи судинорозширювальні, протизапальні, антиокисні властивості, та нормалізує метаболічні порушення [198, 204]. Проте вплив H_2S на функціонування і ультраструктурні зміни жирової тканини брижі та її компонентів, в тому числі у мітохондріях мезентеріальних адипоцитів (МА) за умов вікових змін та станів викликаних тривалим надмірним виживанням вуглеводів, які мають вирішальний цитолітичний вплив за рахунок окисного пошкодження, залишається погано висвітленим у сучасній науковій літературі [179, 181, 104, 209]. Не досліджено особливості функціонування брижі та її компонентів за умов стресу та високофруктозної дієти (англ.: High fructose diet, HFD). Гіперкалорійне високовуглеводне харчування та вікові зміни є ключовими факторами для поступових патологічних змін різних функціональних систем і процесів, пов’язаних з енергетичним метаболізмом, цитопротекцією, та окисно-відновлювальною системою. З даних літератури відомо, що

ендогенний сірководень та сигнальні шляхи його синтезу сприятливо впливають на забезпечення цитопротекції, енергетичні і метаболічні реакції та відновлюють окисно-відновну рівновагу через множинні ефекти на міжклітинному та внутрішньоклітинному рівнях, що стало передумовою для створення новітніх гібридних нестероїдних протизапальних препаратів, які містять у структурі додаткову молекулу H_2S та відповідно володіють властивостями ендогенного донора H_2S [63, 81, 229-231].

Проте, вплив вікових відмінностей вмісту реактивних субстанції тіобарбітурової кислоти (англ.: Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) і активності H_2S-пов'язаних ензимів, а саме цистатіонін γ-ліази (CSE), цистатіонін β-синтази (CBS), сульфіт оксидази (SO), тіосульфат-сульфуртрансферази (TST) на стан брижі та її компонентів – судин, сполучної та жирової тканин за умов стандартної дієти (англ.: Standard diet, SD) і HFD залишається невивченим, хоча такі дослідження мають прикладне клінічне значення і можуть стати науково-обґрунтованою основою для розробки ефективної профілактики змін, спричинених старінням, і фізіологічно обґрунтованих превентивних терапевтичних стратегій для ранніх порушень, зумовлених гіперглікемією, застосуванням нестероїдних протизапальних препаратів і опрацювання нових сполук для покращення функціональної активності брижі.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота є фрагментом комплексних науково-дослідницьких робіт кафедри нормальної фізіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького: «Дослідження ролі системних та паракринних регуляторних механізмів у забезпеченні гомеостазування функціонально-метаболічних параметрів організму за умов адаптації до дії екстремальних чинників різної природи» (№ державної реєстрації: 0116U004510, 2016-2020 рр.) та «Вивчення механізмів регуляції інтегративних систем організму в умовах норми, функціональних

розладів та з'ясування шляхів їх корекції» (№ державної реєстрації: 0121U100164, 2021-2025 рр.). Тема дисертації затверджена Вченою радою медичного факультету № 2 ЛНМУ (наказ № 3 від 14.11.2017). Дисертаційна робота отримала погодження комісії з питань етики наукових досліджень, експериментальних розробок і наукових творів Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протоколи № 4 від 23.04.2018 року та № 8 від 18.10.2021 року).

Мета дослідження. Вивчити вікові аспекти фізіологічного значення брижі та її жирової тканини, за умов стресу, високофруктозного харчування та змін активності біорегуляторного впливу сірководню у щурів.

Завдання дослідження:

1. Вивчити вікові особливості структурно-функціональної організації брижі та її компонентів на ультраструктурному рівні у нормі та за умов індукції гострого стресу, високофруктозного харчування та їх поєднаному впливі.
2. Дослідити відмінності проявів адаптаційно-компенсаторних реакцій тканин брижі щурів різного віку за умов 4-х тижневої високофруктозної дієти, індукції стресу та збільшення активності сірководню.
3. Визначити роль H_2S у вікових відмінностях захисних та адаптаційно-компенсаторних механізмах брижі та її жирової тканини за умов моделювання стрес-індукованих пошкоджень та високофруктозного харчування.
4. З'ясувати вплив донорів сірководню на вміст TBARS у сироватці крові та активність ензимів CBS, CSE, SO і TST у гомогенаті тканин брижі у віковому аспекті та за умов тривалого 28-миденного високофруктозного харчування та індукції гострого стресу.
5. Порівняти особливості впливу нестероїдних протизапальних препаратів у порівняні дії класичного та гібридного H_2S-асоційованого аспірину на баланс про- та антиоксидантних чинників у брижі щурів різного віку за умов поєднаного впливу стресу та високофруктозного харчування.

Об'єкт дослідження – структурно-функціональні особливості брижі та жирової тканини у щурів різного віку за умов стресу, високофруктозної дієти та їх поєднаному впливі та застосування сполук донорів синтезу H_2S.

Предмет дослідження – вікові відмінності ультраструктурних змін брижі, інтенсивності змін пероксидації ліпідів у сироватці крові та активності ензимів синтезу гідроген сульфіду брижі за умов високофруктозної дієти, індукції стресу, застосування аспірину та донорів гідроген сульфіду.

Методи дослідження. Фізіологічні – експериментальне моделювання пошкоджень брижі та жирової тканини 28-миденним високофруктозним харчуванням та індукцією гострого стресу у щурів різних вікових груп; біохімічні – спектрофотометричне визначення вмісту TBARS у сироватці крові, активності ензимів ендогенного синтезу гідроген сульфіду (CBS, CSE, SO і TST) у гомогенатах тканин брижі; морфологічні – електронно-мікроскопічне дослідження для вивчення мікро- та ультраструктури тканин брижі; статистична обробка результатів.

Наукова новизна отриманих результатів.

Проведено вперше у щурів різного віку комплексні морфо-функціональні дослідження тканин брижі та її компонентів за допомогою електронномікроскопічного методу в аспекті вікових змін, за умов 4-тижневого високофруктозного харчування, індукції гострого стресу та їх поєднаному впливі.

Досліджено вікові аспекти фізіологічного значення брижі та жирової тканини за умов стресу та високовуглеводного харчування. Встановлено зміни брижі та жирової тканини за умов одинарного і поєднаного впливу стресу та високовуглеводного харчування у щурів різного віку. Вперше описано вікові зміни на тлі високофруктозного харчування та стресу, що у жировій тканині брижі старих щурів мають ознаки деградації гіпертрофічних ліпідних крапель у клітинах адипоцитів. Іншими проявами були ознаки ендотеліальної дисфункції у капілярах, зміни мікроангіоархітектоніки з міграцію та інфільтрацію імунними клітинами і деструктивно зміненими фібробластами.

Дисбаланс вмісту TBARS і активності CBS, CSE, SO, TST сприяє розвитку окисного дисбалансу та гіпоксії, що формує «metabolic inflammation».

Вперше досліджена резистентність брижі та жирової тканини, у моделі експериментального вікового метаболічного пошкодження 28-денним висококалорійним харчуванням з надмірним вмістом фруктози та індукцією гострого стресу, за умов 9-тиденного введення класичного аспірину та донорів синтезу H_2S – неорганічної сполуки натрій гідроген сульфіду (NaHS) і новітньої гібридної сполуки H_2S-аспірину (АТВ-340). Дослідженнями адаптаційно-компенсаторного ресурсу брижі за умов впливу стресу та корекції донорами H_2S встановлено зменшення інтенсифікації процесів перекисного окиснення ліпідів, важливість каталітичної активності CBS, CSE, SO і TST у забезпеченні резистентності брижі для протидії пошкоджувальним впливам за рахунок цитопротекторної дії H_2S.

Вперше описана порівняльна характеристика впливу екзогенних донорів сірководню на показники активності ензимів CBS, CSE, SO і TST у віковому аспекті та за умов високофруктозного харчування, зміни ендогенного синтезу H_2S.

Встановлено наукові дані про вплив донорів H_2S на забезпечення окисно-відновної рівноваги за замінами функціонування редокс-системи у брижі на основі показників вмісту TBARS та активності ензимів CBS, CSE, SO і TST.

Досліджено особливості цитопротекції брижі та жирової тканини з характером активності H_2S за рахунок моделювання його біосинтезу. З’ясовано особливості впливу екзогенних донорів H_2S на прикладі натрій сульфіту та гібридного H_2S-асоційованого аспірину (АТВ-340) на баланс про- та протиоксидантних факторів у брижі та жировій тканині щурів різного віку за умов поєднаного впливу стресу та високофруктозного харчування.

Практичне значення отриманих результатів.

Результати комплексного морфо-функціонального дослідження брижі та біохімічного дослідження активності ензимів синтезу H_2S поглиблюють

розуміння фізіологічних основ клітино-молекулярних механізмів функціонування брижі і її клітинних компонентів та біорегуляторного впливу H_2S. Дослідження поглиблюють розуміння фізіологічного значення брижі та її жирової тканини за умов високовуглеводного харчування та стрес-індукованих пошкоджень. Встановлено вплив брижі та її жирової тканини на стрес-резистентність організму за умов одинарного і поєднаного впливу гострого стресу та високофруктозного харчування у щурів різного віку.

Вивчення біомаркерів перекисного окиснення ліпідів на основі визначення вмісту TBARS та активності ензимів CBS, CSE, SO і TST, що беруть участь у ендогенному синтезі H_2S, дозволило з'ясувати механізми впливу H_2S на брижу та мезентеріальні адипоцити у віковому аспекті та за умов експериментальних метаболічних пошкоджень, викликаних високофруктозною дієтою. Результатами наших досліджень вперше продемонстровано, що H_2S-пов'язані шляхи регуляції є важливими для мезентеріальних цитопротекторних реакцій та забезпечують відновлення порушень окисно-відновної рівноваги. Виявлені особливості цитопротекторних механізмів брижі за умов модифікації тканинного вмісту H_2S вказують на доцільності дослідження гібридних донорів сірководню, як можливих терапевтичних засобів.

Результати досліджень впроваджені в науково-дослідну роботу та навчальний процес профільних кафедр нормальної фізіології Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького МОЗ України, Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України, Одеського національного медичного університету МОЗ України, Української медичної стоматологічної академії МОЗ України та Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України.

Особистий внесок здобувача.

Дисертантом самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, аналіз наукової літератури за обраною тематикою роботи, експериментальне

дослідження, забір матеріалу, виконання морфологічних досліджень, обґрунтування отриманих результатів та їх статистичний аналіз, написано і оформлено дисертаційну роботу. Формування мети та завдань дослідження, структура роботи, обговорення отриманих результатів, проведено за участі наукового керівника. Дисертаційна робота є завершеним дослідженням, виконана автором згідно програми та плану експериментального дослідження, впродовж 2017-2021 рр. Матеріали даної роботи не використовувались в інших дисертаційних роботах. Експериментальні дослідження проводились спільно зі співробітниками Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького та Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, які є співавторами опублікованих праць, конфлікту інтересів немає.

Апробація результатів дисертації.

Дисертаційну роботу апробовано на фаховому семінарі кафедри нормальної фізіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 27 від 30.11.2021 року).

Основні положення дисертації були представлені на науково-практичних форумах різного рівня: Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Вікові та хронобіологічні аспекти медицини і фармації» (Чернівці, 2017); RECOOP 9th Annual Project Review Meeting (Братислава, Словаччина, 2018); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Довкілля і здоров'я» (Тернопіль, 2018); 2nd Symposium on Innovation in Medicine SMART LION (Львів, 2018); Experimental Biology/FASEB (Сан-Дієго, США, 2019); XX-му з'їзду Українського фізіологічного товариства ім.П.Г. Костюка з міжнародною участю (Київ, 2019); XVIII Міжнародному науковому конгресі СФУЛТ (Львів, 2020); 4nd International Symposium SMART LION 2020 Reality and prognosis COVID-2019 (Львів, 2020), Metabolism Month 2021 (онлайн конференція University of Copenhagen, 2021), 15th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society

with international participation «Homeostasis – From Cell to Organ» (Загреб, Хорватія, 2021).

Публікації.

За результатами дисертаційної роботи опубліковано 16 наукових праць. З них 6 статей: у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України – 2, Scopus та Web of Science – 3, втому числі одна стаття у закордонному науковому виданні, віднесеному до першого квартилю (Q1) відповідно до класифікації SCImago Jornal and Country Rank, вітчизняних журналах – 1; 10 тез – у матеріалах міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій; 1 робота, як розділ в монографії; 1 робота – у навчальному посібнику.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертаційна робота викладена на 168 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 5 розділів, висновків, списку використаних джерел та 3 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 106 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 3 таблицями та 24 рисунками. Список використаних джерел містить 260 найменування, з них 6 кирилицею та 254 латиницею.

РОЗДІЛ 1
СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА ФІЗІОЛОГІЧНУ РОЛЬ БРИЖІ ТА ЇЇ КОМПОНЕНТІВ У ВІКОВОМУ АСПЕКТІ ТА ЗА УМОВ БІОРЕГУЛЯТОРНОГО ВПЛИВУ СІРКОВОДНЮ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Головні засади сучасних поглядів на функції брижі

Одним з важливих повноцінних органів черевної порожнини є брижа. Фізіологічна винятковість брижі проявляється в її унікальних функціях, які інтегрують численні молекулярні впливи міжклітинних сигнальних шляхів. Виділяють кілька поглядів, які вказують на існування знань про брижу з часів прадавньої медицини у розумінні подвоєного листка очеревини (серозної оболонки, яка вистеляє стінки та огортає органи черевної порожнини), між якими розміщені кровоносні судини кишки, лімфатичні вузли та нервові сплетення [56]. Тривалий час загально прийнятим було трактування, що брижа складається з окремих бриж, які не мають між собою анатомічного з’єднання та підтримують петлі кишки, забезпечуючи прикріплення кишки до задньої стінки черевної порожнини і запобігаючи перекручуванню петель [18]. Інакше кажучи, знання про брижу ґрунтувались на догмі, що брижа – фрагментована та допоміжна структура, що складається з декількох розрізнених "бриж". Вважалося, що окремо є брижа тонкої кишки та у деяких частин товстої кишки – поперечноободової та сигмовидної, а у інших частин кишки брижа відсутня [62].

Нещодавні дослідження, які були проведені професорами Кельвіном Коффі і Пітером О'Лірі з Університету Лімеріка (Ірландія) вперше показали, що брижа являє собою єдиний і неподільний орган, з властивими кожному органу морфо-функціональними особливостями і спектром патологічних процесів. Результати дослідження цієї наукової групи були опубліковані в листопаді 2016 року в авторитетному медичному журналі The Lancet

Gastroenterology & Hepatology [55]. Дане відкриття викликало широкий інтерес світової наукової спільноти та появу нових досліджень (Табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Знакові публікації про значення брижі в біомедицині

№	Автори	Назва	Бібліографія, IF (2020 Journal Citation Reports, Clarivate 2021) (кількість цитувань)
1	Coffey JC, O'Leary DP.	The mesentery: structure, function, and role in disease.	The Lancet Gastroenterology & hepatology. 2016 Nov 1;1(3):238-47. IF= 18.48 (201)
2	Coffey JC, O'Leary DP.	Defining the mesentery as an organ and what this means for understanding its roles in digestive disorders.	Expert review of gastroenterology & hepatology. 2017 Aug 3;11(8):703-5. IF=3.51 (25)
3	Coffey CJ, Kiernan MG, Sahebally SM, Jarrar A, Burke JP, Kiely PA, Shen B, Waldron D, Peirce C, Moloney M, Skelly M.	Inclusion of the mesentery in ileocolic resection for Crohn's disease is associated with reduced surgical recurrence.	Journal of Crohn's and Colitis. 2018 Oct;12(10):1139-50. IF=7.82 (119)
4	Byrnes KG, Walsh D, Lewton-Brain P, McDermott K, Coffey JC.	Anatomy of the mesentery: historical development and recent advances.	In Seminars in cell & developmental biology 2019 Aug 1 (Vol. 92, pp. 4-11). Academic Press. IF=6.13 (13).

5	Byrnes KG, Walsh D, Walsh LG, Coffey DM, Ullah MF, Mirapeix R, Hikspoors J, Lamers W, Wu Y, Zhang XQ, Zhang SX.	The development and structure of the mesentery.	Communications Biology. 2021 Aug 18;4(1):1-0.IF=4.04

Дані дослідження переглянули принципи вивчення анатомії черевної порожнини і як результат, оновлене видання популярного підручника з анатомії для майбутніх лікарів – Gray's Anatomy вже врахувало нововведення, зробивши зміни у відповідний розділ. Отже, все більше доказів підтверджують важливість ретельного вивчення фізіологічного значення брижі для функціонування організму в аспекті сучасних трактувань цього органу.

Вважається, що основна функція брижі – просторова підтримка петель тонкої і товстої кишки та запобігання опусканню кишки у порожнину малого тазу. Брижа відмежовує більшу частину кишки від задньої черевної стінки, запобігаючи її опущення у порожнину тазу під час вертикального положення тіла. Вірогідно, що пасаж кишкового вмісту був би сповільнений або навіть неможливий у разі відсутності такого кріплення. Прикріплення товстої кишки до брижі дозволяє їй приймати спіральну конфігурацію, забезпечуючи моторно-евакуаторну функцію травної системи. Брижа розташована між кишкою та іншими органами, що робить її розміщення оптимальним по відношенню до моделі "кишка-оточення", опосередковано спричиняючи локальні чи системні відповіді або їх комбінації [55, 56, 72]. Брижа підтримує розвиток і життєздатність органів черевної порожнини. У період ембріонального розвитку у разі виникнення дефекту брижі можлива атрезія відповідного сегменту кишки, при чому сусідні сегменти, по обидві боки від

атрезії, продовжують розвиватись нормально [94]. Це важливе спостереження, оскільки показує, що розвиток кишки залежить від місцевих факторів прилеглої брижі, а атрезія завжди супроводжується дефектом прилеглої брижі.

Важливою є також роль брижі у розвитку імунної відповіді оскільки у ній знаходиться багато лімфатичних вузлів, які забезпечують захисну функцію організму для протидії впливу мікроорганізмів, що потрапляють в організм через просвіт кишки. У мезентеріальні лімфатичні вузли потрапляють продукти життєдіяльності мікробіоти прилеглої кишки, які у свою чергу регулюють міграцію Т-клітин, В-клітин, NK-клітин і дендритних клітин у слизову оболонку кишки [55, 56, 81, 203,]. Сучасні дані свідчать про те, що велика частина мезентеріальних процесів сприяють регуляції системних про- та протизапальних сигнальних шляхів, фібринолітичних і коагуляційних каскадів [91, 179].

Важлива роль у функціонуванні брижі належить мезентеріальній сполучній тканині – найбільшому мезотеліальному простору людського організму. Мезотелій має здатність до епітеліально-мезенхімальних трансформацій, які можуть мати відношення як до процесів відновлення тканини (наприклад, після хірургічних втручань), так і до розвитку захворювань (наприклад, кили чи утворення спайок) [80].

У брижі людини розміщуються адипоцитарні стовбурові клітини, які мають високу здатність до проліферації та фагоцитарну активність [203]. Також відомо про їхню здатність викликати запальні реакції у прилеглій кишці [145]. Важливою є роль адипоцитів брижі у розвитку хвороби Крона, за умов якої мезентеріальна жирова тканина виходить за межі своїх нормальних анатомічних кордонів – обгортає кишку, стаючи патогномонічною ознакою даного захворювання [202]. Брижове жирове обгортання призводить до накопичення сполучної та лімфатичної тканини у стінці кишки [77, 92].

Згідно сучасних даних жирова тканина брижі синтезує велику кількість адипокінів, серед яких грелін, адипонектин, резистин, адипофілін та інші [94,

196]. Важливими компонентами брижі є лімфатичні і кровоносні судини, дендритні та нейрогліальні клітини.

Не дивлячись на те, що наукові знання про функції брижі постійно оновлюються на даний час не відомо про вікові відмінності структурно-функціональної організації брижі. Крім того, відсутні наукові дані про зміни за умов індукції стресу, змін характеру харчування та впливу важливого біорегулятора міжклітинної комунікації H_2S.

За новими уявленнями органи травлення черевної порожнини об'єднані спільною брижею в єдину систему. З огляду на таке, брижу можна розглядати, як своєрідну інтеграційну платформу, на якій розміщені органи черевної порожнини [55].

Проте на даний час не встановлено остаточної структурно-функціональної організації брижі та вікових відмінностей у її будові. Існує мало даних про клітинну будову брижі та фізіологічну роль компонентів брижі в аспекті їхньої резистентності до дії гострого стресу. Залишається малодослідженою функціональна ролі брижі в організмі людини, а особливо роль мезентеріальних адипоцитів за умов HFD.

Відомо, що мезентеріальні ускладнення відіграють вагому роль в різних абдомінальних і неабдомінальних патологічних станах, серед яких цукровий діабет 2 типу (ЦД2), ожиріння, колоректальний рак, запальні захворювання кишки, дивертикульоз, метаболічний синдром [31, 190].

Спектр патології брижі залишається не визначеним. У науковій літературі обговорюється її роль у виникненні хронічного запалення кишки, онкологічних захворюваннях кишки та ожиріння [91, 203].

Підсумовуючи вище викладене згідно опрацьованої загальнодоступної літератури та сучасних наукометричних бібліографічних баз даних Web, ми з'ясували, що стан вікових особливостей брижі, її реакції на дію пошкоджувальних чинників різного ґенезу та за умов біорегуляторного впливу H_2S попередньо не досліджувався.

1.2 Фізіологічні, молекулярні та клінічні аспекти функціонування жирової тканини

Одними з низки важливих хвороб до яких сьогодні прикута увага світової медичної спільноти є ендокринопатії, що супроводжуються надмірною вагою. За даними ВООЗ у даний час існує пандемія ожиріння, саме тому проблемі функціонування жирової тканини присвячують численні експериментальні і клінічні дослідження [16, 45, 109, 157]. Жирова тканина в кількісному відношенні є однією з найпоширеніших тканин в організмі людини та схильна до проліферації впродовж життя, хоча до кінця XX століття її вивченню не приділялась належна увага.

З прадавніх часів жирова тканина розглядалась лише з точки зору резервного депо для збереження енергії, забезпечення пластичних та енергетичних процесів в організмі [194]. Згідно сучасних наукових уявлень існує чотири основних види жирової тканини: біла жирова тканина (від англ: White adipose tissue), в якій розрізняють білі адипоцити, бура жирова тканина з бурими адипоцитами (від англ: Brown adipose tissue), бежева жирова тканина (від англ: Beige adipose tissue) та рожева жирова тканина (від англ: Pink adipose tissue) [54, 110, 259]. Функції цих адипоцитів є відмінними, проте загальною властивістю є здатність поглинати та накопичувати велику кількість тригліцеридів у періоди надлишку енергії та вивільнювати їх в умовах дефіциту [123, 221]. Також, жирова тканина містить стромально-васкулярну фракцію, яка складається з кровоносних і лімфатичних судин, фібробластів, преадипоцитів та імунних клітин – макрофагів і лімфоцитів. Білі адипоцити містять великі ліпідні краплі, що складаються з тригліцеридів. За даними літератури відомо, що адипоцити володіють здатністю синтезувати ліпопротеїнліпазу – ензим, що локалізується на поверхні ендотеліоцитів гемокапілярів та гідролізує тригліцериди ліпопротеїнів плазми з вивільненням жирних кислот [134]. Вільні жирні кислоти в подальшому поглинаються та етерифікуються адипоцитами. Таким чином, в адипоцитах накопичуються

вільні жирні кислоти, отримані з харчових джерел та які поступають у кров в результаті метаболічних процесів у печінці і ліпопротеїди дуже низької щільності. Також в адипоцитах нагромаджуються вільні жирні кислоти, що були синтезовані безпосередньо в адипоцитах з ацетил-коензиму А (CoA), продукту метаболізму глюкози. Тригліцериди, що зберігаються у великих ліпідних краплях, є субстратами для ліполізу – складного та строго регульованого процесу, каталізованого трьома послідовно діючими ензимами: тригліцеридліпазою адипоцитів (від англ: Adipose triglyceride lipase, ATGL), дигліцеридліпазою – гормончутлива ліпаза (від англ: Hormone-sensitive lipase, HSL) і моногліцеридліпазою (від англ: Monoacylglycerol lipase, MGL) [19, 34, 246]. Кінцевими продуктами ліполізу є гліцерин та вільні жирні кислоти. Гліцерин вивільняється у позаклітинний простір та, у подальшому, метаболізується печінкою. Вільні жирні кислоти можуть, або вивільнятися, або бути повторно етерифіковані в адипоцитах до тригліцеридів за участі гліцерин-3-фосфату, який виступає допоміжним субстратом у реакціях гліколізу. Функція вільних жирних кислот, що вивільняються з жирової тканини, полягає енергетичному забезпечені інших життєво важливих структур, серед яких серцевий м’яз та скелетні м'язи [258].

За останні десятиліття було зібрано багато наукових доказів того, що жирова тканина також є активним ендокринним органом. У 1994 році було виявлено та описано перший гормон жирової тканини – лептин [153, 246]. Пептидний гормон – лептин, синтезується білими адипоцитами у кількості, що прямо пропорційна запасам енергії і реалізує свою дію через високоспеціалізовані рецептори гіпоталамічних центрів, зменшуючи апетит та збільшуючи термогенез і витрату енергії. На даний час відомо, що рецептори до лептину розміщені не тільки в головному мозку, але і в багатьох периферійних тканинах. З моменту відкриття лептину у подальшому було ідентифіковано безліч інших білкових гормонів жирової тканини, які володіють широким спектром функціональної дії на численні процеси, яких об’єднали під терміном «адипокіни» [33, 140, 192].

Також жирова тканина здатна синтезувати широкий спектр важливих біорегуляторів. Серед, яких розрізняють: класичні цитокіни (фактор некрозу пухлин (TNF-α), інтерлейкін-6), хемокіни (інтерлейкін-8, хемоаттрактантний білок моноцитів-1 (MCP-1), гормони (ангіотензин II, адреномедуллін, атріальний натрійуретичний пептид), фактори росту та інгібітори ензимів (вісфатін, васпін, інгібітор активатора плазміногену-1) та білки гострої фази. Жирова тканина також володіє здатністю синтезувати і небілкові біологічно активні медіатори, включаючи газотрансмітери – NO, CO і H_2S, які мають мультифункціональну дію [101, 134, 227].

1.3 Особливості біорегуляторного впливу сірководню на жирову тканину та адипогенез

Численні науково-дослідницькі групи вивчають вплив газотрансмітера H_2S. Спочатку було встановлено, що ендогенний синтез H_2S спричиняється активністю ензиму цистатіонін-β-синтази (CBS) в мозку ссавців і його дія проявляється у вибірковому посилювані нейронної відповіді опосередковано зумовленої рецептором NMDA (N-метил-D-аспартату). Також було встановлено, що H_2S сприяв індукції довгострокового потенціювання у гіпокампі, тоді вперше була запропонована гіпотеза, що H_2S може володіти біологічними властивостями – нейромодулятора [138]. Подальші дослідження виявили, що головними шляхами ендогенного синтезу H_2S є реакції десульфурування L-цистеїну і гомоцистеїну, а також реакції відновлення тіосульфат-аніону. На даний час доказано, що синтез H_2S забезпечується головним чином ензимами – цистатіонін γ-ліази (CSE), цистатіонін β-синтази (CBS), сульфіт оксидази (SO), тіосульфат-сульфуртрансферази (TST), а також цистеїн амінотрансферази (CAT) і β-меркаптопіруват сульфуртрансферази (MST) [120]. Дані ензими постійно присутні та широко використовуються у клітинах та тканинах, а їх експресія може бути викликана низкою патологічних станів. Також встановлено, що окрім ензимного, існує також і

неензимний шлях утворення H_2S, яким забезпечується незначна (близько ~10%) частина ендогенної продукції. Метаболізм H_2S тісно зв'язаний з обміном сірковмісних сполук, головними джерелами для синтезу ендогенного сірководню в організмі є сірковмісні амінокислоти – цистеїн, гомоцистеїн, метіонін, таурин, а також їх похідні.

У 2009 році група дослідників Feng, et al. першими в експериментальних дослідженнях описали здатність білої жирової тканини синтезувати H_2S [75]. Здатність до ендогенного синтезу H_2S у подальшому була виявлена у епідидимальній та періренальних жирових тканинах щурів [84, 242]. У відповідних популяціях адипоцитів було ідентифіковано на рівні мРНК ензими CBS і CSE, які відповідають за ендогенних синтез H_2S. А також було доведено, що інгібітори CSE – DL-пропаргілгліцин (PAG) або β-циано-1-аланін (BCA) зменшують ендогенний синтез H_2S жировою тканиною більше ніж на 80%, що дозволило дослідникам зробити припущення, що CSE є основним ензимом, який відповідає за ендогенний синтез H_2S в адипоцитах. Дані результати у подальшому були підтверджені на прикладах інших депо жирової тканини, а також у дослідженнях на культурах культивованих адипоцитах [70, 237]. Також було виявлено, вікові відмінності у активності CSE та особливості генної експресії ензимів, залучених у ендогенному синтезі H_2S епідидимальною та перириальною жировою тканиною щурів [75]. Тоді як, збільшення концентрації глюкози з фізіологічного (5 мМ) до гіперглікемічного діапазону (20 мМ) знижувала активність CSE та ендогенний синтез H_2S, а групах тварин які отримували 20 мМ даного ефекту не було виявлено, що свідчило, що ефекти від глюкози не є результатом гіперосмолярності [170]. Хоча згідно сучасних даних наукової літератури, що представляють експериментальні дослідження про потенційну біорегуляторну дію H_2S на функціонування жирової тканини, його вплив на мезентеріальні адипоцити у формуванні стрес-резистентності чи протидії цитолітичному впливу гіперглікемії не досліджувався за спектром каталітичної активності CSE, CBS, SO, TST.

1.3.1 Вплив сірководню на регуляцію адипогенезу

Загальновідомим фактом є те, що ожиріння характеризуються збільшенням маси жирової тканини (ЖТ), що можна визначити за збільшенням індексу маси тіла (ІМТ). За умов ожиріння, окрім збільшення маси жирової тканини, що проявляється збільшенням розміру та кількості адипоцитів (гіпертрофічні і гіперпластичні зміни), виникають зміни, які проявляються гіперсекрецією прозапальних, проатерогенних адипокінів, що впливають на адипогенез.

Адипогенез – це процес утворення нових адипоцитів з клітин попередників, який являє собою строго регульовану послідовність трансформацій, що у значній мірі впливає на кількісно-якісні особливості та властивості жирової тканини. Перетворення преадипоцитів в адипоцити визначається послідовним активуванням кількох факторів транскрипції, таких як: γ-рецептор-активатор проліферації пероксисом (PPAR-γ), зв'язувальний CCAT α-протеїн (C/EBP α), зв’язувальний регулятор стеролу-1 (SREBP-1) і зв’язувальний білок вуглеводневої відповіді (ChREBP) [86, 95, 174].

Дослідження ролі H_2S у регуляції адипогенезу *in vitro* з використанням фібробластоподібної лінії преадипоцитів мишей – 3T3-L1, показало, що стимулювання адипогенезу сумішшю інсуліну, дексаметазону та інгібітора PDE – ізобутилметилксантину (IBMX) викликало збільшення активності ензимів CBS, CSE і 3-MST та збільшення концентрації H_2S. Додавання до інкубаційного середовища преадипоцитів (лінії 3T3-L1), екзогенних донорів H_2S (використовували однакове дозування по 50 мкМ) неорганічних – NaHS, або органічних – GYY4137 стимулювало експресію PPARγ та C/EBPα, що є ранніми маркерами адипогенезу. Окрім того, органічний донор H_2S – GYY4137, на відміну від NaHS, збільшував експресію – ChREBP, SREBP1 та адипоцитспецифічних білків: зв'язувального жирні кислоти протеїну-4 (FABP4), періліпіну-А, гормончутливої ліпази, синтази жирних кислот (FAS) [144, 247]. Дослідження впливу: інгібітора CBS – амінооксіоцтової кислоти

(AOAA) та інгібітора CSE – DL-пропаргілгліцину (PAG), що були застосовані під час диференціації преадипоцитів 3T3-L1, зменшували експресію – C/EBPα, ChREBP, SREBP1, HSL. Використання донорів H_2S – NaHS або GYY4137 викликало збільшення накопичення тригліцеридів, тоді як AOAA та PAG – не впливали на накопичення тригліцеридів у диференційованих клітинах 3T3-L1. Отримані результати свідчать, що синтез H_2S активується під час адипогенезу, а ендо- та екзогенний H_2S має біорегуляторну стимулювальну дію на цей процес, тоді як інгібування синтезу H_2S пригнічує адипогенез.

Подібних висновків дійшла група дослідників на чолі з Cai, et al., які встановили, що при використанні буферного розчину збагаченого H_2S (у концентрації H_2S – 200 мкМ), або ендогенним донором H_2S – GYY4137 (200 мкМ) у дослідженнях з дозрівання преадипоцитів лінії – 3T3-L1 у зрілі адипоцити, було виявлено, що сірководень сприяє збільшенню нагромадження ліпідів, експресії периліпіну-1 та збільшенню активності гліцерин-3-фосфатдегідрогенази адипоцитах [42]. Подібні зміни спостерігались також у лініях клітин із надвисокою експресією CSE. Тоді як повний нокдаун активності ензимів CSE за допомогою siRNA зменшував – накопичення ліпідів, експресію PPAR-γ і периліпіну-1 та активність глицерин-3-фосфатдегідрогенази. Вплив H_2S на адипогенез міг бути викликаний опосередковано через інгібування фосфодиестерази. Оскільки, як відомо для диференціювання преадипоцитів у адипоцити потрібна висока внутрішньоклітинна концентрація cAMP, а більшість культиваційних середовищ, які використовуються для індукції адипогенезу містять інгібітори PDE. Використання GYY4137 у концентрації від 1 до 100 мкМ викликало інгібування активності PDE у преадипоцитах – 3T3-L1 у прямій залежності від концентрації, тоді як – PAG збільшував її [82]. Такі дані свідчать, що ендогенний синтез H_2S, який збільшується під час адипогенезу, викликає пригнічення PDE, збільшує концентрацію cAMP і стимулює диференціювання адипоцитів. А також встановлено, що заміна звичного синтетичного інгібітора

PDE – IBMX, на H_2S або GYY4137 у стимулюючому адипогенез буферному "коктейлі" індукувала трансформацію преадипоцитів в адипоцити [42].

Наведені дані узгоджуються з результатами інших досліджень, які показують, що у дослідженнях *in vivo* на мишах ліній з генним блокування синтезу CBS [93] та мишах з блокуванням CSE синтезу [141], що тварини мали меншу масу тіла та об'єм жирової тканими, на противагу до результатів тварин у яких відсутнє блокування синтезу відповідних ензимів. Клінічними дослідженнями встановлено, що одним з клінічних проявів гомоцистинурії (гомозиготного дефіциту ензиму CBS) є ліподистрофія [92]. Наукові результати інших досліджень свідчать, що у пацієнтів з синдромом Дауна, які мають три копії гену CBS (локалізованого у 21 хромосомі людини), часто проявляється супутнє ожиріння [217].

З даних літератури відомо про результати наукових груп дослідників Ambati, et al. [15] та група Li, et al. [128], які вивчали сірководневу активність органічних сульфідів рослинного походження, зробили висновки, що використання органічних сполук часнику: аджоен та диаллілтрисульфіду (DATS), що мають властивості донорів H_2S, викликало пригнічення адипогенезу у культивованих клітинах преадипоцитів лінії 3T3-L1. Введення DATS у дозі 50–75 мкМ зменшувало експресію – C/EBPα, C/EBPβ, PPARγ та FAS у клітинах 3T3-L1. Також було виявлено, що введення DATS викликає пригнічення адипогенезу, через механізм збільшення фосфорилювання кіназ ERK-залежного типу. Проте, остаточно не встановлено чи даний ефект полісульфідів часнику був викликаний безпосередньо H_2S [111, 146]. Отже, все більше доказів підтверджують доцільність використання нових фізіологічно-обґрунтованих сполук, які зможуть імітувати біорегуляторну дію H_2S на адипоцити та адипогенез. Такі дослідження допомагають встановити важливі механізми біорегуляторного впливу H_2S, що є інтегрувальним чинником між численними сигнальними шляхами в організмі.

1.3.2 Вплив H_2S на чутливість жирової тканини до інсуліну та засвоєння глюкози

Згідно даних літератури біорегуляторний вплив H_2S полягає у зниженні інсулінозалежного поглинання глюкози у адипоцитах щурів [75]. Аналогічну дію реєстрували за умов збільшення ендогенного синтезу H_2S шляхом додавання у середовища L-цистеїну або піридоксаль-5'-фосфату. Тоді як, дія інгібіторів біосинтезу H_2S – PAG або BCA викликала протилежний ефект, збільшуючи інсулінозалежне поглинання глюкози на 40%. Отже, це є доказом, що ендогенно синтезований H_2S гальмує поглинання глюкози. Ефект впливу H_2S можна заблокувати інгібітором фосфоїнозитид-3-кинази – LYY294002, а АТР-чутливий інгібітор калієвих каналів – глібенкламід не показував подібної дії. Також згідно даних літератури, активатор АТР-азних калієвих каналів (K^+АТР-азні) – пінацидил, не мав подібного впливу на поглинання глюкози. Це свідчить, що К/АТР-азні канали, є важливою таргетною метою для біорегуляторного впливу H_2S не лише у судинній системі, а й для адипоцитів.

Також у дослідженнях на щурах встановлено, що дієта з високим вмістом жиру, яку часто використовують для моделювання інсулінорезистентності та гіперліпідемії, збільшує експресію CSE та синтез H_2S у жировій тканині, що супроводжується порушеннями поглинання глюкози. Такі дані є підставою для твердження про можливу участь ланки біосинтезу CSE-H_2S у резистентності жирової тканини до інсуліну за умов метаболічного синдрому [75].

Фактор некрозу пухлин-α (TNF-α), який надмірно продукується у жировій тканині під час ожиріння, провокує розвиток інсулінорезистентності та впливає на компоненти сигнального шляху інсуліну [103]. Згідно даних досліджень *in vitro* TNF-α гальмує інсулінозалежне засвоєння глюкози адипоцитами лінії 3T3-L1 і це супроводжується збільшенням активності ензиму CSE та збільшенням синтезу H_2S у тканинах. Негативний вплив TNF-α на інсулінозалежне засвоєння глюкози послаблюється введенням PAG або

BCA, але не реагує на AOAA. На противагу до дії інгібіторів активності CSE, а донор синтезу H_2S – NaHS зменшує інсулінозалежне засвоєння глюкози та її внутрішньоклітинний метаболізм. Таким чином, індукована TNF-α – гіперпродукція H_2S може посилювати пошкоджувальний вплив TNF-α на чутливість жирової тканини до інсуліну [59]. Роботи наукової групи Cai, et al. продемонстрували, що розчин H_2S або ендогенний донор H_2S – GYY4137 посилював поглинання глюкози адипоцитами лінії 3T3-L1 [42].

Це узгоджується з даними групи Manna, et al., що займалась дослідженням впливу H_2S на чутливість адипоцитів лінії 3T3-L1 до інсуліну, на тлі високої (25 мМ) концентрації глюкози [142]. Їхніми дослідженнями було встановлено, що гіперглікемія знижує інсулінозалежне поглинання глюкози адипоцитами, що пов'язано зі зменшенням активності PI3K та збільшенням активності ліпідних фосфатів PTEN, що в кінцевому результаті призводить до зниження рівня фосфоінозитида-3-4-5-трифосфата (P). Окрім того, гіперглікемія знижує фосфорилювання тирозин субстрат-1 рецептора інсуліну (IRS-1) і протеїнкінази-Akt, експресію інсуліночутливого транспортера глюкози GLUT4. Усі ці ефекти гіперглікемії були анульовані введенням донорів H_2S або L-цистеїну. Захисний ефект L-цистеїну блокувало введення інгібітора активності CSE – PAG. При досліджені клітинних ліній адипоцитів за умов нормального рівня глюкози у культиваційному середовищі не було виявлено впливу H_2S чи L-цистеїну на поглинання глюкози адипоцитами. Більше того, іншими дослідженнями було продемонстровано, що гіперглікемія зменшує активність CSE та ендогенний синтез H_2S адипоцитами лінії 3T3-L1 [142]. Це вказує на те, що індукована гіперглікемією інсулінорезистентність зумовлена пригніченням сигнальних шляхів біосинтезу сірководню.

Відомо, що споживання вітаміну D та вміст метаболітів вітаміну D у крові обернено пропорційний чутливості до інсуліну. Було встановлено, що додавання вітаміну D у низьких дозах може бути запропоновано у якості потенційного терапевтичного підходу для лікування цукрового діабету 2 типу

[154]. Крім того, продемонстровано, що активний метаболіт вітамін D3 – 1,25-дигідрокси-холекальциферол (1,25-$(OH)_2$-D_3), збільшує активність ензиму CSE та синтез H_2S адипоцитами 3T3-L1, культивованих за умов високої концентрації глюкози. Також 1,25-$(OH)_2$-D_3 покращував передавання сигналів інсуліну (фосфорилювання IRS-1, активність PI3K та фосфорилювання Akt) та збільшував інсулінозалежне надходження глюкози в адипоцити. Отриманий ефект був невільований за умов моделювання змін активності (гальмування або повний нокдаун) ензиму CSE. Отже, дані результати свідчать, що H_2S бере участь у позитивному впливі вітаміну D на чутливість адипоцитів до інсуліну [142].

Роботи наукової групи Xue, et al. продемонстрували, що NaHS в концентраціях 25 мкМ чи 50 мкМ збільшує споживання глюкози адипоцитами-3T3-L1 у присутності (але не у відсутності) інсуліну на 40% та 70% відповідно [244]. Даний ефект спостерігали у культурах клітин, культивованих у нормо- або гіперглікемічних умовах і за умов додатково обробляння донорами синтезу H_2S. Вплив H_2S посилював активність компонентів сигнального каскаду інсуліну, а саме фосфорилювання β-субодиниць інсулінового рецептора, активність PI3K та фосфорилювання Akt. Як результат вплив NaHS збільшує фосфорилювання тирозин-інсулін рецептора та його кіназну активність, що дозволяє припустити, рецептор інсуліну має пряму таргетну дію на стимулювання H_2S, можливо, за рахунок сповільнення персульфідирування цистеїну. Рецептори інсуліну та/або IRS-1 можуть бути дефосфорильовані та інактивовані протеїнтирозинфосфатазою-1B (PTP1B). Такий ефект гальмування дії H_2S за допомогою PTP1B був продемонстрований в інших системах [118], хоча він був відсутній в клітинах 3T3-L1 [244]. *In vivo,* вплив NaHS, що вводили у дозі 30 мкмоль/кг/день, збільшував системну чутливість до інсуліну в щурів лінії Goto-Kakizaki – генетично модифікованих тварин, які використовуються як експериментальні моделі цукрового діабету 2 типу. Цей ефект на тваринах був за рахунок підвищення регуляції фосфорилювання PI3K та Akt у жировій тканині [244].

У мишей, що отримували стандартну дієту і екзогенне введення GYY4137 зареєстровано пригнічення чутливості до інсуліну, про що вказує підвищення вмісту глюкози та інсуліну у плазмі, а також збільшення індексу HOMA-IR, та інших маркерів інсулінорезистентності [82]. Дія PAG, що гальмує синтез H_2S, не впливала на базальний рівень глюкози та інсуліну та дещо покращувала толерантність до глюкози, що прослідживалось за результатами досліджень перорального тесту на толерантність до глюкози – за змінами кривої концентрації глюкози в плазмі. Такі результати вказують на властивість H_2S знижувати чутливість до інсуліну у мишей на SD. Протилежно, дія GYY4137 спричиняла зниження вмісту глюкози та інсуліну у плазмі, а також індекс HOMA-IR та зменшення площі кривої концентрації глюкози у плазмі у тестах на толерантність порівняно до змін глюкози у мишей, що отримували дієту з високим вмістом жирів впродовж 13-ти тижнів [82]. Цікавим результатом була дія PAG, що показувала вплив аналогічний GYY4137, проте до даних результатів потрібно відноситись з обережністю через обмежену специфічність даного інгібітора. Підсумовуючи огляд наукової літератури можна стверджувати, що вище представлені результати досліджень показують властивість H_2S зменшувати чутливість до інсуліну у худих тварин, тоді як існує протилежний ефект у тварин з ожирінням, які отримували дієту з високим вмістом жирів. Тим не менше, остаточно не встановленим залишається вплив H_2S на жирову тканину за умов тривалої постпрандіальної гіперглікемії та інсулінорезистентності.

1.3.3 Роль сірководню на регуляцію ліполізу

Упродовж останніх двох десятиліть увага численних наукових груп прикута до вивчення функцій та механізмів впливу газотрансмітера H_2S на жировий обмін [105, 207] У дослідженнях групи Geng et al. було продемонстровано, що GYY4137 або L-цистеїн, як донори синтезу H_2S, знижували базальний та стимульований ізопротеренолом рівень вивільнення

гліцерину епідидимальними адипоцитами щурів, тоді як інгібітор ензиму CSE – PAG викликав протилежну дію [82, 67]. Отримані дані свідчили про те, що H_2S пригнічує ліполіз. Екзогенне введення GYY4137 мишам, що отримували дієту з високим вмістом жирів, виявило протилежний ефект, що спричинив зниження вмісту гліцерину. Також було встановлено, що застосування 13-ти тижневої дієти з високим вмістом жирів сприяло зниженню регуляторної активності CSE-H_2S у жировій тканині. Було встановлено, що H_2S гальмує стимульований ізопротеренолом ліполіз за рахунок зменшення фосфорилювання периліпіну-1 (plin-1), білка, що блокує доступ ліпази до субстрату. Механізм модулювання фосфорилювання plin-1 остаточно ще не встановлений. У інших дослідженнях виявлено, що донор H_2S збільшує об'єм жирової тканини та зменшує ліполіз у мишей, тоді як застосування інгібування активності CSE знижувало накопичення жирової тканини та посилювало ліполіз [241]. Цікаво, що донор синтезу H_2S спричиняв сульфгідратацію plin-1, але не гормон-чутливої ліпази. Блокування дії plin-1 усувало вплив H_2S на ліполіз, що вказує на те, що сульфгідратація plin-1 є основною прямою мішенню для дії H_2S при ліполізі [67]. Саме тому, важливо провести дослідження біорегуляторного впливу активності ензимів синтезу H_2S на вісцеральні мезентеріальні адипоцити, їхні ультраструктурні зміни *in vivo* в аспекті виявлення їхніх вікових змін, за умов дії екстремальних чинників і гіперкалорійного харчування.

1.3.4 Роль H_2S за умов ожиріння

Не зважаючи на велику кількість публікацій, присвячених дослідженням мультифункціональної ролі H_2S, його біорегуляторний вплив за умов ожиріння найбільше вивчається в експериментальній медицині. За даними літератури у мишей, що отримували дієту з високим вмістом жирів, після введення H_2S чи ендогенного донора H_2S – GYY4137 (у дозі 100 мкмоль/кг/день), відбувалось збільшення маси тіла, за рахунок

епідидимального, періренального і підшкірного депо жирової тканини [52]. Введення мишам PAG у дозі 30 мг/кг/день викликало протилежний ефект [254]. Використовуючи загальнодоступну літературу та наукові дані з'ясовано, що вплив H_2S на жирову тканину сприяє стимуляції адипогенезу, анаболічному ефекту інсуліну та накопиченню тригліцеридів. Встановлено, що H_2S та GYY4137 збільшують, загальний вміст ДНК у жировій тканині (маркер кількості клітин), а також збільшують експресію та персульфідування PPAR-γ, на відміну від PAG, який викликає зменшення кількості адипоцитів з одночасним збільшенням їхнього середнього розміру. Цікаво, що дія H_2S або GYY4137 збільшує чутливість до інсуліну адипоцитів мишей, що отримували харчування з високим вмістом жирів. У цілому ефект H_2S донора GYY4137 подібний до ефекту агоніста PPAR-γ – тіазолідиндіона, що підвищує чутливість до інсуліну за рахунок стимулювання адипогенезу та збільшення кількості молодих дрібних адипоцитів та відповідно збільшення маси тіла [218].

1.4 Роль H_2S і периваскулярної жирової тканини для регуляції судинних реакцій

Периваскулярна жирова тканина (PVAT) – це специфічне депо вісцеральної жирової тканини, яке оточує більшість великих і середніх артерій, а також деякі вени. Первинно PVAT розглядали лише, як пасивний компонент судинної стінки для механічного захисту. Більшість дослідників вважали функціональну роль PVAT несуттєвою та не вартою широкого топографічного та функціонального дослідження [48, 171]. Все змінилося у 1991 році після дослідження наукової групи Soltis – Cassis, що виявило вплив PVAT на реактивність судин до норепінефрину [206]. В подальших дослідженнях науковці встановили, що PVAT бере активну участь в регуляції судинного тонусу і гомеостазу, володіє секреторними властивостями та здатністю виробляти біологічно активні речовини [132, 133, 135, 145, 202]. У

фізіологічних умовах PVAT синтезує ряд медіаторів: сірководень, оксид азоту, адреномедуллін, ангіотензин, що володіють судинорозширювальними властивостями, зменшують тонус судин, гальмують проліферацію гладеньких м'язових клітин, пригнічують запальні реакції [8, 29, 71, 76, 87, 177]. Нещодавні дані вказують, що у фізіологічних умовах PVAT сприяє судиннорозширювальному ефекту за рахунок синтезу релакс-фактора адипоцитів (від англ.: Adipocyte-derived relaxing factor, ADRF). Протилежно, під час патологічних станів, таких як артеріальна гіпертензія, ожиріння, діабет 2 типу – PVAT набуває ознак джерела цитотоксичності. Синтез і вивільнення вищезазначених «корисних» медіаторів порушується і PVAT продукує судинозвужувальні та прозапальні фактори: активні форми кисню, прозапальні цито- і хемокіни та фактори росту [9, 39, 46, 47, 96, 108, 235].

Сірководень може синтезуватися в артеріях у гладеньких м'язових клітинах [233] та ендотеліоцитах [83]. Присутність PVAT спричиняє моделювання синтезу H_2S в ендотеліоцитах [89]. Згідно сучасних даних H_2S володіє двояким вазоактивним ефектом – судинозвужувальним та судинорозширювальним [214, 215]. Якщо судинорозширювальна дія переважно викликана активацією K/ATP, то судинозвужувальний ефект H_2S, обумовлений пригніченням шляху L-аргінін/NO [10, 79]. Сучасні дані вказують, що зниження синтезу H_2S через гальмування активності ензиму CSE, викликає значне пригнічення судинорозширювальних реакцій. Також встановлено, що ендогенно синтезований H_2S володіє регуляторними властивостями на судинний тонус за умов індукції стресу.

Проте, існують суперечливі дані відносно синергетичних та антагоністичних ефектів H_2S і NO, що були опубліковані науковою групою Coletta et al. та показали, що NO і H_2S взаємно необхідні для фізіологічного контролю функцій судин [57]. Автори виявили, що попередня обробка донором H_2S посилювала судинорозширювальну відповідь грудної аорти на ацетилхолін і до донора NO. Також, пригнічення активності ензиму CSE викликало значне гальмування судинорозширювальних реакцій судин до обох

вазодилататорів. Отже, ендогенна продукція H_2S приймає участь у регуляції судинного тонусу і регулювання тиску різними шляхами [162, 234].

У 2009 році було вперше показано, що периаортальна жирова тканина щурів експресує ензим CSE та синтезує H_2S у присутності L-цистеїну і піридоксаль-5'-фосфату. Скорочення аорти у відповідь на дії застосованих вазоконстрикторів: 5-гідрокситриптаміну, фенілефрину і ангіотензину II, були більш вираженими за умов збереження периаортальної жирової тканини (PAT), ніж після видалення PAT у препаратах. Релаксувальний ефект PAT послаблювався за умов екзогенного застосування пропаргілгліцину і глібенкламіду та відновлювався під час екзогенних введення донорів синтезу H_2S або L-цистеїну. Отже, отримані результати переконливо свідчить, що H_2S є одним з судинорозширювальних факторів, що синтезуються жировою тканиною та приймає участь в регуляції судинного тонусу [27, 30, 74].

У дослідженнях брижових артерій щурів було продемонстровано, що PVAT знижує їхню властивість до вазоконстрикції. Мезентеріальні артерії представляють собою периферійні артерії меншого діаметру, вони відіграють більш важливу роль у регуляції загального периферійного опору, чим великі привідні артерії. Судинорозширювальний ефект PVAT на брижові артерії усувається введенням PAG та відновлювався введенням NaHS, що дозволяє припустити, що на відміну від аорти, K^+_{ATP} канали не задіяні в середніх та менших артеріях. Навпаки, судинорозширювальний ефект NaHS на брижові артерії щурів послаблюється застосуванням інгібітора потенціалзалежних K^+ каналів – 4-амінопіридином (4-AP), а також специфічним інгібітором каналів – XE991. Таким чином, молекулярною таргетною дією синтезованого PVAT H_2S є гладенькі м’язові клітини. Синтез H_2S периаортальною жировою тканиною стимулюється фенілефрином або ангіотензином II [26, 201]. У моделях експериментальної гіпертензії, яку було викликано звуженням черевної аорти, виявлено підвищену експресії CSE та збільшений синтез H_2S периаортальною жировою тканиною. Старіння за даними літератури пов'язане з прогресуючим зменшенням експресії CSE та зниженням синтезу H_2S [41,

112, 159]. Хоче механізм дисоціації між експресією CSE та синтезом H_2S у старих тварин залишається остаточно нез'ясованим.

Цілий ряд досліджень, як у тварин, так і у людей продемонстрували, що вісцеральне ожиріння, а особливо за рахунок збільшення периартеріальних жирових депо, викликає стійкий судиннозвужувальний ефект [28, 127, 208, 226]. Механізм, за допомогою якого ожиріння порушує мітохондріальне окиснення H_2S має пряму залежність від харчування. У щурів, які отримували дієту з нормальним вмістом жиру, кількість мітохондрій в PVAT залишалась нормальною. Проте, вміст кисню був помітно знижений в PVAT у тварин з ожирінням, що узгоджується з багатьма дослідженнями, які показують, що ожиріння викликає гіпоксію жирової тканини через гіпертрофічні та гіперпластичні зміни адипоцитів та зниження відносної щільності капілярів [224]. Таким чином, гіпоксія є відповідальною за порушення мітохондріального окиснення H_2S. Встановлено, що H_2S діє як сенсор для визначення вмісту кисню у кровоносних судинах для хеморецепторів сонних артерій та нирок [158]. Відповідно до цієї теорії, H_2S синтезується з відносно постійною швидкістю, але за умов нормальної оксигенації швидко метаболізується у мітохондріях. Коли pO_2 істотно знижується, окиснення H_2S погіршується, його локальна концентрація збільшується і передача сигналів посилюється. У жировій тканині H_2S може відігравати роль «сенсора» кисню, вміст якого відповідає за концентрацію газу у тканинах.

Нещодавніми дослідженнями показано, що у щурів, які отримували дієту з високим вмістом жирів впродовж 1 місяця, кількість мітохондрій в PVAT була зниженою, про що свідчила менша концентрація мітохондріальної ДНК і цитохрому С та зниження активності цитратсинтази. Також, у них була зменшена експресії факторів транскрипції, що беруть участь в мітохондріальному біогенезі: ко-активатор PPAR-γ-1α (PGC-1α), ядерний респіраторний фактора-1 (NRF-1), мітохондріальний фактор транскрипції А (TTFAM) [7, 22]. Припускають, що харчування дієтою з високим вмістом жирів погіршує окиснення H_2S в жировій тканині, пригнічуючи

мітохондріальний біогенез [222]. Результати досліджень показують, що харчування дієтою з високим вмістом жирів, навіть впродовж нетривалого часу, активує ендоканабіноїдні системи в PVAT, що призводить до пригнічення мітохондріального біогенезу і порушенню окиснення H_2S та посиленню опосередкованого H_2S судинорозширювального ефекту [25, 78]. Дослідження Emilova, et al. [73] продемонструвало, що за умов індукованого за допомогою стрептозотоцину – цукрового діабету, що є експериментальною моделлю діабету 1-го типу, реєструється послаблювальний судинорозширювальний PAG-чутливий ефект PVAT на артерії щурів. Цікаво, що за умов застосування високих концентрацій потужного судиннозвужувального засобу – серотоніну на PVAT відбулось посилення звуження судин у діабетичних щурів, тоді як PAG викликав судинорозширювальний ефект. Дані результати дозволяють зробити висновок, що H_2S-зумовлений судинорозширювальний ефект PVAT не тільки порушується при діабеті, а H_2S викликає судинозвужувальну дію.

Підсумовуючи опрацьовані наукові дані, на сьогодні не відомо про вікові зміни брижі, особливості характеру протидії мезентеріальних адипоцитів, судин, фібробластів та елементів сполучної тканини гострому стресу, пошкоджувального впливу надмірного вживання гіпервуглеводої дієти дії та впливу порушень циклу арахідонової кислоти. Відсутні дослідження ключової ланки, яка б доповнила знання про механізм цитопротекції та підтримку гомеостазу клітин брижі та можливий його потенціал для таргентної терапії. Досліджень ефектів H_2S шляхом застосування сполук донорів його синтезу, що збільшують ендогенний вміст на мезентеріальні адипоцити, вазотропний та сполучно-тканинний компоненти брижі та забезпечували активування цитопротекторних реакцій у доступній нам науковій літературі ми не знайшли. Фізіологічним властивостям брижі в умовах модуляції ендогенного синтезу H_2S та використання електронномікроскопічних досліджень для реєстрації ультраструктурних змін

клітинного складу брижі за умов стресу та гіперглікемії в аспекті вікових змін були присвячені наші дослідження.

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об’єкт, етапи та умови дослідження

Дослідження проводились на лабораторних білих самцях щурів лінії Wistar (N = 228): дорослих тваринах, віком 12-14 тижнів, вагою 198±20 г (n = 84), та старих, віком 42-46 тижнів, вагою 256±28 г (n = 144). Експерименти проведені відповідно до положення Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Директив Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», нормативів Хельсінкської декларації Всесвітньої Медичної асоціації (1996 р.) та Конвенції з біоетики Ради Європи (1997 р.), міжнародних настанов ARRIVE, національного законодавства у цій галузі і директивами Європейського Союзу (EU Directive 2010/63 EU), та дозволів комісії з питань етики наукових досліджень, експериментальних розробок і наукових творів Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протоколів № 4 від 23 квітня 2018 р. та № 8 від 18 жовтня 2021 року).

Щурів утримували у віварію за стандартних умов, у індивідуальних сітчастих клітках (клітках Боллмана) для запобігання копрофагії, при температурі у приміщені 20-23°С. Щурі мали вільний доступ до питної води та отримували стандартний раціон харчування (SD). Для моделювання висококалорійної дієти у серії експериментів було використано харчовий раціон з надмірним вмістом фруктози. Для цього впродовж 28-ми днів тварини мали вільний доступ (*ad libitum*) до 40% розчину фруктози (HFD) [116]. У якості препарату контролю (плацебо) застосовували стерильний 0,9% розчин хлориду натрію.

Кількість використаних щурів вказана в дужках у підписах під рисунками. Після 12-годинної депривації від їжі проводили виведення тварин

з експерименту методом декапітації під загальним інгаляційним наркозом діетиловим ефіром.

Дослідження було розділено на декілька етапів для вивчення вікових відмінностей морфо-функціональної організації брижі за умов стрес- та HFD-індукованих змін. Для оцінювання значення H_2S на зміни окисно-відновної рівноваги у тварин усіх експериментальних груп досліджували особливості функціонування H_2S за вмістом TBARS у сироватці крові та активності ензимів, що відповідають за ендогенний синтез H_2S – цистатіонін γ-ліази (CSE, ЕС 4.4.1.1), цистатіонін β-синтази (CBS, ЕС 4.2.1.22), тіосульфат-сульфуртрансферази (TST, ЕС 2.8.1.1) та сульфітоксидази (SO, ЕС 1.8.3.1) у гомогенаті тканин брижі дорослих та старих щурів та застосування екзогенного введення донора синтезу H_2S – гідросульфіду натрію (NaHS), а також впливу класичного аспірину, поєднання введення NaHS з аспірином та новітньої сполуки H_2S-аспірину.

Для забезпечення достовірно статистичних результатів групи тварин обох вікових груп формувались за вихідною масою тіла. У кожній з експериментальних груп було по 6 щурів (n=6). Маса тіла тварин вимірювалась механічною вагою РН 10С13У, 100г – 10кг±5г (Вага, Україна).

Вимірювання рівнів глюкози у крові здійснювали із хвостової вени щурів глюкометром (Achtung TD-4207, Німеччина).

При дослідженні вікових аспектів фізіологічної ролі брижі та її жирової тканини за умов стресу використано наступні препарати та реактиви: 40% розчин фруктози (моносахарид, молекулярна формула $C_6H_{12}O_6$, молярна маса 180,16 г/моль, виробництва «Клебріг», Україна), натрій гідросульфід (Sigma, США), H_2S-аспірин (АТВ 340) (Antibe Therapeutics Inc., Канада), аспірин («Aspisol», Bayer, Німеччина, 1 флакон з порошком для приготування ін'єкційного розчину містить 100 мг амінооцтової кислоти та 900 мг D,L-лізин-моноацетилсаліцілату, що відповідає 500 мг ацетилсаліцилової кислоти).

Запропоновані дози препаратів попередньо апробовані в експериментальних умовах на лабораторних тваринах та люб’язно надані для

нашого дослідження науковим керівником «Antibe Therapeutics Inc, Toronto, Ontario» (Канада) проф. Wallace J.L. [228-231].

Дослідження на всіх етапах експерименту проводилось згідно стандартів доказової медицини, з групою контролю та застосуванням у досліджені плацебо (1 мл 0,9% р-ну NaCl) для порівняння дії інших препаратів.

І етап – дослідження вікових відмінностей стрес-індукованих змін брижі за умов стандартного та високофруктозного харчування у дорослих (n=36) та старих щурів (n=36) та з'ясування впливу NaHS. Для цього дорослі та старі самці щурів отримували 28-миденну стандартну або високофруктозну дієту, а з 20-го дня експерименту тваринам внутрішньоочеревинно (в/о) вводили NaHS у дозі 5,6 мг/кг/добу протягом 9-ти днів. Тварини групи контролю отримували в/о фізіологічний розчин у дозі 1,0 мл/добу. На 28-й день частині тварин індукували гострий водно-іммобілізаційний стрес (рис.2.1).

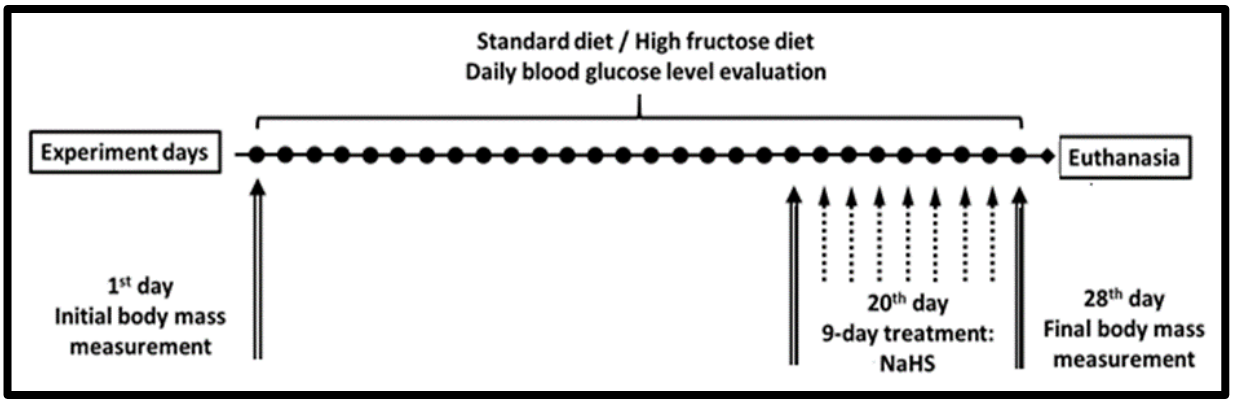

Рис. 2.1. Схема 1 етапу дослідження. Для порівняння особливостей вікових відмінностей стрес-індукованих змін брижі за умов 28-миденної стандартної та високофруктозної дієти у дорослих і старих щурів та впливу 9-тиденного введення NaHS.

ІІ етап дослідження. З'ясувати вікові відмінності впливу нової гібридної сполуки H_2S-аспірину – АТВ-340 на тканину брижі дорослих (n=48) та старих щурів (n=48), та порівняти з – NaHS, аспірином та комбінованим введенням аспірину і NaHS, за умов високофруктозної дієти на індукції гострого стресу. Для цього тварин розділили на групи по 6 особин у кожній. Частина щурів, дорослого і старого віку, залучених у дослідження отримували 28-миденну

стандартну, інші – високофруктозну дієту. Починаючи з 20-го дня дослідження тваринам проводилось 9-тиденне введення препаратів (рис. 2.2).

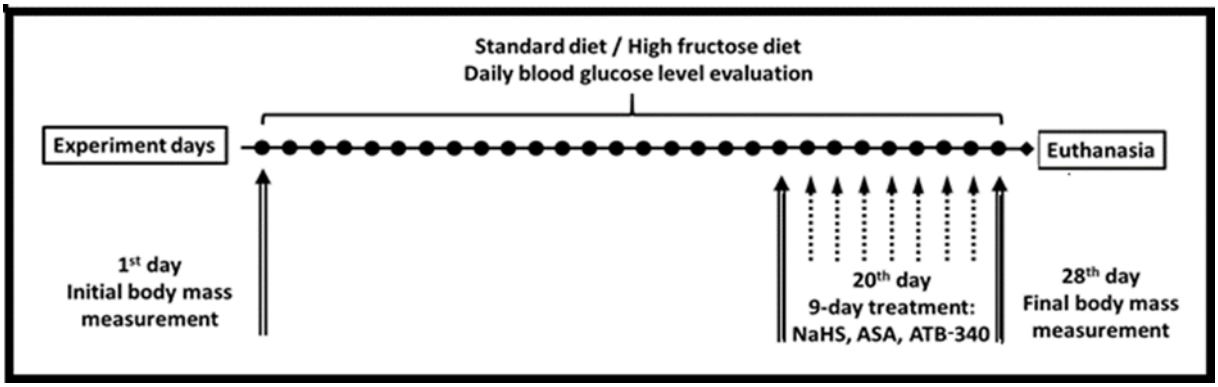

Рис. 2.2. Схема 2 етапу дослідження вікових відмінностей за умов 28-денної високофруктозної дієти на тлі застосування NaHS і H_2S-аспірину.

1 група (дорослі (n = 6), старі (n = 6)) – контроль, які перебували на 28-миденній стандартній дієті та в/о вводили 1,0 мл 0,9% р-ну NaCl;

2 група (дорослі (n = 6), старі (n = 6)) – перебували на 28-миденній високофруктозній дієті та в/о вводили 1,0 мл 0,9% р-ну NaCl;

3 група (дорослі (n = 6), старі (n = 6)) – перебували на 28-миденній високофруктозній дієті та в/о вводили 1,0 мл 0,9% р-ну NaCl з індукцією стресу;

4 група (дорослі (n = 6), старі (n = 6)) – перебували на 28-миденній високофруктозній дієті та в/о вводили аспірин у дозі 10 мг/кг/добу з індукцією гострого стресу;

5 група (дорослі (n = 6), старі (n = 6)) – перебували на 28-миденній високофруктозній дієті та в/о вводили H_2S-аспірин (ATB-340) у дозі 17,5 мг/кг/добу з індукцією гострого стресу;

6 група (дорослі (n = 6), старі (n = 6)) – перебували на 28-миденній високофруктозній дієті та в/о вводили комбінацію аспірину і NaHS з індукцією гострого стресу;

7 група (дорослі (n = 6), старі (n = 6)) – перебували на 28-миденній високофруктозній дієті та в/о вводили NaHS у дозі 5,6 мг/кг/добу з індукцією гострого стресу;

8 група (дорослі (n = 6), старі (n = 6)) – перебували на 28-миденній високофруктозній дієті та в/о вводили NaHS у дозі 5,6 мг/кг/добу без індукції гострого стресу.

Усім тваринам проводили порівняльні дослідження вмісту TBARS у сироватці крові та активності ензимів: CSE, CBS, TST та SO у гомогенаті тканин брижі.

III етап – дослідження ефективності гібридних нестероїдних протизапальних препаратів, що володіють властивостями збільшувати ендогенний вміст H_2S (H_2S-НПЗП), на прикладі АТВ-340 у порівняні до звичайного аспірину (ASA) та поєднаної дії введенням ASA і NaHS на адаптаційно-компенсаторні зміни мезентеріальних клітин у старих щурів (n=60), що отримували високофруктозне та стандартне харчування (рис.2.3). Групи старих самців щурів (n=6), отримували SD або 4-тижневу HFD, та частина з них піддавалась впливу індукції гострого водно-імобілізаційного стресу (WIRS) [219]. Старим щурам проводили дев'ятиденне введення: АТВ-340 (17,5 мг/кг/день), ASA (10 мг/кг/день), NaHS (5,6 мг/кг/день) та комбінації NaHS і аспірину в/о.

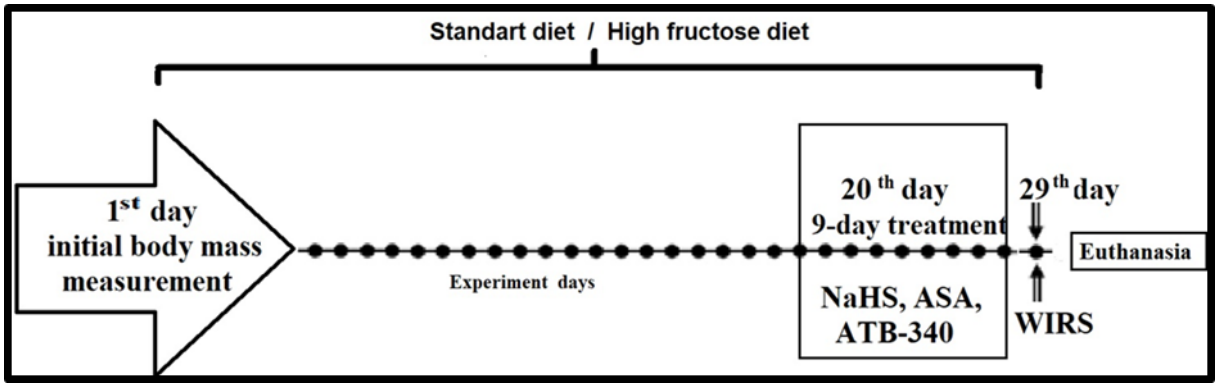

Рис. 2.3. Схема 3 етапу дослідження стрес-індукованих змін брижі старих щурів за умов 28-денної високофруктозної дієти та застосування H_2S-аспірину.

Вміст TBARS у сироватці крові та активність CSE, CBS, TST та SO досліджували біохімічними методами з використанням спектрофотометрії.

Використані у даному досліджені прилади пройшли метрологічну перевірку та були сертифіковані.

2.2. Методика експериментального пошкодження тканин брижі за умов за умов високофруктозної дієти

За даними численних досліджень HFD широко поширена експериментальна модель для індукції метаболічних пошкоджень, які за своїми ознаками є ревалентними до клітинних ознак метаболічних ушкоджень. Для моделювання цитолітичного пошкодження брижі та жирової тканини ми використовували модифіковане харчування з підвищеним вмістом фруктози. З експериментальних дієт з підвищеним складом вуглеводів нами було обрано модель Kozar V.V., 2009 р. [116], яка ґрунтується на модифікації раціону шляхом збільшення споживання дозозалежної частки фруктози за рахунок щоденного *ad libitum* доступу до 40% розчину фруктози в якості пиття впродовж 28-ми днів.

2.3 Методика індукції гострого стресу

Для моделювання ознак патологічного стрес-індукованого пошкодження брижі було застосовано модель водно-іммобілізаційного стресу за методикою Takagi, et al. [219]. Щурів на протязі 2-х годин атравматично іммобілізували у тісних клітках, далі проводили вертикальне занурення у воду, температура якої становила 24°С, по рівень мечоподібного відростка щура. Час перебування у воді складав 1,5 год. При даному методі індукції гострого стресу, використовувався стрес змішаного типу із дією двох стресорів за Г. Сельє, що робить дану модель найбільш наближеною до експериментальних умов за яких буде відбуватись формування стрес-індукованих ушкоджень брижі та жирової тканини, що дозволить оптимально дослідити адаптаційно-компенсаторні властивості брижі та її компонентів. Через 3,5 години після дії стресу тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під загальним інгаляційним наркозом діетиловим ефіром.

2.4 Методика дослідження вікових особливостей ролі гідроген сульфідної модуляції та циклооксигенази у брижі та жировій тканині

Для вивчення вікових особливостей значення гідроген сульфідної модуляції у захисних та адаптаційно-компенсаторних механізмах резистентності брижі та жирової тканини застосовували 9-тиденне в/о введення неорганічного донору H_2S– NaHS у дозі 5,6 мг/кг/добу або 9-тиденне в/о введення гібридної сполуки H_2S-аспірину – АТВ 340, 17,5 мг/кг/добу.

Визначення вікових особливостей адаптаційно-компенсаторних механізмів брижі та жирової тканини за умов модифікації активності циклооксигенази. На групах дорослих і старих щурів проводили порівняння дії класичного аспірину та H_2S-аспірину. Для цього використовували 9-денне в/о введення аспірину у дозі 10 мг/кг/добу та H_2S-аспірину (АТВ 340) у дозі 17,5 мг/кг/добу, що еквімолярна дозі звичайного аспірину [228-231].

Для з'ясування адаптаційно-компенсаторних можливостей брижі та її компонентів на 29-й день експерименту проводили 3,5 годинний водно-іммобілізаційний стрес за загальноприйнятою методикою Takagi, et al. [219].

2.5 Електронномікроскопічне дослідження тканин брижі щура

Після декапітації щурів, забір матеріалу для електронномікроскопічного дослідження проводили з тканин брижі кишки. За допомогою леза скальпеля, попередньо знежиреного ацетоном, вирізали шматочки тканин біоптата брижі завбільшки 1 $мм^3$ та фіксували у 1,5% розчині чотириокису осмію (OsO_4) (Osmium Tetroxide, SPI – Chem USA) на 0,1 М какодилатному буфері (Cacodylic acid Sodium salt. Fluka) при pH 7,2 впродовж 2 год при температурі танення льоду [85].

Після цього промивали буферним розчином цього ж складу (4 свіжі порції по 15 хвилин). Для дегідратації і відмивання від залишків фіксаторів, тканинні блоки проводили через зростаючі концентрації спирту та

пропіленоксиду по схемі. Схема проведення в розчинах етилового спирту: 50% – три свіжі порції по 10 хвилин; 70% – три свіжі порції по 10 хвилин; 96% – дві свіжі порції по 20 хвилин. Проведення через пропіленоксид (Fluka): шість свіжих порцій по 10 хв. Потім зневоднені шматочки тканин поміщали в суміш епоксидної смоли – епон-аралдіт. Склад смоли для водонерозчинного заливного середовища містив: епон 812 – 5 мл, аралдіт М – 3 мл, DDSA – 11 мл, дибутилфталат 0,4 мл, ДМП-30 – 15 крапель. Блоки тканин поміщали в епон-аралдіт шляхом проведення через розчини смоли у зростаючій концентрації по схемі (схема проведення: суміш ацетону і смоли у співвідношенні 3:1 – одна порція на дві години; суміш ацетону і смоли у співвідношенні 1:1 – одна порція на дві години; суміш ацетону і смоли у співвідношенні 3:1 – одна порція на дві години; чиста смола – одна свіжа порція на дванадцять годин при кімнатній температурі). Для кращого просякнення матеріалу зі сумішшю смол ставили у центрифугу на швидкість 10 обертів за хвилину. Потім тканині блоки поміщали шляхом самовтоплення в епон-аралдіт, який знаходився у пластикових капсулах. Полімеризацію матеріалу проводили впродовж 24-х годин у термостаті при температурі 60° С.

Ультратонкі зрізи виготовляли на ультрамікротомі УМТП – 3М з алмазним ножем (DIATOM). Контрастування зрізів проводили за допомогою 1% розчину уранілацетату та в контрастері по Рейнольдсу [210]. Переглядали та вивчали зрізи на електронному трансмісійному мікроскопі УЕМВ –100К (Україна) при прискорюючій напрузі 75 кВ із збільшенням на екрані мікроскопу х2000-х124000. Мікрофотографії робили за допомогою цифрової камери SONY – H9.

2.6 Дослідження біохімічними методами

2.6.1 Визначення вмісту реактивних речовин тіобарбітурової кислоти

Кров для біохімічного визначення вмісту реактивних речовин тіобарбітурової кислоти (TBARS) відбирали після евтаназії щурів методом

кардіопунктури. Вміст TBARS, як маркера визначення продуктів перекисного окиснення ліпідів та інтенсивності окисного стресу, визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою у діагностичному наборі ТБК-Агат (Біоконт, Україна). Кінцеві продукти перекисного окиснення ліпідів утворюють з тіобарбітуровою кислотою забарвлений комплекс червоного кольору, що екстрагується бутанолом, з максимальним поглинанням світла при λ=535 нм.

У пробірки для центрифугування вносили по 0,25 мл сироватки крові (у контрольну пробу вносили 0,25 мл дистильованої води), 1,0 мл насиченого розчину тіобарбітурової кислоти, 3,0 мл 1,4% розчину ортофосфорної кислоти. Пробірки 45 хв інкубували на водяній бані при температурі 100°С, а потім охолоджували 5 хвилин у холодній воді. Далі додавали 4,0 мл n-бутанолу та центрифугували 10 хв. при 3000 об/хв., відбирали супернатант. Оптичну щільність дослідної проби визначали на Apel PD-303 (Японія) у порівняні до контролю при λ=535 та 570 нм. Вміст TBARS розраховувався за формулою: С = ((D535-D570)/0,156) х 16, де С – вміст TBARS в мкмоль/л; D535 та D570 – оптична щільність дослідної проби при 535 та 570 нм, відповідно; 0,156 – коефіцієнт молярної екстинкції комплексу TBARS в л/мкмоль/см, 16 – коефіцієнт розведення сироватки крові [2].

2.6.2 Визначення ензимної активності цистатіонін-γ-ліази, цистатіонін-β-синтази та тіосульфат-сульфуртрансферази

Активність ензимів – цистатіонін-γ-ліази (CSE), цистатіонін-β-синтази (CBS) та тіосульфат-сульфуртрансферази (TST), визначали у гомогенатах тканин брижі (нмоль/хв*1мг білка), використовуючи модифікацію методу Stipanuk M. та Beck P. [211]. Оптимальні умови, pH та час інкубації, для визначення активності ензимів були обрані заздалегідь [251].

Для визначання каталітичної активності ензиму CBS використовували інкубаційне середовище, що містило у кінцевих концентраціях тіосульфат

натрію піридоксальфосфат – 0,67 мМ, L-цистеїн – 3,3 мМ, D,L-гомоцистеїн – 3,3 мМ; буферний розчин Tris-HCl – 0,08 М (pH 8,5).

Для визначання каталітичної активності ензиму CSE використовували інкубаційне середовище, що містило у кінцевих концентраціях піридоксальфосфат – 0,67 мМ, L-цистеїн – 3,3 мМ; буферний розчин Tris-HCl – 0,08 М (pH 8,5).

Для визначання каталітичної активності ензиму TST використовували інкубаційне середовище, що містило у кінцевих концентраціях тіосульфат натрію – 0,2 мМ, 1,4-дітіотрейтол – 2,3 мМ; буферний розчин Tris-HCl – 0,09 М (pH 8,5).

До супернатанту пост'ядерного гомогенату брижі (з концентрацією білка 1-2 мг) додавали 0,5 мл інкубаційного розчину. Для запобігання втрат H_2S у зразках інкубування проводили у щільно закритих пробірках Еппендорфа впродовж 60 хв при температурі 37°C. Реакцію зупиняли охолодженням пробірок на льоді, а після, для зв’язування утвореного H_2S, додавали 0,5 мл 1% розчин ацетат цинку. Контрольні зразки отримували аналогічну обробку. Вміст H_2S оцінювали за стандартним методом отримання метиленового синього [176]. У зразки додавали 0,4 мл 30 мМ FeCl3 в 1,2 М HCl і 0,5 мл 20 мМ N,N-диметил-фенілендіамін у 7,2 М HCl та інкубували при температурі 20 ± 2°C впродовж 20 хв, потім додавали 1 мл 20% трихлороцтової кислоти та центрифугували впродовж 10 хв при 3000 об/хв.

Оптичну щільність супернатанту вимірювання при довжині хвилі λ=670 нм, кюветах з товщиною шару 1,0 см, спектрофотометром Apel PD-303 (Японія). Визначення у зразках концентрації сульфідних аніонів проводили за допомогою калібрувальної шкали [250].

2.6.3 Визначення активності сульфіт оксидази

Визначення активності сульфіт оксидази (SO) у гомогенатах тканин брижі проводили за швидкістю окиснення сульфатного аніона у присутності

гексаціаноферату калію стандартним біохімічним методом. Гомогенати тканин брижі центрифугували при швидкості 3000 об/хв впродовж 30 хв у середовищі 1,15% хлориду калію (співвідношення 1:3). Супернатант до проведення досліджень зберігали мікропробірки Еппендорфа при температурі -20°С [251].

2.7 Статистичне опрацювання результатів досліджень

Статистичний аналіз даних отриманих за результатами досліджень, розрахунок похідних та побудову діаграм проводили на персональному комп'ютері за допомогою ліцензійного пакету програм STATISTICA for Windows 7.0 та електронних таблиць Microsoft Excel (Microsoft Office 2016) з використанням параметричних та непараметричних методів варіаційної статистики. У кожному з отриманих варіаційних рядів даних, розраховували середні значення та стандартну похибку (при правильному розподілі варіаційного ряду), або визначали квартилі і медіани (при неправильному розподілі). Достовірність відмінностей результатів порівнювали за допомогою t-критерія Стьюдента, а при неправильному розподілі – за допомогою U-критерія Манна-Уітні. Порівняння досліджуваних груп з групою контролю проводили однофакторним дисперсійним аналізом ANOVA (від англ: Analysis of variance) за допомогою тесту Даннетта. Результати вважали достовірними при $p \leq 0,05$. Кількість піддослідних тварин у групі вказували у дужках (n).

Використані при наукових дослідженнях прилади підлягали метрологічному контролю.

РОЗДІЛ 3
ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ БРИЖІ У ВІКОВОМУ АСПЕКТІ ЗА УМОВ НОРМИ, ВИСОКОВУГЛЕВОДНОГО ХАРЧУВАННЯ ТА СТРЕСУ

Згідно сучасних уявлень науковців світу брижа – важливий окремий орган черевної порожнини, який відіграє інтегрувальний вплив на травну систему [55, 56]. Але на даний час малодосліджена фізіологічна роль брижі та небагато даних у науковій літературі про особливості морфо-функціональної організації брижі на ультраструктурному рівні. Мезентеріальні зміни відіграють важливу роль у різних гастроентерологічних, абдомінальних та неабдомінальних патологічних станах, таких як: запальні захворювання кишки, ожиріння, метаболічний синдром, діабет, дивертикульоз, колоректальний рак [62]. Не дослідженими залишаються вікові відмінності брижі, її адаптивні зміни в умовах стресу та комбінованого впливу стресу та високофруктозної дієти.

Не дивлячись на значний науковий прогрес, остаточний фізіологічний механізм функціонування клітинних компонентів брижі та їхніх субклітинних структур до тепер недостатньо вивчений. Також є мало даних про роль мезентеріальних адипоцитів у вікових змінах брижі. Дослідження фізіологічних основ механізмів функціонування адипоцитів і біорегуляторів брижі може бути корисним у розробці нових та у вдосконалені існуючих терапевтичних стратегій для профілактики та лікування потенційних хвороб сучасної людини та створення персоналізованої терапії.

Метою даного етапу дослідження було вивчити вікові особливості функціональної організації мезентеріальних клітин та їхніх субклітинних компонентів у нормі та ультраструктурні зміни брижі за умов стресу, високофруктозного харчування та їх поєднаному впливі. А також за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії дослідити зв'язок між особливостями цитопротекції брижі і характером активності H_2S за рахунок

моделювання його синтезу екзогеним введенням сполук, що мають властивості донорів для ендогенної дії: NaHS і H_2S-ASA.

3.1. Вікові особливості мікроструктурної організація брижі білого щура у нормі

Під час електронномікроскопічного дослідження тканин брижі дорослих щурів, які отримували стандартне харчування, на ультраструктурному рівні було виявлено, що основним мезентеріальним компонентом є сполучна тканина, представлена колагеновими волокнами, фібробластами, серед яких є популяції адипоцитів (МА) та мікросудини (рис. 3.1, 3.2). Колагенові волокна брижі щура були побудовані з фібрил, що складалися з мікрофібрил, які мікроскопічно нагадували хвилясті нитки. Фібрили були організовані у пучки, проміжки між пучками заповнені основною речовиною сполучної тканини. Пучки колагенових волокон мали як поздовжню, так і поперечну просторову направленість у тканині брижі (рис. 3.1 А).

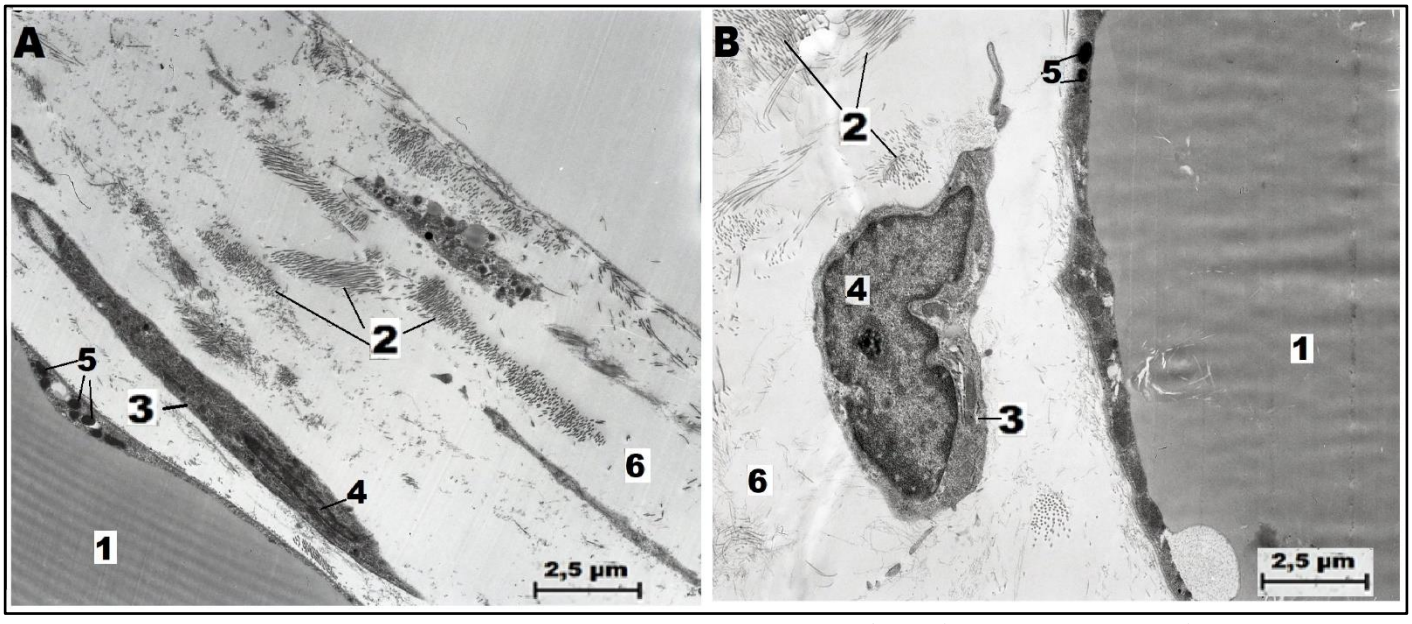

Рис. 3.1 Фрагменти сполучної тканини брижі дорослих щурів, що отримували SD. Електронна мікрофотографія. Зб.: х 4000.

Позначення: 1 – адипоцит; 2 – пучок колагенових волокон; 3 – фібробласт; 4 – ядро фібробласта; 5 – мітохондрії адипоцита; 6 – основна речовина сполучної тканини.

Встановлено, що у групі дорослих щурів, які отримували SD – мезентеріальні адипоцити були великих розмірів та у декілька разів перевищують за розмірами фібробласти. Цитоплазма МА заповнена однією великою краплею жиру з характерною вакуолізацією, вузькі ділянки цитоплазми по периферії містять загальні органели, серед яких переважають мітохондрії з електроннощільним матриксом (рис. 3.1 В).

Мікрофотографії брижі дорослих щурів зі SD верифікують адипоцити без ознак фрагментації великих ліпідних крапель, з мітохондріями нормальної будови та добре розвинутими ендотеліальними клітинами гемокапілярів зі збереженими еритроцитами у просвіті (рис 3.2 А). Клітини ендотеліоцитів мають окремі мікроворсинки, які збільшують поверхню клітини. Ззовні до ендотеліоцитів прилягає базальна мембрана без ознак пошкодження (рис 3.2 В).

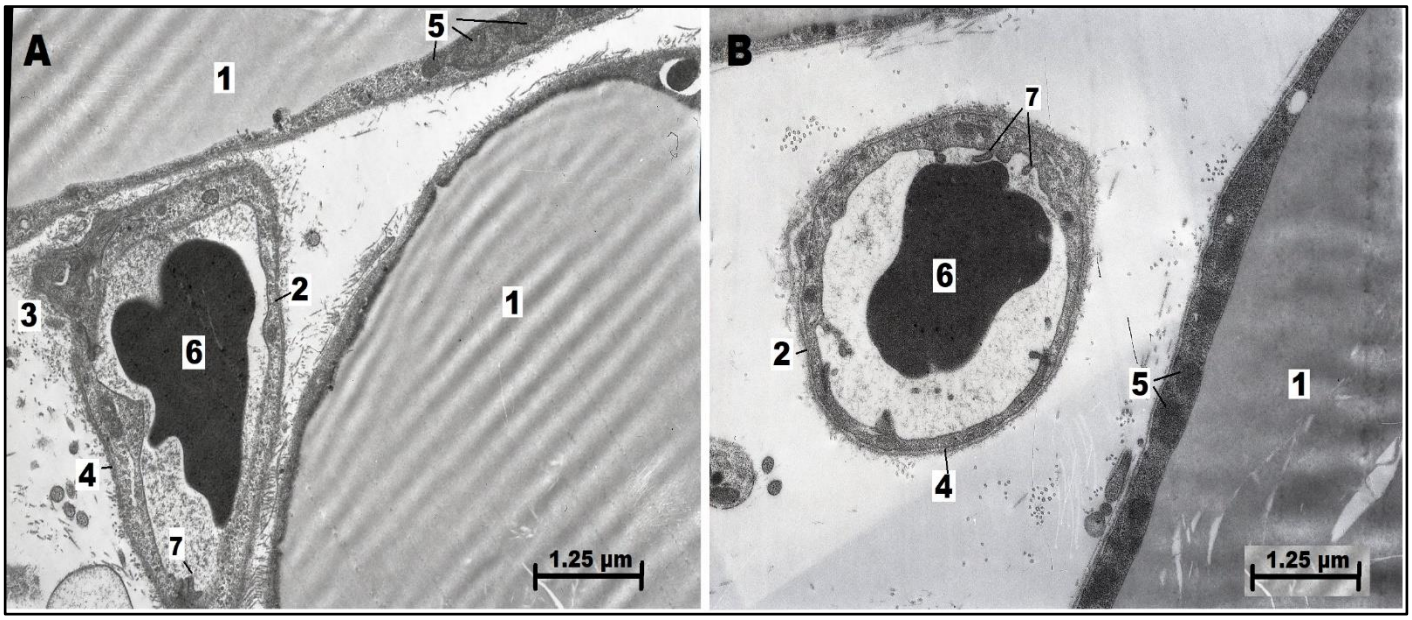

Рис. 3.2 Трансмісійна електронна мікроскопія тканини брижі (забір матеріалу з ділянки пов'язаної з тонкою кишкою) дорослих щурів, що отримували SD. Електронна мікрофотографія. Зб.: х 8000.

Позначення: 1 – адипоцит; 2 – ендотеліальна клітина; 3 – ядро ендотеліоцита;

4 – базальна мембрана; 5 – мітохондрії; 6 – еритроцит; 7 – мікроворсинка.

На електронномікроскопічних фотографіях отриманого матеріалу брижі старих щурів, які отримували SD, під час порівняльного аналізу з електронними мікрофотографіями дорослих щурів виявлено відмінності в ультраструктурній морфо-функціональній організації, що показано на рис. 3.3. У старих щурів на SD виявлено вікові зміни, що проявилися наявністю ознак дегенерації адипоцитів і присутністю у їхній цитоплазмі фрагментованих великих крапель жиру та присутністю мітохондрій різної форми. Також виявлено дефектні мітохондрії у процесі перехресної взаємодії з іншими мітохондріями (рис. 3.3 А). Рис. 3.3 В демонструє вікові морфо-функціональні зміни мітохондрій, про що вказує поява мітохондрій круглої форми серед мітохондрій видовженої форми у цитоплазмі білих адипоцитів.

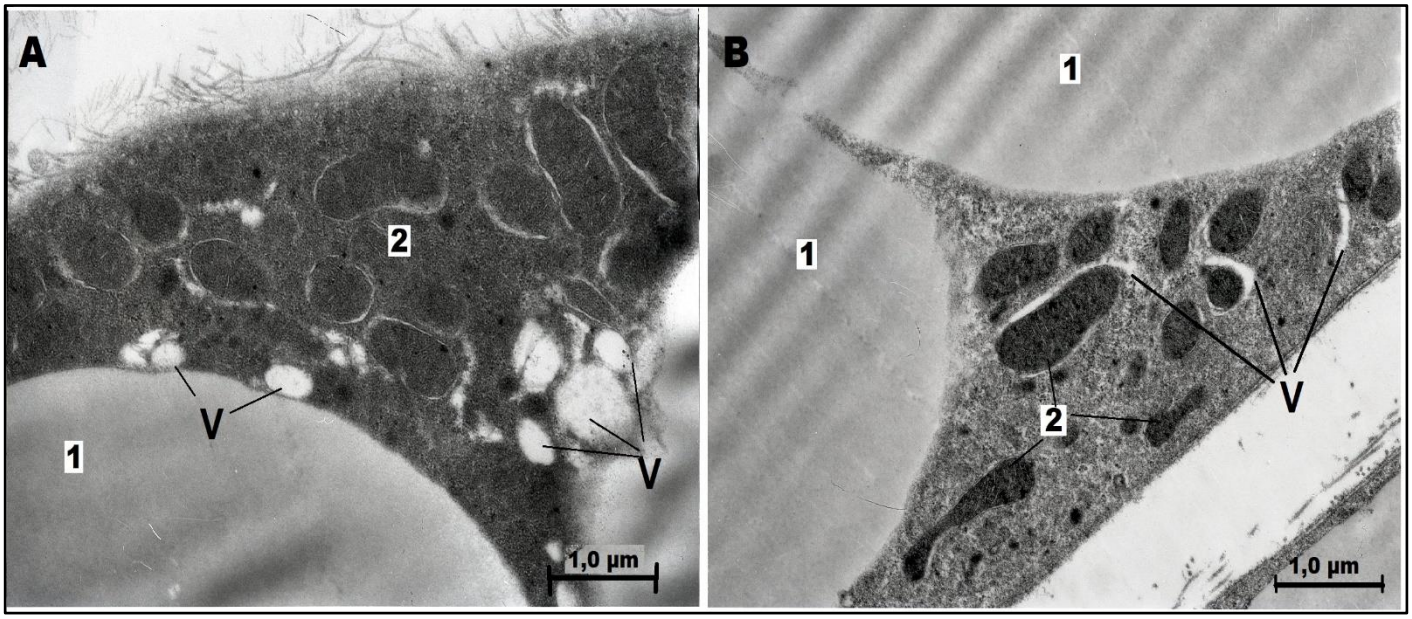

Рис. 3.3 Трансмісійна електронна мікроскопія тканини брижі старих щурів, що отримували SD. Електронна мікрофотографія. Зб.: х 10000.

Позначення: 1 – адипоцит з ознаками дегенерації та вакуолізації у цитоплазмі (V); 2 – мітохондрії різної форми у цитоплазмі адипоцита.

Таким чином, описані вище ознаки змін мікросудин і адипоцитів брижі вказують на наявність вікових відмінностей між дорослими і старими щурами в ультраструктурній організації брижі.

3.2 Вікові відмінності ультраструктурної будови брижі щура за умов високовуглеводного харчування

У сполучній тканині дорослих щурів, які перебували на високофруктозній дієті впродовж 28-ми днів, виявлено мезентеріальні адипоцити, які мали бочкоподібну форму з ознаками гіпертрофії та фрагментації великих ліпідних крапель з утворенням декількох дрібних ліпідних крапель (рис. 3.4 А). Між адипоцитами виявлено інфільтрацію макрофагами. Навколо адипоцитів були хаотично розташовані колагенові фібрили. Периферійна ділянка цитоплазми адипоцита мала ознаки набряку та присутність електронно-щільних мітохондрій з електронно-щільним матриксом. Деякі мітохондрії мали видовжену або округлу форму. Верифікуються ознаки інвагінації плазмалеми МА (рис. 3.4 В).

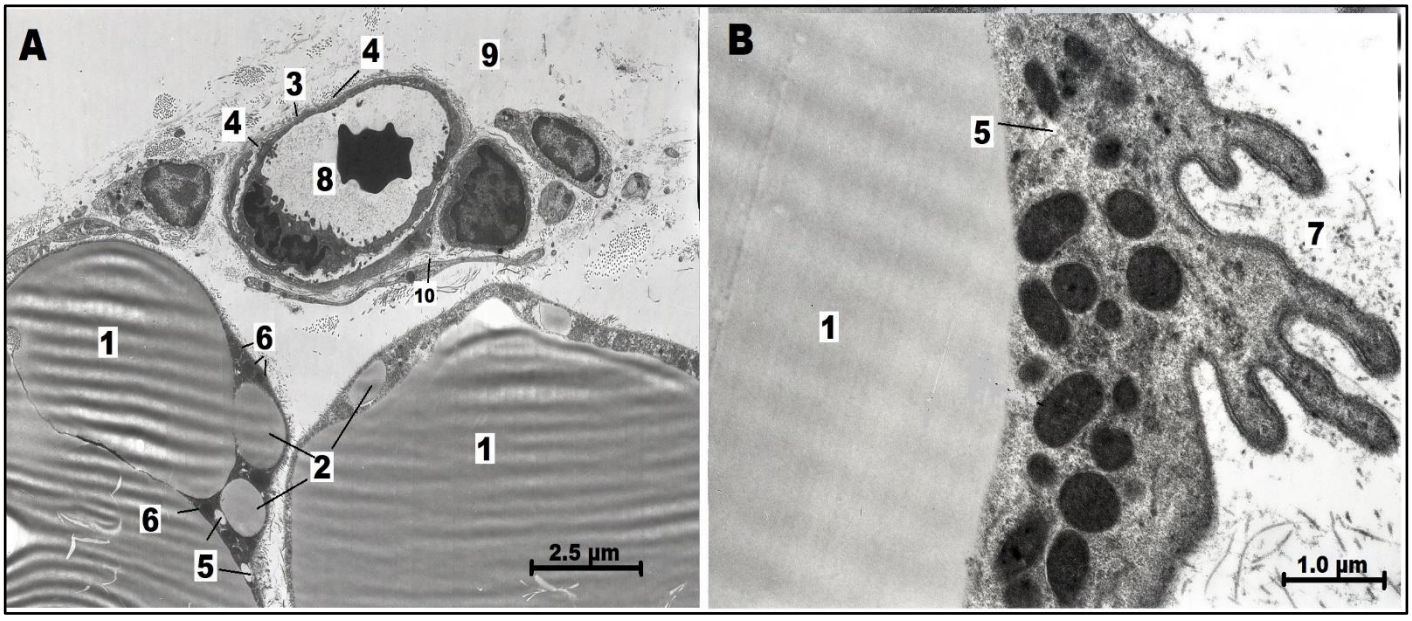

Рис. 3.4 Трансмісійна електронна мікроскопія тканини брижі дорослих щурів, що отримували HFD.

А – Адипоцити з ознаками фрагментації великих ліпідних крапель та дрібними ліпідними краплями у цитоплазмі. Зб.: х 4000; В – фрагмент адипоцита. Зб.: х 10000.

Позначення: 1 – великі краплі жиру; 2 – дрібні ліпідні краплі; 3 –гемокапіляр; 4 – ділянки «оголення» базальної мембрани; 5 – вакуолізована цитоплазма; 6 – мітохондрії круглої форми; 7 – інвагінації плазмалеми; 8 – еритроцит; 9 – сполучна тканина; 10 – субендотеліальний простір.

Вісцеральні капіляри брижі були оточені колагеновими фібрилами, фібробластами та макрофагами. Виявлено на апікальній поверхні ендотеліоцитів гемокапілярів брижі мікроворсинки. У цитоплазмі ендотеліоцитів гемокапілярів наявні мікропіноцитозні пухирці, розширені цистерни ендоплазматичної сітки та присутність поодиноких лізосом. Ядра ендотеліоцитів з ознаками апоптозу. Також наявні ділянки «оголення» базальної мембрани мікрокапілярів та розширений субендотеліальний простір. У центрі гемокапілярів наявні поодинокі еритроцити у просвіті (рис. 3.4 А). Таким чином, отримані візуальні зміни мікроорганізації брижі тварин, які пов’язані зі споживанням високофруктозного харчування, що індукує альтерацію адипоцитів і пошкодження мікросудин, відповідають ознакам ендотеліальної дисфункції та альтерації адипоцитів.

У старих щурів, що отримували впродовж 4-ох тижнів HFD, було виявлено подібні зміни, але більш вираженого характеру ніж у дорослих щурів. Мезентеріальні адипоцити були гіпертрофовані та виявлено фрагментацію великих ліпідних крапель з утворенням великої кількості мікрокрапель у цитоплазмі (рис. 3.5 А). На периферійних ділянках цитоплазми адипоцитів виявлено вакуолізацію та присутністю мітохондрій круглої форми з електронно-щільним матриксом (рис. 3.5 А). Ядра адипоцитів були з невеликою кількістю гетерохроматину, який прилягає до нуклеолеми (рис. 3.5 В). Клітинні ядра ендотеліоцитів фрагментовані, що характерно для апоптозу, спостерігається також ущільнення цитоплазми та десквамація мікроворсинок

ендотеліоцитів. У просвіті гемокапілярів виявлено велику кількість еритроцитів зміненої форми (рис. 3.5 А). Навколо гемокапілярів вісцерального типу у сполучній тканині ідентифікуються розширення міжклітинного простору, що є ознакою набряку (рис. 3.5).

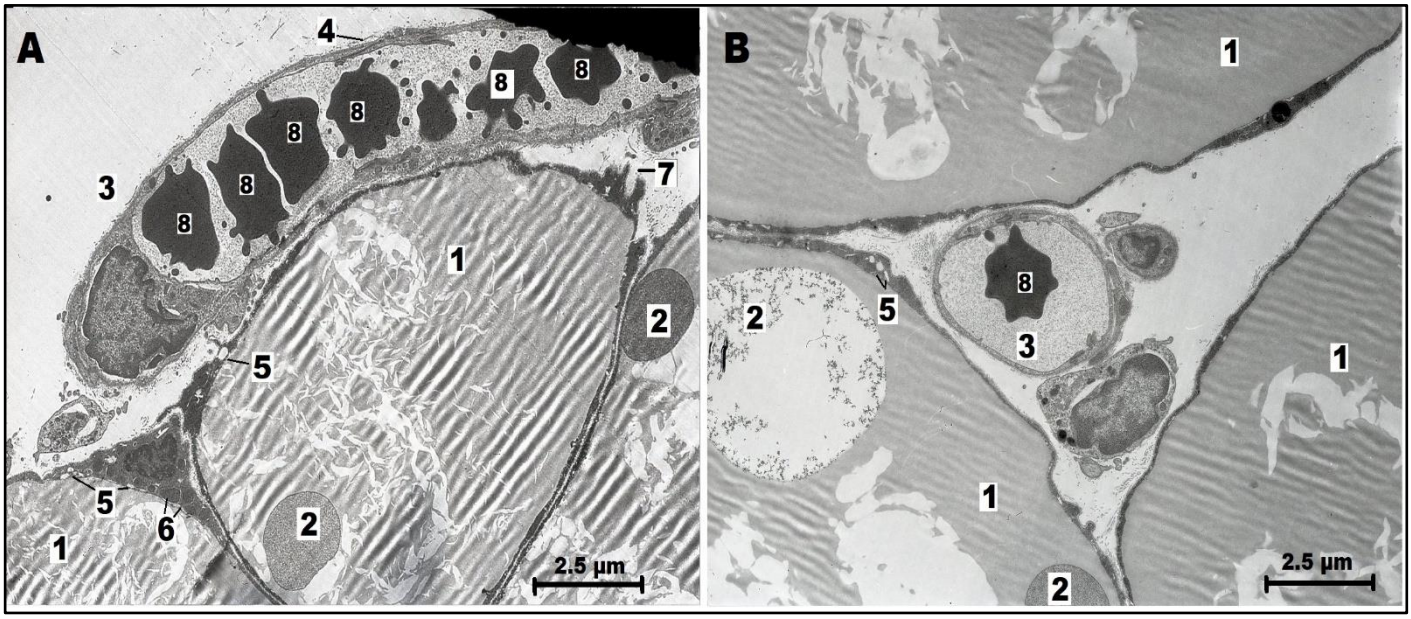

Рис. 3.5. Трансмісійна електронна мікроскопія тканини брижі старих щурів, що отримували HFD. Зб.: х 4000.

Позначення: 1 – великі ліпідні краплі; 2 – дрібні ліпідні краплі; 3 – гемокапіляри; 4 – ділянка «оголеної» базальної мембрани; 5 – вакуолізована цитоплазма; 6 – мітохондрія; 7 – інвагінації плазмалеми адипоцита; 8 – еритроцит;

Відмічено, що 28-миденне надмірне споживання HFD, спричиняє ознаки пошкодження мітохондрій, що можна охарактеризувати, як дегенеративні зміни мезентеріальних адипоцитів. Задокументовано появу дезорганізованих ендотеліоцитів гемокапілярів з ознаками: пошкодження базальної мембрани, розширення субендотеліального шару та пошкодження замикальних контактів між ендотеліоцитами, що можна характеризувати як ендотеліальну дисфункцію.

Таким чином, наші результати щодо вікових відмінностей ультраструктурної морфофункціональної організації брижі за умов споживання надмірної кількості висококалорійного високофруктозного харчування обґрунтовують цитолітичний вплив HFD, як для щурів дорослого, так і старого віку. Отже, ранніми ознаками змін брижі у тварин з HFD є поява гіпертрофованих адипоцитів з ознаками структурних змін мітохондрій. Також характерними змінами були ознаки ендотеліальної дисфункції та дезорганізації сполучної тканини, що можуть за даними літератури стати тригером до порушень енергетичного метаболізму та появи ознак генералізованих окисних пошкоджень організму [90].

3.3 Вікові особливості морфо-функціональних адаптаційних змін брижі щурів за умов високофруктозної дієти у поєднанні з індукцію стресу

Для дослідженя вікових відмінностей морфо-функціональних змін і адаптативних реакцій брижі дорослим і старим тваринам індукували гострий стрес за методом Takagi [219]. Мезентеріальні адипоцити у дорослих щурів, які перебували 28-миденній HFD та піддавались впливу гострого стресу (WIRS), мали ознаки дефрагментації великих ліпідних крапель, причому деякі краплі виділялися назовні з клітин (рис. 3.6). Також були виявлені ушкоджені гемокапіляри з ознаками руйнування ендотелію, з ділянками «оголеної» базальної мембрани та набряком простору між ендотелієм та прилеглою базальною мембраною. На апікальній поверхні ендотеліоцитів присутні мікроворсинки з ознаками десквамації, у їхній цитоплазмі ідентифікуються розширені цистерни ендоплазматичної сітки та поодинокі лізосоми, ядра ендотеліоцитів з ознаками апоптозу (рис. 3.6 А). У просвіті гемокапіляра присутній еритроцит. До базальної мембрани ззовні прилягають перицити з вакуолізованою цитоплазмою (рис. 3.6 А). Трансформовані адипоцити брижі щурів з цієї групи мали ознаки «slimming» (від англ. «slimming» - похудіти),

інвагінацію плазмолеми, зменшення об’єму ліпідної краплі та присутністю у цитоплазмі великої кількості лізосом (рис. 3.6 В)

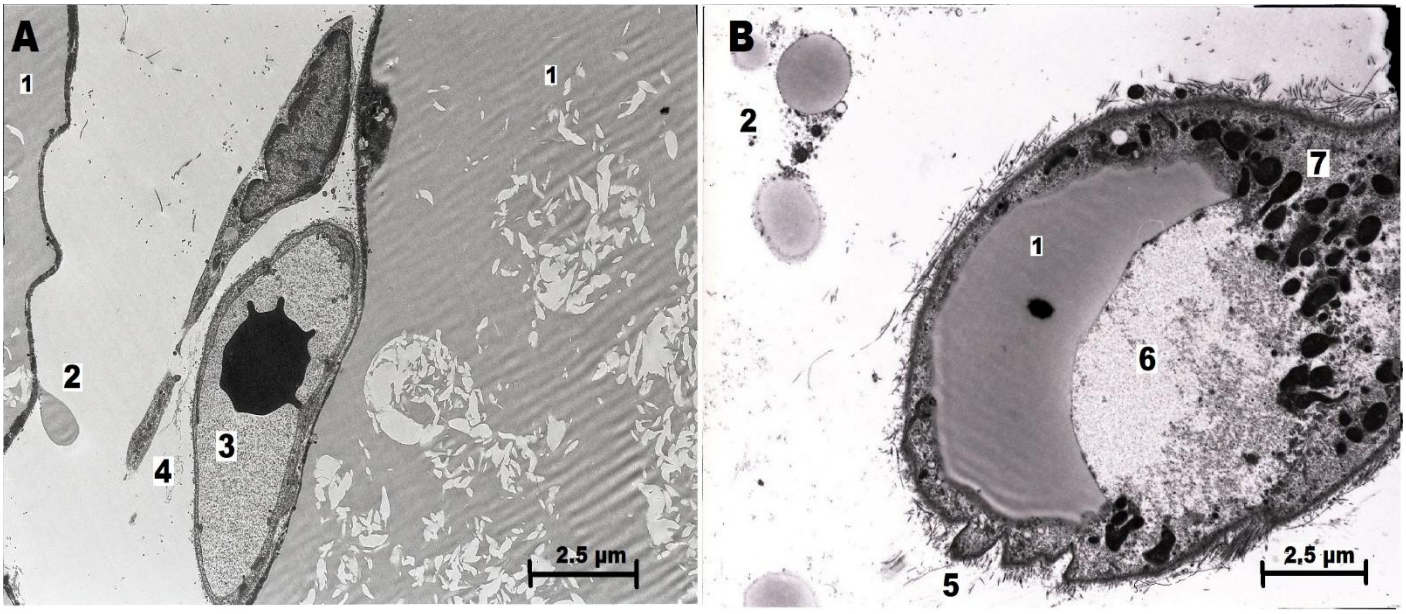

Рис. 3.6 Трансмісійна електронна мікроскопія тканини брижі дорослих щурів, які отримували HFD та за умов індукції гострого стресу (WIRS). Зб.: х 4000.

А – Фрагмент мезентеріального адипоцита з ознаками дефрагментації жиру.

В – Фрагмент адипоцита з ознакою інвагінації плазмалеми

Позначення: 1 – великі краплі жиру; 2 – виділення крапель жиру назовні; 3 – пошкоджений гемокапіляр; 4 – набряк між ендотелієм та базальною мембраною; 5 – інвагінації плазмалеми; 6 – цитоплазма; 7 – мітохондрій.

Зміни виявлені під час дослідження мезентеріальних адипоцитів старих щурів, які отримували HFD та в подальшому піддавались індукції гострого стресу зображені на рис. 3.7. Мезентеріальні адипоцити старих щурів, мали ознаки фрагментації великих ліпідних крапель, з великою кількістю дрібних ліпідних крапель та присутністю мітохондрій різної форми у периферійній ділянці цитоплазми (рис. 3.7 А). Також у периферійних ділянках цитоплазми адипоцитів поряд з дефектними мітохондріями, виявлено фаголізосоми насичені ліпідними крапельками. Колагенові волокна були дезорганізовані з

ознаками дефрагментації. Спостерігались зміни в мікроархітектурі клітин ендотеліальних капілярів, наявність мікроворсинок, пошкоджену з елементами «оголення» базальну мембрану. Верифіковані ознаки руйнування щільних міжклітинних контактів між ендотеліоцитами (рис. 3.7 В). Виявлення ознак набряку у субмембранному просторі гемокапілярів та наявні у просвіті дефектні еритроцити (рис. 3.7 В).

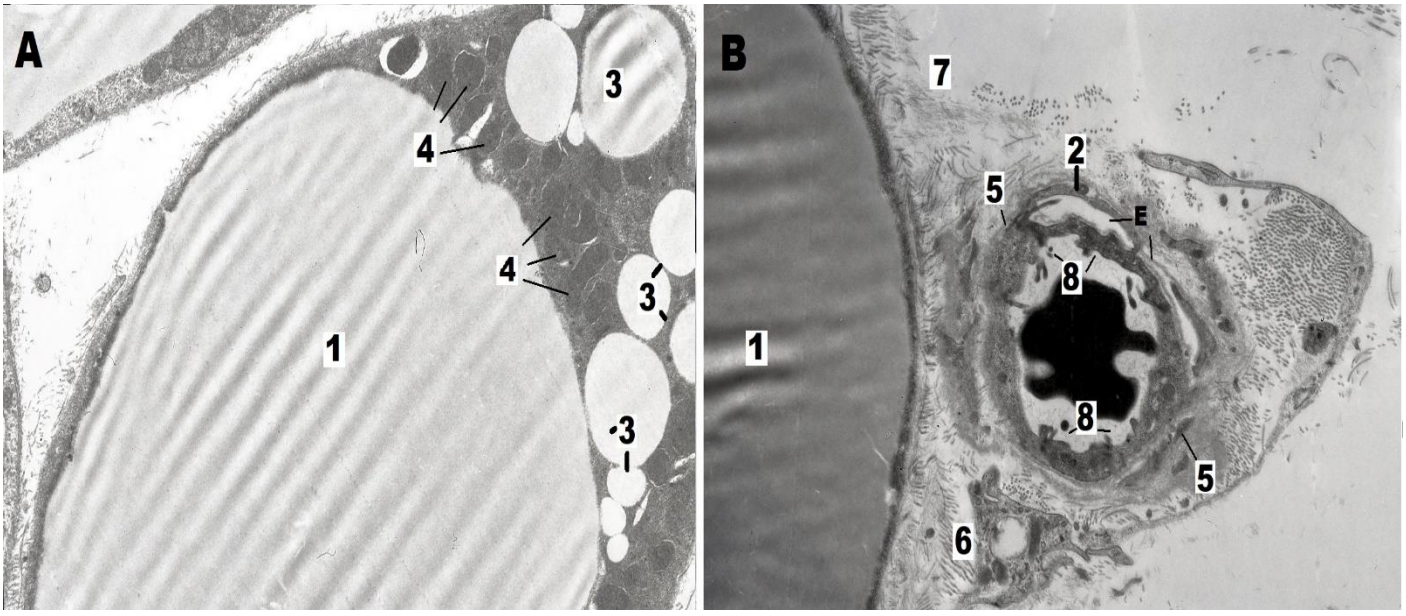

Рис. 3.7 Трансмісійна електронна мікроскопія тканини брижі старих щурів, що отримували HFD та піддавались індукції гострого стресу. Зб.: х 4000.

Позначення: 1 – адипоцит з ознаками фрагментації великих ліпідних крапель; 2 – ендотеліоцити гемокапілярів; 3 – дрібні ліпідні краплі; 4 – мітохондрії різної форми; 5 – ділянки пошкодження та руйнування базальної мембрани; 6 – набряк інтерстиційного простору; 7 – дезорганізовані колагенові волокна; 8 – мікроворсинки; Е – набряк навколокапілярного простору.

Таким чином, дані результати свідчать про те, що індукція гострого стресу в умовах HFD у щурів старого віку впливає на мезентеріальні адипоцити у більшій мірі порівняно до дорослих щурів. Характерними ознаками таких змін були: фрагментація великих ліпідних крапель,

пошкоджені мітохондрії у адипоцитів та ендотеліальна дисфункція мікросудин і дезорганізація структур сполучної тканини у старих щурів.

3.4 Зміни резистентності адипоцитів та компонентів сполучної тканини брижі за умов модуляції активності циклооксигенази у щурів з HFD

Зміни у мезентеріальній тканині дорослих щурів, що отримували 28-миденну високофруктозну дієту та піддавались впливу гострого стресу та екзогенного введення впродовж 9-ти днів: аспірину (ASA); поєднання ASA та NaHS; або гібридного H_2S-аспірину (ATB-340) показані на рис. 3.8. Характерними ознаками структурних змін клітинних компонентів брижі після застосування 9-тиденного блокування активності циклооксигенази за допомогою аспірину, були пошкодження ендотеліоцитів гемокапілярів, які мали ознаки дезорганізації з вираженим субендотеліальним набряком та ділянками «оголення» базальної мембрани. Фібробласти у сполучній тканині зберігали звичну форму та розмір клітин (рис.3.8 А). Виявлено, що у МА була вакуолізована цитоплазма навколо ліпідної краплі, цитоплазматичний набряк, гіпертрофовані мітохондрії з ущільненим матриксом. Також у цитоплазмі МА були присутні мітохондрії з ознаками розпаду та саморуйнування (рис. 3.8 В). У щурів, яких годували HFD та отримували впродовж 9-ти днів поєднання NaHS та ASA, ознаки дисфункції ендотелію судин брижі були менш вираженими, а навколо мезентеріальних адипоцитів овальної форми, візуалізувалися фібрили колагену без ознак пошкодження (рис. 3.8 С). Введення групі тварин H_2S-ASA (ATB-340) характеризувалось зменшенням ознак пошкодження мітохондрій МА, що вказує на мітохондріальну протекторну дію. Ядро адипоцитів мало невелику кількість гетерохроматину і було оточене інтактною нуклеолемою. Отже, отримані результати дозволяють стверджувати, що попереднє введення комбінації NaHS та аспірину виявляє цитопротекторну дію на МА. У цій групі тварин електронномікроскопічні дослідження продемонстрували, що МА зберігають свою форму та нормальні

розміри, незважаючи на наявність декількох дрібних крапель жиру на периферії цитоплазми (рис. 3.8, C). Також 9-тиденне введення H_2S-ASA (ATB-340) спричиняло мітохондріальний протекторний вплив, оскільки мітохондрії були звичної форми (рис. 3.8 D).

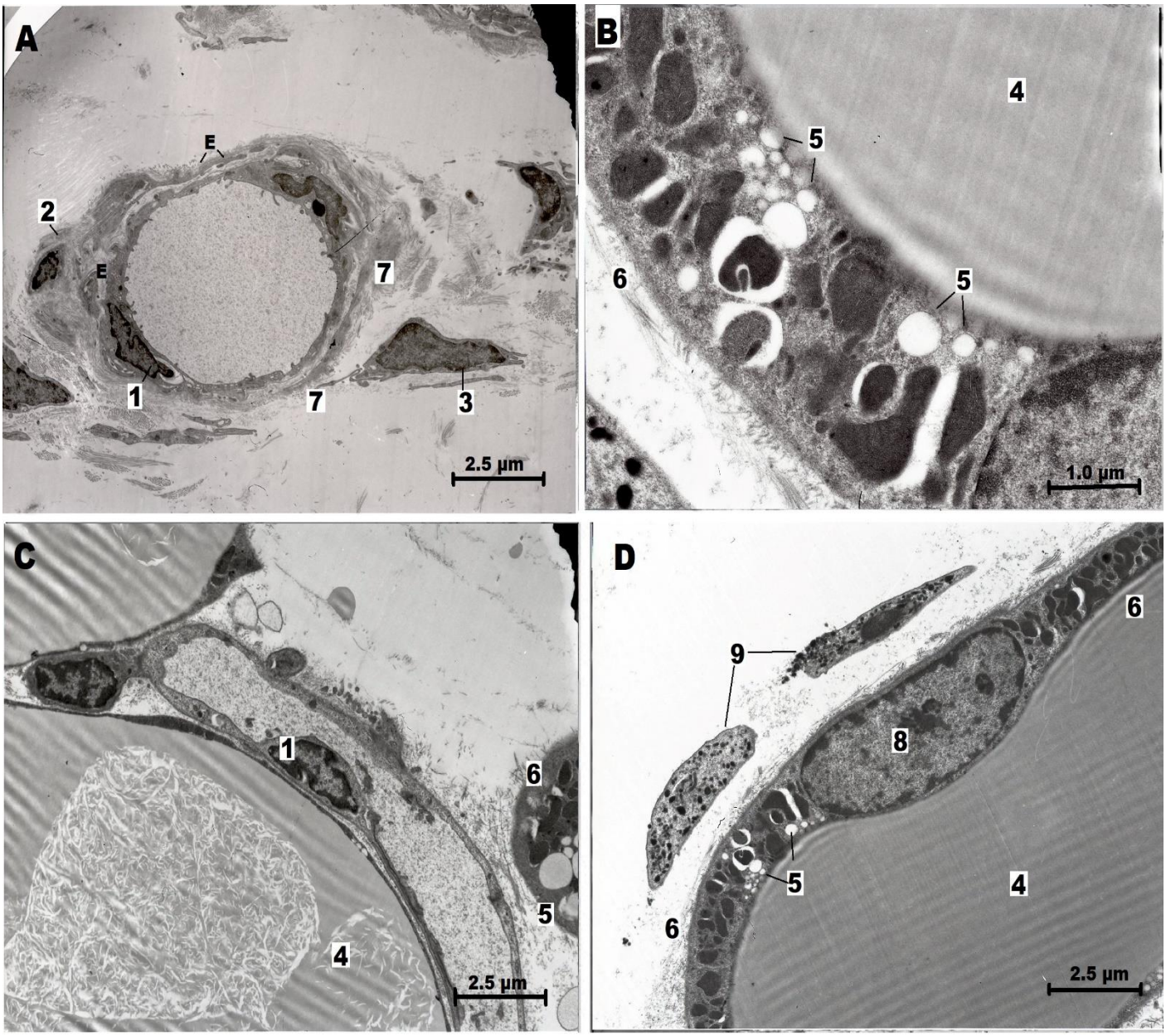

Рис. 3.8 Трансмісійна електронна мікроскопія мезентеріальних клітин дорослих щурів, які перебували HFD і зазнали дії гострого стресу та 9-тиденного блокування циклооксигенази аспірином (A, B); отримання 9-тиденного поєднаного впливу аспірину та NaHS (C); 9 денного отримували H_2S-ASA (ATB-340) (D). Зб.: A,C,D – x 4000; B – x 10000

Позначення: 1 – ендотеліоцит; 2 – перицит; 3 – фібробласт; 4 – велика крапля жиру в адипоциті; 5 – дрібні ліпідні краплі; 6 – мітохондрії; 7 – «оголення» базальної мембрани; 8 – клітинне ядро з гетерохроматином; 9 – тучні клітини

Ультраструктурні зміни старих щурів, які отримували HFD та яким індукували гострий стрес зображено на рис. 3.9. У старих тварин, що додатково отримували 9-тиденне введення аспірину, гіпертрофовані МА мали ознаки дегенерації, яка візуалізувалась великою кількістю дрібних ліпідних крапель по периферії цитоплазми клітини (рис. 3.9 А).

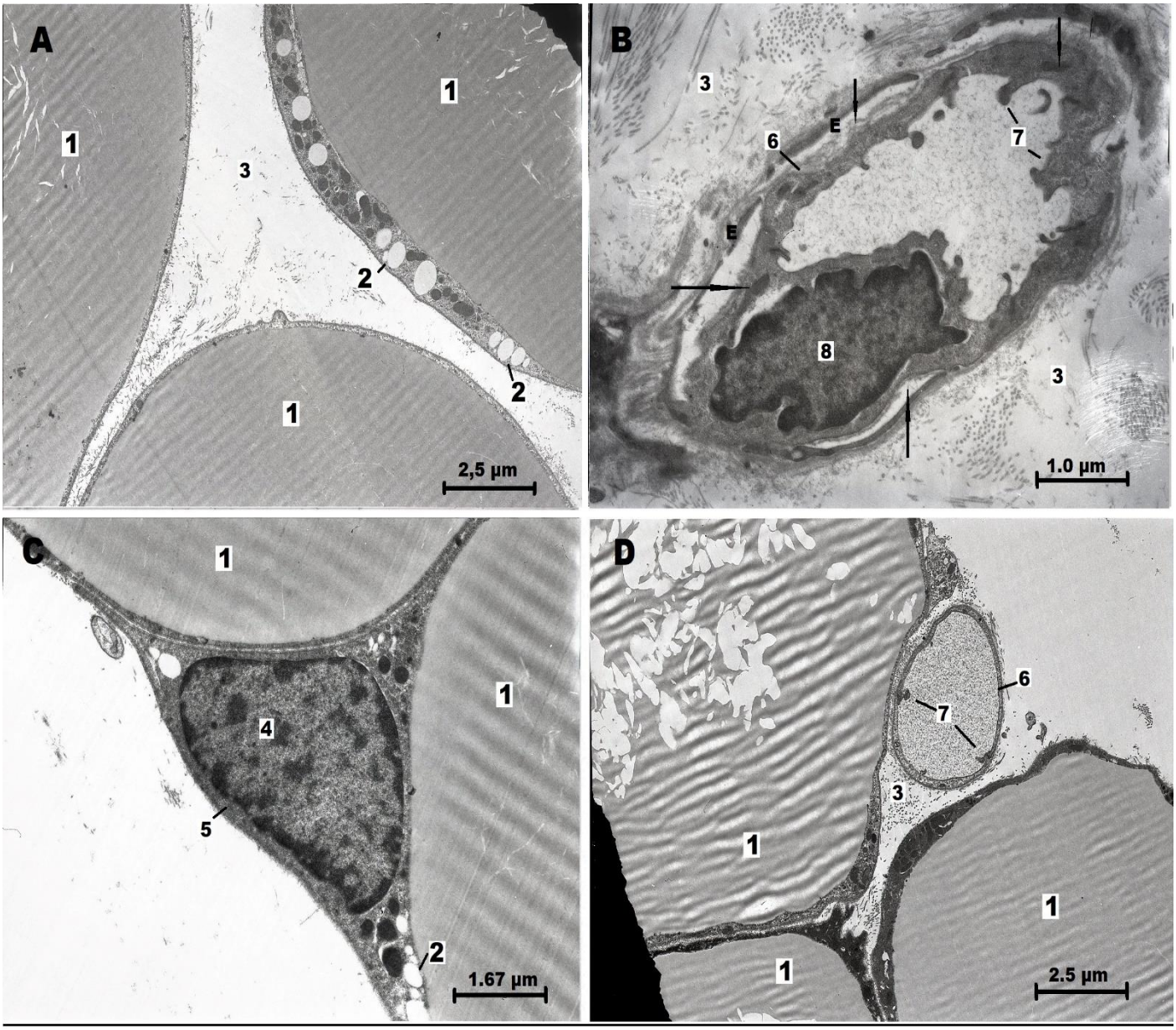

Рис. 3.9 Адипоцити у мезентеріальній сполучній тканині старих щурів, які отримували HFD та індукції гострого стресу та отримували: 9-тиденне

введення аспірину (A, B); 9-тиденний поєднаний вплив аспірину та NaHS (C); 9-тиденне введення АТВ-340 (D). Електронна мікрофотографія. Зб.: A,D x 4000; B x 10000; C x 6000

A, Фрагмент з трьома типовими МА з ознаками фрагментації великих ліпідних крапель з утворенням декількох дрібних ліпідних крапель та дефективними мітохондріями у цитоплазмі. B, Гемокапіляр з пошкодженою базальною мембраною з нечіткими контурами, ендотеліоцити зі збільшеним ядром, колагенові волокна в периваскулярному просторі. C, Добре збережений фібробласт між двома моновакуолярними МА з інтерналізацією ліпідної краплі з дегенеруючих адипоцитів. D, Збережений гемокапіляр між трьома білими моновакуолярними адипоцитами з поодинокими дрібними ліпідними краплями.

Позначення: 1 – адипоцит; 2 – інтерналізована ліпідна крапля; 3 – сполучна тканина; 4 – ядро фібробласта; 5 – фібробласт; 6 – гемокапіляр; 7 – мікроворсинки; 8 – ядро ендотеліоцита.

Дослідження адаптивних змін мікрокапілярів брижі виявило міжстромальний набряк та ендотеліоцити, що мали пошкоджені міжклітинні контакти, дефектну базальну мембрану з ділянками «оголення» (позначено стрілками) (рис. 3.9 B). Дія поєднаного впливу аспірину з NaHS, як донора H_2S, мала цитопротекторний вплив на ендотеліоцити гемокапілярів, тоді як мезентеріальні адипоцити мали одну велику ліпідну краплю розташовано центрально та значну кількість дрібних ліпідних крапель на периферії клітини (рис. 3.9 C). У групах старих тварин, які отримували АТВ-340 видно добре збережені фібробласти, які розташовані у основній речовині сполучної тканини між МА і мають ознаки інтерналізації вільного жиру. Задокументували адипоцити з ознаками дегенерації та добре збережений капіляр, що знаходиться між адипоцитами (рис. 3.9 D).

Отже, отримані результати дозволяють окреслити вікові відмінності, а також структурно-функціональний цитолітичний вплив 28-миденного

високофруктозного харчування на брижу дорослих та старих тварин, що проявляється гіпертрофічними та дегенеративними змінами адипоцитів, ознаками ендотеліальної дисфункції та пошкодженням мітохондрій.

3.5 Вплив гідроген сульфідної модуляції на структурно-функціональну організацію брижі у старих щурів за умов HFD у поєднанні з індукцією стресу

Для оцінки впливу H_2S на адаптивні зміни брижі старих щурів, які отримували 28-миденне високофруктозне харчування у поєднанні з індукцією гострого стресу, було проведено 9-тиденне введення препарату NaHS, як екзогенного донора H_2S, та порівняння його дії на старих тваринах без індукції гострого стресу. Електромікроскопічні дані змін брижі у старих щурів, продемонстровано на рис. 3.10 та 3.11.

У групі старих тварин, які отримували 28-миденну HFD без індукції гострого стресу, введення екзогенного донора синтезу H_2S – препарату NaHS показало, що адипоцити мали менше ознак фрагментації великих ліпідних крапель та меншу кількість дрібних ліпідних крапель у цитоплазмі адипоцитів. Також була продемонстрована тенденцію до зменшення кількості пошкоджених мітохондрій у цитоплазмі МА (рис. 3.10 А). Введення NaHS продемонструвало цитопротекторну дію на гемокапіляри, виявлено добре збережені ендотеліоцити з меншими пошкодженнями базальні мембрани, та меншу кількість зруйнованих еритроцит у просвіті гемокапіляра (рис. 3.10 В).

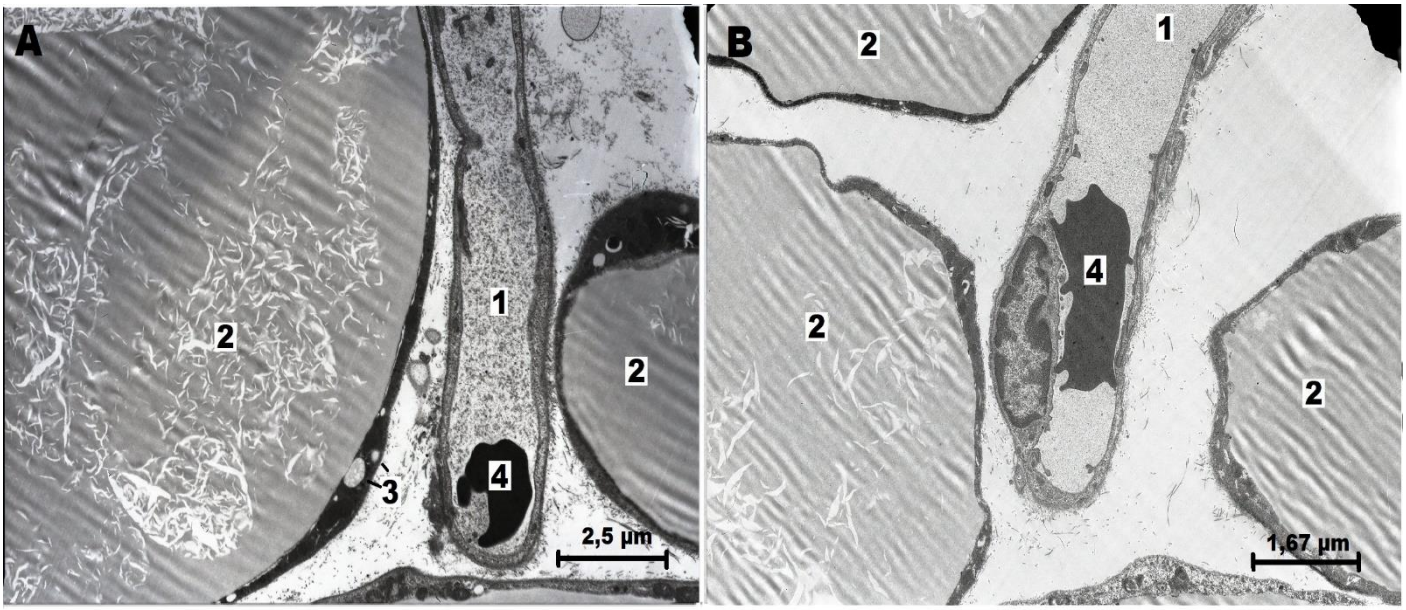

Рис. 3.10 Трансмісійна електронна мікроскопія тканин брижі старих щурів на HFD та отримували NaHS.

А, Добре збережений гемокапіляр між трьома білими адипоцитами зі збереженими великими ліпідними краплями Зб.: х 4000.

В, Збережені ендотеліоцити з деструктивним еритроцитом у просвіті, що прилип до апікальної поверхні ендотеліоцитів, які оточені адипоцитами без ознак фрагментації великих ліпідних крапель Зб.: х 6000.

Позначення: 1 – гемокапіляр; 2 – адипоцити без ознак фрагментації великих ліпідних крапель; 3 – поодинокі ліпідні краплі; 4 – еритроцит.

Після введення NaHS групі старих щурів, які отримували HFD у поєднанні з індукції гострого стресу, також виявлено позитивні зміни у організації клітин під час ультраскопічного дослідження. А саме у брижі виявлено збільшені моновакуолярні адипоцити, що містили на периферії невелику кількості дрібних ліпідних крапель (рис. 3.11 А). У міжклітинному просторі наявні вільні ліпідні краплі та добре збережені гемокапіляри, без ознак пошкодження ендотеліоцитів, які були з оптимально розвиненим ядром та ядерцем, що може свідчити про цитопротекторний вплив H_2S мезентеріальні клітини (рис. 3.11 В).

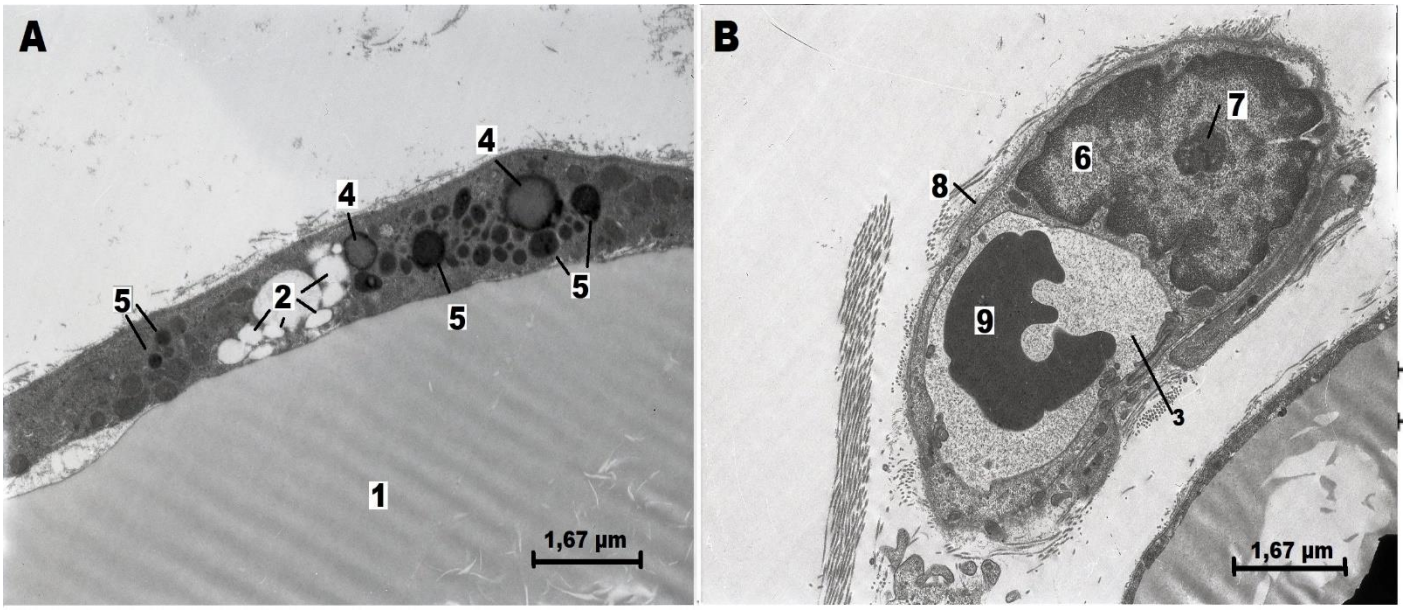

Рис. 3.11 Трансмісійна електронна мікроскопія тканин брижі старих щурів, які отримували поєднаний вплив HFD і стресу та вводили препарат NaHS. Позначення: А, Адипоцит (1) з ознаками фрагментації великої ліпідної краплі, наявністю дрібних ліпідних крапель (2) у цитоплазмі, фаголізосомами заповненими ліпідами (4) та присутністю мітохондрій круглої форми (5). Зб.: х 4000,

В, Ендотеліоцит з оптимально розвиненим ядром (6) і ядерцем (7), а також потовщеною та набряклою базальною мембраною (8) зі зміненими еритроцитами (9) у просвіті гемокапіляра. Зб.: х 6000.

Таким чином, дані нашого дослідження показали, що зміни брижі у старих щурів на тлі HFD, а саме зміни мезентеріальних адипоцитів, їх мітохондрій, та зміни у сполучній тканині є оборотними під впливом донора H_2S – NaHS. Було продемонстровано ангіопротекторну дію H_2S на стан мезентеріальних ендотеліоцитів, що підтверджує широке коло дії донорів H_2S на судинний компонент брижі та спричиняє покращення трофічних і регенераторних процесів.

Висновки до розділу 3

1. Проведені морфо-функціональні дослідження брижі показали, що існують вікові відмінності в ультраструктурній організації брижі старих щурів

порівняно до дорослих тварин, які проявилися дегенеративними змінами адипоцитів, появою фрагментованих ліпідних крапель у їх цитоплазмі, наявністю дефектних мітохондрій різної форми, частина з них мала ознаки перехресної взаємодії між собою.

2. Отримування 28-миденного високофруктозного харчування показало його цитотоксичний вплив на брижу дорослих і старих щурів, прояви якого у старих тварин мали більш виражений характер. Ранніми ознаками змін брижі були – гіпертрофовані та дегенеративно змінені адипоцити з ознаками структурних змін мітохондрій, ендотеліальна дисфункція та дезорганізація сполучної тканини. Дані гістологічні та морфо-функціональні зміни у подальшому можуть опосередковано свідчити про можливі порушення енергетичного метаболізму та окисних пошкоджень.

3. Індукція гострого стресу показує відмінності у адаптивних реакцій брижі у віковому аспекті. Виявлено підвищення чутливості брижі до цитоагресивного впливу в умовах високофруктозного харчування у більшій мірі у старих щурів у порівнянні з дорослими тваринами.

4. Дані нашого дослідження показали, що зміни брижі у старих щурів на тлі HFD, а саме зміни мезентеріальних адипоцитів, їх мітохондрій, та зміни у мезентеріальній сполучній тканині є оборотними під впливом екзогенного донора H_2S – NaHS, що підтверджує цитопротекторну дію ендогенного H_2S та його екзогенних донорів.

5. Отримані результати дають можливість краще зрозуміти механізм формування вікових змін резистентності тканин брижі та значення синтезу ендогенного гідроген сульфіду у протидії пошкоджувальним чинникам, що лежать в основі мезентеріальної патології, виробити у майбутньому оптимальні засади профілактики та лікування.

Результати власних досліджень розділу 3 викладені у 5 статтях [4, 182, 183, 185, 186], апробовані на наукових форумах [38, 252, 253] та впроваджені

у наукову роботу та навчальний процес у викладання дисципліни «Фізіологія» у вищих медичних закладах України (додаток).

1. Ревенко ОВ, Заячківська ОС, Вікові морфо-функціональні зміни структур брижі за умов стрес-індукованих пошкоджень і дії гідроген сульфіду. Клінічна та експериментальна патологія. 2018.Т.17,№3(65),ч.2. С. 104-108. *(Дисертант провів фрагмент експериментальних досліджень за умов поєднаного впливу високофруктозного харчування та стресу та здійснив аналіз отриманих результатів, їх статистичну обробку, підготовку статті до друку).* [4]
2. Revenko O, Zaichko N, Wallace J, Zayachkivska O. Hydrogen sulfide system attenuates injury by hyperglycemia and stress: The role of mesenteric adipocytes in ages animals. Праці НТШ Медичні науки. 2018, Т. 54, № 2. С. 115-124. *(Дисертант провів фрагмент експериментальних досліджень та здійснив аналіз і узагальнення отриманих результатів, їх статистичну обробку, підготував статтю до друку).* [186]
3. Revenko O, Zaichko N, Wallace J, Zayachkivska O. Targening hydrogen sulfide system treatment for mesenterial adiposity in rats submitted to fructose consumption. Фізіологічний журнал, 2019, Т. 65, № 3, С. 118-119. *(Підготував матеріал для стендової доповіді, тезу до друку).* [187]
4. Zayachkivska O, Pavlovskiy Y, Revenko O, Yashchenko A. Physiological Basis For Novel Drug Hydrogen Sulfide-Related Therapy Used To Treat Oxidative Stress In The Model Of Fructose-Induced Injury. The FASEB Journal. 2019 Apr;33(1):lb67-. *(Підготував тезу до друку).* [252]
5. Revenko O, Zaichko N, Wallace J, Zayachkivska O. Exogenous hydrogen sulfide for the treatment of mesenteric damage associated with fructose-induced malfunctions via inhibition of oxidative stress. Ukr.Biochem.J. 2020; Volume 92, Issue 2, Mar-Apr, pp. 86-97. *(Дисертант провів фрагмент експериментальних досліджень та здійснив аналіз отриманих результатів*

за умов поєднаного впливу високовуглеводного харчування та стресу, їх узагальнення та статистичну обробку, підготовку статті до друку). [185]

6. Ревенко О, Заячківська О. Відмінності функціонування мітохондрій жирової тканини брижі за умов надмірного споживання фруктози та екзогенного введення донорів сірководню. XVIII Конгрес СФУЛТ. Львів, 1-3 жовтня 2020. Матеріали міжнародного наукового конгресу, тези доп. Львів-Київ-Чикаго, 2020. С. 192-193 *(Підготував тезу до друку).* [3]
7. Revenko O, Kovalyshyn V, Yashchenko A, Wallace J, Zayachkivska O. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug ATB-340 treatment potentially reduces mesenteric metaflammation in the experimental age-and high fructose dietary-induced injury. Proceeding of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences. 2021 Jun 13;64(1). *(Дисертант провів фрагмент експериментальних досліджень та здійснив аналіз отриманих результатів, узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку статті до друку)*. [182]
8. Revenko O, Pavlovskiy Y, Savytska M, Yashchenko A, Kovalyshyn V, Chelpanova I, Varyvoda O, Zayachkivska O. Hydrogen sulfide prevents mesenteric adipose tissue damage, endothelial dysfunction, and redox imbalance from high fructose diet-induced injury in aged rats. Frontiers in Pharmacology. 2021 Aug 30;12:693100. (*Дисертант провів фрагмент експериментального дослідження, підготовку статті до друку)* [183]

РОЗДІЛ 4
ВІКОВІ ВІДМІННОСТІ ІНТЕНСИВНОСТІ ПЕРОКСИДАЦІЇ ЛІПІДІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ТА АКТИВНОСТІ ЕНЗИМІВ СИНТЕЗУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ БРИЖІ ЗА УМОВ ВИСОКОФРУКТОЗНОЇ ДІЄТИ, ІНДУКЦІЇ СТРЕСУ, ЗАСТОСУВАННЯ АСПІРИНУ ТА ДОНОРІВ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ

Маса дорослих щурів на початок дослідження становила 198±20 г, старих щурів 256±28 г, встановлено вікові зміни маси тіла у старих щурів – збільшення на 29% порівняно до дорослих тварин ($p < 0,05$). У дорослих і старих щурів, які перебували на SD упродовж чотирьохтижневого експерименту, істотних змін маси тіла не виявлено. У дорослих щурів, які отримували HFD, відбулось збільшення маси тіла на 69% ($p < 0,05$) до 342±31 г. У старих щурів перебування на 28-миденній високофруктозній дієті, показало збільшення маси тіла на 80% до 457±47 г. У групах тварин, яким вводили донори синтезу H_2S істотних змін маси тіла не виявлено.

Дорослим і старим щурам проводили вимірювання глікемії натще у 1-й та 28-й день екперименту. Рівень глюкози у тварин з SD на перший день у дорослих щурів склав 6,3±0,2 ммоль/л, у старих – 6,5±0,3 ммоль/л. Перебування щурів на стандартній дієті без і з введенням сполук, що збільшують вміст ендогенного H_2S не показало істотних змін значень глікемії. У щурів, яких годували HFD упродовж 28-ми днів, спостерігалося підвищення глікемії натще: до 7,9±0,7 ммоль/л – у дорослих щурів та до 8,4±0,7 ммоль/л – у старих щурів ($p < 0,05$ vs SD). Статистично вірогідної різниці у змінах рівня глюкози у групах тварин з HFD і тим, яким вводили донори H_2S не виявлено.

Висококалорійна високовуглеводна дієта з надлишковим вмістом фруктози та старіння є ключовими факторами для поступових змін фізіологічних властивостей різних функціональних систем і процесів, у тому числі пов’язаних з енергетичним метаболізмом, цитопротекцією, станом редокс систем. Відомо, що ендогенний сірководень та його сигнальні шляхи

сприятливо впливають на забезпечення цитопротекції, енергетичних і метаболічних реакцій та окисно-відновну рівновагу через множинні ефекти на міжклітинні та внутрішньоклітинні процеси [238]. Проте, вплив вікових відмінностей активності H_2S-пов'язаних ензимів на стан брижі та її компонентів – судин, сполучної та жирової тканин за умов SD і HFD залишається невивченим, хоча такі дослідження можуть стати науково-обґрунтованою основою для розробки ефективної профілактики змін, спричинених старінням, і фізіологічно обґрунтованої терапевтичної стратегії ранніх порушень, спричинених гіперглікемією, застосуванням нестероїдних протизапальних препаратів і опрацювання нових сполук для покращення функціональної активності брижі.

Харчування високофруктозною дієтою (HFD), що спричиняє тривалу постпрандіальну гіперглікемію є передумовою розвитку преметаболічного синдрому та характеризується підвищеним вмістом метилгліоксалю та має виразну цитолітичну дію [38, 156, 249, 252]. Фруктоза є одним з моносахаридів поряд з глюкозою і галактозою. У наш час фруктоза широко використовується харчовій промисловості, як підсилювач смаку. У організмі відсутня пряма біологічна потреба у харчовій фруктозі, з фізіологічної точки зору фруктоза використовується як проміжний продукт у метаболізмі глюкози. Концентрація вільної циркулюючої фруктози у крові становить (~ 0,01 ммоль/л) і це дуже низький показник у порівнянні з глюкозою (~ 5,5 ммоль/л) [223].

Відомо, що визначення вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів у наслідок дії реактивних форм кисню та вільних радикалів, може використовуватися для оцінки окисних пошкоджень тканин шляхом вимірювання вмісту реактивних речовин тіобарбітурової кислоти (TBARS) [107, 150]. Слід відмітити, що гіперглікемія постпрандіального ґенезу, як наслідок HFD, своєрідний метаболічний стрес, що спричиняє зміни в електронно-транспортному ланцюгу у мітохондріях і в енергетичному обміні, активування шляху сорбітолу, сприяє гіпоксія-індукованим пошкодження

тканин, що можуть супроводжуватись епізодами ішемії та реперфузії, призводять до збільшення вироблення вільних радикалів та ослаблення антиокисної системи [31, 51, 130, 139]. Останнім часом з'являється більше даних проте, що розвиток окисного стресу супроводжується зменшенням антиокисного захисту [13, 176, 195, 248].

Саме тому, завданням даного етапу нашої роботи було дослідити вікові відмінності стрес- та HFD- індукованих змін брижі за вмістом TBARS у сироватці крові та активністю ензимів, що беруть участь у синтезі H_2S, а саме цистатіонін γ-ліази, цистатіонін β-синтази, тіосульфат-дитиолсульфур-трансферази та сульфітоксидази у гомогенаті тканин брижі у дорослих та старих щурів. Також з'ясувати вплив на них гідросульфіду натрію (NaHS), який вважається донором H_2S, порівняти дію класичного аспірину, поєднання NaHS з аспірином і H_2S-аспірину, що виявляє збільшення ендогенного вмісту H_2S.

Для цього дослідження залучали дорослих та старих самців щурів, що отримували стандартну дієту або 28-миденну високофруктозну дієту, та з 20-го дня екзогенне введення NaHS (5,6 мг/кг/добу протягом 9-ти днів, в/о) у порівняні з плацебо, в якості застосування фізіологічного розчину. На 28-й день частині тварин індукували гострий водно-іммобілізаційний стрес для вивчення адаптивних змін шляхом порівняння вмісту реакційноздатних речовин тіобарбітурової кислоти (TBARS) у сироватці крові та активності ензимів, залучених у синтезі H_2S.

4.1 Вікові відмінності вмісту реактивних речовин тіобарбітурової кислоти у сироватці крові щурів за умов стандартної дієти чи високофруктозного харчування, введення NaHS та індукції стресу.

У групах дорослих і старих щурів, які отримували харчування стандартною дієтою, яких ми вважати групами контролю для відповідних вікових груп, вміст TBARS у плазмі крові становив 3,11±0,14 нмоль/л у

дорослих щурів, тоді як у старих – 4,52±0,25 нмоль/л. Ми виявили збільшення вмісту TBARS у старих щурів на 45%, у порівнянні з дорослими тваринами ($p < 0,001$ vs дорослі на SD) (рис. 4.1). Отримані дані вказують на збільшення вмісту TBARS, як наслідок інтенсифікації процесів окисних реакцій, що збільшують утворення кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів у похилому віці.

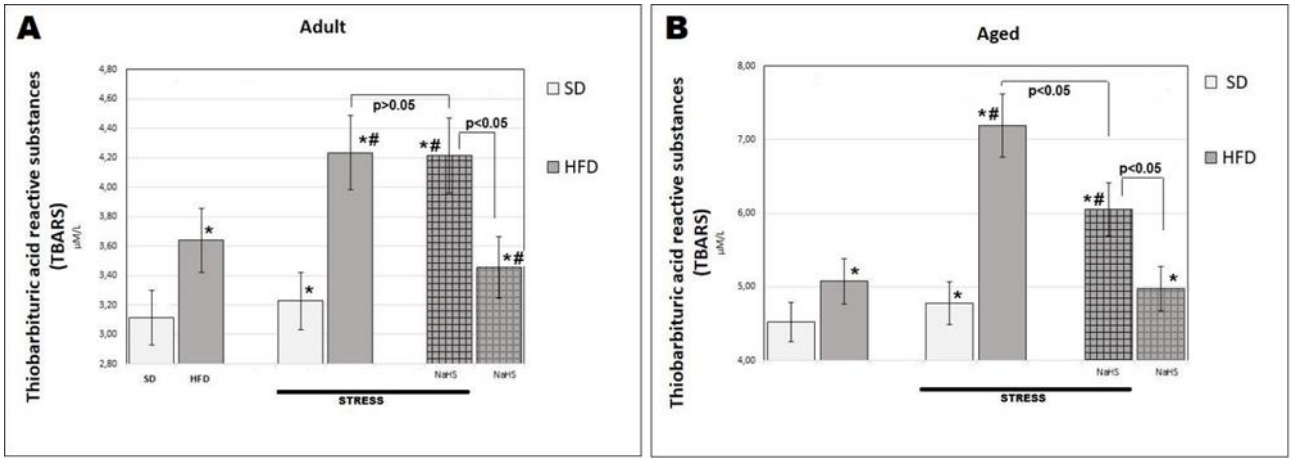

Рис. 4.1 Порівняльні зміни вмісту реактивних речовин тіобарбітурової кислоти (TBARS) у дорослих (A) та старих щурів (B), які перебували впродовж 28-ми днів на стандартній дієті (SD) або високофруктозній дієті (HFD) та отримували введення плацебо, натрій гідросульфід (NaHS) за і без умов застосування гострого стресу (n = 6);

* $p<0,05$ vs SD; # $p<0,05$ vs HFD.

У тварин, які впродовж 28-ми днів, отримували дієту з високим вмістом фруктози (HFD) вміст TBARS був наступним: у дорослих щурів 3,64±0,3 нмоль/л, що становить – 17% збільшення показників до аналогічної вікової групи на SD ($p < 0,05$). У старих щурів відповідно збільшення до 5,08±0,17 нмоль/л, що на 12% більше порівняно до аналогічної групи тварин на SD ($p < 0,05$). Значне підвищення вмісту TBARS за умов HFD можна пояснити тим, що тривале 4-х тижневе споживання висококалорійного високовуглеводного харчування буде спричиняти ознаки окислювального стресу, що у свою чергу буде призводити до порушення окисно-відновлювальних процесів. За даними досліджень інших авторів, які вказують, що вироблення вільних радикалів є

прямим результатом гіперглікемії та показують статистично доказовий зв'язок між вісцеральним ожирінням та збільшеним вмістом TBARS [21, 96, 150, 152]. Підвищення вмісту TBARS у крові буде ознакою проявів окисних пошкоджень в тканинах [14, 193, 196].

Для дослідження адаптивних властивостей бриж було застосовувана індукція гострого водно-імобілізаційного стресу для дорослих і старих тварин, що отримували SD і HFD. Вплив стресу викликав статистично значущі зміни у вмісті TBARS, а саме у дорослих щурів на SD вміст TBARS після індукції гострого стресу збільшився на 3,5% (до 3,22±0,13 нмоль/л), у старих щурів – на 6% (до 4,77±0,23 нмоль/л) порівняно до даних тварин аналогічних вікових груп з SD, яким не застосовували індукцію гострого стресу ($p < 0,05$ vs групи на SD). У групах щурів, які перебували на HFD, індукція стресу спричинила збільшення вмісту TBARS: у дорослих щурів – на 15% (до 4,24±0,15 нмоль/л), а старих щурів достовірно вірогідно – на 41% (до 7,19±0,36 нмоль/л) ($p < 0,05$ vs до відповідних вікових груп на HFD без індукції стресу).

У групі дорослих щурів, які перебували на HFD за умов індукції гострого стресу, введення NaHS не викликало значних змін вмісту TBARS. Тоді, як застосування екзогенного введення NaHS для збільшення вмісту ендогенного гідроген сульфіду старим щурам, що перебуваючи на HFD піддавались впливу стресу, достовірно вірогідно знижувало вміст TBARS на 16% порівняно до старих тварин, що отримували плацебо на тлі HFD та стресу ($p < 0,05$). Також попереднє введення NaHS у групах щурів, які перебували на HFD та не піддавались індукції стресу, не спричинило значних змін вмісту TBARS. Отримані результати вказують на вікові відмінності адаптивних реакцій на гострий стрес та підтверджують негативний вплив HFD на мобілізацію функціональних резервів у осіб дорослого та старого віку. Одним з можливих механізмів може бути вікові відмінності у функціональній активності ензимів антиокисної дії.

Застосування попереднього введення NaHS, як екзогенного донора H_2S, достовірно вірогідно продемонструвало позитивний вплив на зменшення

вмісту TBARS у старих щурів, що піддавались комбінованій дії високовуглеводного харчування та гострого стресу. Такий ефект NaHS у групі старих щурів, які перебували на HFD та зазнали впливу гострого стресу, можна трактувати як антиокисний, що обмежував порушення окисно-відновних реакцій.

4.2 Зміни активності цистатіонін-γ-ліази (CSE) у гомогенаті брижі за умов стандартної і високофруктозної дієт, індукції гострого стресу та введення NaHS у щурів різного віку.

У дорослих щурів, які перебували на SD, показник активності цистатіонін-γ-ліази (CSE) склав 1,26±0,08 нмоль/хв•1мг білка (рис. 4.2). Тоді як активність CSE у старих щурів на SD, була на 17% вірогідно достовірно нижчою та склала 1,05±0,07 нмоль/хв•1мг білка ($p < 0,05$ vs до дорослих на SD), що може свідчити про пов'язане з віком зниження активності CSE.

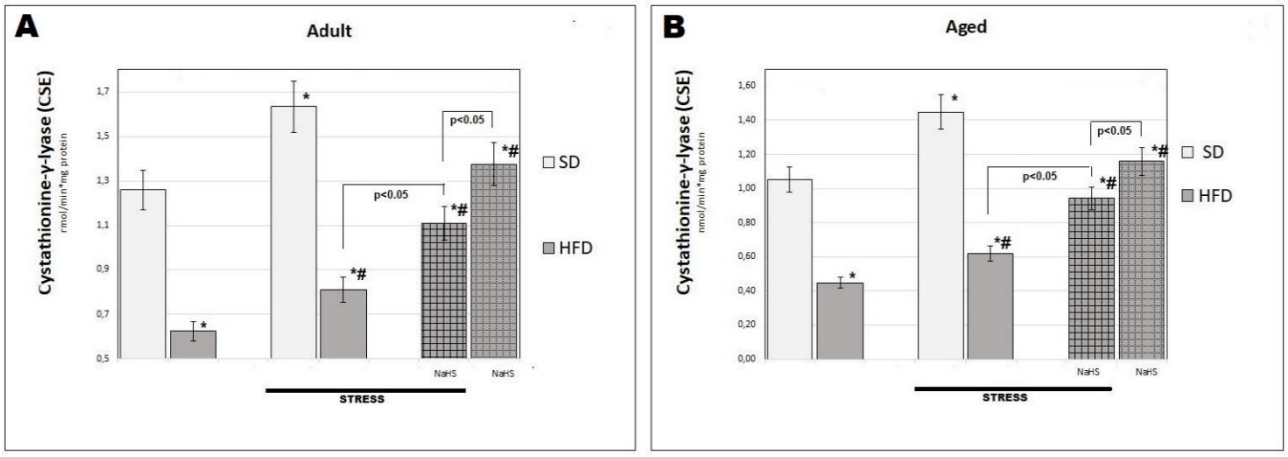

Рис. 4.2 Порівняльні зміни активності цистатіонін-γ-ліази (CSE) у дорослих (А) та старих (В) щурів, які перебували на стандартній дієті (SD) або високофруктозній дієті (HFD) з або без впливу гострого стресу та отримували NaHS (n = 6); * $p<0,05$ vs SD; # $p<0,05$ vs HFD.

У групах щурів, які отримували HFD, було виявлено зниження активності CSE майже удвічі порівняно до груп на SD. Так, у дорослих щурів

на HFD, виявлено зниження активності CSE на – 51% до 0,62±0,05 ($p < 0,05$ vs до дорослих щурів на SD), а у старих щурів, відповідно, зниження на – 57% до 0,45±0,04 ($p < 0,05$ vs старих на SD). Такі дані вказують, що підвищений вміст фруктози у харчуванні індукує зниження активності CSE в брижі, головного ензиму, що бере участь у синтезі H_2S [216]. Відповідно зниження активності CSE, спричинить зниження синтезу ендогенного H_2S [119, 245]. Також, за умов гострого стресу у піддослідних щурів на SD виявлено, що індукція стресу у цих тварин викликала підвищення рівня CSE: у дорослих щурів – до 1,63±0,09 нмоль/хв•1мг білка, тоді як у старих – підвищення активності до 1,45±0,09 нмоль/хв•1мг білка, що склало збільшення активності на 29% та 38%, відповідно, у порівнянні до аналогічних вікових груп тварин на SD без індукції гострого стресу ($p < 0,05$). Подібні тенденції були виявлені також у групах щурів, що отримували HFD. Вплив гострого стресу спричинив підвищення активності CSE у дорослих щурів до 0,81±0,05 нмоль/хв•1мг білка, а у старих – до 0,62±0,06 нмоль/хв•1мг білка на 30% та 37%, відповідно, у порівнянні до вікових груп, які не піддавались впливу стресу ($p < 0,05$ vs до аналогічних вікових груп на HFD). Отримані результати показують відмінності у активності CSE у віковому аспекті, що демонструє зниження захисних чинників тканини брижі з віком, особливо за умов високовуглеводного харчування та індукції гострого стресу.

Додатково було досліджено показники активності CSE у щурів різного віку, що перебували HFD впродовж 28-ми днів і яким впродовж 9-ти днів вводили плацебо або екзогенний донор H_2S – натрій гідросульфід (NaHS) за умов та без індукції гострого стресу. У групах щурів, які перебували на HFD та піддавались індукції стресу, 9-тиденне щоденне введення NaHS спричинило збільшення активності CSE: у дорослих щурів – до 1,11±0,08 нмоль/хв•1мг білка ($p<0,05$ vs групи дорослих тварин на HFD+стрес), а у старих – до 0,94±0,04 нмоль/хв•1мг білка ($p<0,05$, vs групи старих тварин на HFD+стрес), що склало зростання на 37% у дорослих та на 51%, відповідно, у старих щурів у порівняні до даних щурів, яким не давали NaHS.

У групах щурів, які перебували на HFD та не піддавались індукції стресу, 9-тиденне екзогенне застосування NaHS спричинило двократне збільшення активності CSE (у дорослих CSE зріс з 0,62 нмоль/хв•1мг білка до 1,38 нмоль/хв•1мг білка, а у старих щурів – з 0,45 нмоль/хв•1мг білка до 1,16 нмоль/хв•1мг білка) у порівнянні до груп, які не отримували NaHS та не піддавались впливу стресу ($p < 0,05$).

Отримані дані дозволяють дійти висновку, що продемонстроване збільшення активності CBS у гомогенатах брижі на тлі екзогенного введення донора гідроген сульфіду з використанням неорганічного донора біосинтезу H_2S – NaHS сприяє збільшенню ендогенного синтезу H_2S, що, в свою чергу, за даними літератури проявляє цитопротекторну, антиокисну, протизапальну дії на пошкоджувальний вплив HFD [161].

4.3 Вікові відмінності активності цистатіонін-β-синтази (CBS) у гомогенаті брижі за умов стандартної та високофруктозної дієт, індукції гострого стресу та введення NaHS.

У дорослих щурів групи контролю, які отримували SD, активність CBS склала 0,98±0,09 нмоль/хв•1мг білка (рис. 4.3), тоді як активність CBS у старих щурів – на 16% нижчою порівняно до даних дорослих тварин на стандартному харчуванні та склала 0,82±0,06 нмоль/хв•1мг білка ($p < 0,05$ vs дорослі на SD). Такі дані свідчать про вікові відмінності в активності CBS, що за характером подібні до каталітичної активності CSE.

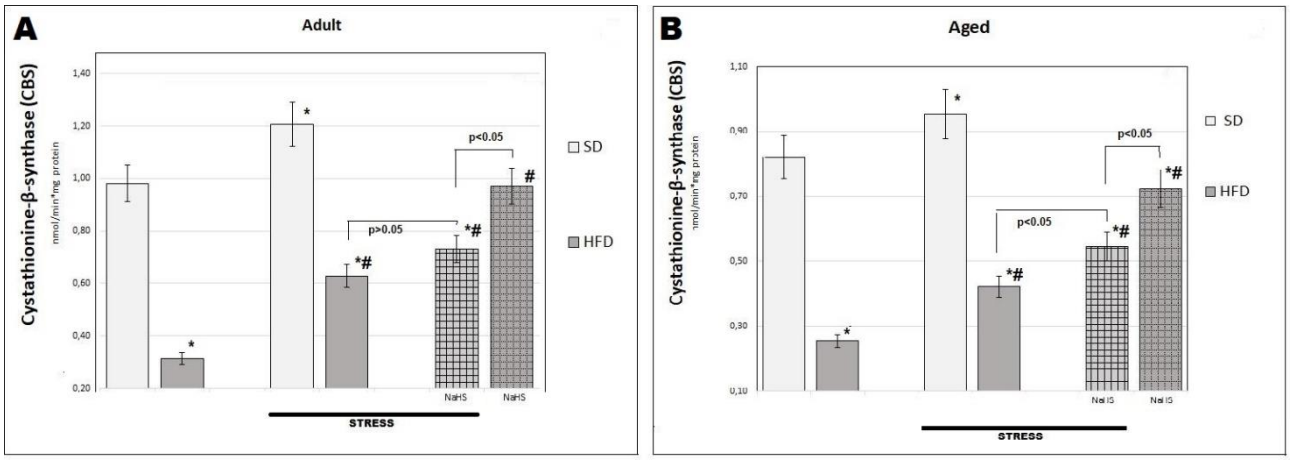

Рис. 4.3 Порівняльні зміни активності цистатіонін-β-синтази (CBS) у дорослих (A) та старих (B) щурів, які перебували на стандартній дієті (SD) або високофруктозній дієті (HFD) з чи без впливу гострого стресу та отримували NaHS (n = 6); * p<0,05 vs SD; # p<0,05 vs HFD.

У групах щурів, які отримували високофруктозне харчування, було виявлено зниження активності CBS у порівняні до аналогічних вікових груп на стандартному харчуванні: у дорослих щурів виявлено зниження на 69% до 0,31±0,05 нмоль/хв•1мг білка (p < 0,05 vs дорослі щурі на SD), а у старих щурів відповідно – на 70% до 0,25±0,035 нмоль/хв•1мг білка (p < 0,05 vs старі на SD). Це може вказувати, що 28-миденна високофруктозна дієта викликає зниження активності CBS у суттєво більшому ступені, чим зміни активності CSE, а отже пошкоджувальний вплив HFD на синтез ендогенного H_2S буде посилюватись.

Індукція стресу для дослідження адаптивних змін активності CBS, показала, що у тварин на SD відбулось підвищення активності серед дорослих щурів до 1,2±0,08 нмоль/хв•1мг білка та у старих – до 0,95±0,05 нмоль/хв•1мг білка, що склало збільшення на 22% та 15%, відповідно, у порівнянні до відповідних вікових груп на SD без індукції гострого стресу (p < 0,05). Аналогічно у групах щурів, які перебували на HFD, вплив гострого стресу проявився підвищенням активності CSE у дорослих щурів до 0,63±0,08 нмоль/хв•1мг білка, а у старих – до 0,42±0,05 нмоль/хв•1мг білка, відповідно на 103% та 68% від показників груп тварин на HFD, які не піддавались стресу

($p < 0,05$). Вплив стресу у тварин, що отримували HFD вказує вікові відмінності в активності CBS, а також демонструє, що активність ензимів CBS, буде більш значимою, ніж активність CSE за умов HFD та індукції стресу.

Дослідження впливу натрій гідросульфіду (NaHS), як донора ендогенного H_2S, показало, у групах щурів, які отримували HFD та піддавались індукції гострого стресу, після введення NaHS відбулось збільшення активності CBS: у дорослих щурів – до 0,73±0,07 нмоль/хв•1мг білка, а у старих – до 0,54±0,039 нмоль/хв•1мг білка, що склало збільшення інтенсивності каталітичної активності на 15% у дорослих та на 28% у старих щурів, відповідно, порівняно до даних аналогічних вікових груп щурів за умов HFD та індукції стресу, яким вводили плацебо ($p < 0,05$ vs відповідно групи з HFD+WIRS).

У групах тварин, які перебуваючи на HFD і не піддавались впливу гострого стресу, після введення NaHS відбулось збільшення активності CBS. Так, у дорослих тварин виявлено кратне збільшення активності CBS: з 0,31 нмоль/хв•1мг білка до 0,97 нмоль/хв•1мг білка ($p < 0,05$ vs дорослі щурі з HFD), а у старих щурів з 0,25 нмоль/хв•1мг білка до 0,72 нмоль/хв•1мг білка ($p < 0,05$ vs старі тварини на HFD) у порівнянні до даних тварин аналогічних вікових груп на HFD, та які отримували плацебо.

Таким чином, проведені біохімічні дослідження показали, що відбувається зниження каталітичної активності CBS з віком, що подібно до вікових змін активності CSE. Високофруктозна дієта викликає зниження активності CBS, як у дорослих так і у старих тварин, у більшій мірі, чим це відбувається з активністю CSE. Вплив гострого стресу викликає зростання активності ензимів ендогенної секреції H_2S, що може свідчити про залучення даного газотрансмітера у реалізацію адаптивних реакцій, що підтверджено результатами змін активності CSE за умов екзогенного введення NaHS дорослим і старим тваринам.

4.4 Особливості активності тіосульфат-сульфуртрансферази (TST) у гомогенаті брижі у тварин різного віку за умов стандартної дієти і високофруктозного харчування, індукції стресу та введення NaHS.

У дорослих щурів, контрольної групи, які перебували на SD, показники активності тіосульфат-сульфуртрансферази (TST) склали 1,16±0,09 нмоль/хв•1мг білка, тоді як активність TST у старих щурів на SD, була майже на 13% нижчою та склала 1,01±0,04 нмоль/хв•1мг білка ($p < 0,05$ vs до дорослих щурів на SD) (рис. 4.4), що може свідчити про наявне зниження активності TST зі збільшенням вікового цензу.

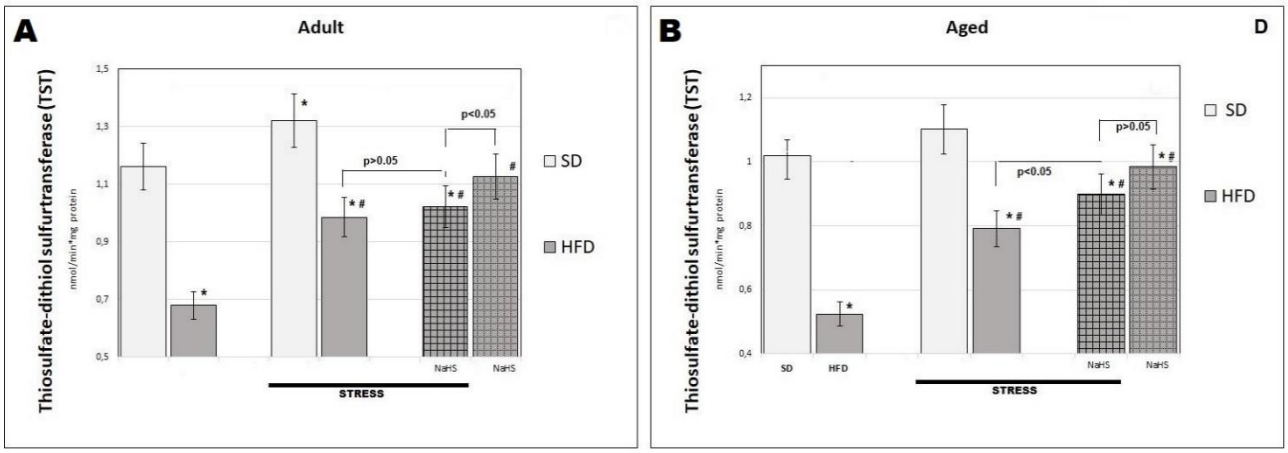

Рис. 4.4 Порівняльні зміни активності тіосульфат-сульфуртрансферази (TST) у дорослих (А) та старих (В) щурів, які перебували на стандартній дієті (SD) або високофруктозній дієті (HFD) з або без індукції гострого стресу та отримували NaHS (n = 6);

* $p<0,05$ vs SD; # $p<0,05$ vs HFD.

У обох вікових групах щурів, які отримували HFD, встановлено значне зниження активності TST у порівняні до тварин, що отримували SD. Так у дорослих щурів на HFD, виявлено зниження показника TST на 42% до 0,68±0,02 нмоль/хв•1мг білка ($p < 0,05$ vs дорослих тварин з SD), а у старих щурів – на 48% до 0,53±0,05 нмоль/хв•1мг білка ($p < 0,05$ vs старих тварин з SD). Такі результати свідчать, що HFD спричиняє зменшення ензимної

активності TST, що в свою чергу спричиняє зниження синтезу ендогенного H_2S, що сприяє зменшенню інтенсивності проявів мультифункціональної активності гідроген сульфіду.

Досліджуючи активність TST у гомогенаті брижі за умов моделювання гострого стресу у щурів на SD та HFD, було виявлено, що індукція стресу спричинила вікові відмінності в активності TST. Дія стресу у тварин з SD викликала підвищення активності TST у дорослих щурів до 1,32±0,06 нмоль/хв•1мг білка, а у старих – підвищення до 1,1±0,1 нмоль/хв•1мг білка, що складає збільшення на 14% та 9%, відповідно, у порівнянні до аналогічних груп тварин без індукції гострого стресу ($p < 0,05$ vs тварин з SD). Подібні тенденції були виявлені також у групах щурів, які перебували на HFD та зазнали вплив стресу. Так підвищення активності TST у дорослих щурів склало 0,99±0,07 нмоль/хв•1мг білка, а у старих – 0,79±0,05 нмоль/хв•1мг білка, що є збільшенням на 45% та 50%, відповідно, у порівнянні до відповідних вікових груп, які не піддавались стресу ($p < 0,05$ vs HFD груп). Отримані результати показують вікові відмінності активності TST, що може спричинити зниження захисних властивостей брижі під час старіння, особливо за умов високофруктозного харчування та індукції гострого стресу.

При подальшому досліджені активності TST у щурів різного віку, що перебували HFD, та отримували введення екзогенного донора H_2S – NaHS за умов та без застосування гострого стресу, встановлено наступне. Після введення NaHS у групах щурів, які отримували HFD та індукцію гострого стресу, відбулось збільшення показника активності TST: у дорослих щурів активність TST – збільшилась до 1,02±0,06 нмоль/хв•1мг білка ($p < 0,05$ vs дорослі тварини з HFD+WIRS), а у старих – до 0,9±0,05 нмоль/хв•1мг білка ($p < 0,05$ vs старих щурів HFD+WIRS), що показало, відповідно, зростання на 14% у порівняні до даних щурів, які не отримували NaHS.

Для вивчення ефекту гідроген сульфіду на активність TST застосовували попереднє введення неорганічного донора H_2S – речовину NaHS. У групах щурів, які перебували на HFD та не піддавались індукції гострого стресу, після

введення NaHS відбулось кратне збільшення активності TST: у дорослих тварин від 0,68 нмоль/хв•1мг білка до 1,13±0,05 нмоль/хв•1мг білка, а у старих щурів – від 0,53 нмоль/хв•1мг білка до 0,99±0,08 нмоль/хв•1мг білка у порівнянні до груп, які не отримували NaHS та не піддавались впливу стресу ($p < 0,05$ vs відповідних вікових тварин на HFD).

Підсумовуючи отримані результати, нами було показано вікові відмінності каталітичної активності ензимів, залучених в реалізацію ефектів гідроген сульфіду, а саме простежується зниження активності CBS, CSE, TST у віковому аспекті. У групах щурів, які отримували HFD, спостерігалася зниження активності ензимів (CBS, CSE, TST) порівняно з тваринами, що годували SD. Також було встановлено значну різницю в активності ензимів між дорослими та старими щурами на HFD. Вікові порівняння показали, що у старих щурів абсолютні показники активності CBS, CSE, TST були нижчими ніж у дорослих тварин.

Примітно, що зафіксовано посилення активності всіх ензимів, пов'язаних з H_2S під час індукції гострого стресу, як на стандартній дієті, так і на високовуглеводній дієті. Ми побачили, що введення NaHS у дорослих щурів, які зазнали стресу при харчуванні HFD, призвело до збільшення активності CBS – 16%, CSE – 37%, а TST на 3% у порівнянні з дорослими щурами на HFD і без індукції стресу ($p < 0,05$), у старих щурів відповідно збільшення CBS – 28%, CSE – 51% та TST – 14% ($p < 0,01$). Таким чином, наші результати вказують на те, що NaHS може регулювати активність – CBS, CSE і TST, має потенціал для відновлення окисно-відновної рівноваги під час пошкодження брижі у щурів, спричиненого старінням та HFD.

4.5 Відмінності активності сульфіт-оксидази (SO) у гомогенаті брижі щурів різного віку за умов HFD, індукції стресу та введення NaHS

Сульфіт-оксидаза (SO) – один з ензимів, що забезпечує процес утилізації H_2S у мітохондріях та бере участь у клітинних енергетичних та фізіологічних

процесах. Тому, нам було цікаво дослідити роль активності SO у брижі в нормі у дорослих і старих щурів, з'ясувати вікові відмінності активності за умов високофруктозного харчування, індукції гострого стресу та за умов екзогенного застосування NaHS.

У групах дорослих і старих тварин, що отримували SD, активність SO становила 2,95±0,15 нмоль/хв•1мг білка у дорослих щурів, а у старих – 4,15±0,1 нмоль/хв•1мг білка. Встановлено вікове збільшення активності SO на 41% старих щурів у порівняні з дорослими тваринами, що отримували SD ($p < 0,05$) (рис. 4.5).

Перебування тварин упродовж 28-ми днів на HFD спричинило збільшення активності SO, а саме: у дорослих щурів – до 3,27±0,17 нмоль/хв•1мг білка, що становить 11 % порівняно до групи дорослих тварин на SD ($p < 0,05$); для старих щурів – до 4,8±0,23 нмоль/хв•1мг білка, відповідно збільшення на 15% ($p < 0,05$ vs старі щурі на SD) (рис. 4.5). Бачимо, що відбулося підвищення активності SO у дорослих та старих тварин, які отримували на HFD, що свідчить про активування внутрішньомітохондріальних процесів, які забезпечують окисне фосфорилювання, що опосередковано вказує на критичний результат окисних процесів у дихальному ланцюзі мітохондрій за умов гіперглікемії [161].

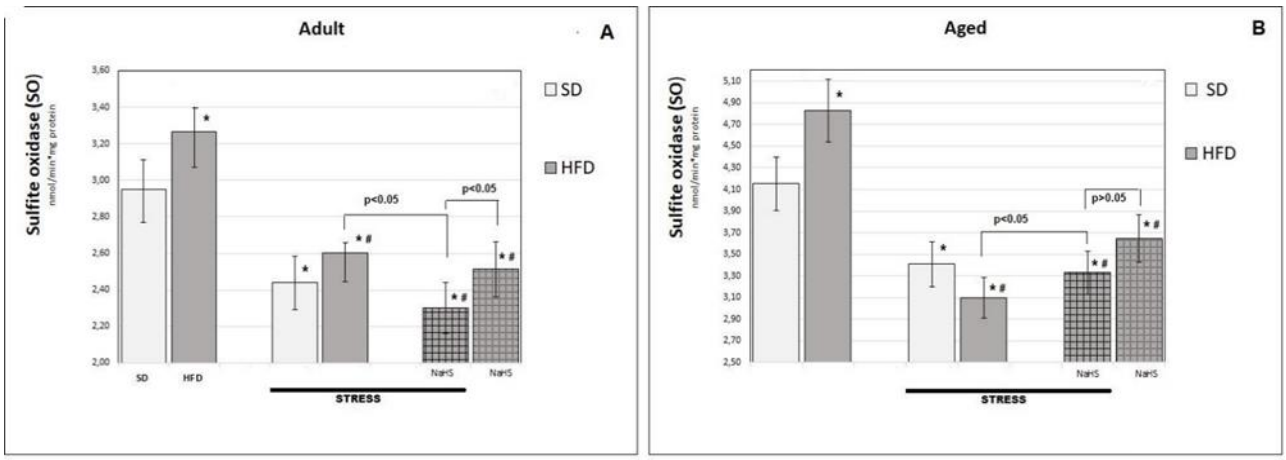

Рис. 4.5 Порівняльні зміни активності сульфіт-оксидаза (SO) у дорослих (A) та старих (B) щурів, які перебували стандартній дієті (SD) або

високофруктозній дієті (HFD) з або без впливу гострого стресу та отримували NaHS (n = 6); * p<0,05 vs SD; # p<0,05 vs HFD.

Дія гострого стресу викликала видимі зміни у активності SO. При впливі гострого стресу на тварин, які перебували на SD виявлено, зниження активності SO: у дорослих на – 17% до 2,44±0,08 нмоль/хв•1мг білка (p < 0,05 vs дорослих тварин з SD), а у старих – 18 % до 3,1±0,16 нмоль/хв•1мг білка (p < 0,05 vs старих щурів з SD) відповідно. Індукція стресу у тварин які отримували HFD, також призвела до зменшення активності SO, а саме: у дорослих тварин – на 21%, до 2,6±0,18 нмоль/хв•1мг білка (p < 0,05 vs дорослі тварини з HFD), у старих щурів зменшення активності SO – на 36%, до 3,1±0,16 нмоль/хв•1мг білка. (p < 0,05 vs старі щурі на HFD) у порівнянні до груп відповідних тварин на HFD.

У дорослих щурів введення NaHS спричинило зменшення активності SO на 12% до 2,23±0,09 нмоль/хв•1мг білка (p < 0,05vs дорослі тварини HFD+WIRS). Введенням NaHS старим щурам з HFD, яким індукували стрес викликало збільшення активності SO до 3,33±0,15 нмоль/хв•1мг білка (p < 0,05 vs старі щурі з HFD+WIRS) порівняно до результатів тварин, що перебували на високофруктозній дієті та зазнали індукції стресу та отримували введення плацебо.

Введення NaHS групам щурів на HFD без індукції стресу, призвело до зменшення каталітичної активності SO, що у дорослих щурів, що і у старих. А саме: у дорослих зменшення на 24% до 2,51±0,14 нмоль/хв•1мг білка (p < 0,05 vs дорослі з HFD), у старих щурів активність зменшилась - 25% до 3,64±0,19 нмоль/хв•1мг білка (p < 0,05 vs старі тварини з HFD).

Таким чином, ми бачимо збільшення каталітичної активності ензимів SO з віком у тварин, як на стандартній дієті, так і за умов високофруктозного харчування. Індукція гострого стресу призвела до зменшення активності SO в обох групах тварин, що узгоджується з даними про зменшення функціонального резерву у старих тварин порівняно до дорослих. Екзогенне

введення донора гідроген сульфіту – NaHS у групах дорослих і старих щурів, які отримували HFD та індукцію стресу призвело до збільшення активності SO лише у групі старих тварин. Ці дані співвідносні з результатами морфофункціональних досліджень брижі за допомогою електромікроскопічного вивчення клітин брижі та її субклітинних структур і демонструють потенційну мітохондріальне протекторну дію гідроген сульфіду за умов вікових змін і цитолітичного впливу високофруктозної дієти.

4.6 Вікові відмінності активності цистатіонін-γ-ліази та цистатіонін-β-синтази у гомогенаті брижі після введення класичного та гібридного H_2S-аспірину за умов високофруктозної дієти та індукції гострого стресу

Метою даному етапу дослідження було з'ясувати вікові відмінності впливу нового експериментального препарату АТВ-340, гібридної сполуки H_2S-аспірину, що містить у своїй молекулярній структурі додаткову активну групу, яка виступає донором H_2S на брижу дорослих та старих щурів. Та порівняти його вплив з – NaHS та класичним аспірином за умов високофруктозної дієти на індукції гострого стресу. Для цього ми використали дорослих та старих самців щурів, які були розділені на групи по 6 тварин у кожній. Тварини отримували 28-миденну стандартну або високофруктозну дієту, та з 20-го дня дослідження проводилось 9-тиденне в/о введення препаратів: аспірину у дозі 10 мг/кг/добу; NaHS у дозі 5,6 мг/кг/добу; комбінації аспірину та NaHS; H_2S-аспірину (АТВ-340) дозі 17,5 мг/кг/добу, а також введення для порівняння у якості контролю, плацебо – фізіологічний розчин в/о у дозі 1,0 мл. На 28-й день частина тварин піддавались впливу гострого стресу для вивчення адаптивних змін шляхом порівняння вмісту TBARS у сироватці крові та активності ензимів: CSE, CBS, TST та SO.

У групах щурів, які перебували на HFD та піддавались індукції стресу, та отримували 9-тиденне введення плацебо активності CSE склала: у дорослих щурів – 0,81±0,05 нмоль/хв•1мг білка, а у старих тварин – 0,62±0,04 нмоль/хв•1мг білка (рис. 4.6).

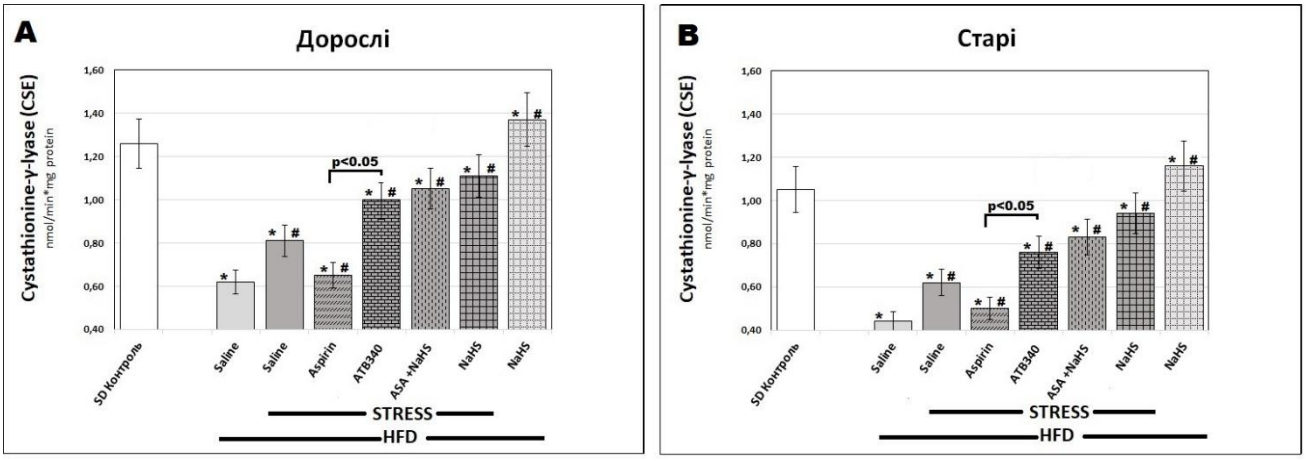

Рис. 4.6 Порівняльні зміни активності цистатіонін-γ-ліази (CSE) у дорослих (A) та старих (B) щурів, які перебували на високофруктозній дієті (HFD) з індукцією гострого стресу та отримували: аспірин, комбінацію аспірину і NaHS, H_2S-аспірин, NaHS та плацебо (n = 6); * p<0,05 vs SD; # p<0,05 vs HFD.

Введення класичного аспірину у аналогічних групах показало зменшення активності CSE: у дорослих щурів – до 0,65±0,07 нмоль/хв•1мг білка (p < 0,05 vs групи дорослих тварин на HFD+стрес), а у старих – до 0,5±0,04 нмоль/хв•1мг білка (p < 0,05 vs групи старих тварин на HFD+стрес), що склало зменшення на 20% у дорослих та на 24% у старих тварин, відповідно. Тоді як, введення H_2S-аспірину (ATB-340) збільшило активність CSE: у дорослих тварин – до 1,01±0,08 нмоль/хв•1мг білка (p < 0,05 vs групи дорослих тварин на HFD+стрес), а у старих – до 0,76±0,07 нмоль/хв•1мг білка (p < 0,05 vs групи старих тварин на HFD+стрес), що склало збільшення на 24% у дорослих та на 22% у старих тварин, відповідно. У щурів, яким вводили NaHS у комбінації з аспірином, було подібне збільшення активності CSE: у дорослих тварин – до 1,05±0,09 нмоль/хв•1мг білка (p < 0,05 vs групи дорослих

тварин на HFD+стрес), а у старих – до 0,83±0,07 нмоль/хв•1мг білка (p < 0,05 vs групи старих тварин на HFD+стрес).

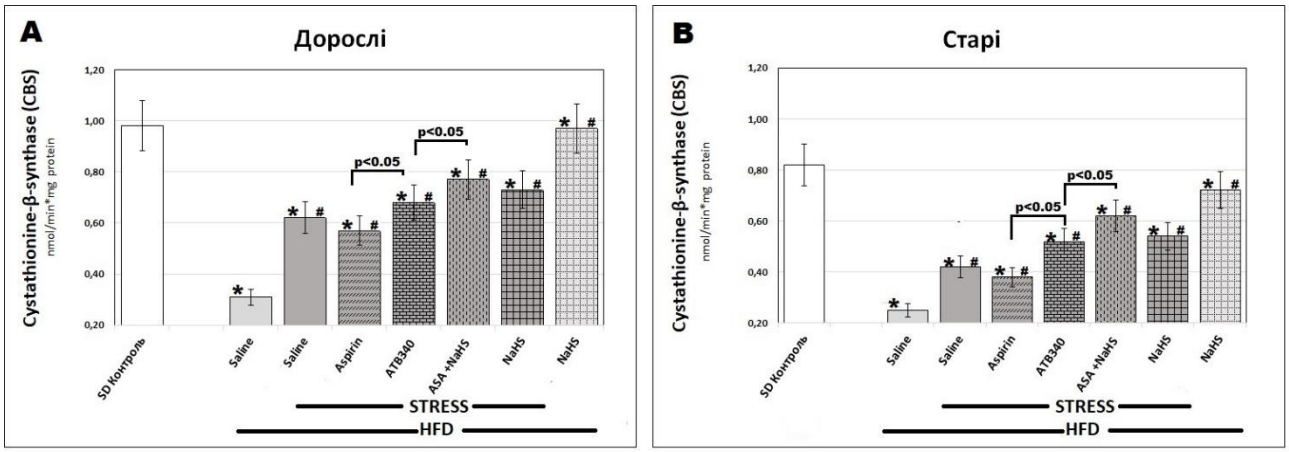

Рис. 4.7 Порівняльні зміни активності цистатіонін-β-синтази (CBS) у дорослих (A) та старих (B) щурів, які перебували на високофруктозній дієті (HFD) з індукцією гострого стресу та отримували: аспірин, комбінацію аспірину і NaHS, H_2S-аспірин, NaHS та плацебо (n = 6);

* p<0,05 vs SD; # p<0,05 vs HFD.

При досліджені активності CBS були отримані наступні дані. У контрольних групах щурів, що отримували плацебо перебуваючи на HFD з індукцією стресу, активність CBS була: у дорослих щурів – до 0,62±0,08 нмоль/хв•1мг білка, а у старих – до 0,42±0,05 нмоль/хв•1мг білка. У групах тварин, яким вводили класичний аспірин не відбулось значних змін активності CBS: у дорослих щурів активність склала – до 0,57±0,09 нмоль/хв•1мг білка, а у старих – до 0,38±0,03 нмоль/хв•1мг білка (рис. 4.7).

Після введення H_2S-аспірину (ATB-340), як донора H_2S, відбулося збільшення активності CBS: у дорослих щурів – до 0,68±0,08 нмоль/хв•1мг білка, а у старих – до 0,52±0,03 нмоль/хв•1мг білка, що склало збільшення інтенсивності каталітичної активності на 10% у дорослих та на 24% у старих щурів, відповідно, порівняно до даних аналогічних вікових груп щурів за умов HFD та індукції стресу, яким вводили плацебо (p < 0,05 vs відповідно групи з HFD+WIRS). У щурів, яким вводили NaHS у комбінації з аспірином, було збільшення активності CBS: у дорослих щурів – до 0,77±0,08 нмоль/хв•1мг

білка, а у старих – до 0,62±0,03 нмоль/хв•1мг білка, що склало збільшення інтенсивності каталітичної активності на 24% у дорослих та на 47% у старих щурів, відповідно, порівняно до даних аналогічних вікових груп.

Результати виявили вікові відмінності реагування на H_2S-аспірин (ATB-340), та показують ATB-340 володіє властивостями екзогенного донора H_2S і після введення викликає зміни активності ензимів CSE та CBS, у дорослих і старих тварин та за результатом подібні до змін після введення NaHS.

4.7 Порівняння активності тіосульфат-сульфуртрансферази та сульфітоксидази брижі під час застосування класичного та гібридного H_2S-аспірину у дорослих та старих щурів за умов високофруктозної дієти та стресу

У групах тварин, що отримували HFD та індукцію стресу активність TST склала: у дорослих щурів – 0,99±0,07 нмоль/хв•1мг білка, а у старих тварин – 0,79±0,05 нмоль/хв•1мг білка (рис. 4.8).

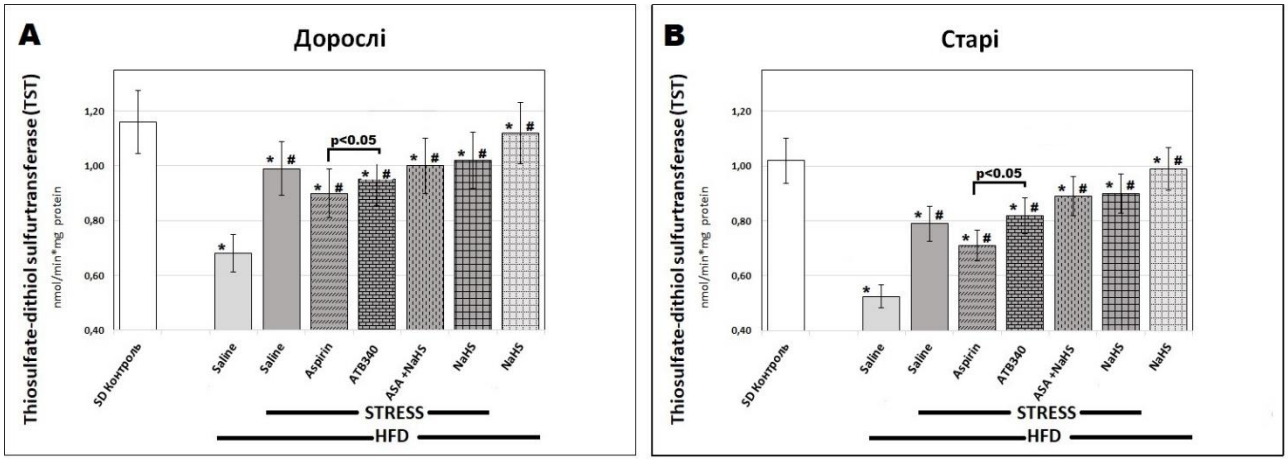

Рис. 4.8 Порівняльні зміни активності тіосульфат-сульфуртрансферази (TST) у дорослих (A) та старих (B) щурів, які отримували високофруктозну дієту (HFD) та індукцію стресу і вводили: аспірин, комбінацію аспірину і NaHS, H_2S-аспірин, NaHS та плацебо (n = 6);

* p<0,05 vs SD; # p<0,05 vs HFD.

У групах дорослих та старих тварин, яким попередньо вводили аспірин було виявлено зниження активності TST: у дорослих – до 0,9±0,08 нмоль/хв•1мг білка, а у старих – до 0,71±0,06 нмоль/хв•1мг білка, що показало, відповідно, зменшення на 10% та – 11% у порівняні до відповідних вікових груп, які отримували плацебо ($p < 0,05$, vs дорослі та старі тварини з HFD+WIRS).

Після введення експериментального екзогенного донора H_2S – ATB-340, не відбулось статистично значимих змін активності TST: у дорослих – показник 0,95±0,07 нмоль/хв•1мг білка, а у старих – 0,82±0,04 нмоль/хв•1мг білка, що може свідчити незначний вплив ATB-340 на каталітичну активність ензиму TST. У групах дорослих щурів, яким проводилось введення NaHS або комбіноване введення NaHS разом з аспірином, було виявлено збільшення активності TST на 3% лише у групі тварин, яким вводили NaHS. Комбіноване введення NaHS разом з аспірином також не показало змін активності TST.

Активність SO у групах тварин, яким на тлі високофруктозного харчування та індукції стресу вводили препарат плацебо становила: у дорослих – 2,6±0,12 нмоль/хв•1мг білка, а у старих – 3,1±0,3 нмоль/хв•1мг білка (рис. 4.9)

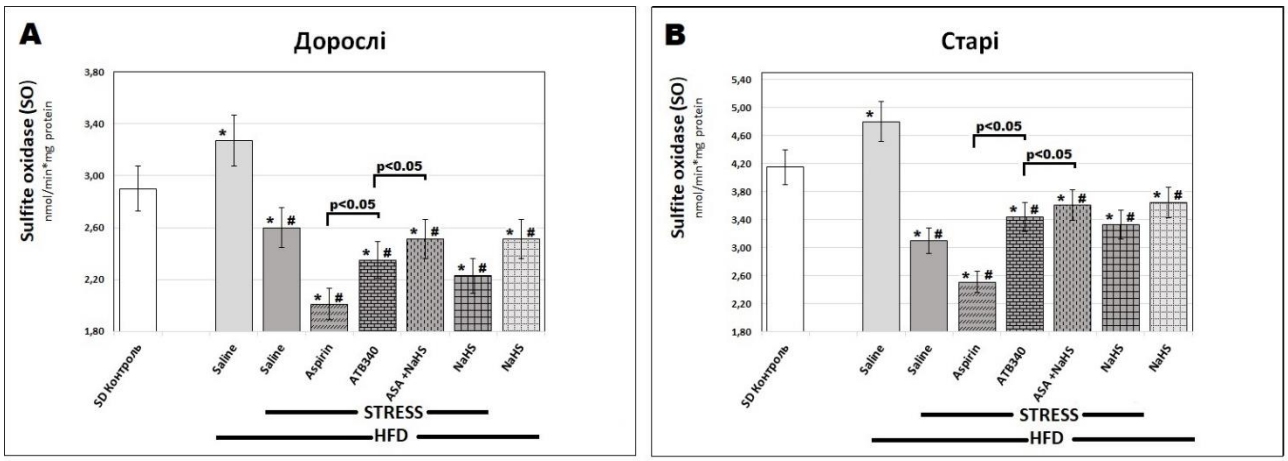

Рис. 4.9 Порівняльні зміни активності сульфітоксидази (SO) у дорослих (A) та старих (B) щурів, які отримували високофруктозну дієту (HFD) та індукцію стресу і вводили: аспірин, комбінацію аспірину і NaHS, H2S-аспірин, NaHS та плацебо (n = 6);

* p<0,05 vs SD; # p<0,05 vs HFD.

У групі дорослих щурів, які попередньо отримували АТВ-340, активність SO знизилась – до 2,35±0,07 нмоль/хв•1мг білка, що склало 10% зниження ензимної активності. Тоді як у старих щурів активність ензиму SO – збільшилась до 3,44±0,3 нмоль/хв•1мг білка, що склало 11% збільшення. Ми бачимо вікові відмінності у активності ензиму SO після введення H_2S-аспірину. Для порівняння, у групах тварин, яким вводили класичний аспірин було зниження активності SO: у дорослих – до 2,01±0,11 нмоль/хв•1мг білка, а у старих – до 2,51±0,10 нмоль/хв•1мг білка, що показало, відповідно, зменшення на 23% та – 19%. Тоді як, введення комбінації аспірину та NaHS викликало зміни подібні до АТВ-340, а саме зниження активності SO – до 2,51±0,06 нмоль/хв•1мг білка, що склало 4%. Тоді як у старих тварин було збільшення активності SO – до 3,61±0,13 нмоль/хв•1мг білка, що склало 11%.

Висновки до розділу 4

Отримані результати у цьому етапі досліджень дозволяють прийти до наступних висновків.

1. На моделях вікових відмінностей функціонування брижі та індукції пре-метаболічного синдрому у щурів з'ясовано зміни каталітичної активності ензимів синтезу гідроген сульфіду у тварин дорослого і старого віку, за умов індукції гострого стресу і модифікації харчування з використанням висококалорійного високофруктозного харчування.

2. З'ясовано, що вміст TBARS був збільшеним у старих щурів порівняно до дорослих щурів і в обох вікових групах за умов HFD, що може свідчити про прояви окисного стресу, що сприяє порушенням окисно-відновлювальних процесів та появі цитолітичних впливів для тканин організму.

3. Попереднє введення NaHS з метою покращення ендогенного вмісту H_2S продемонструвало зменшення вмісту TBARS у старих щурів з SD і тих, що отримували високофруктозне харчування та зазнали гострого стресу,

що свідчить про зменшення інтенсивності окислювального впливу.

4. Доведено в біохімічних дослідженнях, що існують вікові відмінності у активності ензимів CBS, CSE, TST, яка була нижчою у старих щурів, ніж у дорослих тварин. Вплив HFD сприяв зменшенню активності вказаних ензимів, тоді як застосування NaHS збільшувало каталітичну активність CBS, CSE, TST, що опосередковано свідчить про збільшене утворення гідроген сульфіду, який виявляє мультифункціональну дію і має потужний вазодилятаторний, антиокисний і протиапоптичний ефекти.

5. Застосування гідроген сульфідної корекції за допомогою NaHS причинило зменшення каталітичної активності SO, залученої у внутрішньоклітинний синтез H_2S, в обох вікових групах щурів за умов SD і HFD, що також характеризувався зменшенням вмісту TBARS, є непрямим доказом про покращення енергетичних процесів у тканинах брижі і облегшення процесів окиснення у організмі тварин.

Результати власних досліджень розділу 4 викладені у 5 статтях [4, 182, 183, 185, 186], апробовані на наукових форумах [5, 187] та впроваджені у наукову роботу та навчальний процес у викладання дисципліни “Фізіологія” у вищих медичних закладах України (додаток).

1. Ревенко О.В., Заячківська О.С., Вікові морфо-функціональні зміни структур брижі за умов стрес-індукованих пошкоджень і дії гідроген сульфіду. Клінічна та експериментальна патологія. 2018.Т.17,№3(65),ч.2. С. 104-108. *(Дисертант провів фрагмент експериментальних досліджень та здійснив аналіз отриманих результатів за умов поєднаного впливу високовуглеводного харчування та стрес, їх статистичну обробку, підготовку статті до друку).* [4]

2. Ревенко О.В. Морфо-функціональні особливості білого жиру очеревини за умов стресу. Всеукраїнська науково-практична конференція

«Довкілля і здоров'я»: тези доп. Тернопіль, 2018. С. 51-52. *(Підготував матеріал для стендової доповіді, тезу до друку)*. [5]

3. Revenko O., Zaichko N., Wallace J., Zayachkivska O. Hydrogen sulfide system attenuates injury by hyperglycemia and stress: The role of mesenteric adipocytes in ages animals. Праці НТШ Медичні науки. 2018, Т. 54, № 2. С. 115-124. *(Дисертант провів фрагмент експериментальних досліджень, виконав аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку статті до друку).* [186]

4. Revenko O, Zaichko N, Wallace J, Zayachkivska O. Targening hydrogen sulfide system treatment for mesenterial adiposity in rats submitted to fructose consumption. Фізіологічний журнал, 2019, Т. 65, № 3, С. 118-119. *(Підготував матеріал для стендової доповіді, тезу до друку).* [187]

5. Revenko O, Zaichko N, Wallace J, Zayachkivska O. Exogenous hydrogen sulfide for the treatment of mesenteric damage associated with fructose-induced malfunctions via inhibition of oxidative stress. Ukr.Biochem.J. 2020; Volume 92, Issue 2, Mar-Apr, pp. 86-97. *(Дисертант провів фрагмент експериментальних досліджень та здійснив аналіз отриманих результатів за умов поєднаного впливу високовуглеводного харчування та стресу, виконав узагальнення результатів, статистичну обробку, підготовку статті до друку).* [185]

6. Revenko O, Kovalyshyn V, Yashchenko A, Wallace J, Zayachkivska O. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug ATB-340 treatment potentially reduces mesenteric metaflammation in the experimental age-and high fructose dietary-induced injury. Proceeding of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences. 2021 Jun 13;64(1). *(Дисертант провів фрагмент експериментальних досліджень та виконав аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку статті до друку).* [182]

7. Revenko O, Pavlovskiy Y, Savytska M, Yashchenko A, Kovalyshyn V, Chelpanova I, Varyvoda O, Zayachkivska O. Hydrogen sulfide prevents mesenteric adipose tissue damage, endothelial dysfunction, and redox imbalance

from high fructose diet-induced injury in aged rats. Frontiers in Pharmacology. 2021 Aug 30;12:693100. *(Дисертант провів фрагмент експериментальних досліджень та здійснив аналіз отриманих результатів за умов поєднаного впливу високовуглеводного харчування та стресу, їх статистичну обробку, підготовку статті до друку).*[183]

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Згідно нещодавніх епідеміологічних досліджень поширення метаболічних розладів у світі сягає високого рівня, який за характером близький до пандемії. Із кожним роком в Україні та світі збільшується поширеність ожиріння [16]. Також прослідковується тенденція до зростання частоти ожиріння серед населення старшого віку, що часто пов’язане з коморбідними станами, серед яких цукровий діабет ІІ типу (ЦД2), гіпертонічна хвороба, ішемічна хвороба серця, стеатогепатит, гастроентерологічні захворювання та інші [172, 199]. З огляду на такі обставини останнім часом з'являється все більше наукових даних, що свідчать про важливу функціональну роль жирової тканини. Згідно сучасних наукових уявлень відомо про білу, буру, бежеву та рожеву жирові тканини, адипоцити, яких відрізняються за морфо-функціональними властивостями [99, 122, 205].

За даними фізіологічних досліджень важливу роль для енергетичного метаболізму має функціонування жирової тканини, яка представлена білими, бурими і бежевими адипоцитами, що секретують широкий спектр біологічно активних речовин, які мають вплив на запалення, вазорегуляторні реакції та проліферацію (Таб. 5.1) та метаболічні процеси (Таб. 5.2).

Таблиця 5.1

Вплив жирової тканини та її біорегуляторів на біологічні процеси	
Вплив на	Біорегулятори
Запалення	IL-1Rα – Інтерлейкін-1 рецептор α IL-1β – Інтерлейкін -1β IL-8 – Інтерлейкін -8 IL-10 – Інтерлейкін -10 CRP – С-реактивний білок MCP-1 – Моноцитарний хемоаттрактантний протеїн-1 OPN – Остеопонтин (Osteopontin)

	Вісфатін (Visfatin)
Судинну стінку	Ангіотензиноген (Angiotensinogen) Адипонектин (Adiponectin) PAI-1 – Інгібітор активації плазминогена 1 типу (Plasminogen activator inhibitor 1) VEGF – Фактор росту ендотелію судин (Vascular endothelial growth factor) Тканинні фактори (Tissue factors) NO – оксид азоту H_2S – сірководень
Проліферецію	TGF-β Трансформувальний фактор росту β IGF-1 Інсуліноподібний фактор росту 1 HGF Фактор росту гепатоцитів NGF Фактор росту нервів LIF Фактор гальмування лейкозних клітин Фібронектин
Імунні реакції	Адипсин (Adipsin) ASP – Протеїн стимулюючий ацилювання (Acylation stimulating protein) Система комплементу Factors B і C3 CSFs – Колонієстимулювальний фактор (Colony-stimulating factor) IL-17D – Інтерлейкін 17D (Interleukin-17D) Амілоїд сироватки SAA3 (Serum amyloid A3)
Цитокінову регуляцію	Лептин TNF-α – Фактор некрозу пухлин α Хемерин

Однією з унікальних властивостей жирової тканини є її здатність до перепрограмування фізіологічних процесів інших клітин тіла [20, 24, 29]. Крім

того, мітохондрії адипоцитів можуть змінювати важливі біологічні процеси, включно з окисним фосфорилюванням, синтезом АТР та генерування АФК, що, у свою чергу, може сприяти генеруванню метаболічних сигналів для появи гіпертрофічних і гіперпластичних змін адипоцитів, які спричиняють ожиріння, прозапальні реакції та судинні розлади [35].

Таблиця 5.2.

Вплив жирової тканини та її біорегуляторів на метаболічні процеси	
Метаболізм глюкози	FFA – Вільні жирні кислоти (Free fatty acids) Резистин (Resistin) H_2S – сірководень
Ліпідний обмін	ApoE – Аполіпопротеїн Е (Apolipoprotein E) LPL – Ліпопротеїн ліпаз (Lipoprotein lipase) Гліцерин (Glycerol) CD36 – Диференційний лейкоцитарний антиген (Leukocyte differentiation antigen) CD36 HSL – Гормон чутлива ліпаза (Hormone-sensitive lipase) ATGL – Адипоцитарна тригіцерин ліпаза (Adipose triglyceride lipase) H_2S – сірководень

Жирова тканина, а особливо її вісцеральний тип, до якої належить мезентеріальна жирова тканина, на клітинному рівні володіє унікальною здатністю акумулювати та інтегрувати різні екзогенні впливи і перетворювати їх у сигнальні шляхи, що реалізуються адипокінами, хемокінами, лейкінами і газотрансмітерами. Вплив газотрансмітера H_2S на жирову тканину за умов ожиріння і метаболічного синдрому залежить від складу дієти, тривалості висококалорійного харчування та безпосереднього депо жирової тканини. Механізми реалізації ефектів H_2S складні та залишаються до кінця не вивчені.

Така міжклітинна взаємодія сприяє ризику розвитку численних метаболічних розладів, пов'язаних з ожирінням, ЦД2, шлунково-кишковими та серцево-судинними захворюваннями, що часто спричиняють життєвонебезпечні наслідки [126, 200, 257]. Нещодавні клінічні дані показали, що у осіб з ожирінням, особливо похилого віку, коронавірусна хвороба COVID-19 часто призводить до поліорганної дисфункції та фатальних змін у більшому ступені, ніж в осіб без ожиріння [115, 173, 220].

Оскільки, вісцеральна і підшкірна біла жирова тканини мають різні фізіологічні та метаболічні функції та адаптаційний потенціал до змін внутрішнього середовища, їхні адипоцити мають відмінні функціональні ролі у регуляції обміну речовин [68, 239]. Нещодавні дослідження про функціонування мітохондрій адипоцитів вказують, що їх стан є вирішальним для різноманітних сигнальних шляхів, які забезпечують цитопротекцію, запалення і/або апоптоз [44, 97, 114]. Більш того, дані наукової групи Miliotis, et al. 2019 вказують, що ультраструктурні дослідження білих адипоцитів з точки зору визначення їхньої форми, якісних та кількісних характеристик мітохондрій, допоможуть зосередити увагу на них, як на об'єкті, для розробки нових терапевтичних стратегій [149].

Нещодавнє відкриття стосовно брижі, як нового окремого органу черевної порожнини, показало, що однією зі складових його частин є фізіологічно активні мезентеріальні білі адипоцити [55, 56], ці клітини, мають погане капілярне кровопостачання та низьку активність власних ензимів антиокисного захисту, що робить їх вразливими до цитолітичної дії гіпоксії та вільних радикалів [117]. Нещодавні дані про накопичення «наповзаючого» мезентеріальнго жирового фіброзу (відоме як англомовний термін: «creeping fat») відіграє рушійну роль у виникненні трансмурального запалення у брижі за рахунок взаємовпливу МА на виникнення фіброзу. що може відігравати вагому роль у патогенезі ряду гастроентерологічних захворювань, серед яких є хвороба Крона [143, 190]. Проте точний механізм пошкодження жирової тканини, який спричиняє поступову втрату фізіологічної цілісності, кількісно-

якісні зміни МА та складу стромально-судинних клітин, ще не до кінця зрозумілий [60, 212, 232,]. Зв’язок між змінами МА під час старіння та їх пошкодженням за умов HFD все ще залишається малодослідженим на сьогодні. Враховуючи вище викладене, ми обрали для досліджень вивчати як змінюються мезентеріальні клітини з віком та порівняти дані зміни під час HFD.

Традиційна теорія розвитку ожиріння пов'язана з дисбалансом та надлишком калорій, коли спожитих калорій перевищує кількість використаних для забезпечення діяльності організму. У результаті створюються умови для появи метаболічних розладів, які формують ожиріння. В останнє десятиліття популярною стає й інша гіпотеза, що надмірне споживання швидких та рафінованих вуглеводів викликає інсулінорезистентність, а високий рівень інсуліну спричиняє ожиріння. З огляду на те, що інсулін є гормоном, який стимулює накопичення жиру, дана гіпотеза не пояснює вісцеральний тип ожиріння або чому у частини людей виявляється накопичення жиру в внутрішніх органах і/або навколо них. Згідно сучасних даних про механізм розвитку вісцерального ожиріння, надмірне споживання моносахаридів викликає запальний процес у клітинах, які їх швидко метаболізують. Під час метаболізму фруктози у підшкірних адипоцитах, зростає рівень синтезу кортизолу для зниження проявів запального процесу. Збільшення вмісту внутрішньоклітинного кортизолу спричиняє вивільнення вільних жирних кислот з підшкірних адипоцитів, що у подальшому накопичуються у вісцеральній жировій тканині. Також, надмірне споживання простих вуглеводів ініціює запальний процес у печінці та збільшення внутрішньопечінкового синтезу кортизолу за рахунок активування гідроксистероїддегідрогенази 1-го типу, внаслідок чого викликає накопичення жиру в печінці (жировий гепатоз). По суті, реакція кортизолу на запалення за умов надмірного вживання фруктози зумовлює вісцеральний тип ожиріння. Окрім того, надмірне проникнення фруктози через гематоенцефалічний бар'єр, спричиняє активування гіпоталамо-гіпофізарно-

надниркової осі, виділення кортизолу, який додатково стимулює глюконеогенез у печінці, що призводить до загальної інсулінорезистентності та подальших метаболічних порушень, які формують появу ожиріння.

Проведення досліджень газотрансмітерів у численних наукових дослідах показало, що вони володіють сприятливим впливом на цитопротекцію, проявляючи судинорозширювальні, протизапальні, антиокисні властивості та нормалізують метаболічний дисбаланс [204, 216]. Показано, що високовуглеводне харчування зумовлює пригнічення каталітичної активності ензимів синтезу H_2S, важливого біорегулятора протиоксидантних і судиннотропних реакцій [23, 175]. Також досліджено вплив рівня H_2S на окисно-відновну рівновагу у мітохондріях, що може стати відправною точкою до переходу від фізіологічного та патологічного стану у клітинах [151, 164]. Проте, мало відомо про вплив H_2S на морфо-функціональні зміни мітохондрій у МА за умов метаболічних станів, пов’язаних із старінням та хронічним надмірним споживанням глікемічних вуглеводів, які мають вирішальний цитолітичний вплив за рахунок окисного пошкодження [147]. Тоді як, нові дані показали, що хронічне зловживання високофруктозною дієтою викликає метаболічні порушення та відповідно супутні захворювання, такі як ожиріння, ЦД2 [32, 64]. Саме тому, існує потреба в дослідженнях для вивчення взаємозв'язку між пошкодженням МА, яке проявляється поступовою втратою їх фізіологічної цілісності, та порушенням окисно-відновної рівноваги під час старіння за умов HFD. Це допоможе у майбутньому розробити ефективну цільову терапію, оскільки H_2S має антиокисну дію і може контролювати процеси, важливі для окисно-відновної рівноваги.

Нещодавні дослідження встановили, що ожиріння пов'язане з порушенням регуляції синтезу адипокінів та появою хронічного системного низькоінтенсивного запалення (англ.: Low grade inflammation) у жировій тканині [106]. Роль H_2S у даному контексті є малодослідженою та широко не вивчалась. Було виявлено, що висока концентрація глюкози (25 мМ) зменшує

експресію CSE на рівні мРНК в адипоцитах лінії 3T3-L1, що пов'язано з підвищенням активності хемоаттрактантного білка моноцитів-1 (MCP-1) та зменшенням активності адипонектину [73, 160]. Крім того, за умов моделювання гіперекспресії CSE або введення NaHS простежується зниження синтезу MCP-1 і підвищення синтезу адипонектину. Дані вказують на шкідливий вплив гіперглікемії на адипокіновий профіль, що може бути викликано, принаймні частково, дефіцитом H_2S у жировій тканині.

Ряд досліджень показали, що вміст маркерів прозапальних реакцій тісно пов'язаний з ЦД2 та є визнаним фактором ризику розвитку ЦД2 у майбутньому [12, 58, 94]. На даний час численні доклінічні та клінічні дослідження переконливо підтверджують думку про те, що запалення, викликане ожирінням, відіграє важливу роль у розвитку інсулінорезистентності та ЦД2 [65, 189]. При ожирінні для виникнення перших проявів хронічного низькоінтенсивного (асептичного) запалення потрібне тривале надмірне гіперкалорійне харчування. Даний вид запалення, що викликається ожирінням, формує «metabolic inflammation» і є найбільш важким ускладненим його проявом в інсуліночутливих тканинах. Такий стан характеризується надмірною секрецією цитокінів, хемокінів та інфільтрацією жирової тканини імунними клітинами [180]. За умов ожиріння жирова тканина продукує збільшений вміст багатьох прозапальних цитокінів. Саме з цієї причини, біла жирова тканина, вважається основним цитотоксичним органом, набуває властивостей опосередковано індукувати хронічне запалення. Хронічне запалення та метаболічні цитолітичні медіатори, які секретуються жировою тканиною у кров, тісно пов'язані з метаболічними ускладненнями ожиріння, серед яких ЦД2 і атеросклероз [167]. Запалення жирової тканини за умов ожиріння характеризується інфільтрацією макрофагами, що спровоковане руйнуванням адипоцитів і секрецією адипокінів: TNF-α, IL-6 і хемокіну – MCP-1 [199, 258].

За останні 25 років важлива роль, серед протиоксидантних медіаторів належить газотрансмітеру H_2S. На даний час численні дослідницькі групи

науковців вивчають механізми, через які реалізуються дія H_2S на запалення. Згідно нових даних H_2S по-різному впливає на запальний процес у жировій тканині в різних експериментальних моделях [23, 53, 58]. У сучасній літературі є доказові дані, що донори H_2S значно послаблюють адипоцитарний синтез цитокінів, який запускається прозапальними факторами макрофагів [243]. Також H_2S проявляє протизапальний вплив на макрофаги [240]. Особливо важливими є дані, що вказують на порушення ендогенного синтезу H_2S [36, 49, 50, 129] та зниження концентрації H_2S у плазмі за умов ожиріння та ЦД2 [236]. Надлишкова експресія ензиму CSE або екзогенне введення NaHS збільшує вміст ендогенного H_2S та значно пригнічує індуковану високим рівнем глюкози – секрецію MCP-1 у зрілих адипоцитах – лінії 3T3-LI, що свідчить про те, що H_2S проявляє протизапальну дію на зрілі адипоцити [160]. Подальші дослідження показали, що ожиріння провокує збільшення синтезу H_2S, а також збільшує споживання H_2S, ймовірно, через стимулювання катаболізму H_2S радикальними частинками – активними формами оксигену та нітрогену [225]. Також, у моделях хронічного запалення у мишей з ожирінням показано зменшення ендогенного H_2S. Під час ожиріння надходження Ca^{2+}, яке здійснюється під контролем депо-керованого входу кальцію (від англ: Store-operated calcium entry, SOCE), збільшується одночасно зі споживанням H_2S, а зниження концентрації внутрішньоклітинного H_2S сприяє збільшує SOCE [256]. Активування шляху SOCE під час прозапального стимулювання забезпечує використання сигнального шляху Ca^{2+} необхідного для активування ядерного чинника активації Т-клітин (від англ.: Nuclear factor of activated T-cells, NFAT) і ядерного фактора «каппа-бі» (від англ.: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-kB), а також факторів транскрипції, відповідальних за експресію генів, що кодують цитокіни [113, 256]. Гальмування SOCE або зменшення втрат ендогенного H_2S в адипоцитах, також знижує секрецію прозапальних цитокінів. Таким чином H_2S відіграє важливу протизапальну роль у жировій тканині мишей з експериментальним ожирінням [160].

Враховуючи опрацьовані літературні джерела, актуальним завданням є вивчення впливу H_2S на мезентеріальні адипоцити у віковому аспекті, за умов HFD, індукції гострого стресу і впливу нестероїдних протизапальних препаратів (NSAIDs). Важливою ознакою ожиріння є накопичення макрофагів в жировій тканині та їхнє трансформування від протизапального (M2) до прозапального (M1) фенотипів. Такі зміни з M2 на M1 опосередковані відкриттям кальцієвих каналів плазматичної мембрани та збільшенням внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+}. Макрофаги жирової тканини, отримані від мишей з ожирінням, що було викликане високофруктозним харчуванням, характеризувались більш низькою внутрішньоклітинної концентрацією H_2S, незважаючи на високу експресію і активність CSE. Ліпополісахарид збільшував експресію CSE, але зменшував внутрішньоклітинний вміст H_2S у культивованих культурах макрофагів – RAW264.7, вказуючи на те, що запалення пов'язане з дефіцитом H_2S, швидше за все, через його підвищене споживання і метаболізм. Також встановлено, що дія ліпополісахариду стимулювала надходження кальцію, залучаючи SOCE. У той час, як GYY4137 не впливав на шлях SOCE. Більше того, використання для пригнічення синтезу ензиму CSE – PAG, амінооксиацетату та речовини siRNA знижували внутрішньоклітинний синтез H_2S і стимулювали відповідь SOCE у клітинних культурах макрофагів RAW264.7 та у макрофагах мишей. Збільшення маркерів M1 – IL-6, IL-1β, синтази оксиду азоту та зниження маркерів M2 – аргіназа-2 або рецептора манози C тип-1 у мишей з надмірною вагою при ожирінні, гальмувалось введенням – GYY4137 або інгібіторів SOCE. Підсумовуючи отримані результати можна стверджувати, що дефіцит H_2S сприяє активуванню SOCE і переродженню макрофагів жирової тканини з протизапального фенотипу на прозапальний фенотип за умов ожиріння [160].

Враховуючи опрацьовані літературні джерела, актуальним завданням є вивчення впливу H_2S на мезентеріальні адипоцити у віковому аспекті, за умов HFD, індукції гострого стресу і впливу нестероїдних протизапальних препаратів (NSAIDs).

На даний час ми маємо обмежені знання про значення H_2S у енергетичних і метаболічних процесах у аспекті функціонування брижі, а саме мезентеріальних адипоцитів та змін функцій їхніх мітохондрій, і впливу на інші компоненти брижі: мезентеріальні судини, фібробласти та елементи сполучної тканини. Знання про фізіологічне значення ендогенного H_2S для міжклітинних і внутрішньоклітинних процесів впливають на наше розуміння окисно-відновної рівноваги, гомеостазу клітин та клітинної смерті, синтезу прозапальних молекул у цитоплазмі та можливий потенціал для таргентної терапії [44].

У світлі останніх даних є можливість досліджувати ультраструктурні мітохондріальні зміни за допомогою класичної трансмісійної електронної мікроскопії або 3D серійного сканування [131]. Ключовими для розуміння метаболічних процесів є зміни у мітохондріях, а також електронномікроскопічні дослідження ультраструктурних змін клітинного складу брижі у віковому аспекті, цитолітичного впливу на тлі високофруктозної дієти. Отримані результати електронної мікроскопії брижі у нашому експериментальному дослідженні продемонстрували існування вікових змін мезентеріальних клітин, у тому числі адипоцитів, стану ендотелію гемокапілярів і сполучної тканини. Встановлено, що у старих тварин були характерні гіпертрофічні зміни МА, які мали ознаки деградації жиру, різної форми та дефектні мітохондрії. У мікросудинах брижі виявлено дисфункцію ендотелію, порушення цілісності базальної мембрани мікросудин.

Численні експериментальні дослідження різних наукових груп показують, що епігенетичні фактори сприяють ризику численних метаболічних порушень, пов’язаних з ожирінням, ЦД2, неалкогольною жировою хворобою печінки (стеатоз печінки) [146, 168].

Дослідження як на людях, так і на тваринах демонструють потенційно негативні ефекти впливу надмірного споживання гіперглікемічних вуглеводів на фізіологічні та метаболічні процеси [98, 121, 148]. В умовах вживання

великої кількості фруктози у харчуванні та вікових змін настає пошкодження адипоцитів, що будуть пов’язані з порушеннями обміну речовин та ожирінням [61, 169]. Клінічні дослідження, вказують, на важливу прогностичну цінність збільшення мезентеріального або вісцерального жиру, як більш ранньої ознаки змін метаболічних процесів, ніж прояви симптомів ендокринних захворювань, пов’язаних з порушенням обміну речовин [125].

У наших дослідженнях було використано тваринні моделі метаболічних розладів, що засновані на 28-денному харчуванні HFD [116]. Така експериментальна модель належить до групи моделей, що індукують метаболічні зміни за допомогою специфічних змін у дієті для гризунів. Ензим фруктозокіназа, каталізуючи реакцію фосфорилювання фруктози, дозволяє фруктозі безперешкодно надходити на ланцюг реакції гліколізу, перетворюючи фруктозу на фруктозо-1,6-бісфосфат, який далі перетворюється у піруват. За таких умов фруктоза може одночасно брати участь у декількох процесах: (а) частина фруктози перетворюється у лактат з піровату, (б) інша частина може перетворитись у тріозо-фосфат, який легко трансформується на глюкозу або глікоген у реакціях глюконеогенезу, (в) частина вуглеводів, отриманих з фруктози, можуть бути трансформовані у жирні кислоти, (d) фруктоза може інгібування окиснення печінкових ліпідів, що сприяє синтезу ліпопротеїдів дуже низької щільності – тригліцеридів та повторній етерифікації жирних кислот [15]. У результаті цього фруктоза швидко поглинається і легко метаболізується печінкою з утворенням молекул глюкози, глікогену, піровату, лактату, гліцерину та ацил-гліцерину. Надмірне споживання фруктози спричиняє постпрандіальну гіперглікемію і секрецію інсуліну. Утилізація глюкози відбувається за допомогою гліколізу і конвертації глюкози у глікоген у печінці та м’язах. Інсулін, у свою чергу, впливає на жирову тканину і стимулює синтез жирних кислот та їхнє нагромадження в адипоцитах, викликаючи їхні зміни.

Для встановлення фізіологічних змін брижі під час старіння та впливу високовуглеводного висококалорійного харчування, ми порівнювали вікові

зміни мезентеріальних клітин у щурів, яких годували стандартною та високофруктозною дієти. Вибір індукції гострого WIRS був важливим для вивчення адаптивних змін мезентеріальних клітин під час гострого ушкодження. Дана модель WIRS спочатку була розроблена для вивчення гастроцитопротекції (Takagi, Okabe, 1968), але в подальшому швидко стала широко використовуватись для кращого розуміння цитопротекторних ефектів у травній системі та генералізованих ефектів на організм [219]. Огляд доступної нам літератури підтвердив, що використання моделі WIRS для вивчення адаптаційно-компенсаторних змін брижі, нами було зроблено вперше.

Під час електронномікроскопічного аналізу тканин брижі дорослих щурів, що перебували під час дослідження на SD, було виявлено, що основною складовою брижі є сполучна тканина у якій розміщуються популяції адипоцитів з мітохондріями нормальної будови та добре розвинутими гемокапілярами, нами встановлено, що у старих щурів вікові зміни характеризувались дегенерацією адипоцитів з наявністю у їх цитоплазмі фрагментованих великих ліпідних крапель та появою мітохондрій різної форми.

За результатами ультраструктурного дослідження отриманого матеріалу з брижі дорослих щурів, які перебували на HFD, було виявлено пошкодження мезентеріальних білих адипоцитів, що характеризувалось деструкцією базальної мембрани МА, фрагментацією великих ліпідних крапель з появою великої кількості дрібних ліпідних крапель у цитоплазмі, і появою змінених мітохондрій різної форми. Також були виявлені ознаки пошкодження ендотеліоцитів гемокапілярів брижі та ознаки альтерації фібробластів у щурів, яких годували високофруктозним харчуванням та проводили індукцію гострого стресу. Дані результати підтверджують інші дослідження, що досліджували метаболічні порушення за умов HFD та спричинені ними зміни, які аналогічні для пришвидшеного старіння [197]. Нами встановлено ультраструктурні зміни МА у старих щурів, які перебували на HFD і

проявлялись появою круглої форми мітохондрій та великої кількості дрібних ліпідних крапель у периферійних ділянках цитоплазми адипоцитів. Змінені форма та розмір мітохондрій можуть бути ознаками мітоптозу – самоліквідації функціонально неспроможних мітохондрій за умов надмірного нагромадження вільних радикалів, що свідчить про порушення окисно-відновних процесів [100, 213].

Отже, 4-тижнева HFD викликала гіпертрофічні та гіперпластичні зміни МА з ознаками порушень мітохондріальних процесів і ендотеліальної дисфункції та дезорганізацію сполучної тканини. Дані зміни можуть бути спричині дисбалансом окисно-відновної рівноваги і тригером для метаболічних порушень та окисних пошкоджень. Індукція гострого стресу підсилювала цитолітичний вплив HFD і показала існування відмінностей адаптивних реакцій брижі у віковому аспекті.

Ми висунули гіпотезу, що вивчаючи біомаркери продуктів перекисного окиснення ліпідів на основі визначення вмісту реакційноздатних речовин тіобарбітуротової кислоти (TBARS) та активності ензимів, що беруть участь у синтезі H_2S, ми зможемо з'ясувати механізм ефекту H_2S на брижу та МА у експериментальній моделі метаболічних порушень, викликаних високофруктозним харчування, і використовуючи щурів різного віку. До ензимів, що беруть участь у синтезі H_2S було включено визначення активності CSE, CBS, TST та SO, які контролюють окисно-відновні реакції на внутрішньоклітинному та міжклітинному рівнях. Оскільки, відомо про широке коло ефектів впливу газотрансмітера H_2S на поширення запалення, пригнічення лейкоцитарно-ендотеліальної адгезії, енергетичні процеси у мітохондріях, та окисно-відновну рівновагу, що були широко досліджувані упродовж останніх десятиліть і використовуються при впроваджені нових терапевтичних стратегій [17, 66, 163] у нашому дослідженні ми застосовували екзогенне введення NaHS, що стимулює збільшення ендогенного вмісту H_2S. У зв'язку з вище викладеним, у наступному етапі нашого дослідження було детально вивчено ранні вікові зміни брижі дорослих та старих щурів, що

отримували SD чи HFD з урахуванням стану окисно-відновних реакцій мезентеріальної тканини з акцентом на вміст TBARS та активність ензимів CSE, CBS, TST та SO, за умов індукції стресу та стимуляції біодоступності ендогенного H_2S за умов екзогенного введення його донорів – NaHS та H_2S-ASA.

Оскільки, нещодавні дослідження декількох наукових центрів продемонстрували, що стимулювання ендогенного синтезу H_2S може позитивно впливати на збереження фізіологічних властивостей адипоцитів людини доцільними будуть дослідження сполук донорів сірководню для функціонування мезентеріальної жирової тканини [58, 59]. Ми вивчали вплив NaHS на зміни окисно-відновної рівноваги мезентеріальних клітин щурів, що споживали HFD. У нашому дослідженні встановлено у старих щурів, що перебували на HFD, відбулось підвищення вмісту TBARS і виявлено зниження активності ензимів, які відповідають за продукцію H_2S. Стимулювання синтезу ендогенного H_2S за допомогою NaHS викликала цитопротекцію МА та ендотеліоцитів капілярів брижі, зменшувало вміст TBARS і підвищувало каталітичну активність ензимів синтезу H_2S, які регулюють окисно-відновну рівновагу за допомогою різних міжклітинних та внутрішньоклітинних шляхів [147, 165]. Дані наших результатів вперше продемонстрували, що H_2S-пов’язані шляхи регуляції є важливими для мезентеріальних цитопротекторних реакцій, які забезпечують зниження TBARS і відновлення порушень окисно-відновної рівноваги, що регулюється внутрішньоклітинною та позаклітинною активністю ензимів CBS, CSE, TST та SO. У перспективі було б цікаво дослідити функцій мітохондрій МА за умов порушення окисно-відновної рівноваги, зумовленого вільними радикалами, та моделювання програмованої клітинної смерті на тлі введення донорів синтезу H_2S.

Існує декілька пояснень зв’язку між білими адипоцитами, запаленням та окисно-відновною рівновагою, що є важливим для підтримання метаболічного гомеостазу та структурно-функціональної цілісності адипоцитів, ендотеліальних клітин капілярів та фібробластів у брижі [109, 124, 136, 137,

157]. Існують докази, що трансформаційні зміни мітохондрій білих адипоцитів, їхнє поглинання макрофагами індукує асептичне запалення і призводить до виникнення ожиріння [37, 45, 149, 260]. Беручи до уваги, що за умов норми адипоцити забезпечують збереження метаболізму, гомеостаз та цілісність жирової тканини, застосування NaHS виявило виразну мітопротекторну дію у МА. Наші результати показали важливість ендогенної продукції H_2S для підтримки цілісності мезентеріальних клітин, які спровоковані старінням. Цікаво відзначити, що стимулювання вироблення ендогенного H_2S за допомогою NaHS продемонструвало зниження рівня пошкоджень мезентеріальної жирової тканини, порушень мітохондрій та окисно-відновної рівноваги у дорослих та старих щурів, як за SD, так і за HFD.

Для дослідження впливу H_2S часто використовують спотворення стереотипу відповіді, застосовуючи блокування синтезу H_2S. Проте, останні дослідження показали, що використання з експериментальною метою наявних інгібіторів синтезу ензимів CBS і CSE має обмежений характер, через їхню погану мембранну проникність та низьку специфічність. Окрім того, у лініях експериментальних тварин з повним чи частковим пригніченням синтезу ензимів CBS, CSE виявляють значну кількість аномалій, що не дозволяє використовувати їх у моделюванні патологій у людей. Тому, більш доцільно зосередити увагу на напрямках направлених на шлях ендогенного збільшення синтезу H_2S за допомогою екзогенних донорів сірководню. Враховуючи позитивний вплив H_2S на адипоцити, що проявляється – протизапальними, захисними та інсулін-сенсибілізуючими властивостями, а також позитивним ефектом на тонус судин, можна передбачати, що посилення активності ензимів, залучених у сигнальні шляхи синтезу H_2S, може мати потенціал для розроблення нових терапевтичних стратегій. Використання екзогенних донорів H_2S для збільшення ендогенного вмісту H_2S викликає значний науковий інтерес для можливої терапії таких широко поширених захворювань, як ожиріння та ЦД2 (рис. 5.1).

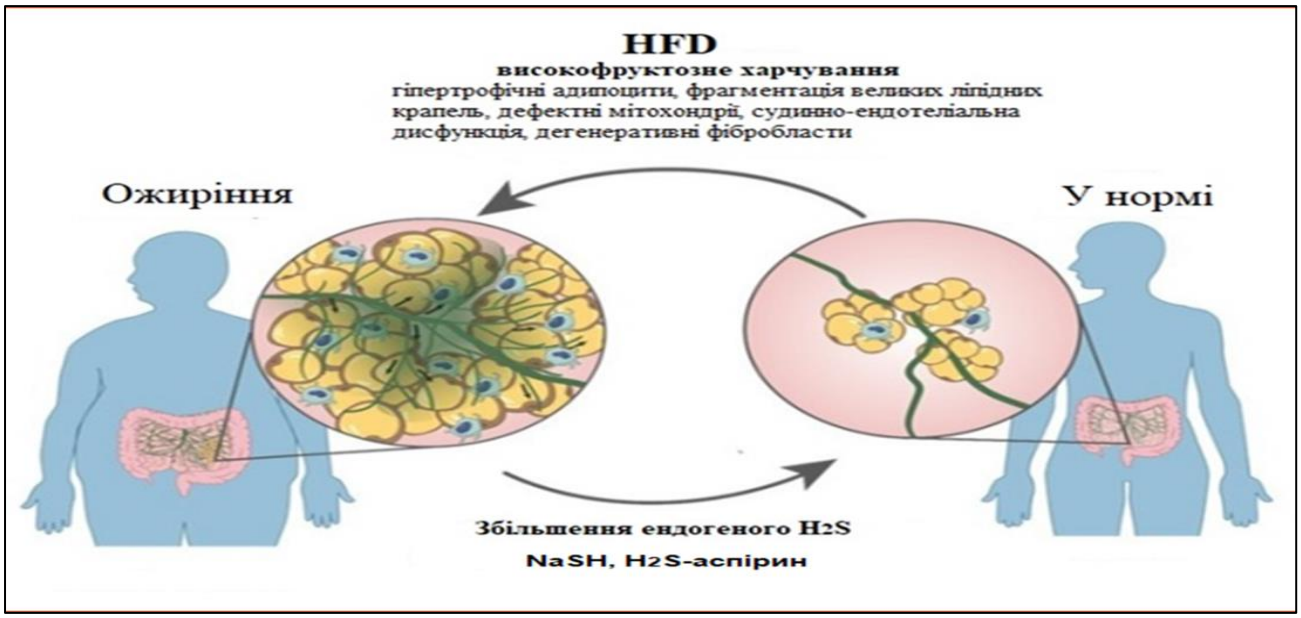

Рис 5.1 Вплив H_2S на білі мезентеріальні адипоцити і стромально-судинні клітини брижі

У більшості досліджень впливу H_2S – використовують неорганічні сульфіди, такі як гідросульфід натрію (NaHS) і сульфід натрію (Na_2S), основним недоліком яких є швидке та короткотривале збільшення концентрації H_2S [175]. NaHS може активувати ATP-залежні калієві канали (K^+_{ATP}), протеїнкіназу B/Akt або Nrf2 - індуковані шляхи [255]. Для подолання недоліків сульфідних солей було синтезовано декілька органічних донорів H_2S зі сповільненим вивільненням, найбільш популярним з яких є – GYY4137, але вони володіють H_2S-незалежною активністю [155]. L-цистеїн широко використовується в експериментальних дослідженнях для збільшення ендогенного синтезу H_2S. Основним недоліком L-цистеїну, як попередника H_2S є то, що він може метаболізуватись різними шляхами. В останні роки була розроблена нова група донорів H_2S. Ця група представлена гібридними сполуками класичних нестероїдних протизапальних препаратів, що містять додаткову структурно модифіковану молекулу для ендогенного вивільнення H_2S (H_2S-NAID). Новітні H_2S-NAID мають протизапальну дію і потенційно володіють захисними властивостями відносно травної та серцево-судинної системи [175, 228, 229]. Розробка і застосування донорів H_2S з різним впливом

може відіграти вирішальне значення для розуміння усіх біологічних функцій H_2S. У наших дослідженнях ми використовували сполуку з групи H_2S-NAID – ATB-340, що показала виразну цитопротекторну дію на мезентеріальні клітини за умов HFD у старих щурів та антирадикальну дію за рахунок зменшення вмісту TBARS і збільшення активності CBS, CSE, TST та зменшення активності SO.

Узагальнюючи наші дослідження, ми дійшли висновку, що ендогенний сірководень, який синтезується мезентеріальними адипоцитами і ендотеліоцитами, бере участь у механізмах цитопротекції, регуляції окисно-відновної рівноваги, проявляючи мітопротекторну і антирадикальну дію. Наші результати вказують, що H_2S – важлива біорегуляторна сполука, що забезпечує міжклітинну комунікацію у брижі. Хоча за останні роки досягнуто значного прогресу у вивчені функціонального значення H_2S, залишається ще багато недосліджених аспектів ролі цього біорегулятора, які потребують ґрунтовного вивчення. Так наукові дані про ефекти H_2S у жировій тканині, його роль в регуляції чутливості до інсуліну і ліполізі, часто показують суперечливі відомості [11, 34, 42, 82, 93].

У нашому досліджені встановлено, що H_2S відіграє вагому роль на клітини брижі у нормалізації мітохондріальної дисфункції мезентеріальних адипоцитів, зменшені ознак ендотеліальної дисфункції та альтерації фібробластів, та відновленні окисно-відновної рівноваги за умов виникнення змін брижі унаслідок старіння та високофруктозного харчування. Дані спостереження можна використати у подальшому для вироблення оптимальних терапевтичних стратегій. А застосування гібридних сполук H_2S-асоційованих нестероїдних протизапальних препаратів, як донорів ендогенного синтезу H_2S має перспективи з огляду на залучення їх у молекулярно-клітинні механізми природної резистентності брижі, що забезпечуються активністю циклооксигеназ та синтезу простаноїдів.

Таким чином, проведені нами дослідження дозволяють зробити нижчезазначені висновки.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено шляхи вирішення актуального наукового завдання медицини, зокрема фізіології, що стосується комплексного морфо-функціонального дослідження брижі та її тканинних компонентів в аспекті вікових змін, за високофруктозного харчування, індукції гострого стресу та їх поєднання. В роботі описано наслідки впливу сполук натрію сульфіту і H_2S-аспірину (АТВ-340), здатних збільшувати ендогенний вміст сірководню, які дозволяють поглибити уявлення про особливості цитопротекції брижі та її клітинних компонентів, залежно від ендогенного вмісту H_2S. Досліджено цитодеструктивні впливи різного ґенезу, що відбуваються під впливом гіперглікемії та окисного стресу, залежно від активності, залучених у синтез H_2S ензимів та окисно-відновні процеси. Результати роботи дозволяють експериментально обґрунтувати доцільність використання натрію сульфіту та АТВ-340 для цитопротекції в брижі та проявів дисбалансу окисно-відновних процесів у щурів різного віку, за умов поєднаного впливу стресу та високофруктозного харчування.

1. На моделі брижі у щурів проведено морфо-функціональні дослідження ультраструктурної організації її тканинних компонентів у віковому аспекті та їхніх адаптаційно-компенсаторних реакцій за індукції гострого стресу та залежно від активності циклооксигенази. З’ясовано, що у старих щурів порівняно до дорослих присутні дегенеративні зміни у мезентеріальних адипоцитах з появою фрагментації великих ліпідних крапель, наявністю дефектних мітохондрій зі зміненою формою та розміром, також ендотеліальної дисфункції у мікросудинах брижі.

2. На моделі 28-денного високофруктозного харчування в аспекті вікових змін виявлено особливості мезентеропатії у старих тварин. Її характерними ознаками були гіперпластичні зміни жирової тканини у брижі, якій були притаманні дегенеративно змінені та гіпертрофовані білі адипоцити з ознаками мітоптозу, що свідчить про порушення процесів, які відбуваються

в мітохондріях, а також про порушення цілісності мікросудин і дезорганізацію сполучної тканини. Дослідження індукції гострого стресу виявили вікові відмінності в адаптивних реакціях брижі та підвищенні її чутливості у старих тварин до цитоагресивного впливу за умов високофруктозної дієти, тоді як застосування донорів синтезу сірководню (натрію сульфіту та H_2S-аспірину) нівелювало такі зміни.

3. 28-денне високофруктозне харчування викликало збільшення маси тіла та зростання рівня глюкози натще в обох вікових групах, а також характерні гіпертрофічні та гіперпластичні зміни мезентеріальних адипоцитів брижі та біохімічні зміни активності окисно-відновлювальних процесів. Ці зміни можна трактувати як ранні ознаки пре-метаболічного синдрому у дорослих та старих щурів.

4. Встановлено, що у старих щурів відбувається збільшення вмісту TBARS на 40%, порівняно до дорослих щурів ($p<0,05$). За високофруктозної дієти настає збільшення TBARS на 12-15% в обох вікових групах, порівняно до аналогічних вікових груп ($p<0,05$). Таке зростання може свідчити про залучення механізму окисного стресу, викликаного порушенням окисно-відновлювальних процесів, у цитодиструктивних змінах тканин брижі за умов гіперглікемії та вікових змін. Попереднє введення NaHS призводило до зменшення вмісту TBARS у старих щурів за високофруктозного харчування та індукції гострого стресу.

5. Встановлено вікові відмінності в активності ензимів цистатіонін γ-ліази (CSE), цистатіонін β-синтази (CBS), тіосульфат-сульфуртрансферази (TST), а саме зниження активності даних ензимів у тварин з віком та зростання активності сульфіт оксидази при старінні. Високофруктозна дієта сприяє зменшенню активності вказаних ензимів, тоді як застосування донорів H_2S викликає збільшення каталітичної активності CBS, CSE, TST. Ці результати опосередковано свідчать про збільшення ендогенного синтезу H_2S, який володіє вазодилятаційним, антиокисним і протиапоптичним ефектами на тканину брижі.

6. Зміни мезентеріальних адипоцитів брижі, їхніх мітохондрій та мезентеріальної сполучної тканини можуть мати оборотний характер за умов застосування екзогенних донорів H_2S – NaHS і АТВ-340, що свідчить про цитопротекторну дію ендогенного H_2S. Результати досліджень із застосування NaHS і АТВ-340 допомагають кращому розумінню механізмів формування вікових змін резистентності тканин брижі та значення ендогенного синтезу гідроген сульфіду у протидії пошкоджувальним чинникам, що лежать в основі мезентеріальної патології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Була Н, Павловський Я, Ревенко О. Вплив сірководню на зміни цитопротекції за умов стресу. В: Сабо Ш., Сабо К., Заячківська О. Стрес: від Ганса Сельє до сьогодні. Львів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Наукове товариство ім. Шевченка; 2019. Розд.10, с.109-111.
2. Коробейникова ЭН. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой. Клиническая лабораторная диагностика. 1989(7):8-10.
3. Ревенко О, Заячківська О. Відмінності функціонування мітохондрій жирової тканини брижі за умов надмірного споживання фруктози та екзогенного введення донорів сірководню. XVIII Конгрес СФУЛТ. Львів, 1-3 жовтня 2020. Матеріали міжнародного наукового конгресу, тези доп. Львів-Київ-Чикаго, 2020. С. 192-
4. Ревенко ОВ, Заячківська ОС. Вікові морфо-функціональні зміни структур брижі за умов стрес-індукованих пошкоджень і дії гідроген сульфіду (H_2S). Клінічна та експериментальна патологія. 2018(17,№ 3 (2)):104-8.
5. Ревенко ОВ. Морфо-функціональні особливості білого жиру очеревини за умов стресу. Всеукраїнська науково-практична конференція «Довкілля і здоров'я»: тези доп. Тернопіль, 2018. С. 51-52.
6. Савицька МЯ, Суходольська НВ, Ковальчук ІМ, Була НС, Ревенко ОВ, Лис ОБ, Павловський ЯІ. Фізіологія травлення: навчальний посібник до практичних занять та самостійної роботи для студентів-магістрів медичного факультету. Львів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького; 2019. 102 с.
7. Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. Journal of Neuroscience. 1996 Feb 1;16(3):1066-71.

8. Agabiti-Rosei C, Paini A, De Ciuceis C, Withers S, Greenstein A, Heagerty AM, Rizzoni D. Modulation of vascular reactivity by perivascular adipose tissue (PVAT). Current hypertension reports. 2018 May;20(5):1-1.
9. Aghamohammadzadeh R, Greenstein AS, Yadav R, Jeziorska M, Hama S, Soltani F, Pemberton PW, Ammori B, Malik RA, Soran H, Heagerty AM. Effects of bariatric surgery on human small artery function: evidence for reduction in perivascular adipocyte inflammation, and the restoration of normal anticontractile activity despite persistent obesity. Journal of the American College of Cardiology. 2013 Jul 9;62(2):128-35.
10. Ahmad A, Dempsey SK, Daneva Z, Azam M, Li N, Li PL, Ritter JK. Role of nitric oxide in the cardiovascular and renal systems. International journal of molecular sciences. 2018 Sep;19(9):2605.
11. Akahoshi N, Yokoyama A, Nagata T, Miura A, Kamata S, Ishii I. Abnormal amino acid profiles of blood and cerebrospinal fluid from cystathionine β-synthase-deficient mice, an animal model of homocystinuria. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2019 Jun 1;42(6):1054-7.
12. Akash MS, Rehman K, Chen S. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Journal of cellular biochemistry. 2013 Mar;114(3):525-31.
13. Aktay G, Gürsoy ŞÖ, Uyumlu U, Ünüvar S, İlhan N. Protective effect of atorvastatin on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats independently their lipid-lowering effects. Journal of biochemical and molecular toxicology. 2019 May;33(5):e22295.
14. Altoum AE, Osman AL, Babker AM. Correlation of oxidative stress markers malondialdehyde (MDA), antioxidant vitamins A, E, and C with glycated hemoglobin (HBA1C) levels in Type 2 diabetes mellitus. Asian J Pharm Clin Res. 2018;11(5):281-3.
15. Ambati S, Yang JY, Rayalam S, Park HJ, Della-Fera MA, Baile CA. Ajoene exerts potent effects in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting adipogenesis and inducing apoptosis. Phytotherapy Research: An International Journal

Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2009 Apr;23(4):513-8.

16. Amiri S. Obesity and overweight prevalence in immigration: A Meta-analysis. Obesity Medicine. 2021 Jan 28:100321.
17. Andreadou I, Schulz R, Papapetropoulos A, Turan B, Ytrehus K, Ferdinandy P, Daiber A, Di Lisa F. The role of mitochondrial reactive oxygen species, NO and H_2S in ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection. Journal of cellular and molecular medicine. 2020 Jun;24(12):6510-22.
18. Argikar AA, Argikar UA. The mesentery: an ADME perspective on a 'new'organ. Drug metabolism reviews. 2018 Jul 3;50(3):398-405.
19. Arner P, Langin D. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. Trends in Endocrinology & Metabolism. 2014 May 1;25(5):255-62.
20. Asakawa A, Inui A, Inui T, Katsuura G, Fujino MA, Kasuga M. Leptin treatment ameliorates anxiety in ob/ob obese mice. Journal of diabetes and its complications. 2003 Mar 1;17(2):105-7.
21. Asano M, Nakano F, Nakatsukasa E, Tsuduki T. The 1975 type Japanese diet improves the gut microbial flora and inhibits visceral fat accumulation in mice. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2020 Jul 2;84(7):1475-85.
22. Barella LF, Jain S, Kimura T, Pydi SP. Metabolic roles of G protein-coupled receptor signaling in obesity and type 2 diabetes. The FEBS Journal. 2021 Apr;288(8):2622-44.
23. Barton M, Meyer MR. HuR-ry up: how hydrogen sulfide protects against atherosclerosis.
24. Beigneux AP, Allan CM, Sandoval NP, Cho GW, Heizer PJ, Jung RS, Stanhope KL, Havel PJ, Birrane G, Meiyappan M, Gill JE. Lipoprotein lipase is active as a monomer. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2019 Mar 26;116(13):6319-28.

25. Bellocchio L, Cervino C, Vicennati V, Pasquali R, Pagotto U. Cannabinoid type 1 receptor: another arrow in the adipocytes' bow. Journal of neuroendocrinology. 2008 May;20:130-8.
26. Bełtowski J, Jamroz-Wiśniewska A. Hydrogen sulfide in the adipose tissue—physiology, pathology and a target for pharmacotherapy. Molecules. 2017 Jan;22(1):63.
27. Bełtowski J, Wójcicka G, Jamroz-Wiśniewska A. Hydrogen sulfide in the regulation of insulin secretion and insulin sensitivity: Implications for the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus. Biochemical pharmacology. 2018 Mar 1;149:60-76.
28. Beltowski J, Wojtak A. Divergent effects of hydrogen sulfide and polysulfides on inflammatory phenotype of perivascular adipose tissue. Atherosclerosis. 2019 Aug 1;287:e243-4.
29. Bełtowski J. Endogenous hydrogen sulfide in perivascular adipose tissue: role in the regulation of vascular tone in physiology and pathology. Canadian journal of physiology and pharmacology. 2013;91(11):889-98.
30. Beltowski J. High fat diet-induced obesity augments H_2S in perivascular adipose tissue by cannabinoid-mediated decrease in mitochondrial biogenesis. Atherosclerosis. 2015 Jul 1;241(1):e28.
31. Bernier-Latmani J, Petrova TV. Intestinal lymphatic vasculature: structure, mechanisms and functions. Nature reviews Gastroenterology & hepatology. 2017 Sep;14(9):510-26.
32. Bidwell AJ. Chronic fructose ingestion as a major health concern: is a sedentary lifestyle making it worse? A review. Nutrients. 2017 Jun;9(6):549.
33. Bilski J, Mazur-Bialy A, Wojcik D, Surmiak M, Magierowski M, Sliwowski Z, Pajdo R, Kwiecien S, Danielak A, Ptak-Belowska A, Brzozowski T. Role of obesity, mesenteric adipose tissue, and adipokines in inflammatory bowel diseases. Biomolecules. 2019 Dec;9(12):780.

34. Bolsoni-Lopes A, Alonso-Vale MI. Lipolysis and lipases in white adipose tissue–An update. Archives of endocrinology and metabolism. 2015;59:335-42.
35. Boudina S, Graham TE. Mitochondrial function/dysfunction in white adipose tissue. Experimental physiology. 2014 Sep 1;99(9):1168-78.
36. Brancaleone V, Roviezzo F, Vellecco V, De Gruttola L, Bucci M, Cirino G. Biosynthesis of H_2S is impaired in non-obese diabetic (NOD) mice. British journal of pharmacology. 2008 Nov;155(5):673-80.
37. Brestoff JR, Wilen CB, Moley JR, Li Y, Zou W, Malvin NP, Rowen MN, Saunders BT, Ma H, Mack MR, Hykes Jr BL. Intercellular mitochondria transfer to macrophages regulates white adipose tissue homeostasis and is impaired in obesity. Cell metabolism. 2021 Feb 2;33(2):270-82.
38. Bula N, Pavlovsky Y, Student V, Revenko O, Wallace JL, Zayachkivska O. Translational aspects of place of hydrogen sulfide-releasing non-steroidal anti-inflammatory drugs on the tomorrow's landscape for stressassociated disorders. Proceeding of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences. 2017 Jun 26;49(1):21-.
39. Bussey CE, Withers SB, Aldous RG, Edwards G, Heagerty AM. Obesity-related perivascular adipose tissue damage is reversed by sustained weight loss in the rat. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2016 Jul;36(7):1377-85.
40. Byrnes KG, Walsh D, Lewton-Brain P, McDermott K, Coffey JC. Anatomy of the mesentery: historical development and recent advances. InSeminars in cell & developmental biology 2019 Aug 1 (Vol. 92, pp. 4-11). Academic Press.
41. Cacanyiova S, Majzunova M, Golas S, Berenyiova A. The role of perivascular adipose tissue and endogenous hydrogen sulfide in vasoactive responses of isolated mesenteric arteries in normotensive and spontaneously hypertensive rats. J. Physiol. Pharmacol. 2019 Apr 1;70:295-306.

42. Cai J, Shi X, Wang H, Fan J, Feng Y, Lin X, Yang J, Cui Q, Tang C, Xu G, Geng B. Cystathionine γ lyase–hydrogen sulfide increases peroxisome proliferator-activated receptor γ activity by sulfhydration at C139 site thereby promoting glucose uptake and lipid storage in adipocytes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2016 May 1;1861(5):419-29.
43. Carmo Filho A, Cunha BD. Inferior mesenteric vein thrombosis and COVID-19. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2020;53.
44. Cedikova M, Kripnerová M, Dvorakova J, Pitule P, Grundmanova M, Babuska V, Mullerova D, Kuncova J. Mitochondria in white, brown, and beige adipocytes. Stem cells international. 2016 Oct;2016.
45. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose tissue distribution, inflammation and its metabolic consequences, including diabetes and cardiovascular disease. Frontiers in cardiovascular medicine. 2020 Feb 25;7:22.
46. Chang L, Villacorta L, Li R, Hamblin M, Xu W, Dou C, Zhang J, Wu J, Zeng R, Chen YE. Loss of perivascular adipose tissue on peroxisome proliferator–activated receptor-γ deletion in smooth muscle cells impairs intravascular thermoregulation and enhances atherosclerosis. Circulation. 2012 Aug 28;126(9):1067-78.
47. Chang L, Zhao X, Garcia-Barrio M, Zhang J, Chen YE. MitoNEET in perivascular adipose tissue prevents arterial stiffness in aging mice. Cardiovascular drugs and therapy. 2018 Oct;32(5):531-9.
48. Cheng CK, Bakar HA, Gollasch M, Huang Y. Perivascular adipose tissue: the sixth man of the cardiovascular system. Cardiovascular drugs and therapy. 2018 Oct;32(5):481-502.
49. Cheng Z, Garikipati VN, Nickoloff E, Wang C, Polhemus DJ, Zhou J, Benedict C, Khan M, Verma SK, Rabinowitz JE, Lefer D. Restoration of hydrogen sulfide production in diabetic mice improves reparative function of bone marrow cells. Circulation. 2016 Nov 8;134(19):1467-83.

50. Cheng Z, Shen X, Jiang X, Shan H, Cimini M, Fang PU, Ji Y, Park JY, Drosatos K, Yang X, Kevil CG. Hyperhomocysteinemia potentiates diabetes-impaired EDHF-induced vascular relaxation: role of insufficient hydrogen sulfide. Redox biology. 2018 Jun 1;16:215-25.
51. Cherian DA, Peter T, Narayanan A, Madhavan SS, Achammada S, Vynat GP. Malondialdehyde as a marker of oxidative stress in periodontitis patients. Journal of pharmacy & bioallied sciences. 2019 May;11(Suppl 2):S297.
52. Cheung SH, Lau JY. Hydrogen sulfide mediates athero-protection against oxidative stress via S-sulfhydration. PLoS One. 2018 Mar 8;13(3):e0194176.
53. Chi Q, Chi X, Hu X, Wang S, Zhang H, Li S. The effects of atmospheric hydrogen sulfide on peripheral blood lymphocytes of chickens: perspectives on inflammation, oxidative stress and energy metabolism. Environmental research. 2018 Nov 1;167:1-6.
54. Cinti S. White, brown, beige and pink: A rainbow in the adipose organ. Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research. 2019 Feb 1;4:29-36.
55. Coffey JC, O'Leary DP. The mesentery: structure, function, and role in disease. The Lancet Gastroenterology & hepatology. 2016 Nov 1;1(3):238-47.
56. Coffey JC, Walsh D, Byrnes KG, Hohenberger W, Heald RJ. Mesentery—a ‘New’organ. Emerging Topics in Life Sciences. 2020 Sep 8;4(2):191-206.
57. Coletta C, Papapetropoulos A, Erdelyi K, Olah G, Módis K, Panopoulos P, Asimakopoulou A, Gerö D, Sharina I, Martin E, Szabo C. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012 Jun 5;109(23):9161-6.
58. Comas F, Latorre J, Cussó O, Ortega F, Lluch A, Sabater M, Castells-Nobau A, Ricart W, Ribas X, Costas M, Fernández-Real JM. Hydrogen sulfide

impacts on inflammation-induced adipocyte dysfunction. Food and Chemical Toxicology. 2019 Sep 1;131:110543.

59. Comas F, Moreno-Navarrete JM. The impact of H_2S on obesity-associated metabolic disturbances. Antioxidants. 2021 May;10(5):633.

60. Conte M, Martucci M, Sandri M, Franceschi C, Salvioli S. The dual role of the pervasive “fattish” tissue remodeling with age. Frontiers in endocrinology. 2019 Feb 26;10:114.

61. Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Valiante S, Liverini G, Iossa S. Adipose tissue remodeling in rats exhibiting fructose-induced obesity. European journal of nutrition. 2014 Mar 1;53(2):413-9.

62. Dalla Pria HR, Torres US, Velloni F, Santiago RA, Zacarias MS, Silva LF, Tamamoto F, Walsh D, von Atzingen AC, Coffey JC, D'Ippolito G. The mesenteric organ: new anatomical concepts and an imaging-based review on its diseases. InSeminars in Ultrasound, CT and MRI 2019 Dec 1 (Vol. 40, No. 6, pp. 515-532). WB Saunders.

63. De Cicco P, Panza E, Ercolano G, Armogida C, Sessa G, Pirozzi G, Cirino G, Wallace JL, Ianaro A. ATB-346, a novel hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug, induces apoptosis of human melanoma cells and inhibits melanoma development in vivo. Pharmacological research. 2016 Dec 1;114:67-73.

64. de Farias Lelis D, Andrade JM, Almenara CC, Broseguini-Filho GB, Mill JG, Baldo MP. High fructose intake and the route towards cardiometabolic diseases. Life Sciences. 2020 Aug 12:118235.

65. Deng J, Wang M, Guo Y, Fischer H, Yu X, Kem D, Li H. Activation of α7nAChR via vagus nerve prevents obesity-induced insulin resistance via suppressing endoplasmic reticulum stress-induced inflammation in Kupffer cells. Medical hypotheses. 2020 Jul 1;140:109671.

66. Dilek N, Papapetropoulos A, Toliver-Kinsky T, Szabo C. Hydrogen sulfide: An endogenous regulator of the immune system. Pharmacological research. 2020 Aug 8:105119.

67. Ding Y, Wang H, Geng B, Xu G. Sulfhydration of perilipin 1 is involved in the inhibitory effects of cystathionine gamma lyase/hydrogen sulfide on adipocyte lipolysis. Biochemical and biophysical research communications. 2020 Jan 15;521(3):786-90.
68. Do TT, Marie G, Héloïse D, Dorothée G, Marthe M, Bruno F, Marion B. Glucocorticoid-induced insulin resistance is related to macrophage visceral adipose tissue infiltration. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 2019 Jan 1;185:150-62.
69. Dombkowski RA, Russell MJ, Olson KR. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2004 Apr;286(4):R678-85.
70. Dongó E, Benkő Z, Csizmazia Á, Marosi G, Grottke A, Jücker M, Schumacher U, Kiss L. H_2S preconditioning of human adipose tissue-derived stem cells increases their efficacy in an in vitro model of cell therapy for simulated ischemia. Life sciences. 2014 Sep 15;113(1-2):14-21.
71. Dubrovska G, Verlohren S, Luft FC, Gollasch M. Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2004 Mar;286(3):H1107-13.
72. Emile SH. Refining the anatomy of the mesentery: how can it affect management of colorectal cancer?. The Lancet Gastroenterology & Hepatology. 2017 Apr 1;2(4):244.
73. Emilova R, Dimitrova D, Mladenov M, Daneva T, Schubert R, Gagov H. Cystathionine gamma-lyase of perivascular adipose tissue with reversed regulatory effect in diabetic rat artery. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2015 Jan 2;29(1):147-51.
74. Fang L, Zhao J, Chen Y, Ma T, Xu G, Tang C, Liu X, Geng B. Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator. Journal of hypertension. 2009 Nov 1;27(11):2174-85.

75. Feng X, Chen Y, Zhao J, Tang C, Jiang Z, Geng B. Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator. Biochemical and biophysical research communications. 2009 Feb 27;380(1):153-9.
76. Fésüs G, Dubrovska G, Gorzelniak K, Kluge R, Huang Y, Luft FC, Gollasch M. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. Cardiovascular research. 2007 Sep 1;75(4):719-27.
77. Feuerstein JD, Cheifetz AS. Crohn disease: epidemiology, diagnosis, and management. InMayo Clinic Proceedings 2017 Jul 1 (Vol. 92, No. 7, pp. 1088-1103). Elsevier.
78. Fonseca L, Castillo V, Aguirre C, Silva P, Ronco AM, Llanos M. Stress during lactation induces insulin resistance associated with an increase in type 1 cannabinoid receptors in liver and adipose tissue. Journal of nutrition and metabolism. 2019 Jan 17;2019.
79. Fuschillo S, Palomba L, Capparelli R, Motta A, Maniscalco M. Nitric oxide and hydrogen sulfide: a nice pair in the respiratory system. Current medicinal chemistry. 2020 Dec 1;27(42):7136-48.
80. Ge Y, Li Y, Gong J, Zhu W. Mesenteric organ lymphatics and inflammatory bowel disease. Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger. 2018 Jul 1;218:199-204.
81. Gemici B, Elsheikh W, Feitosa KB, Costa SK, Muscara MN, Wallace JL. H_2S-releasing drugs: anti-inflammatory, cytoprotective and chemopreventative potential. Nitric Oxide. 2015 Apr 30;46:25-31.
82. Geng B, Cai B, Liao F, Zheng Y, Zeng Q, Fan X, Gong Y, Yang J, Cui QH, Tang C, Xu GH. Increase or decrease hydrogen sulfide exert opposite lipolysis, but reduce global insulin resistance in high fatty diet induced obese mice. PloS one. 2013 Sep 13;8(9):e73892.
83. Gheibi S, Jeddi S, Kashfi K, Ghasemi A. Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H_2S: Implications in hypertension. Biochemical pharmacology. 2018 Mar 1;149:42-59.

84. Gholami H, Ghasemi A. Effect of thyrotoxicosis on gene expression of hydrogen sulfide-producing enzymes in epididymal adipose tissue of male rats. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism. 2019 Oct 10;21(2):92-101.
85. Glauert AM. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. 1975.
86. Gliemann L, Rytter N, Lindskrog M, Slingsby MH, Åkerström T, Sylow L, Richter EA, Hellsten Y. Endothelial mechanotransduction proteins and vascular function are altered by dietary sucrose supplementation in healthy young male subjects. The Journal of physiology. 2017 Aug 15;595(16):5557-71.
87. Gollasch M. Adipose-vascular coupling and potential therapeutics. Annual review of pharmacology and toxicology. 2017 Jan 6;57:417-36.
88. Goodfellow M, Courtney M, Upadhyay Y, Marsh R, Mahawar K. Mesenteric venous thrombosis due to coronavirus in a post roux-en-y gastric bypass patient: a case report. Obesity Surgery. 2021 May;31(5):2308-10.
89. Grambow E, Klee G, Xie W, Schafmayer C, Vollmar B. Hydrogen sulphide reduces the activity of human endothelial cells. Clinical Hemorheology and Microcirculation. 2020 Aug 27(Preprint):1-1.
90. Graton ME, Potje SR, Troiano JA, Vale GT, Perassa LA, Nakamune AC, Tirapelli CR, Bendhack LM, Antoniali C. Apocynin alters redox signaling in conductance and resistance vessels of spontaneously hypertensive rats. Free Radical Biology and Medicine. 2019 Apr 1;134:53-63.
91. Guedj K, Abitbol Y, Cazals-Hatem D, Morvan M, Maggiori L, Panis Y, Bouhnik Y, Caligiuri G, Corcos O, Nicoletti A. Adipocytes orchestrate the formation of tertiary lymphoid organs in the creeping fat of Crohn's disease affected mesentery. Journal of autoimmunity. 2019 Sep 1;103:102281.
92. Guglielmo FF, Anupindi SA, Fletcher JG, Al-Hawary MM, Dillman JR, Grand DJ, Bruining DH, Chatterji M, Darge K, Fidler JL, Gandhi NS. Small

bowel Crohn disease at CT and MR enterography: imaging atlas and glossary of terms. Radiographics. 2020 Mar;40(2):354-75.

93. Gupta S, Kruger WD. Cystathionine beta-synthase deficiency causes fat loss in mice. PloS one. 2011 Nov 11;6(11):e27598.

94. Gutin L, Piceno Y, Fadrosh D, Lynch K, Zydek M, Kassam Z, LaMere B, Terdiman J, Ma A, Somsouk M, Lynch S. Fecal microbiota transplant for Crohn disease: A study evaluating safety, efficacy, and microbiome profile. UEG Journal. 2019 Jul;7(6):807-14.

95. Hammarstedt A, Gogg S, Hedjazifar S, Nerstedt A, Smith U. Impaired adipogenesis and dysfunctional adipose tissue in human hypertrophic obesity. Physiological reviews. 2018 Oct 1;98(4):1911-41.

96. Hashmi WJ, Ismail H, Jafri L, Mirza B. Ethnopharmacological activity of Hedera nepalensis K. Koch extracts and lupeol against alloxan-induced type I diabetes. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2020 Dec 7;56.

97. He Z, Ning N, Zhou Q, Khoshnam SE, Farzaneh M. Mitochondria as a therapeutic target for ischemic stroke. Free Radical Biology and Medicine. 2020 Jan 1;146:45-58.

98. Henry CJ, Quek RY, Kaur B, Shyam S, Singh HK. A glycaemic index compendium of non-western foods. Nutrition & diabetes. 2021 Jan 6;11(1):1-36.

99. Hilton C, Karpe F, Pinnick KE. Role of developmental transcription factors in white, brown and beige adipose tissues. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2015 May 1;1851(5):686-96.

100. Hiramoto S, Tsubota M, Yamaguchi K, Okazaki K, Sakaegi A, Toriyama Y, Tanaka J, Sekiguchi F, Ishikura H, Wake H, Nishibori M. Cystitis-related bladder pain involves ATP-dependent HMGB1 release from macrophages and its downstream H_2S/Cav3. 2 signaling in mice. Cells. 2020 Aug;9(8):1748.

101. Hsiao WY, Guertin DA. De novo lipogenesis as a source of second messengers in adipocytes. Current diabetes reports. 2019 Nov;19(11):1-3.

102. Huang CW, Moore PK. H_2S synthesizing enzymes: biochemistry and molecular aspects. Chemistry, biochemistry and pharmacology of hydrogen sulfide. 2015:3-25.

103. Huang CY, Yao WF, Wu WG, Lu YL, Wan H, Wang W. Endogenous CSE/H_2S system mediates TNF-α-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. Cell biochemistry and function. 2013 Aug;31(6):468-75.

104. Jia J, Wang Z, Zhang M, Huang C, Song Y, Xu F, Zhang J, Li J, He M, Li Y, Ao G. SQR mediates therapeutic effects of H_2S by targeting mitochondrial electron transport to induce mitochondrial uncoupling. Science advances. 2020 Aug 1;6(35):eaaz5752.

105. Jiang JL, Tian Y, Li L, Yu M, Hou RP, Ren XM. H_2S alleviates salinity stress in cucumber by maintaining the Na^+/K^+ balance and regulating H_2S metabolism and oxidative stress response. Frontiers in plant science. 2019 May 28;10:678.

106. Jing H, Gao X, Xu L, Lin H, Zhang Z. H_2S promotes a glycometabolism disorder by disturbing the Th1/Th2 balance during LPS-induced inflammation in the skeletal muscles of chickens. Chemosphere. 2019 May 1;222:124-31.

107. Kaczmarek A, Muzolf-Panek M. Predictive modeling of changes in TBARS in the intramuscular lipid fraction of raw ground beef enriched with plant extracts. Antioxidants. 2021 May;10(5):736.

108. Kagota S, Maruyama-Fumoto K, Iwata S, Shimari M, Koyanagi S, Shiokawa Y, McGuire JJ, Shinozuka K. Perivascular adipose tissue-enhanced vasodilation in metabolic syndrome rats by apelin and n-acetyl–l-cysteine-sensitive factor (s). International journal of molecular sciences. 2019 Jan;20(1):106.

109. Kahn CR, Wang G, Lee KY. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. The Journal of clinical investigation. 2019 Oct 1;129(10):3990-4000.

110. Kaisanlahti A, Glumoff T. Browning of white fat: agents and implications for beige adipose tissue to type 2 diabetes. Journal of physiology and biochemistry. 2019 Feb;75(1):1-0.

111. Katsouda A, Szabo C, Papapetropoulos A. Reduced adipose tissue H_2S in obesity. Pharmacological research. 2018 Feb 1;128:190-9.

112. Ketonen J, Shi J, Martonen E, Mervaala E. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. Circulation Journal. 2010;74(7):1479-87.

113. Kim Y, Moon JS, Lee KS, Park SY, Cheong J, Kang HS, Lee HY, Do Kim H. Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates the expression of iNOS through IKK and NF-κB activity in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages and RAW 264.7 cells. Biochemical and biophysical research communications. 2004 Feb 13;314(3):695-703.

114. Kiriyama Y, Nochi H. Intra-and intercellular quality control mechanisms of mitochondria. Cells. 2018 Jan;7(1):1.

115. Korakas E, Ikonomidis I, Kousathana F, Balampanis K, Kountouri A, Raptis A, Palaiodimou L, Kokkinos A, Lambadiari V. Obesity and COVID-19: immune and metabolic derangement as a possible link to adverse clinical outcomes. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2020 Jul 1;319(1):E105-9.

116. Kozar VV, Kudria MY, Ustenko NV, Pavlenko TO, Zhurakovska MV. The state of the humoral component of immunity under conditions of metabolic syndrome with underlying hypoestrogenia and its farmacological correction. Buk Med Herald. 2009;13:141-4.

117. Kredel LI, Siegmund B. Adipose-tissue and intestinal inflammation–visceral obesity and creeping fat. Frontiers in immunology. 2014 Sep 24;5:462.

118. Krishnan N, Fu C, Pappin DJ, Tonks NK. H_2S-induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. Science signaling. 2011 Dec 13;4(203):ra86-.

119. Kundu S, Pushpakumar SB, Tyagi A, Coley D, Sen U. Hydrogen sulfide deficiency and diabetic renal remodeling: role of matrix metalloproteinase-9. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2013 Jun 15;304(12):E1365-78.

120. Lau WB, Ohashi K, Wang Y, Ogawa H, Murohara T, Ma XL, Ouchi N. Role of adipokines in cardiovascular disease. Circulation Journal. 2017 Jun 23;81(7):920-8.

121. Law M, Huot PS, Lee YT, Vien S, Luhovyy BL, Anderson GH. The effect of dairy and nondairy beverages consumed with high glycemic cereal on subjective appetite, food intake, and postprandial glycemia in young adults. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism. 2017;42(11):1201-9.

122. Lee JH, Park A, Oh KJ, Lee SC, Kim WK, Bae KH. The role of adipose tissue mitochondria: regulation of mitochondrial function for the treatment of metabolic diseases. International journal of molecular sciences. 2019 Jan;20(19):4924.

123. Lee P, Swarbrick MM, Ho KK. Brown adipose tissue in adult humans: a metabolic renaissance. Endocrine reviews. 2013 Jun 1;34(3):413-38.

124. Lefranc C, Friederich-Persson M, Palacios-Ramirez R, Cat AN. Mitochondrial oxidative stress in obesity: role of the mineralocorticoid receptor. Journal of Endocrinology. 2018 Sep 1;238(3):R143-59.

125. Li XH, Feng ST, Cao QH, Coffey JC, Baker ME, Huang L, Fang ZN, Qiu Y, Lu BL, Chen ZH, Li Y. Degree of creeping fat assessed by CT enterography is associated with intestinal fibrotic stricture in patients with Crohn’s disease: A potentially novel mesenteric creeping fat index. Journal of Crohn's and Colitis. 2021 Jan 7.

126. Li Z, Hardij J, Bagchi DP, Scheller EL, MacDougald OA. Development, regulation, metabolism and function of bone marrow adipose tissues. Bone. 2018 May 1;110:134-40.

127. Liao J, Yin H, Huang J, Hu M. Dysfunction of perivascular adipose tissue in mesenteric artery is restored by aerobic exercise in high-fat diet induced obesity. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2021 May;48(5):697-703.

128. Lii CK, Huang CY, Chen HW, Chow MY, Lin YR, Huang CS, Tsai CW. Diallyl trisulfide suppresses the adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes through ERK activation. Food and chemical toxicology. 2012 Mar 1;50(3-4):478-84.

129. Lin J, Chen M, Liu D, Guo R, Lin K, Deng H, Zhi X, Zhang W, Feng J, Wu W. Exogenous hydrogen sulfide protects human umbilical vein endothelial cells against high glucose-induced injury by inhibiting the necroptosis pathway. International journal of molecular medicine. 2018 Mar 1;41(3):1477-86.

130. Liu Z, Cai Y, Zhang X, Zhu Z, He J. High serum levels of malondialdehyde and antioxidant enzymes are associated with post-stroke anxiety. Neurological Sciences. 2018 Jun;39(6):999-1007.

131. Louveau I, Vincent A, Tacher S, Gilbert H, Gondret F. Increased expressions of genes and proteins involved in mitochondrial oxidation and antioxidant pathway in adipose tissue of pigs selected for a low residual feed intake. Journal of animal science. 2016 Dec 1;94(12):5042-54.

132. Lu C, Su LY, Lee RM, Gao YJ. Mechanisms for perivascular adipose tissue-mediated potentiation of vascular contraction to perivascular neuronal stimulation: the role of adipocyte-derived angiotensin II. European journal of pharmacology. 2010 May 25;634(1-3):107-12.

133. Lu C, Zhao AX, Gao YJ, Lee RM. Modulation of vein function by perivascular adipose tissue. European journal of pharmacology. 2011 Apr 25;657(1-3):111-6.

134. Luo L, Liu M. Adipose tissue in control of metabolism. Journal of endocrinology. 2016 Dec 1;231(3):R77-99.

135. Lynch FM, Withers SB, Yao Z, Werner ME, Edwards G, Weston AH, Heagerty AM. Perivascular adipose tissue-derived adiponectin activates BKCa channels to induce anticontractile responses. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2013 Mar 15;304(6):H786-95.

136. Ma X, Wang D, Zhao W, Xu L. Deciphering the roles of PPARγ in adipocytes via dynamic change of transcription complex. Frontiers in endocrinology. 2018 Aug 21;9:473.

137. Magnuson AM, Regan DP, Booth AD, Fouts JK, Solt CM, Hill JL, Dow SW, Foster MT. High-fat diet induced central adiposity (visceral fat) is associated with increased fibrosis and decreased immune cellularity of the mesenteric lymph node in mice. European journal of nutrition. 2020 Jun;59(4):1641-54.

138. Mahadevan A, Welsh IC, Sivakumar A, Gludish DW, Shilvock AR, Noden DM, Huss D, Lansford R, Kurpios NA. The left-right Pitx2 pathway drives organ-specific arterial and lymphatic development in the intestine. Developmental cell. 2014 Dec 22;31(6):690-706.

139. Mahmood NA. Glutathion-S-transferase Enzyme and Malondialdehyde (MDA) in Colorectal Cancer and in Healthy Control. studies. 2010 Jan;15:16.

140. Mancuso P, Bouchard B. The impact of aging on adipose function and adipokine synthesis. Frontiers in endocrinology. 2019 Mar 11;10:137.

141. Mani S, Yang G, Wang R. A critical life-supporting role for cystathionine γ-lyase in the absence of dietary cysteine supply. Free Radical Biology and Medicine. 2011 May 15;50(10):1280-7.

142. Manna P, Jain SK. Vitamin D up-regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation and glucose utilization mediated by cystathionine-γ-

lyase (CSE) activation and H2S formation in 3T3L1 adipocytes. Journal of Biological Chemistry. 2013 Aug 23;288(34):24871-.

143. Mao R, Kurada S, Gordon IO, Baker ME, Gandhi N, McDonald C, Coffey JC, Rieder F. The mesenteric fat and intestinal muscle interface: creeping fat influencing stricture formation in Crohn's disease. Inflammatory bowel diseases. 2019 Feb 21;25(3):421-6.

144. Mastrocola R, Collino M, Rogazzo M, Medana C, Nigro D, Boccuzzi G, Aragno M. Advanced glycation end products promote hepatosteatosis by interfering with SCAP-SREBP pathway in fructose-drinking mice. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2013 Sep 15;305(6):G398-407.

145. Mebius RE, Streeter PR, Michie S, Butcher EC, Weissman IL. A developmental switch in lymphocyte homing receptor and endothelial vascular addressin expression regulates lymphocyte homing and permits CD4+ CD3-cells to colonize lymph nodes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1996 Oct 1;93(20):11019-24.

146. Melino S, Leo S, Toska Papajani V. Natural hydrogen sulfide donors from Allium sp. as a nutraceutical approach in type 2 diabetes prevention and therapy. Nutrients. 2019 Jul;11(7):1581.

147. Mezouari A, Nangia R, Gagnon J. The protective role of hydrogen sulfide against obesity-associated cellular stress in blood glucose regulation. Antioxidants. 2020 Nov;9(11):1038.

148. Mhd Omar NA, Frank J, Kruger J, Dal Bello F, Medana C, Collino M, Zamaratskaia G, Michaelsson K, Wolk A, Landberg R. Effects of high intakes of fructose and galactose, with or without added fructooligosaccharides, on metabolic factors, inflammation, and gut integrity in a rat model. Molecular Nutrition & Food Research. 2021 Mar;65(6):2001133.

149. Miliotis S, Nicolalde B, Ortega M, Yepez J, Caicedo A. Forms of extracellular mitochondria and their impact in health. Mitochondrion. 2019 Sep 1;48:16-30.

150. Montes-Nieto R, Insenser M, Murri M, Fernández-Durán E, Ojeda-Ojeda M, Martínez-García MÁ, Luque-Ramírez M, Escobar-Morreale HF. Plasma thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in young adults: Obesity increases fasting levels only in men whereas glucose ingestion, and not protein or lipid intake, increases postprandial concentrations regardless of sex and obesity. Molecular nutrition & food research. 2017 Nov;61(11):1700425.

151. Murphy B, Bhattacharya R, Mukherjee P. Hydrogen sulfide signaling in mitochondria and disease. The FASEB Journal. 2019 Dec;33(12):13098-125.

152. Nascimento M, Punaro GR, Serralha RS, Lima DY, Mouro MG, Oliveira LC, Casarini DE, Rodrigues AM, Higa EM. Inhibition of the P2X7 receptor improves renal function via renin-angiotensin system and nitric oxide on diabetic nephropathy in rats. Life sciences. 2020 Jun 15;251:117640.

153. Nielsen TS, Jessen N, Jørgensen JO, Møller N, Lund S. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. Journal of molecular endocrinology. 2014 Jun 1;52(3):R199-222.

154. Nimitphong H, Park E, Lee MJ. Vitamin D regulation of adipogenesis and adipose tissue functions. Nutrition Research and Practice. 2020 Dec 1;14(6):553-67.

155. Nin DS, Idres SB, Song ZJ, Moore PK, Deng LW. Biological effects of morpholin-4-Ium 4 methoxyphenyl (morpholino) phosphinodithioate and other phosphorothioate-based hydrogen sulfide donors. Antioxidants & redox signaling. 2020 Jan 10;32(2):145-58.

156. Nithya S, Deepika A, Rehman A, Abineeshwar G. Potential metabolic effects with use of high-fructose corn syrup in foodstuffs: A review. Drug Invention Today. 2019 Jan 1;11(1).

157. Oikonomou EK, Antoniades C. The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease. Nature Reviews Cardiology. 2019 Feb;16(2):83-99.

158. Olson KR. Hydrogen sulfide as an oxygen sensor. Antioxidants & redox signaling. 2015 Feb 10;22(5):377-97.

159. Owen MK, Witzmann FA, McKenney ML, Lai X, Berwick ZC, Moberly SP, Alloosh M, Sturek M, Tune JD. Perivascular adipose tissue potentiates contraction of coronary vascular smooth muscle: influence of obesity. Circulation. 2013 Jul 2;128(1):9-18.

160. Pan Z, Wang H, Liu Y, Yu C, Zhang Y, Chen J, Wang X, Guan Q. Involvement of CSE/H_2S in high glucose induced aberrant secretion of adipokines in 3T3-L1 adipocytes. Lipids in health and disease. 2014 Dec;13(1):1-7.

161. Panagaki T, Randi EB, Augsburger F, Szabo C. Overproduction of H_2S, generated by CBS, inhibits mitochondrial Complex IV and suppresses oxidative phosphorylation in Down syndrome. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2019 Sep 17;116(38):18769-71.

162. Pandzic Jaksic V, Grizelj D, Livun A, Ajduk M, Boscic D, Vlasic A, Marusic M, Gizdic B, Kusec R, Jaksic O. Inflammatory gene expression in neck perivascular and subcutaneous adipose tissue in men with carotid stenosis. Angiology. 2021 Apr 28:00033197211012539.

163. Papapetropoulos A, Wallace JL, Wang R. From primordial gas to the medicine cabinet. British journal of pharmacology. 2020 Feb;177(4):715.

164. Paul BD, Snyder SH, Kashfi K. Effects of hydrogen sulfide on mitochondrial function and cellular bioenergetics. Redox Biology. 2021 Jan 1;38:101772.

165. Pavlovskiy Y, Lutsyk M, Yashchenko A, Zaichko N, Wallace J, Zayachkivska O. ATB 340, a modulator of Sulfite Oxidase activity, reduces oxidative stress in hyperglycemia and stress exposed gastric mucosa in old rats. Proceeding of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences. 2018 Dec 28;54(2):33-41.

166. Pavlovskiy Y, Yashchenko A, Zayachkivska O. H2S Donors Reverse Age-Related Gastric Malfunction Impaired Due to Fructose-Induced Injury via CBS, CSE, and TST Expression. Frontiers in Pharmacology. 2020 Jul 24;11:1134.

167. Petrus P, Lecoutre S, Dollet L, Wiel C, Sulen A, Gao H, Tavira B, Laurencikiene J, Rooyackers O, Checa A, Douagi I. Glutamine links obesity to inflammation in human white adipose tissue. Cell metabolism. 2020 Feb 4;31(2):375-90.

168. Pichette J, Gagnon J. Implications of hydrogen sulfide in glucose regulation: how H_2S can alter glucose homeostasis through metabolic hormones. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016 Oct;2016.

169. Pinnick KE, Hodson L. Challenging metabolic tissues with fructose: tissue-specific and sex-specific responses. The Journal of physiology. 2019 Jul;597(14):3527-37.

170. Piragine E, Calderone V. Pharmacological modulation of the hydrogen sulfide (H_2S) system by dietary H_2S-donors: A novel promising strategy in the prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus. Phytotherapy Research. 2021 Apr;35(4):1817-46.

171. Pond CM. Accuracy and artistry in anatomical illustration of perivascular adipose tissue. Frontiers in physiology. 2017 Dec 4;8:990.

172. Ponti F, Santoro A, Mercatelli D, Gasperini C, Conte M, Martucci M, Sangiorgi L, Franceschi C, Bazzocchi A. Aging and imaging assessment of body composition: from fat to facts. Frontiers in endocrinology. 2020 Jan 14;10:861.

173. Popkin BM, Du S, Green WD, Beck MA, Algaith T, Herbst CH, Alsukait RF, Alluhidan M, Alazemi N, Shekar M. Individuals with obesity and COVID-19: A global perspective on the epidemiology and biological relationships. Obesity Reviews. 2020 Nov;21(11):e13128.

174. Poulos SP, Dodson MV, Culver MF, Hausman GJ. The increasingly complex regulation of adipocyte differentiation. Experimental Biology and Medicine. 2016 Mar;241(5):449-56.

175. Powell CR, Dillon KM, Matson JB. A review of hydrogen sulfide (H_2S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. Biochemical pharmacology. 2018 Mar 1;149:110-23.

176. Qi C, Lin X, Li S, Liu L, Wang Z, Li Y, Bai R, Xie Q, Zhang N, Ren S, Zhao B. SoHSC70 positively regulates thermotolerance by alleviating cell membrane damage, reducing ROS accumulation, and improving activities of antioxidant enzymes. Plant Science. 2019 Jun 1;283:385-95.

177. Qi XY, Qu SL, Xiong WH, Rom O, Chang L, Jiang ZS. Perivascular adipose tissue (PVAT) in atherosclerosis: a double-edged sword. Cardiovascular diabetology. 2018 Dec;17(1):1-20.

178. Randi EB, Casili G, Jacquemai S, Szabo C. Selenium-binding protein 1 (SELENBP1) supports hydrogen sulfide biosynthesis and adipogenesis. Antioxidants. 2021 Mar;10(3):361.

179. Rehal S, von der Weid PY. TNFΔARE mice display abnormal lymphatics and develop tertiary lymphoid organs in the mesentery. The American journal of pathology. 2017 Apr 1;187(4):798-807.

180. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. Nature Reviews Endocrinology. 2017 Nov;13(11):633-43.

181. Ren XC, Zhang XQ, Xu R, Huang JQ, Zhang Q. Analyzing energy materials by cryogenic electron microscopy. Advanced Materials. 2020 Jun;32(24):1908293.

182. Revenko O, Kovalyshyn V, Yashchenko A, Wallace J, Zayachkivska O. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug ATB-340 treatment

potentially reduces mesenteric metaflammation in the experimental age-and high fructose dietary-induced injury. Proceeding of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences. 2021 Jun 13;64(1).

183. Revenko O, Pavlovskiy Y, Savytska M, Yashchenko A, Kovalyshyn V, Chelpanova I, Varyvoda O, Zayachkivska O. Hydrogen sulfide prevents mesenteric adipose tissue damage, endothelial dysfunction, and redox imbalance from high fructose diet-induced injury in aged rats. Front. Pharmacol. 12: 693100. doi: 10.3389/fphar. 2021 Aug 30.

184. Revenko O, Pavlovskyi Y, Savytska M, Zayachkivska O. Mitochondria in mesentery adipocytes are the key targets for NSAID-induced injury and H_2S cytoprotection during advanced age and metaflammation. 15th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation, Zagreb, Croatia. 2021:14

185. Revenko O, Zaichko N, Wallace J, Zayachkivska O. Exogenous hydrogen sulfide for the treatment of mesenteric damage associated with fructose-induced malfunctions via inhibition of oxidative stress. The Ukrainian Biochemical Journal. 2020;92(2):86-97.

186. Revenko O, Zaichko N, Wallace J, Zayachkivska O. Hydrogen sulfide system attenuates injury by hyperglycemia and stress: role of mesenteric adipocytes in aged animals. Proceeding of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences. 2018 Dec 28;54(2):115-24.

187. Revenko O, Zaichko N, Wallace J, Zayachkivska O. Targening hydrogen sulfide system treatment for mesenterial adiposity in rats submitted to fructose consumption. Фізіологічний журнал, 2019, Т. 65, № 3, С. 118-

188. Revenko OV, Pavlovskyi YI, Zayachkivska OS. The significance of crosstalk of Cystathionine-γ-lyase/Hydrogen Sulfide system and redox homeostasis under stress and hyperglycemia: Focus on mesenterial adipocytes. RECOOP ninth Annual Project Review Meeting, Bratislava, Slovak Republic. 2018:65

189. Richardson VR, Smith KA, Carter AM. Adipose tissue inflammation: feeding the development of type 2 diabetes mellitus. Immunobiology. 2013 Dec 1;218(12):1497-504.

190. Rivera ED, Coffey JC, Walsh D, Ehrenpreis ED. The mesentery, systemic inflammation, and Crohn's disease. Inflammatory bowel diseases. 2019 Jan 10;25(2):226-34.

191. Rocque GB, Cleary JF. Palliative care reduces morbidity and mortality in cancer. Nature Reviews Clinical Oncology. 2013 Feb;10(2):80-9.

192. Rodríguez A, Becerril S, Hernández-Pardos AW, Frühbeck G. Adipose tissue depot differences in adipokines and effects on skeletal and cardiac muscle. Current opinion in pharmacology. 2020 Jun 1;52:1-8.

193. Roxo DF, Arcaro CA, Gutierres VO, Costa MC, Oliveira JO, Lima TF, Assis RP, Brunetti IL, Baviera AM. Curcumin combined with metformin decreases glycemia and dyslipidemia, and increases paraoxonase activity in diabetic rats. Diabetology & metabolic syndrome. 2019 Dec;11(1):1-8.

194. Russo L, Lumeng CN. Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. Immunology. 2018 Dec;155(4):407-17.

195. Salatić I, Dragović T, Stevanović I, Drašković-Pavlović B, Ninković M. Whether the insulin is necessary for the struggle against oxidative stress in diabetes mellitus type 2-a pilot study. Vojnosanitetski pregled. 2020(00):138-.

196. Salimoglu S, Kilinc G, Calik B. Anatomy of the colon, rectum, and anus. InColon Polyps and Colorectal Cancer 2021 (pp. 1-22). Springer, Cham.

197. Salvestrini V, Sell C, Lorenzini A. Obesity may accelerate the aging process. Frontiers in endocrinology. 2019 May 3;10:266.

198. Sanchez-Aranguren LC, Ahmad S, Dias IH, Alzahrani FA, Rezai H, Wang K, Ahmed A. Bioenergetic effects of hydrogen sulfide suppress

soluble Flt-1 and soluble endoglin in cystathionine gamma-lyase compromised endothelial cells. Scientific reports. 2020 Sep 25;10(1):1-1.

199. Saxton SN, Clark BJ, Withers SB, Eringa EC, Heagerty AM. Mechanistic links between obesity, diabetes, and blood pressure: role of perivascular adipose tissue. Physiological reviews. 2019 Oct 1;99(4):1701-63.

200. Scheja L, Heeren J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. Nature reviews endocrinology. 2019 Sep;15(9):507-24.

201. Schleifenbaum J, Köhn C, Voblova N, Dubrovska G, Zavarirskaya O, Gloe T, Crean CS, Luft FC, Huang Y, Schubert R, Gollasch M. Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. Journal of hypertension. 2010 Sep 1;28(9):1875-82.

202. Serena C, Keiran N, Madeira A, Maymó-Masip E, Ejarque M, Terrón-Puig M, Espin E, Martí M, Borruel N, Guarner F, Menacho M. Crohn's disease disturbs the immune properties of human adipose-derived stem cells related to inflammasome activation. Stem Cell Reports. 2017 Oct 10;9(4):1109-23.

203. Shah N, Kruchko DH, Ehrenpreis ED. The role of the mesentery in metabolic syndrome and diabetes mellitus. InThe mesenteric organ in health and disease 2021 (pp. 123-129). Springer, Cham.

204. Shibuya N, Kimura H. Production of hydrogen sulfide from d-cysteine and its therapeutic potential. Frontiers in endocrinology. 2013 Jul 16;4:87.

205. Shimizu I, Walsh K. The whitening of brown fat and its implications for weight management in obesity. Current obesity reports. 2015 Jun 1;4(2):224-9.

206. Soltis EE, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. Clinical and Experimental Hypertension. Part A: Theory and Practice. 1991 Jan 1;13(2):277-96.

207. Soriano RN, Braga SP, Breder JS, Batalhao ME, Oliveira-Pelegrin GR, Ferreira LF, Rocha MJ, Carnio EC, Branco LG. Endogenous peripheral hydrogen sulfide is propyretic: its permissive role in brown adipose tissue thermogenesis in rats. Experimental physiology. 2018 Mar 1;103(3):397-407.

208. Souza-Paula E, Polonio LC, Zochio GP, da Silva KP, Kushima H, Dias-Junior CA. Anticontractile effect of perivascular adipose tissue but not of endothelium is enhanced by hydrogen sulfide stimulation in hypertensive pregnant rat aortae. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2020 Dec 1;76(6):715-29.

209. Steiger AK, Marcatti M, Szabo C, Szczesny B, Pluth MD. Inhibition of mitochondrial bioenergetics by esterase-triggered COS/H_2S donors. ACS chemical biology. 2017 Aug 18;12(8):2117-23.

210. Stempak JG, Ward RT. An improved staining method for electron microscopy. The Journal of cell biology. 1964 Sep 1;22(3):697.

211. Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. Biochemical Journal. 1982 Aug 15;206(2):267-77.

212. Streich K, Smoczek M, Hegermann J, Dittrich-Breiholz O, Bornemann M, Siebert A, Bleich A, Buettner M. Dietary lipids accumulate in macrophages and stromal cells and change the microarchitecture of mesenteric lymph nodes. Journal of advanced research. 2020 Jul 1;24:291-300.

213. Sun F, Luo JH, Yue TT, Wang FX, Yang CL, Zhang S, Wang XQ, Wang CY. The role of hydrogen sulphide signalling in macrophage activation. Immunology. 2021 Jan;162(1):3-10.

214. Sun HJ, Wu ZY, Cao L, Zhu MY, Liu TT, Guo L, Lin Y, Nie XW, Bian JS. Hydrogen sulfide: recent progression and perspectives for the treatment of diabetic nephropathy. Molecules. 2019 Jan;24(15):2857.

215. Sun HJ, Wu ZY, Nie XW, Bian JS. Role of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the link between inflammation and hydrogen sulfide. Frontiers in pharmacology. 2020 Jan 21;10:1568.

216. Suzuki K, Olah G, Modis K, Coletta C, Kulp G, Gerö D, Szoleczky P, Chang T, Zhou Z, Wu L, Wang R. Hydrogen sulfide replacement therapy protects the vascular endothelium in hyperglycemia by preserving mitochondrial function. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011 Aug 16;108(33):13829-34.

217. Szabo C. The re-emerging pathophysiological role of the cystathionine-β-synthase-hydrogen sulfide system in Down syndrome. The FEBS journal. 2020 Aug;287(15):3150-60.

218. Szijártó IA, Markó L, Filipovic MR, Miljkovic JL, Tabeling C, Tsvetkov D, Wang N, Rabelo LA, Witzenrath M, Diedrich A, Tank J. Cystathionine γ-lyase–produced hydrogen sulfide controls endothelial no bioavailability and blood pressure. Hypertension. 2018 Jun;71(6):1210-7.

219. Takagi K, Okabe S. The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer. The Japanese Journal of Pharmacology. 1968 Mar 1;18(1):9-18.

220. Tamara A, Tahapary DL. Obesity as a predictor for a poor prognosis of COVID-19: a systematic review. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews. 2020 Jul 1;14(4):655-9.

221. Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. Physiological reviews. 2013.

222. Tedesco L, Valerio A, Dossena M, Cardile A, Ragni M, Pagano C, Pagotto U, Carruba MO, Vettor R, Nisoli E. Cannabinoid receptor stimulation impairs mitochondrial biogenesis in mouse white adipose tissue, muscle, and liver: the role of eNOS, p38 MAPK, and AMPK pathways. Diabetes. 2010 Nov 1;59(11):2826-36.

223. Topsakal S, Ozmen O, Ozgocmen M. Effects of alpha-lipoic acid on high fructose induced hepatic pathology. Biotechnic & Histochemistry. 2019 May 19;94(4):271-6.

224. Trayhurn P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. Physiological reviews. 2013 Jan;93(1):1-21.

225. Velmurugan GV, Huang H, Sun H, Candela J, Jaiswal MK, Beaman KD, Yamashita M, Prakriya M, White C. Depletion of H_2S during obesity enhances store-operated Ca2+ entry in adipose tissue macrophages to increase cytokine production. Science signaling. 2015 Dec 15;8(407):ra128-.

226. Victorio JA, da Costa RM, Tostes RC, Davel AP. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: sex differences. Current Pharmaceutical Design. 2020 Aug 1;26(30):3768-77.

227. Villarroya J, Cereijo R, Gavaldà-Navarro A, Peyrou M, Giralt M, Villarroya F. New insights into the secretory functions of brown adipose tissue. Journal of Endocrinology. 2019 Nov 1;243(2):R19-27.

228. Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346). British journal of pharmacology. 2010 Mar;159(6):1236-46.

229. Wallace JL, de Nucci G, Sulaieva O. Toward more GI-friendly anti-inflammatory medications. Current treatment options in gastroenterology. 2015 Dec;13(4):377-85.

230. Wallace JL, Nagy P, Feener TD, Allain T, Ditrói T, Vaughan DJ, Muscara MN, De Nucci G, Buret AG. A proof-of-concept, Phase 2 clinical trial of the gastrointestinal safety of a hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug. British journal of pharmacology. 2020 Feb;177(4):769-77.

231. Wallace JL, Vaughan D, Dicay M, MacNaughton WK, de Nucci G. Hydrogen sulfide-releasing therapeutics: translation to the clinic. Antioxidants & Redox Signaling. 2018 Jun 1;28(16):1533-40.

232. Wang Q, Wu H. T cells in adipose tissue: critical players in immunometabolism. Frontiers in immunology. 2018 Oct 30;9:2509.

233. Wang Y, Matson JB. Supramolecular nanostructures with tunable donor loading for controlled H_2S release. ACS applied bio materials. 2019 Oct 16;2(11):5093-8.

234. Watts SW, Darios ES, Contreras GA, Garver H, Fink GD. Male and Female High Fat Fed Dahl SS rats are largely protected from vascular dysfunctions: PVAT contributions reveal sex differences. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2021 Apr 30.

235. Watts SW, Flood ED, Garver H, Fink GD, Roccabianca S. A new function for perivascular adipose tissue (PVAT): assistance of arterial stress relaxation. Scientific reports. 2020 Feb 4;10(1):1-1.

236. Whiteman M, Gooding KM, Whatmore JL, Ball CI, Mawson D, Skinner K, Tooke JE, Shore AC. Adiposity is a major determinant of plasma levels of the novel vasodilator hydrogen sulphide. Diabetologia. 2010 Aug;53(8):1722-6.

237. Wójcicka G, Jamroz-Wiśniewska A, Atanasova P, Chaldakov GN, Chylińska-Kula B, Bełtowski J. Differential effects of statins on endogenous H_2S formation in perivascular adipose tissue. Pharmacological research. 2011 Jan 1;63(1):68-76.

238. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. Nutrition & metabolism. 2016 Dec;13(1):1-2.

239. Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. Acta physiologica. 2012 Jun;205(2):194-208.

240. Wu J, Chen A, Zhou Y, Zheng S, Yang Y, An Y, Xu K, He H, Kang J, Luckanagul JA, Xian M. Novel H_2S-Releasing hydrogel for wound repair via in situ polarization of M2 macrophages. Biomaterials. 2019 Nov 1;222:119398.

241. Xia J, Yu P, Zeng Z, Ma M, Zhang G, Wan D, Gong D, Deng S, Wang J. Lauric triglyceride ameliorates high-fat-diet-induced obesity in rats by reducing lipogenesis and increasing lipolysis and β-oxidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2021 Jan 12.

242. Xia YQ, Ning JZ, Cheng F, Yu WM, Rao T, Ruan Y, Yuan R, Du Y. GYY4137 a H_2S donor, attenuates ipsilateral epididymis injury in experimentally varicocele-induced rats via activation of the PI3K/Akt pathway. Iranian journal of basic medical sciences. 2019 Jul;22(7):729.

243. Xie L, Gu Y, Wen M, Zhao S, Wang W, Ma Y, Meng G, Han Y, Wang Y, Liu G, Moore PK. Hydrogen sulfide induces Keap1 S-sulfhydration and suppresses diabetes-accelerated atherosclerosis via Nrf2 activation. Diabetes. 2016 Oct 1;65(10):3171-84.

244. Xue R, Hao DD, Sun JP, Li WW, Zhao MM, Li XH, Chen Y, Zhu JH, Ding YJ, Liu J, Zhu YC. Hydrogen sulfide treatment promotes glucose uptake by increasing insulin receptor sensitivity and ameliorates kidney lesions in type 2 diabetes. Antioxidants & redox signaling. 2013 Jul 1;19(1):5-23.

245. Yamamoto J, Sato W, Kosugi T, Yamamoto T, Kimura T, Taniguchi S, Kojima H, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Yuzawa Y. Distribution of hydrogen sulfide (H_2S)-producing enzymes and the roles of the H_2S donor sodium hydrosulfide in diabetic nephropathy. Clinical and experimental nephrology. 2013 Feb;17(1):32-40.

246. Yang A, Mottillo EP. Adipocyte lipolysis: from molecular mechanisms of regulation to disease and therapeutics. Biochemical Journal. 2020 Mar 13;477(5):985-1008.

247. Yang G, Ju Y, Fu M, Zhang Y, Pei Y, Racine M, Baath S, Merritt TJ, Wang R, Wu L. Cystathionine gamma-lyase/hydrogen sulfide system is essential for adipogenesis and fat mass accumulation in mice. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2018 Feb 1;1863(2):165-76.

248. Yilmaz G, Yilmaz FM, Aral Y, Yucel D. Levels of serum sialic acid and thiobarbituric acid reactive substances in subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus. Journal of clinical laboratory analysis. 2007;21(5):260-4.

249. Zafar MI, Frese M, Mills KE. Chronic fructose substitution for glucose or sucrose in food or beverages and metabolic outcomes: an updated systematic review and meta-analysis. Frontiers in Nutrition. 2021;8.

250. Zaichko N, Pentyuk N, Melnik A. The formation of hydrogen sulfide in the organs of rats. Med. chem. 2009;11(4):7-13.

251. Zaichko NV, Ol'khovs' kyĭ OS, Mel'nyk AV, Iurchenko PO, Konakhovych NF. Influence of polymicroelement preparation esmin on hydrogen sulfide levels and indices of pro-and antioxidant system in the rat myocardium of different age. Ukrainian biochemical journal. 2014 May 1;86(3):69-76.

252. Zayachkivska O, Pavlovskiy Y, Revenko O, Yashchenko A. Physiological basis for novel drug hydrogen sulfide-related therapy used to treat oxidative stress in the model of fructose-induced injury. The FASEB Journal. 2019 Apr;33(S1):lb67-.

253. Zayachkivska O, Revenko O, Bula N, Savytska M, Yaschenko A. Amelioration of metaflammation induced in rats by exogenous hydrogen sulfide: Focus on mesenteric adipocyte oxidative stress. The FASEB Journal. 2020 Apr 1;34(S1):1-.

254. Zhang H, Huang Y, Chen S, Tang C, Wang G, Du J, Jin H. Hydrogen sulfide regulates insulin secretion and insulin resistance in diabetes mellitus, a new promising target for diabetes mellitus treatment? A review. Journal of advanced research. 2021 Jan 1;27:19-30.

255. Zhao S, Song T, Gu Y, Zhang Y, Cao S, Miao Q, Zhang X, Chen H, Gao Y, Zhang L, Han Y. Hydrogen sulfide alleviates liver injury through the s-sulfhydrated-kelch-like ech-associated protein 1/nuclear erythroid 2–

related factor 2/low-density lipoprotein receptor–related protein 1 pathway. Hepatology. 2021 Jan;73(1):282-302.

256. Zhou X, Yang W, Li J. Ca2+-and protein kinase C-dependent signaling pathway for nuclear factor-κB activation, inducible nitric-oxide synthase expression, and tumor necrosis factor-α production in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. Journal of Biological Chemistry. 2006 Oct 20;281(42):31337-47.

257. Zhu Q, Glazier BJ, Hinkel BC, Cao J, Liu L, Liang C, Shi H. Neuroendocrine regulation of energy metabolism involving different types of adipose tissues. International journal of molecular sciences. 2019 Jan;20(11):2707.

258. Zhu Q, Scherer PE. Immunologic and endocrine functions of adipose tissue: implications for kidney disease. Nature Reviews Nephrology. 2018 Feb;14(2):105-20.

259. Zoico E, Rubele S, De Caro A, Nori N, Mazzali G, Fantin F, Rossi A, Zamboni M. Brown and beige adipose tissue and aging. Frontiers in endocrinology. 2019 Jun 20;10:368.

260. Zou W, Rohatgi N, Brestoff JR, Li Y, Barve RA, Tycksen E, Kim Y, Silva MJ, Teitelbaum SL. Ablation of fat cells in adult mice induces massive bone gain. Cell metabolism. 2020 Nov 3;32(5):801-13.

Додаток А

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані результати дисертації:

1. Ревенко ОВ, Заячківська ОС. Вікові морфо-функціональні зміни структур брижі за умов стрес-індукованих пошкоджень і дії гідроген сульфіду. Клінічна та експериментальна патологія. 2018.Т.17,№3(65),ч.2. С. 104-108. *(Дисертант провів фрагмент експериментального дослідження та здійснив аналіз отриманих результатів, їх статистичну обробку, підготовку статтю до друку).*
2. Revenko O, Zaichko N, Wallace J, Zayachkivska O. Hydrogen sulfide system attenuates injury by hyperglycemia and stress: The role of mesenteric adipocytes in ages animals. Праці НТШ Медичні науки. 2018, Т. 54, № 2. С. 115-124. *(Дисертант виконав фрагмент експериментального дослідження, провів аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку статтю до друку)*
3. Revenko O, Zaichko N, Wallace J, Zayachkivska O. Exogenous hydrogen sulfide for the treatment of mesenteric damage associated with fructose-induced malfunctions via inhibition of oxidative stress. Ukr.Biochem.J. 2020; Volume 92, Issue 2, Mar-Apr, pp. 86-97. *(Дисертант провів фрагмент експериментального дослідження та здійснив аналіз отриманих результатів, їх статистичну обробку, підготовку статті до друку).*
4. Revenko O, Kovalyshyn V, Yashchenko A, Wallace J, Zayachkivska O. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug ATB-340 treatment potentially reduces mesenteric metaflammation in the experimental age-and high fructose dietary-induced injury. Proceeding of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences. 2021 Jun 13;64(1), pp. 95-106.
   (Дисертант провів експериментальну частини роботи, пов'язаної з вивченням впливу гідроген сульфід-спорідненого аспірину на тканину брижі).

5. Revenko O, Pavlovskiy Y, Savytska M, Yashchenko A, Kovalyshyn V, Chelpanova I, Varyvoda O, Zayachkivska O. Hydrogen sulfide prevents mesenteric adipose tissue damage, endothelial dysfunction, and redox imbalance from high fructose diet-induced injury in aged rats. Frontiers in Pharmacology. 2021 Aug 30;12:693100.
   (Дисертант провів експериментальне дослідження та здійснив аналіз отриманих результатів, їх статистичну обробку, підготовку статтю до друку)
6. Була Н, Павловський Я, Ревенко О. Вплив сірководню на зміни цитопротекції за умов стресу. В: Сабо Ш., Сабо К., Заячківська О. Стрес: від Ганса Сельє до сьогодні. Львів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Наукове товариство ім. Шевченка; 2019. Розд.10, с.109-111.
   (Дисертант представив результати експериментальної частини роботи, пов'язаної з вивченням фізіологічної ролі брижі за умов стресу)
7. Савицька МЯ, Суходольська НВ, Ковальчук ІМ, Була НС, Ревенко ОВ, Лис ОБ, Павловський ЯІ. Фізіологія травлення: навчальний посібник до практичних занять та самостійної роботи для студентів-магістрів медичного факультету. Львів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького; 2019. 102 с.
   (Дисертант представив результати експериментальної частини роботи, пов'язаної з вивченням механізмів цитопротекторної дії сірководню на тканину брижі)

Наукові праці, які засвідчують апробацію результатів дисертації:

8. Bula N, Pavlovsky Y, Student V, Revenko O, Wallace J, Zayachkivska O. Translational aspects of place of hydrogen sulfide-releasing non-sreriodal anti-inflammatory drugs on the tomorrow's landscape for stress-associated disorders. Proceedings of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences. 2017;49(1):21.

(Дисертант підготував тези до друку)

9. Pavlovskiy J, Revenko O, Grushka O, Zayachkivska O, Linking hydrogen sulfide (H_2S) effects with anti-inflammatory pathway is romising for resolution of stress-associated disorders. Всеукраїнська науково-практична конференція «Довкілля і здоров'я»: тези доп. Тернопіль, 2018. С. 45-46.
(Дисертант підготував тези до друку)
10. Ревенко ОВ. Морфо-функціональні особливості білого жиру очеревини за умов стресу. Всеукраїнська науково-практична конференція «Довкілля і здоров'я»: тези доп. Тернопіль, 2018. С. 51-52.
(Дисертант підготував матеріал для стендової доповіді, тези до друку)
11. Revenko OV, Pavlovskyi YI, Zayachkivska OS. The significance of crosstalk of Cystathionine-γ-lyase/Hydrogen Sulfide system and redox homeostasis under stress and hyperglycemia: Focus on mesenterial adipocytes. RECOOP ninth Annual Project Review Meeting, Bratislava, Slovak Republic. 2018:65.
(Дисертант підготував матеріал для стендової доповіді, тези до друку)
12. Revenko O, Zaichko N, Wallace J, Zayachkivska O. Targening hydrogen sulfide system treatment for mesenterial adiposity in rats submitted to fructose consumption. Фізіологічний журнал, 2019, Т. 65, № 3, С. 118-119.
(Дисертант підготував матеріал для стендової доповіді, тези)
13. Zayachkivska O, Pavlovskiy Y, Revenko O, Yashchenko A. Physiological Basis For Novel Drug Hydrogen Sulfide-Related Therapy Used To Treat Oxidative Stress In The Model Of Fructose-Induced Injury. The FASEB Journal. 2019 Apr;33(1):lb67-.
(Дисертант підготував тези до друку)
14. Ревенко О, Заячківська О. Відмінності функціонування мітохондрій жирової тканини брижі за умов надмірного споживання фруктози та екзогенного введення донорів сірководню. XVIII Конгрес СФУЛТ. Львів, 1-3 жовтня 2020. Матеріали міжнародного наукового конгресу, тези доп. Львів-Київ-Чикаго, 2020. С. 192-193
(Дисертант підготував тези до друку)

15. Zayachkivska O, Revenko O, Bula N, Savytska M, Yaschenko A. Amelioration of metaflammation induced in rats by exogenous hydrogen sulfide: Focus on mesenteric adipocyte oxidative stress. The FASEB Journal. 2020 Apr 1;34(S1):1-. *(Дисертант підготував тези до друку)*
16. Revenko O, Pavlovskiy Y, Savytska M, Zayachkivska O. Mitochondria in mesentery adipocytes are the key targets for NSAID-induced injury and H_2S cytoprotection during advanced age and metaflammation. 15^{th} Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation. Zagreb, Croatia. 2021 Oct 7-8; 14
(Дисертант підготував матеріал для стендової доповіді, тези)

Додаток Б

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних форумах різного рівня:

1. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Вікові та хронобіологічні аспекти медицини і фармації» (Чернівці, 2017) – стендова доповідь, публікація тез;
2. RECOOP 9th Annual Project Review Meeting (Братислава, Словаччина, 2018) – стендова доповідь, публікація тез;
3. Всеукраїнській науково-практичній конференції «Довкілля і здоров'я» (Тернопіль, 2018) – стендова доповідь, публікація тез;
4. 2nd Symposium on Innovation in Medicine SMART LION (Львів, 2018) – стендова доповідь, публікація тез;
5. Experimental Biology/FASEB (Сан-Дієго, США, 2019) – публікація тез;
6. XX-му з'їзду Українського фізіологічного товариства ім.П.Г. Костюка з міжнародною участю (Київ, 2019) – стендова доповідь, публікація тез;
7. XVIII Міжнародному науковому конгресі СФУЛТ (Львів, 2020) – стендова доповідь, публікація тез;
8. 4nd International Symposium SMART LION 2020 Reality and prognosis COVID-2019 (Львів, 2020), Metabolism Month 2021 (онлайн конференція University of Copenhagen, 2021) –публікація тез,
9. 15th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society with international participation «Homeostasis – From Cell to Organ» (Загреб, Хорватія, 2021) – публікація тез.

Додаток В

ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного медичного
університету ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України
_____ проф. І.М.Кліщ
_____ 2020р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Вплив сірководню на зміни структур бриж за умов стресу.

2. **Установа-розробник:** Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, кафедра нормальної фізіології, м.Львів, вул.Пекарська, 69, 79010, Україна.

Розроблювач: Ревенко Олег Вікторович.

Джерела інформації:

- Ревенко О.В., Заячківська О.С., Вікові морфо-функціональні зміни структур бриж за умов стрес-індукованих пошкоджень і дії гідроген сульфіду. Клінічна та експериментальна патологія. 2018.Т.17,№3(65),ч.2. С. 104-108.
- Фізіологія травлення: навчальний посібник до практичних занять та самостійної роботи для студентів-магістрів медичного факультету [М.Я. Савицька, Н.В. Суходольська, І.М. Ковальчук, І.Є. Дзісь, Н.С. Була, В. Є. Ревенко, О.Б. Лис, Я.І. Павловський] // за ред.: О.С. Заячківської. – Львів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, 2020. – 102 с.: іл.

Базова установа, яка проводить впровадження: Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра фізіології з основами біоетики та біобезпеки.

3. **Результати застосування** пропозиції за період з вересня по травень 2020 р. Матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри нормальної фізіології на практичних заняттях.

4. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо значення сірководню та роль сірководню на зміни цитопротекції за умов стресу .

5. Зауваження, пропозиції: не вносилися.

6. Затверджено на засіданні кафедри

Завідувач кафедри фізіології
з основами біоетики та біобезпеки _____ **проф. Вадзюк С.Н.**

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з наукової роботи
Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова
_____ проф. О.В.Власенко
30.06. 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Вплив сірководню на зміни цитопротекції за умов стресу.
2. **Установа-розробник:** Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, кафедра нормальної фізіології, м.Львів, вул.Пекарська, 69, 79010, Україна.

Розроблювач: Ревенко Олег Вікторович.

Джерела інформації:

- Сабо Ш., Сабо К., Заячківська О. Стрес: від Ганса Сельє до сьогодні. Львів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, 2019. – 109 с.
- Фізіологія травлення: навчальний посібник до практичних занять та самостійної роботи для студентів-магістрів медичного факультету [М.Я. Савицька, Н.В. Суходольська, І.М. Ковальчук, І.Є. Дзісь, Н.С. Була, В. Є. Ревенко, О.Б. Лис, Я.І. Павловський] // за ред.: О.С. Заячківської. – Львів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, 2020. – 102 с.: іл.

3. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, кафедра нормальної фізіології.
4. **Результати застосування** пропозиції за період з вересня 2019 р. по травень 2020 р. Матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри нормальної фізіології на практичних заняттях.
5. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо значення сірководню та роль сірководню на зміни цитопротекції за умов стресу .
6. **Зауваження, пропозиції**: не вносилися.
7. **Затверджено на засіданні кафедри**: 30.06.2020 р., протокол №8.

Відповідальний за впровадження:
Заслужений працівник освіти України,
завідувач кафедри нормальної фізіології
Вінницького національного медичного
університету ім. М. І. Пирогова,
д. мед. наук, _____ проф.Йолтухівський М.В.
30.06.2020 р.

"ЗАТВЕРДЖУЮ"
Проректор з науково-педагогічної роботи
Одеського національного медичного університету
_____ проф. І. П. Шмакова
«____» _____ 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Вплив сірководню на зміни цитопротекції за умов стресу.

2. **Установа-розробник:** Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, кафедра нормальної фізіології, м.Львів, вул.Пекарська, 69, 79010, Україна.

Розроблювач: Ревенко Олег Вікторович.

Джерела інформації:

- Revenko O, Zaichko N, Wallace J, Zayachkivska O. Exogenoushydrogensulfideforthetreatmentofmesentericdamageassociatedwithfructose-inducedmalfunctionsviainhibitionofoxidativestress. Ukr.Biochem.J. 2020; Volume 92, Issue 2, Mar-Apr, pp. 86-97
- Zayachkivska O, Revenko O, Bula N, Savytska M, Yaschenko A. Ameliorationofmetaflammationinducedinratsbyexogenoushydrogensulfide: Focusonmesentericadipocyteoxidativestress. The FASEB Journal. 2020 Apr 1;34(S1):1-.

Базова установа, яка проводить впровадження: Одеський національний медичний університет, кафедра фізіології.

3. **Результати застосування** пропозиції за період з вересня по травень 2020 р. Матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри нормальної фізіології на практичних заняттях.

4. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо значення сірководню та роль сірководню на зміни цитопротекції за умов стресу.

5. Зауваження, пропозиції: не вносилися.

6. Затверджено на засіданні кафедри

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри фізіології
Одеського національного медичного університету
д.мед.наук, проф. _____ Шандра О.А.