

Національна академія медичних наук України
ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України"

Кваліфікаційна наукова робота на правах рукопису

Примірник ____

ПОПАЗОВА ОЛЕНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 616-092.19+57.017.3

ДИСЕРТАЦІЯ
КАРДІОПРОТЕКТИВНІ ВЛАСТИВОСТІ МОДУЛЯТОРІВ
СИСТЕМИ ПО ПІСЛЯ ПРЕНАТАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

091 – Біологія, освітньо-наукова програма «Фармакологія»

09 Біологія

Подається на здобуття ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О.О. Попазова

Наукові керівники:

Ядловський Олег Євгенович, доктор біологічних наук;

Бєленічев Ігор Федорович, доктор біологічних наук, професор

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

Попазова О.О. Кардіопротективні властивості модуляторів системи NO після пренатальної гіпоксії (Експериментальне дослідження). – кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія, освітньо-наукова програма «Фармакологія» (09 Біологія). – ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України", Київ, 2025.

Постгіпоксичні порушення серцево-судинної системи є однією з основних причин захворюваності новонароджених, зустрічаються у 40-70% дітей, які перенесли пренатальну гіпоксію (ПГ). Механізми їх формування недостатньо вивчені, що робить цю проблему актуальною для кардіології дитячого віку. Клінічна симптоматика часто маскується під інші захворювання, що ускладнює діагностику. До теперішнього часу не існує єдиної думки щодо поетапної комплексної терапії постгіпоксичних кардіальних порушень. Під впливом гіпоксії порушується функція системи оксиду азоту (NO), що призводить до серцево-судинних порушень. Однак роль системи NO у розвитку патології серцево-судинної системи у новонароджених і можливі кардіопротекторні ефекти модуляторів NO недостатньо вивчені. Тому перспективною є фармакологічна модуляція системи NO як важливий напрям у лікуванні захворювань серцево-судинної системи у нащадків після пренатальної гіпоксії. L-аргінін, тіотриазолін, ангіолін та мілдронат відомі своєю здатністю позитивно впливати на систему NO, що робить їх надзвичайно привабливими потенційними засобами постнатальної кардіопротекції.

L-аргінін є субстратом для утворення NO в ендотеліальних клітинах, має антиоксидантні та мембраностабілізуючі властивості. Тіотриазолін є скавенджером NO, захищає його від активних форм кисню (АФК), проявляє протиішемічні властивості. Ангіолін підвищує експресію судинного ендотеліального фактора росту (VEGF), біодоступність NO і експресію

ендотеліальної NO-синтази (eNOS), проявляє мітопротекторні властивості. Мілдронат знижує утворення карнітину, отриманого з його попередника гамма-бутиробетаїну, накопичення якого стимулює синтез NO.

Дисертаційна робота присвячена обґрунтуванню ефективності модуляторів системи NO — L-аргініну, тіотриазоліну, ангіоліну та мілдронату — у корекції постгіпоксичних кардіоваскулярних порушень у нащадків щурів після ПГ.

ПГ моделювали шляхом внутрішньочеревного введення натрію нітриту (50 мг/кг) з 16 по 21 день вагітності. На 30-й та 60-й день постнатального розвитку у щурів, які зазнали ПГ та отримували досліджувані препарати, проводили комплексне дослідження функціонального стану серця. Тварин виводили з експерименту під наркозом тіопенталом натрію (40 мг/кг). Для морфологічного, біохімічного, імуноферментного та молекулярно-генетичного аналізу відбирали кров (з черевної аорти) і серце, з гомогенату якого методом центрифугування виділяли цитозольну та мітохондріальну фракції.

Морфологічні зміни ендотеліоцитів судин серця досліджували гістологічно (забарвлення гематоксилін-еозином). Вимірювали площу поперечного перерізу ядер ендотеліальних клітин в артеріолах діаметром 30–50 мкм. Підтвердженням ендотеліальної дисфункції у мікросудинах міокарда є зменшення площі ядер ендотеліальних клітин, що у 1-місячних щурів зменшилася на 42,6%, а у 2-місячних — на 43,4%. Електрокардіографічні параметри реєстрували за допомогою системи ECG TUNNEL, що дозволило дослідити порушення автономної регуляції серцевого ритму, зміни симпато-парасимпатичного балансу, зниження функціональної стабільності синусового вузла та підвищення варіабельності RR-інтервалів. У щурів із ПГ також спостерігалось зростання потужності електричної систоли, що може свідчити про компенсаторні або дистрофічні зміни у роботі міокарда.

Біохімічні та імуноферментні дослідження, а також ПЛР у реальному часі показали, що ПГ спричиняє глибокі порушення в системі оксиду азоту. Зокрема, встановлено зниження експресії eNOS в сироватці крові на 55% через 1 місяць та eNOS мРНК — на 77% через 2 місяці, а також підвищення рівня індукцйбельної

NO-синтази (iNOS) у цитозолі у 2 рази через 1 місяць і iNOS мРНК — у 6,9 рази через 2 місяці. Ці зміни супроводжувалися зменшенням біодоступності NO, активацією нітрозативного стресу та зростанням рівня нітротирозину у 5,5 рази. Також виявлено зниження експресії теплошокowego білка 70 кДа (HSP70) — у 5,6 рази через 1 місяць і в 3,44 рази через 2 місяці, а також пригнічення транскрипції фактора індукції гіпоксії-1 α (HIF-1 α) — на 79% і 61,1% відповідно. Ці зміни підтверджувалися кількісною ПЛР у реальному часі після виділення РНК та проведення зворотної транскрипції.

Окрім змін у NO-залежній системі, ПГ супроводжувалася вираженим дисбалансом ангіогенезу й ендотеліальної функції. Було встановлено підвищення рівня розчинного рецептора ендотеліального протеїну С (sEPCR) у 1,92 рази на першому та у 2,14 рази на другому місяці життя, зниження рецепторної тирозинкінази (Tie-2) на 42,3% та 37,9%, а також зниження вмісту VEGF-B на 28,1% і 35,2%. Значно зростала концентрація білка пригнічення пухлиногенезу 2 (ST2) у сироватці (у 6,28 та 3,63 рази відповідно), що вказує на активне ремоделювання міокарда та підвищений ризик розвитку серцевої недостатності.

Для корекції виявлених змін застосовували фармакологічні препарати, що модулюють продукцію та біодоступність NO: ангіолін, тіотриазолін, L-аргінін і мілдронат. Найвищу ефективність продемонстрував ангіолін, який сприяв нормалізації електрофізіологічних параметрів серця: знижував парасимпатичну активність, відновлював функцію синусового вузла та покращував показники електричної систоли. Це супроводжувалося підвищенням експресії eNOS у 3,74 рази, зниженням ST2 на 77%, зменшенням нітротирозину на 56,5%, збільшенням рівня HSP70, а також підвищенням мРНК HIF-1. Ангіолін також знижував рівень sEPCR на 34,7–53,3%, підвищував Tie-2 на 60,7–62,8%, VEGF-B — на 48,9–67,0%, а також у 5,7–19 разів збільшував експресію генів VEGF та VEGF-B. Крім того, він стимулював активність антиоксидантних ферментів — супероксиддисмутази (Cu/ZnSOD), глутатіонпероксидази 1 та 4 (GPX1 та GPX4) та відновлював морфометричні параметри ендотеліальних клітин.

Тіотриазолін і L-аргінін також сприяли поліпшенню стану NO-системи,

знижуючи прояви оксидативного стресу, хоча їх ефективність була дещо меншою. Мілдронат продемонстрував найменшу ефективність серед досліджених засобів.

Таким чином, результати дослідження підтверджують, що ПГ призводить до стійких порушень нітратергічної регуляції, ангіогенезу та електрофізіології серця у нащадків. Експериментальна терапія модуляторами NO, зокрема ангіоліном, дозволяє частково або повністю нормалізувати ці показники, що вказує на його високий потенціал як кардіопротекторного засобу у постгіпоксичних станах.

Наукова новизна проведеної роботи.

Уперше експериментально підтверджено висунуту нами концепцію фармакологічної модуляції нітросидергічної системи в комплексній терапії постгіпоксичних порушень серцево-судинної системи (ССС) у новонароджених. Суть цієї концепції полягає у застосуванні препаратів, що підвищують біодоступність та продукцію оксиду азоту (NO) — таких як тіотриазолін, ангіолін, мілдронат та L-аргінін — як кардіопротекторів.

У ході даного дослідження вперше показано, що в патогенезі уражень серця внаслідок ПГ важливу роль відіграють порушення функціонування нітросидергічної системи. Вперше встановлено, що експериментальна ПГ асоціюється зі статистично значущим зменшенням продукції NO у міокарді, що розвивається внаслідок зниження активності та експресії eNOS, а також зменшення його біодоступності через пригнічення експресії антиоксидантних ферментів (СОД, GPX) та ендогенних факторів цитопротекції (HSP70, HIF-1). Це, у свою чергу, призводить до розвитку нітрозативного стресу, порушень роботи серця та формування ендотеліальної дисфункції. У дисертаційній роботі вперше виявлено кардіопротекторну дію модуляторів NO (тіотриазоліну, ангіоліну, мілдронату та аргініну) після перенесеної ПГ. Вона проявляється в покращенні електрофізіологічної активності серця, нормалізації вегетативної регуляції серцевої діяльності, зниженні рівня нітрозативного й оксидативного стресу, гальмуванні формування ендотеліальної дисфункції, відновленні функціональної активності нітросидергічної системи міокарда, а також активації механізмів ендогенної цито- та кардіопротекції — як одразу після завершення

експериментальної терапії, так і в більш віддалені терміни спостереження.

Практична значимість проведеної роботи.

Результати проведеного дослідження розширюють теоретичні уявлення щодо ролі NO у патогенезі кардіоміопатії, спричиненої ПГ, та доводять доцільність модуляції його рівня як потенційної мішені для кардіопротекції. На підставі отриманих результатів теоретично обґрунтовано й експериментально підтверджено доцільність застосування L-аргініну, тіотриазоліну, мілдронату та, особливо, ангіоліну в комплексній терапії порушень серцево-судинної системи у новонароджених після перенесеної ПГ.

Результати дослідження впроваджено в навчальний процес і наукову діяльність: кафедри клінічної фармації та клінічної фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, кафедри фармакології Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, кафедри фармакології та медичної рецептури з курсом нормальної фізіології та кафедри акушерства і гінекології ЗДМФУ, кафедри фармакології, загальної та клінічної фармації Дніпровського державного медичного університету, а також у наукову діяльність Інституту фармакології та токсикології НАМН України. За результатами дослідження було доповнено звіт з доклінічного вивчення розчину для парентерального введення ангіоліну.

Особистий внесок здобувача.

Під час підготовки та роботи над дисертацією дисертантка особисто виконала патентний пошук, здійснила критичний аналіз літературних джерел за темою дисертації. Під керівництвом наукових керівників було сформульовано мету та завдання роботи, а також проведено планування дослідження. Було опановано всі необхідні експериментальні методи дослідження – моделювання ПГ, а також оцінку впливу досліджуваних засобів на електрофізіологічні, біохімічні та молекулярні показники стану ССС. За безпосередньої участі авторки були проведені електрофізіологічні, біохімічні, імуноферментні та гістологічні дослідження та ПЛР в реальному часі. Дисертанткою особисто було проведено статистичну обробку цифрових даних,

проаналізовано отримані результати, складено таблиці та рисунки, підготовлено та написано розділи роботи. У співпраці з науковими керівниками авторка роботи здійснила аналіз та узагальнення отриманих результатів, а також оформив висновки з дисертації. Авторка не запозичувала ідеї та/або результати роботи інших співавторів у сумісних публікаціях.

Апробація результатів дисертації.

Основні положення та результати дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на: 82-й науково-практичній конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2022» (Запорізький державний медичний університет (ЗДМУ), м. Запоріжжя, 17 травня 2022 р.); 83-й науково-практичній конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2023» (ЗДМУ, м. Запоріжжя, 25–26 травня 2023 р.); 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 1–30 November 2023, MDPI: Basel, Switzerland; 84-й науково-практичній конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2024» (Запорізький державний медико-фармацевтичний університет (ЗДМФУ), м. Запоріжжя, 23–24 травня 2024 р.); науково-практичній конференції молодих вчених із міжнародною участю «Актуальні питання фармакології та лікарської токсикології» (№137) (м. Київ, вересень 2024 р.); 85-й науково-практичній конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2025» (ЗДМФУ, м. Запоріжжя, 15–16 травня 2025 р.).

Публікації: За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових робіт, у тому числі 5 наукових статей, всі з яких входять до наукометричних баз Scopus, 6 тез доповідей.

Ключові слова: *пренатальна гіпоксія; оксидативний стрес; активні форми кисню; гістологічні дослідження; токсичність; варіабельність серцевого ритму; NO; експресія генів; фактор росту ендотелію судин; кардіопротекція; антиоксидантна система; ендотеліопротекція; серцево-судинна система.*

ANNOTATION

Popazova O.O. Cardioprotective Properties of NO System Modulators after Prenatal Hypoxia (Experimental Study). – Qualification scientific work on the rights of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 Biology, educational and scientific program “Pharmacology” (09 Biology). – State Institution "Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine," Kyiv, 2025.

Post-hypoxic cardiovascular disorders are among the leading causes of morbidity in newborns, occurring in 40–70% of infants who have experienced prenatal hypoxia (PH). The mechanisms underlying their development remain insufficiently understood, which makes this issue highly relevant in pediatric cardiology. The clinical presentation is often masked by symptoms of other diseases, complicating the diagnostic process. To date, there is no consensus on a stepwise comprehensive therapy for post-hypoxic cardiac disorders. Under the influence of hypoxia, the function of the nitric oxide (NO) system is impaired, leading to cardiovascular disorders. However, the role of the NO system in the development of cardiovascular pathology in newborns and the potential cardioprotective effects of NO modulators remain insufficiently explored. Therefore, pharmacological modulation of the NO system is a promising direction in the treatment of cardiovascular diseases in offspring after prenatal hypoxia. The ability to positively affect the NO system is known for L-arginine, thiotriazoline, angiolin, and mildronate, making them extremely attractive as potential agents for postnatal cardioprotection.

L-arginine is a substrate for NO synthesis in endothelial cells and possesses antioxidant and membrane-stabilizing properties. Thiotriazoline acts as an NO scavenger, protects it from reactive oxygen species (ROS), and exhibits anti-ischemic properties. Angiolin increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), the bioavailability of NO, and the expression of endothelial NO synthase (eNOS), exhibiting mitoprotective properties. Mildronate reduces the formation of

carnitine from its precursor gamma-butyrobetaine, and the accumulation of the latter stimulates NO synthesis.

This dissertation is devoted to substantiating the efficacy of NO system modulators, L-arginine, thiotriazoline, angiotensin, and mildronate, in correcting post-hypoxic cardiovascular disorders in the offspring of rats after PH.

PH was modeled via intraperitoneal injection of sodium nitrite (50 mg/kg) from day 16 to 21 of pregnancy. On postnatal days 30 and 60, comprehensive assessments of cardiac function were performed in the offspring that had been exposed to PH and received the studied drugs. The animals were euthanized under sodium thiopental anesthesia (40 mg/kg). Blood (from the abdominal aorta) and heart tissue were collected for morphological, biochemical, immunoenzymatic, and molecular-genetic analyses. Cytosolic and mitochondrial fractions were isolated from cardiac homogenates by centrifugation.

Morphological changes in cardiac vascular endothelial cells were evaluated histologically (hematoxylin-eosin staining). The cross-sectional area of endothelial nuclei in arterioles 30–50 μm in diameter was measured. A reduction in nuclear area — by 42.6% in 1-month-old rats and 43.4% in 2-month-old rats — indicated endothelial dysfunction in myocardial microvessels.

Electrocardiographic parameters were recorded using the ECG TUNNEL system, which allowed evaluation of autonomic rhythm regulation, sympatho-parasympathetic balance, functional stability of the sinus node, and RR-interval variability. Rats with PH also showed increased electrical systole power, suggesting compensatory or dystrophic changes in myocardial function.

Biochemical and immunoenzymatic studies, as well as real-time PCR, showed that prenatal hypoxia (PH) causes profound disturbances in the nitric oxide system. In particular, a 55% decrease in eNOS expression in blood serum was observed after 1 month, and eNOS mRNA decreased by 77% after 2 months. Additionally, the level of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the cytosol increased 2-fold after 1 month, and iNOS mRNA increased 6.9-fold after 2 months. These changes were accompanied by a reduction in NO bioavailability, activation of nitrosative stress, and a 5.5-fold increase

in nitrotyrosine levels. A decrease in the expression of the 70 kDa heat shock protein (HSP70) was also detected—5.6-fold after 1 month and 3.44-fold after 2 months—as well as suppression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) transcription by 79% and 61.1%, respectively. These changes were confirmed by quantitative real-time PCR following RNA isolation and reverse transcription.

In addition to changes in the NO-dependent system, prenatal hypoxia (PH) was accompanied by a pronounced imbalance in angiogenesis and endothelial function. An increase in the level of soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) was observed—1.92-fold in the first month and 2.14-fold in the second month of life—along with a decrease in receptor tyrosine kinase Tie-2 by 42.3% and 37.9%, respectively, and a reduction in VEGF-B content by 28.1% and 35.2%. The concentration of tumor suppressor protein 2 (ST2) in serum significantly increased (6.28- and 3.63-fold, respectively), indicating active myocardial remodeling and an elevated risk of developing heart failure.

To correct these alterations, pharmacological agents modulating NO production and bioavailability were administered: angiolin, thiotriazoline, L-arginine, and mildronate. Angiolin demonstrated the highest efficacy, normalizing cardiac electrophysiological parameters by reducing parasympathetic activity, restoring sinus node function, and improving electrical systole markers. This was accompanied by a 3.74-fold increase in eNOS expression, a 77% decrease in ST2, a 56.5% reduction in nitrotyrosine, an increase in HSP70 levels, as well as an elevation of HIF-1 mRNA.

Angiolin also decreased sEPCR levels by 34.7–53.3%, increased Tie-2 by 60.7–62.8%, VEGF-B by 48.9–67.0%, and enhanced the expression of VEGF and VEGF-B genes by 5.7 to 19 times. Additionally, it stimulated the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (Cu/ZnSOD), glutathione peroxidases 1 and 4 (GPX1 and GPX4) and restored the morphometric parameters of endothelial cells.

Thiotriazoline and L-arginine also improved NO system function and reduced oxidative stress markers, although their efficacy was somewhat lower. Mildronate was the least effective among the tested agents.

In conclusion, the study demonstrates that PH leads to persistent disturbances in

nitroergic regulation, angiogenesis, and myocardial electrophysiology in offspring. Experimental therapy with NO modulators — particularly angiolin — can partially or fully normalize these parameters, highlighting its high potential as a cardioprotective agent in post-hypoxic conditions.

Scientific novelty of the obtained results

For the first time, the concept of pharmacological modulation of the nitroxidergic system in the comprehensive therapy of post-hypoxic cardiovascular disorders in newborns has been experimentally confirmed. The essence of this concept lies in the use of drugs that increase the bioavailability and production of nitric oxide (NO) — such as thiotriazoline, angiolin, mildronate, and L-arginine — as cardioprotective agents.

This study has demonstrated for the first time that dysfunction of the nitroxidergic system plays a crucial role in the pathogenesis of heart damage caused by prenatal hypoxia (PH). It was established for the first time that experimental PH is associated with a statistically significant decrease in NO production in the myocardium, which develops due to reduced activity and expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), as well as decreased NO bioavailability caused by suppressed expression of antioxidant enzymes (SOD, GPX) and endogenous cytoprotective factors (HSP70, HIF-1). These changes, in turn, lead to nitrosative stress development, impaired cardiac function, and endothelial dysfunction formation.

The dissertation work revealed for the first time the cardioprotective effects of NO modulators (thiotriazoline, angiolin, mildronate, and arginine) following PH. These effects manifest as improved electrophysiological activity of the heart, normalization of autonomic regulation of cardiac function, reduction of nitrosative and oxidative stress, inhibition of endothelial dysfunction development, restoration of functional activity of the myocardial nitroxidergic system, and activation of endogenous cyto- and cardioprotective mechanisms — both immediately after the completion of experimental therapy and at more remote observation periods.

Practical significance of the obtained results

The results expand theoretical understanding of the role of NO in the pathogenesis of PH-induced cardiomyopathy and demonstrate the feasibility of modulating NO levels

as a potential target for cardioprotection. Based on the obtained results, the rationale and experimental confirmation were provided for the use of L-arginine, thiotriazoline, mildronate, and especially angiolin in the complex therapy of cardiovascular disorders in newborns after PH.

The findings have been implemented into the educational process and scientific activities of the Departments of Clinical Pharmacy and Clinical Pharmacology at Vinnytsia National Medical University named after M. I. Pyrohov, the Department of Pharmacology at Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, the Department of Pharmacology and Medical Prescription with a course of Normal Physiology and the Department of Obstetrics and Gynecology at ZSMFU, the Departments of Pharmacology, General and Clinical Pharmacy at Dnipro State Medical University, as well as the scientific work of the Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine.

Based on the research results, the preclinical study report of the angiolin solution for parenteral administration was supplemented.

Author's Personal Contribution

During the preparation and execution of this dissertation, the author personally conducted a patent search and performed a critical review of scientific literature on the research topic. Under the supervision of the scientific advisors, the purpose and objectives of the study were formulated and the experimental design was developed. The author mastered all necessary experimental research methods, including modeling of PH and the evaluation of the effects of the studied agents on electrophysiological, biochemical, and molecular parameters of the cardiovascular system.

The author actively participated in the execution of electrophysiological, biochemical, immunoenzymatic, histological studies, and real-time PCR analysis. Statistical data processing, result analysis, preparation of tables and figures, and writing of research sections were carried out by the author. In collaboration with the scientific advisors, the results were analyzed and summarized, and the conclusions of the dissertation were formulated. The author did not borrow ideas or results from co-authors in joint publications.

Main provisions and results of the dissertation

The main findings and results of the dissertation were presented and discussed at the following conferences: The 82nd Scientific and Practical Conference with International Participation for Young Scientists and Students “Topical Issues of Modern Medicine and Pharmacy – 2022” (Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, May 17, 2022); The 83rd Scientific and Practical Conference with International Participation for Young Scientists and Students “Topical Issues of Modern Medicine and Pharmacy – 2023” (Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, May 25–26, 2023); The 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, November 1–30, 2023, MDPI: Basel, Switzerland; The 84th Scientific and Practical Conference with International Participation for Young Scientists and Students “Topical Issues of Modern Medicine and Pharmacy – 2024” (Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Zaporizhzhia, May 23–24, 2024); The Scientific and Practical Conference of Young Scientists with International Participation “Topical Issues of Pharmacology and Drug Toxicology” (No. 137), Kyiv, September 2024; The 85th Scientific and Practical Conference with International Participation for Young Scientists and Students “Topical Issues of Modern Medicine and Pharmacy – 2025” (Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Zaporizhzhia, May 15–16, 2025).

Publications: Based on the materials of the dissertation, 11 scientific papers have been published, including 5 scientific articles indexed in Scopus, and 6 theses of reports.

Key words: *Prenatal hypoxia; oxidative stress; reactive oxygen species; histological studies; toxicity; heart rate variability; NO; gene expression; vascular endothelial growth factor; cardioprotection; endothelioprotection; antioxidant system; cardiovascular system.*

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Попазова О. О. Особливості порушень у нітроксидергічній системі міокарду щурів після внутрішньоутробної гіпоксії. Збірник тез доповідей 82 науково-практичної конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2022» (Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, 17 травня 2022 р.). – Запоріжжя: ЗДМУ, 2022. – с. 77.

2. Popazova O.O., Belenichev I.F., Abramov A.V., Bukhtiyarova N.V., Cheresniuk I.L., Skoryna D.Yu. Indicators of bioelectrical activity of the rat heart after prenatal hypoxia and pharmacological correction. *Innov Biosyst Bioeng*, 2023, 6 (3-4):148–160 <http://dx.doi.org/10.20535/ibb.2022.6.3-4.268504>. Scopus Q3. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, експериментальні дослідження, обговорення результатів та підготовку тексту статті до друку).*

3. Popazova O. O. ECG changes in rats after prenatal hypoxia and course treatment with modulators of NO. Друк. Збірник тез доповідей 83 науково-практичної конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2023» (Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, 25-26 травня 2023 р.). – Запоріжжя: ЗДМУ, 2023.

4. Popazova O., Belenichev I., Bukhtiyarova N., Ryzhenko V., Oksenysh V., Kamyshnyi A. Cardioprotective Activity of Pharmacological Agents Affecting NO Production and Bioavailability in the Early Postnatal Period after Intrauterine Hypoxia in Rats. Друк. *Biomedicines* 2023, 11, 2854. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102854>. Scopus Q1. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, експериментальні дослідження, обговорення результатів та підготовку тексту статті до друку).*

5. Belenichev I., Aliyeva O, Bukhtiyarova N., Popazova O., Ryzhenko O. Prognostic Significance of Neurodegradation/Neuroplasticity Markers and Endothelial Dysfunction Indicators in Assessing the Efficiency of Therapy for Children with CNS Disorders after

Prenatal Hypoxia Proceedings of the 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 1–30 November 2023, MDPI: Basel, Switzerland, doi:10.3390/ECMC2023-15626.

6. Popazova, O., Belenichev, I., Yadlovskiy, O., Oksenysh, V., Kamyshnyi, A. Altered blood molecular markers of cardiovascular function in rats after intrauterine hypoxia and drug therapy. *Current Issues in Molecular Biology*, 2023, 45(11), 8704–8715. <https://doi.org/10.3390/cimb45110547>. Scopus Q2. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, експериментальні дослідження, обговорення результатів та підготовку тексту статті до друку).*

7. Popazova O. O. Disruption of cardiac bioelectrical activity after intrauterine hypoxia and approaches to cardioprotection in the postnatal period. Збірник тез доповідей 84 науково-практичної конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2024» (Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, м. Запоріжжя, 23-24 травня 2024 р.). – Запоріжжя: ЗДМФУ, 2024, с.125. (диплом I ступеню)

8. Попазова О. О., Беленічев І.Ф., Ядловський О.Є. Вплив модуляторів системи оксиду азоту на порушення серцево-судинної системи у щурів після пренатальної гіпоксії. Актуальні питання фармакології та лікарської токсикології: матеріали науково-практичної конференції молодих вчених із міжнародною участю (№137), вересень 2024, м. Київ.

9. Popazova O. O. Development of approaches to pharmacological correction of endothelial dysfunction in newborns after prenatal hypoxia: Focus on NO system modulators. Збірник тез доповідей 85 науково-практичної конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2025» (Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, м. Запоріжжя, 15-16 травня 2025 р.). – Запоріжжя: ЗДМФУ, 2025, с 231. (диплом I ступеню).

10. Belenichev, I., Popazova, O., Yadlovskiy, O., Bukhtiyarova, N., Ryzhenko, V., Pavlov, S., Oksenysh, V., Kamyshnyi, O. Possibility of using NO modulators for pharmacocorrection of endothelial dysfunction after prenatal hypoxia. *Pharmaceuticals*,

2025, 18(1), 106. <https://doi.org/10.3390/ph18010106>. Scopus Q1. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, експериментальні дослідження, обговорення результатів та підготовку тексту статті до друку).*

11. Popazova O., Belenichev I., Bukhtiyarova N., Ryzhenko V., Gorchakova N., Oksenysh V., Kamyshnyi O. Molecular and Biochemical Mechanisms of Cardiomyopathy Development Following Prenatal Hypoxia—Focus on the NO System. *Antioxidants*. 2025; 14(6):743. <https://doi.org/10.3390/antiox14060743>. Scopus Q1. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, обговорення результатів та підготовку тексту статті до друку).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ.....	20
ВСТУП.....	23
РОЗДІЛ 1 РОЛЬ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ В МОЛЕКУЛЯРНИХ І БІОХІМІЧНИХ МЕХАНІЗМАХ ФОРМУВАННЯ КАРДІОМІОПАТІЇ ПІСЛЯ ПРЕНАТАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	30
1.1 Внутрішньоутробна гіпоксія та її вплив на розвиток серцево-судинної системи	
1.1.1 Пренатальна гіпоксія та її наслідки.....	30
1.1.2 Причини розвитку пренатальної гіпоксії.....	35
1.1.3 Роль оксиду азоту у регуляції роботи серця	35
1.1.4 Роль оксиду азоту у серці під час ембріонального розвитку	37
1.1.5 Зміни в системі оксиду азоту в серці нащадків після ПГ	38
1.2 Механізми серцево-судинної дисфункції після пренатальної гіпоксії	41
1.2.1 Порухення енергетичного обміну в міокарді та мітохондріальна дисфункція у нащадків після ПГ	41
1.2.2 Нітрозативний стрес у серці нащадків після пренатальної гіпоксії	45
1.2.3 NO-залежні механізми ендотеліальної дисфункції після пренатальної гіпоксії	50
1.2.4 NO та апоптоз кардіоміоцитів після пренатальної гіпоксії	55
1.3 Молекулярні механізми та стресові відповіді.....	58
1.3.1 Взаємодія оксиду азоту (NO) та HIF у міокарді після перинатальної гіпоксії	58
1.3.2 Оксид азоту (NO) та запалення після перинатальної гіпоксії	60
1.3.3 NO та HSP70 після ПГ	61
1.3.4 Оксидативний стрес у пошкодженні міокарда після пренатальної гіпоксії	65
1.4 Кардіопротекція та терапевтичні підходи	66
1.4.1 Кардіопротекція після пренатальної гіпоксії	66

1.4.2 Модулятори оксиду азоту (NO) — перспективні кардіопротектори після пренатальної гіпоксії	68
1.4.2.1 Ангіолін ((S)-2,6-діаміно-гексанова кислота 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат)	70
1.4.2.2 Тіотриазолін (морфолін 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат; морфолінтіазолат)	74
1.4.2.3 Мілдронат	76
1.4.2.4 L-аргінін	77
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	79
2.1 Експериментальна модель ПГ та характеристика лабораторних тварин	79
2.2 Характеристика обраних препаратів і фармакологічних агентів	81
2.3 Анестезія.....	82
2.4 Підготовка біологічного матеріалу	82
2.5 Імуноферментний аналіз	83
2.5.1 Імуноферментний аналіз, який проводили в сироватці крові	83
2.5.2 Імуноферментний аналіз, що вимірювали в цитозольному гомогенаті серця	84
2.6 Полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу.....	85
2.7 Біохімічні методи	88
2.8 Морфометричні дослідження.....	89
2.9 Підготовка тварини до реєстрації ЕКГ та її проведення	90
2.10 Статистичний аналіз.....	94
РОЗДІЛ 3 ХАРАКТЕРИСТИКИ БІОЕЛЕКТРИЧНОЇ АКТИВНОСТІ СЕРЦЯ ЩУРІВ ПІСЛЯ ПРЕНАТАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ ТА ЇЇ ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ	96
3.1 Характеристика параметрів автоматизму міокарда	97
3.2 Характеристика параметрів збудливості міокарда	103
3.3 Характеристика параметрів контрактильності міокарда.....	106
3.4 Функціональна ефективність ЕКГ міокарда (RANKS) після експериментальної терапії наслідків пренатальної гіпоксії	109

Резюме	114
РОЗДІЛ 4 ДІЯ РІЗНИХ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ЗАСОБІВ НА СИСТЕМУ ОКСИДУ АЗОТУ У ЩУРІВ ПІСЛЯ ПРЕНАТАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ.....	115
4.1 Кардіопротекторний вплив фармакологічних препаратів на продукцію та біодоступність оксиду азоту в постнатальному періоді після внутрішньоутробної гіпоксії у щурів	116
4.2 Дослідження біомаркерів окисного стресу, запалення та гіпоксії в експериментальних умовах	127
4.3 Можливість застосування модуляторів NO для фармакокорекції ендотеліальної дисфункції після пренатальної гіпоксії	137
Резюме.	154
ВИСНОВКИ.....	157
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	159
Додаток А Акти провадження.....	218
Додаток Б Список опублікованих автором праць на тему дисертації.....	223
Додаток В Відомості про апробацію результатів дисертації.....	226

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ

ADMA – асиметричний диметиларгінін;

Ас – ацетилювання (acetylation);

АДФ – аденозиндифосфат;

АМФ – аденозинмонофосфат;

АМРК – АМФ-активована протеїнкіназа;

АТФ – аденозинтрифосфат;

Akt – серин/треонін-протеїнкіназа В;

ВН4 – тетрагідробіоптерин;

BrdU (5-бром-2'-дезоксидуридин) – тест для виявлення проліферації клітин;

Cmax cor – максимальна концентрація в міокарді;

cGMP – циклічний гуанозинмонофосфат (cyclic guanosine monophosphate);

Cu/ZnSOD (Cu/Zn-SOD) – мідь-цинкова супероксиддисмутаза;

DAMPs – молекули, асоційовані з ушкодженням (Damage-Associated Molecular Patterns);

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

eNOS – ендотеліальна NO-синтаза (endothelial nitric oxide synthase);

EDTA – едетатнатрію (ethylene diamine tetraacetic acid);

ELISA – імуноферментний аналіз (enzyme-linked immunosorbent assay);

FeSOD – залізовмісна супероксиддисмутаза;

GPX-1 (GPX1) – глутатіонпероксидаза 1;

GPX-4 (GPX4) – глутатіонпероксидаза 4;

HIF – фактор, індукований гіпоксією (Hypoxia-Inducible Factor);

HIF-1 α (HIF-1) – альфа-субодиниця фактора, індукованого гіпоксією 1;

HMGB-1 – білок високої рухливості групи В1 (High-Mobility Group Box 1);

HSP70 (HSP/HSP70) – теплошоківий білок 70 кДа (heat shock protein 70);

iNOS – індукцйбельна NO-синтаза (inducible nitric oxide synthase);

IKK – кіназа-інгібітор NF- κ B (I κ B kinase);

IL-1 β , IL-6, IL-8 – інтерлейкіни (interleukins);

in vitro / in vivo – в умовах in vitro (в пробірці), in vivo (в організмі);

ІХС – ішемічна хвороба серця;

KCl – хлорид калію (potassium chloride);

КМЦ – кардіоміоцит(и);

LDH – лактатдегідрогеназа;

LPS – ліпополісахариди (lipopolysaccharides);

lncRNA – довгі некодуючі РНК (long non-coding RNA);

mPTP – мітохондріальна пора відкриття переходу (mitochondrial permeability transition pore);

miR-155-5 – мікроРНК-155-5р (мікроРНК – коротка некодуюча РНК);

miRNA – мікроРНК;

mРНК – матрична рибонуклеїнова кислота (месенджерна РНК);

NADH – відновлена форма нікотинамідаденіндинуклеотиду;

NADPH (НАДФН) – нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат (відновлена форма);

NF- κ B (NF-kB) – ядерний фактор каппа-В (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells);

NiSOD – нікельвмісна супероксиддисмутаза;

NO – оксид азоту (Nitric Oxide);

NOS – синтази оксиду азоту (Nitric Oxide Synthases);

NO-модулююча активність – здатність регулювати рівень оксиду азоту;

OH⁻ – гідроксид-іон;

ONOO⁻ – пероксинітрит (peroxynitrite);

PAR1 – рецептор протеази-1 (protease-activated receptor 1);

pH – водневий показник (рівень кислотності);

PCR – полімеразна ланцюгова реакція (polymerase chain reaction);

PI3K – фосфоінозитид-3-кіназа (Phosphoinositide 3-Kinase);

PKC – протеїнкіназа C (Protein Kinase C);

PKG – протеїнкіназа G (protein kinase G);

ПГ – пренатальна гіпоксія;

PGF – простагландин F;

PBS – фосфатно-сольовий буфер (phosphate buffered saline);

PCR – полімеразна ланцюгова реакція (polymerase chain reaction);

RhoA/Rho-кіназа – сигнальний шлях RhoA/Rho-кінази;

Redox Factor-1 – фактор, що бере участь у відновленні редокс-чутливих груп;

SH-групи – тіольні групи (сульфгідрильні);

SOD – супероксиддисмутаза (superoxide dismutase);

SP1 – специфічний транскрипційний фактор 1 (Specificity Protein 1);

SUMO – сумоїляція (Small Ubiquitin-like Modifier);

ССС – серцево-судинна система;

ST2 – білок пригнічення пухлиногенезу 2 (suppression of tumorigenicity 2 protein);

sEPCR – розчинний рецептор ендотеліального протеїну C (soluble endothelial protein C receptor);

Tie2 – рецепторна тирозинкіназа (tyrosine kinase receptor Tie2);

TLR-4 – Toll-подібний рецептор 4 (Toll-like Receptor 4);

TNF- α – фактор некрозу пухлин альфа (Tumor Necrosis Factor alpha);

VEGF – судинний ендотеліальний фактор росту (vascular endothelial growth factor);

ЦНС – центральна нервова система.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Постгіпоксичні порушення серцево-судинної системи (ССС) належать до провідних причин захворюваності новонароджених і, за даними різних джерел, зустрічаються у 40–70% дітей, які зазнали впливу внутрішньоутробної гіпоксії. Саме ці порушення нерідко стають відправною точкою для розвитку багатьох, часто тяжких, захворювань як у дитячому, так і в дорослому віці. На сьогодні механізми розвитку постгіпоксичних уражень серця залишаються недостатньо вивченими, що визначає актуальність даної проблеми у педіатричній кардіології [1-8]. Клінічні прояви цієї патології в гострий період є поліморфними, часто маскують інші захворювання, тому нерідко виникає потреба у проведенні диференційної діагностики з вродженими вадами серця, вродженим міокардитом та кардіоміопатіями. На сьогодні відсутній єдиний погляд щодо етапності та комплексності терапії постгіпоксичних уражень серця [9,10]. У зв'язку з цим пошук нових структурних, молекулярних та біохімічних особливостей постгіпоксичних уражень ССС у новонароджених та розробка на їх основі підходів до фармакотерапії є предметом наукового інтересу.

Згідно з сучасними уявленнями, ендотеліальна дисфункція та пов'язані з нею порушення функціонування системи оксиду азоту (NO) лежать в основі розвитку багатьох серцево-судинних захворювань [11,12]. Під впливом гіпоксії, інфекції та інших пошкоджувальних чинників відбувається дизрегуляція системи оксиду азоту, що призводить до формування патологічних змін у різних органах і системах, зокрема у ССС [13,14]. Однак дані літератури щодо ролі системи NO у розвитку серцево-судинної патології у новонароджених, а також можливостей кардіопротекторної дії її модифікаторів є доволі обмеженими. У низці досліджень встановлено кардіо- та ендотеліопротекторні властивості препаратів, здатних як підвищувати синтез NO, так і посилювати його біодоступність [15-19].

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

Дисертаційна робота є фрагментом планової наукової теми кафедри фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медико-фармацевтичного університету «Роль тіол-дисульфідної системи в реалізації механізмів нейродеструкції/нейропротекції та розробка шляхів фармакологічної модуляції після пренатальної гіпоксії» (2023–2025 рр., № держреєстрації: 0123U101110). Дисертантка є співвиконавицею зазначеної теми. У межах виконання наукової роботи здобувачкою особисто проведено експериментальні дослідження.

Мета дослідження: на підставі експериментальних досліджень обґрунтувати доцільність застосування модуляторів системи NO (L-аргініну, тіотриазоліну, ангіоліну та мілдронату) як засобів кардіопротекції після пренатальної гіпоксії.

Задачі дослідження:

1. Вивчити вплив модуляторів системи оксиду азоту (L-аргініну, тіотриазоліну, ангіоліну та мілдронату) на показники ЕКГ, молекулярні та біохімічні маркери ушкодження серця у новонароджених щурів після пренатальної гіпоксії у 2-місячному віці.

2. Оцінити вплив L-аргініну, тіотриазоліну, ангіоліну та мілдронату на стан системи оксиду азоту та нітрозативного стресу в міокарді щурів після пренатальної гіпоксії шляхом визначення експресії мРНК eNOS та iNOS, білкової експресії eNOS і iNOS, рівнів стабільних метаболітів NO та нітротирозину у тварин 1- та 2-місячного віку.

3. Оцінити вплив L-аргініну, тіотриазоліну, ангіоліну та мілдронату на стан ендогенної цитопротекції та антиоксидантної системи міокарда після пренатальної гіпоксії шляхом визначення експресії HSP70, мРНК HIF-1 α , а також концентрацій антиоксидантних ферментів (SOD1, GPX1, GPX4) у тварин 1- та 2-місячного віку.

4. Визначити вплив L-аргініну, тіотриазоліну, ангіоліну та мілдронату на окремі показники ендотеліальної дисфункції (морфометричні характеристики

ендотеліальних клітин мікросудин міокарда, експресію sEPCR, Tie2, VEGF-B) у щурів 1- та 2-місячного віку.

5. Провести порівняльну оцінку ефективності застосування вищезгаданих препаратів з метою усунення порушень серцево-судинної системи після пренатальної гіпоксії.

Об'єкт дослідження – функціональні, біохімічні та молекулярні порушення нітросидергічної системи у міокарді щурів після пренатальної гіпоксії.

Предмет дослідження – кардіопротективна дія L-аргініну, тіотриазоліну, ангіоліну та мілдронату після експериментальної пренатальної гіпоксії.

Наукова новизна проведеної роботи.

Уперше експериментально підтверджено висунуту нами концепцію фармакологічної модуляції нітросидергічної системи в комплексній терапії постгіпоксичних порушень серцево-судинної системи (ССС) у новонароджених. Суть цієї концепції полягає у застосуванні препаратів, що підвищують біодоступність та продукцію оксиду азоту (NO) — таких як тіотриазолін, ангіолін, мілдронат та L-аргінін — як кардіопротекторів.

У ході даного дослідження вперше показано, що в патогенезі уражень серця внаслідок ПГ важливу роль відіграють порушення функціонування нітросидергічної системи. Вперше встановлено, що експериментальна ПГ асоціюється зі статистично значущим зменшенням продукції NO у міокарді, що розвивається внаслідок зниження активності та експресії eNOS, а також зменшення його біодоступності через пригнічення експресії антиоксидантних ферментів (СОД, GPX) та ендогенних факторів цитопротекції (HSP70, HIF-1). Це, у свою чергу, призводить до розвитку нітрозативного стресу, порушень роботи серця та формування ендотеліальної дисфункції.

У дисертаційній роботі вперше виявлено кардіопротекторну дію модулаторів NO (тіотриазоліну, ангіоліну, мілдронату та аргініну) після перенесеної ПГ. Вона проявляється в покращенні електрофізіологічної активності серця, нормалізації вегетативної регуляції серцевої діяльності, зниженні рівня нітрозативного й оксидативного стресу, гальмуванні формування ендотеліальної дисфункції,

відновленні функціональної активності нітроксидергічної системи міокарда, а також активації механізмів ендогенної цито- та кардіопротекції — як одразу після завершення експериментальної терапії, так і в більш віддалені терміни спостереження.

Практична значимість проведеної роботи.

На підставі отриманих результатів теоретично обґрунтовано й експериментально підтверджено доцільність застосування L-аргініну, тіотриазоліну, мілдронату та, особливо, ангіоліну в комплексній терапії порушень серцево-судинної системи у новонароджених після перенесеної ПГ. Результати дослідження впроваджено в навчальний процес і наукову діяльність: кафедри клінічної фармації та клінічної фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, кафедри фармакології Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, кафедри фармакології та медичної рецептури з курсом нормальної фізіології та кафедри акушерства і гінекології ЗДМФУ, кафедри фармакології, загальної та клінічної фармації Дніпровського державного медичного університету, а також у наукову діяльність Інституту фармакології та токсикології НАМН України. За результатами дослідження було доповнено звіт з доклінічного вивчення розчину для парентерального введення ангіоліну.

Модель експериментального дослідження.

Експериментальне дослідження виконано на 170 білих щурах лінії Вістар серед яких 50 тварин віком 4,5 місяця з масою тіла 220–240 г, 60 — віком 1 місяць та 60 — віком 2 місяці. Модель пренатальної гемічної гіпоксії відтворювали шляхом внутрішньоочеревинного введення нітриту натрію у дозі 50 мг/кг вагітним самкам щурів з 16 по 21 день гестації. Контрольні тварини отримували рівноважний об'єм фізіологічного розчину. Після народження нащадків було розподілено на шість експериментальних груп: інтактну, контрольну після ПГ без лікування та чотири групи, які отримували протягом 30 днів постнатального періоду фармакологічні препарати з потенційною кардіопротекторною дією — тіотриазолін (50 мг/кг), ангіолін (50 мг/кг), L-аргінін (200 мг/кг) або мілдронат (100 мг/кг). Препарати вводили щоденно внутрішньоочеревинно.

Методи дослідження.

На 30-й та 60-й день постнатального розвитку у щурів проводили забір біоматеріалу після наркозу тіопенталом натрію (40 мг/кг) внутрішньоочеревинно. Кров брали з черевної аорти, після чого екстрагували серце. Зразки серцевої тканини та сироватки використовували для гістологічного, біохімічного, імуноферментного та молекулярно-генетичного аналізу. Морфологічний аналіз виконували за допомогою забарвлення гематоксиліном і еозином та напівкількісного оцінювання деструктивних змін у кардіоміоцитах. Біохімічно визначали рівні маркерів оксидативного і нітрозативного стресу, прозапальних і вазорегуляторних молекул (HSP70, ST2, eNOS, iNOS, нітротирозин, sEPCR, Tie2, VEGF-B, SOD1, GPX1, GPX4). Імуноферментне визначення проводили за стандартними протоколами з комерційними наборами. Експресію генів HIF-1, VEGF та VEGF-B досліджували методом кількісної ПЛР у реальному часі після виділення РНК і зворотної транскрипції. ЕКГ реєстрували системою ECG TUNNEL. Статистичний аналіз виконували у Statistica®, SPSS, Excel та VideoTest Morphology із попередньою перевіркою нормальності розподілу, застосуванням відповідних параметричних або непараметричних тестів, значущість визнавали при $p < 0,05$.

Особистий внесок здобувача.

Під час підготовки та роботи над дисертацією авторка особисто виконала патентний пошук, здійснила критичний аналіз літературних джерел за темою дисертації. Під керівництвом наукових керівників було сформульовано мету та завдання роботи, а також проведено планування дослідження. Було засвоєно всі необхідні експериментальні методи дослідження – моделювання ПГ, оцінку впливу досліджуваних засобів на електрофізіологічні, біохімічні та молекулярні показники стану ССС. За безпосередньої участі авторки були проведені електрофізіологічні, біохімічні, імуноферментні та гістологічні дослідження та ПЛР в реальному часі. Дисертанткою особисто було проведено статистичну обробку цифрових даних, проаналізовано отримані результати, складено таблиці та рисунки, підготовлено та написано розділи роботи. У співпраці з науковими

керівниками було здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, а також оформовано висновки з дисертації. Авторка не запозичувала ідеї та/або результати роботи інших співавторів у сумісних публікаціях.

Апробація результатів дисертації

Основні положення та результати дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на: 82-й науково-практичній конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2022» (Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, 17 травня 2022 р.); 83-й науково-практичній конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2023» (Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, 25–26 травня 2023 р.); 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 1–30 November 2023, MDPI: Basel, Switzerland; 84-й науково-практичній конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2024» (Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, м. Запоріжжя, 23–24 травня 2024 р.); науково-практичній конференції молодих вчених із міжнародною участю «Актуальні питання фармакології та лікарської токсикології» (№137) (м. Київ, вересень 2024 р.); 85-й науково-практичній конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2025» (Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, м. Запоріжжя, 15–16 травня 2025 р.).

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових праць, зокрема 5 наукових статей, усі з яких індексуються у міжнародній наукометричній базі Scopus. Із них 3 статті опубліковані у виданнях, що належать до першого квартилю, одна — до другого квартилю, одна — до третього квартилю. Окрім того, опубліковано 6 тез доповідей у збірниках матеріалів науково-практичних конференцій.

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота викладена державною мовою на 227 сторінках машинописного тексту та складається з анотації, списку друкованих праць, вступу, 4 розділів: огляду літератури, матеріалів та методів, власних досліджень, а також загальних висновків, списку використаних джерел (з яких кирилицею – 19, латиницею – 501) та додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 134. сторінки друкованого тексту. Роботу ілюстровано 17 таблицями та 15 рисунками.

РОЗДІЛ 1

РОЛЬ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ В МОЛЕКУЛЯРНИХ І БІОХІМІЧНИХ МЕХАНІЗМАХ ФОРМУВАННЯ КАРДІОМІОПАТІЇ ПІСЛЯ ПРЕНАТАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Внутрішньоутробна гіпоксія та її вплив на розвиток серцево-судинної системи

1.1.1 Пренатальна гіпоксія та її наслідки

Гіпоксичні зміни енергетичного обміну міокарда призводять до стрімкого зниження його скоротливої функції. Цьому сприяють певні анатомо-фізіологічні особливості новонароджених, зокрема дифузний тип коронарних артерій із численними анастомозами між правою та лівою коронарними артеріями, їх невеликий діаметр, а також переважання симпатичної регуляції, тонус якої підтримується попередньою гіпоксичною дисфункцією центральної нервової системи (ЦНС), що відома як цереброкардіальний синдром [20-22].

Внутрішньоутробна гіпоксія зумовлює порушення вегетативної регуляції коронарних судин, що призводить до порушень енергетичного обміну та різкого зниження синтезу макроергічних сполук у мітохондріях кардіоміоцитів [23-26]. Ацидоз, гіперкатехоламінемія, гіпоглікемія та погіршення реологічних властивостей крові є ключовими патогенетичними факторами гіпоксичного ушкодження провідних кардіоміоцитів новонароджених, сприяючи розвитку різних видів аритмій [27,28]. Вагому роль у виникненні порушень серцевого ритму після гіпоксії відіграють також розлади вегетативної регуляції [29,30]. Зв'язок між гіпоксичним ураженням міокарда та різними порушеннями ритму й провідності серця підтверджується результатами морфологічних та ультраструктурних досліджень [31,32].

У провідній системі серця після перенесеної внутрішньоутробної гіпоксії спостерігаються ознаки апоптозу та дистрофії, причому простежується певна

залежність між ступенем вираженості морфологічних змін та клінічно зареєстрованими порушеннями ритму і провідності. Кінцевим морфологічним результатом гіпоксичного ураження міокарда може бути вогнищева дистрофія, яка має два можливих наслідки: повне зворотне відновлення функції або формування вогнищевого кардіосклерозу [33-37]. У сучасній науковій літературі кардіоміопатії розглядають як захворювання неясної етіології, що уражають переважно міокард і характеризуються порушенням властивостей скоротливих білків серцевого м'яза, внаслідок чого ефективність скорочення серця значно знижується [38-41].

Це, у свою чергу, негативно впливає на функціонування всієї ССС дитини — виникають симптоми серцевої недостатності, які поступово прогресують, супроводжуючись шунтуванням крові з одного кола кровообігу в інше за відсутності морфологічних ознак активного запалення. Кардіоміопатії поділяють на первинні (ідіопатичні) та вторинні [34,42,43]. Транзиторна постгіпоксична ішемія міокарда належить до вторинної кардіоміопатії та переважно спостерігається у перші години та дні життя новонародженого. Серед гемодинамічних чинників, що відіграють важливу роль у розвитку постгіпоксичної кардіоміопатії, особливе значення мають транзиторна легенева гіпертензія, підвищення артеріального тиску та закриття фетальних комунікацій, що створюють додаткове навантаження на міокард із зниженою функціональною здатністю [44-46].

Залежно від перебігу пологів та результату народження ступінь ушкодження ССС буде різним: це може проявлятися неонатальною легеневою гіпертензією, збереженням фетальних комунікацій, дисфункцією міокарда із дилатацією порожнини серця, ішемією міокарда, а також порушеннями ритму й провідності серця [47-53]. Гіпоксія призводить до підвищеного навантаження на серце, оскільки у дитини відбувається звуження судин малого та великого кола кровообігу, що є наслідком підвищеного вивільнення катехоламінів та прямої дії вуглекислого газу [23,26,54-55]. При цьому збільшується венозне повернення крові до серця та підвищується тиск у правому шлуночку, який може зрівнятися із

системним артеріальним тиском. Коронарний кровотік не здатний повністю забезпечити кардіоміоцити киснем, а потреба у ньому зростає. Це зумовлює розвиток коронарної недостатності та ішемії міокарда [34,56-59].

У дітей, які перенесли як хронічну внутрішньоутробну, так і перинатальну гіпоксію, у неонатальному періоді спостерігається синдром серцево-судинної дезадаптації, який супроводжується тривалим (до кількох місяців життя) підвищенням активності кардіоспецифічних ферментів. Цей період можна вважати перехідним у процесах метаболізму міокарда новонароджених, які перенесли гіпоксію. У дітей із хронічною внутрішньоутробною гіпоксією синдром серцево-судинної дезадаптації, як правило, має транзиторний, доброякісний характер з швидким зворотнім розвитком клінічної симптоматики та майже повною відсутністю резидуальних явищ. У кожної третьої дитини, яка перенесла перинатальну гіпоксію, зберігаються залишкові прояви у вигляді мінімальних ознак легеневої гіпертензії. Значно рідше виявляють недостатність клапанів та зниження скоротливої здатності міокарда шлуночків. Це зумовлює необхідність тривалого амбулаторного спостереження за такими дітьми та проведення відповідної медичної корекції.

Визначення типу вегетативної реактивності дозволяє обрати провідний напрям для здійснення коригуючих заходів, що запобігають формуванню функціональної патології серця у цих пацієнтів у майбутньому. ПГ призводить до зростання навантаження на серце через вазоконстрикцію судин як системного, так і легеневого кола кровообігу, що зумовлено порушеннями у системі оксиду азоту, розвитком нітрозативного стресу та ендотеліальної дисфункції [23,60-71]. Все це призводить до неспроможності ССС забезпечувати киснем працюючий міокард, що зумовлює розвиток ішемії.

У середньому у 30% дітей, які перенесли внутрішньоутробну гіпоксію, зберігаються залишкові явища, такі як мінімальні ознаки легеневої гіпертензії, зниження насосної функції серця, порушення вегетативної регуляції серцевої діяльності. ПГ негативно впливає на морфологічні та функціональні характеристики ССС на всіх етапах онтогенезу та може призводити до

формування диспропорцій у розвитку серця, а також морфофункціональних порушень у системі провідності.

Функціональні зміни ССС при синдромі постгіпоксичної дезадаптації обумовлені порушенням нейрогуморальної регуляції судинного тону, транзиторною неонатальною легеневою гіпертензією, тривалим збереженням фетальних комунікацій та затримкою формування зрілого типу метаболізму кардіоміоцитів [6,8,33,72-75]. Порушення функціонування ССС вже виявляють під час первинного огляду новонародженого, зокрема у вигляді неповної блокади правої ніжки пучка Гіса, екстрасистолії та ознак субендокардіальної ішемії. Тому постгіпоксична кардіоміопатія розглядається як один із факторів ризику розвитку серцево-судинної патології (порушення ритму, судинні дистонії та інші) у більш пізні періоди життя [6,76-78].

У скоротливому міокарді та провідній системі у постгіпоксичний період виявляють клітини з ознаками апоптозу та дистрофії, причому спостерігається певна кореляція між вираженістю морфологічних змін та порушеннями біоелектричної активності у вигляді розладів ритму та провідності. Наслідком гіпоксичного ураження міокарда може бути вогнищева дистрофія, яка за відсутності адекватної терапії може прогресувати до розвитку вогнищового кардіосклерозу [79,80]

Підсумовуючи вищевикладене, можна стверджувати, що ПГ є потужним ушкоджувальним фактором, який запускає механізми оксидативного та нітрозативного стресу, дисфункції мітохондрій, порушення енергозабезпечення серця та апоптозу (Рис. 1.1.1.). Дослідження молекулярних та біохімічних механізмів розвитку постгіпоксичної кардіоміопатії у новонароджених показали, що багато з цих процесів залежать від системи NO. Усе це робить систему NO перспективним об'єктом для вивчення як у фундаментальній медицині та біології, так і перспективною мішенню для фармакологічної корекції.

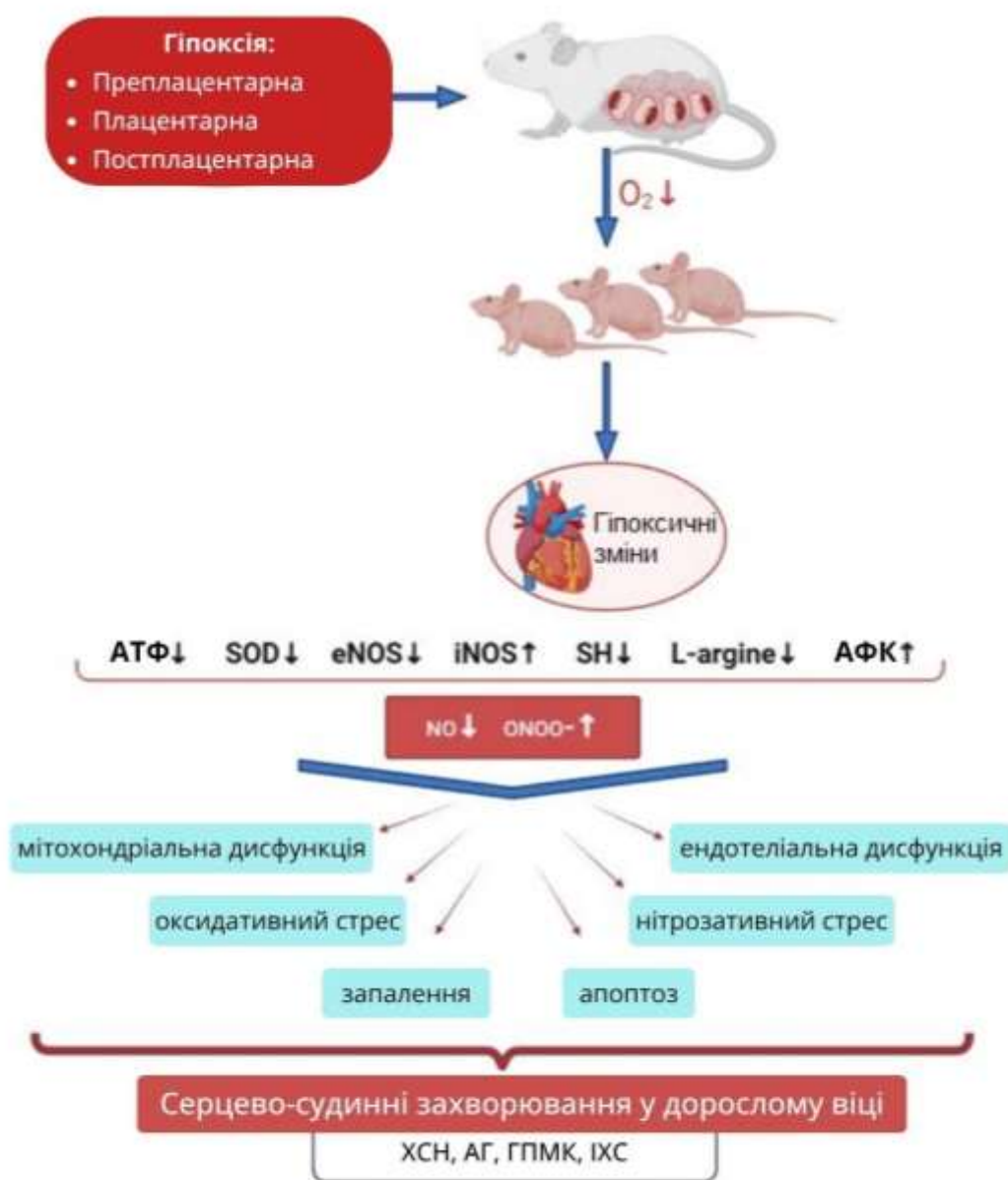


Рис. 1.1.1. Пренатальна гіпоксія та її вплив на серцево-судинну систему плода та нащадків. Пренатальна гіпоксія спричиняє порушення функціонування системи NO, що супроводжується дефіцитом NO, підвищенням рівня активних форм кисню (АФК) та їх цитотоксичних похідних, а також активацією NO-залежних молекулярно-біохімічних механізмів, які зумовлюють розвиток апоптозу, ендотеліальної та мітохондріальної дисфункції, запальних процесів, оксидативного та нітрозативного стресу. Сукупність цих змін створює передумови для формування серцево-судинної патології у дорослому віці, зокрема хронічної серцевої недостатності (ХСН), артеріальної гіпертензії (АГ), гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) та ішемічної хвороби серця (ІХС). Рисунок створено авторкою за допомогою BioRender та узагальнює розділ.

1.1.2 Причини розвитку пренатальної гіпоксії

Пренатальна гіпоксія є наслідком широкого спектра несприятливих процесів, що відбуваються в організмі дитини, матері або в плаценті. Ймовірність розвитку гіпоксії підвищується при наявності захворювань у матері – анемії, серцево-судинної патології (вроджених вад серця, гіпертонії), хвороб нирок, дихальної системи (хронічного бронхіту, бронхіальної астми тощо), цукрового діабету, токсикозів вагітності, багатоплідної вагітності, інфекцій, що передаються статевим шляхом [1,6].

На формування ПГ впливає також вживання алкоголю, нікотина, наркотична та інші види залежностей у матері. Гіпоксія може виникати при порушеннях плодово-плацентарного кровообігу, зумовлених загрозою викидня, переношеною вагітністю, патологією пуповини, фетоплацентарною недостатністю, аномаліями родової діяльності та іншими ускладненнями вагітності та пологового процесу. ПГ поділяють на преплацентарну, матково-плацентарну та постплацентарну гіпоксію [23,25,41,52,58,65,67,70,74].

1.1.3 Роль оксиду азоту у регуляції роботи серця

Роль оксиду азоту (NO) у регуляції різноманітних процесів у серцево-судинній системі є добре відомою. Ендотеліальні клітини синтезують та вивільняють NO, який опосередковує широкий спектр ефектів, включаючи регуляцію судинного тону, гемостазу, артеріального тиску та ремоделювання судинної стінки [81-84]. Важливість NO для функціонування кардіоміоцитів також добре висвітлена, зокрема його участь у регуляції іонних каналів, гомеостазу Ca^{2+} , скоротливої здатності, енергетичного метаболізму, проліферації та формуванні резистентності до гіпоксії [85,86].

Оксид азоту реалізує свої метаболотропні, фізіологічні та інші ефекти через різні механізми дії. Зокрема, NO може посттрансляційно модифікувати білки-мішені, головним чином шляхом приєднання нітрозогрупи до тіолової бічної

групи цистеїну — процесу, відомого як S-нітрозилювання. Це призводить до набуття білком нових властивостей [87,88]. Ефекти безпосередньої модифікації білків-мішеней NO обмежуються відносно короткою дистанцією дифузії молекули. Передачу сигналу NO на більші відстані забезпечують молекули-кар'єри, зокрема S-нітрозоглутатіон, який виступає як носій та донор NO, транспортує його до віддалених мішеней [89-91]. Встановлено, що екзогенне введення глутатіону підсилює шлуночкові аритмії, індуковані розтягненням, що розглядається як потенційний механізм зв'язку між циклічністю NO та механічною відповіддю міокарда [92,93].

Окрім цього, NO активує сигнальний шлях фосфорилювання, залежний від cGMP/протеїнкінази G (PKG). Активація цього шляху призводить до фосфорилювання білків-мішеней, пригнічення шляху MEK1/2/ERK1/2 та активації сигнальних шляхів JNK1, 2 та 3. Кінцевим результатом такого процесу є розвиток кардіопротекторного ефекту та пригнічення експресії генів, що беруть участь у розвитку гіпертрофії, а також регуляція генів апоптозу [94-96]. Отримано дані, які свідчать про те, що у міокарді сигнальний шлях cGMP-нітрозилювання опосередковується ендотеліальною NO-синтазою (eNOS) [88,97,98].

У серці здорових новонароджених щурів NO регулює інтегриновий комплекс. Інтегрини — це група цитоскелетних білків, які не тільки забезпечують міжклітинну адгезію, але й беруть участь у сприйнятті та інтеграції механічних сигналів. Інтегрини є гетеродимерними трансмембранними рецепторами, які з'єднують позаклітинний матрикс із актиновим цитоскелетом, передаючи механічні сигнали у клітину [99-102]. У кардіоміоцитах здорових особин інтегрини сприяють підтримці функції серця та здатні модулювати механічне та електричне з'єднання у серці. Зокрема, у кардіоміоцитах новонароджених щурів інтегрини за участю NO сприяють вивільненню Ca^{2+} із саркоплазматичного ретикулуму. Окрім модулювання гомеостазу Ca^{2+} за допомогою сигнальної системи NO, встановлено, що стимулюючий вплив NO безпосередньо регулює експресію інтегринів через cGMP-залежний механізм [85,103,104].

Функціональні властивості певних іонних каналів у міокарді можуть

регулюватися NO шляхом нітрозилювання білкових фрагментів каналу (нітрозилювання тіольних груп цистеїну). Це нітрозилювання може як посилювати, так і пригнічувати активність каналу залежно від його типу. Зокрема, існують іонні канали, чутливі до механічних впливів, активність яких модулюється NO через нітрозилювання тіолових груп. Оксид азоту вивільняється у кардіоміоцитах у відповідь на механічні стимули та здатний регулювати провідність, модулюючи активність іонних каналів [105-109].

1.1.4 Роль оксиду азоту у серці під час ембріонального розвитку

Добре відома кардіопротекторна та ендотеліопротекторна роль оксиду азоту (NO), що синтезується ендотеліальною NO-синтазою (eNOS). NO забезпечує захист від ушкоджень міокарда під час реперфузії, регулює провідну систему серця, бере участь у синхронізації скорочення та релаксації серця, активує компенсаторні енергетичні шунти, модулює агрегацію тромбоцитів, регулює судинний тонус та інгібує проліферацію клітин гладеньких м'язів судин [109-115].

Проте глобальні ефекти NO на розвиваючу серцево-судинну систему не до кінця зрозумілі. Відомо, що NO впливає на ранню міграцію кардіогенних попередників та васкулогенез [116,117]. NO активує розчинну гуанілатциклазу та каталізує синтез циклічного гуанозинмонофосфату (сGMP), вторинного месенджера, який впливає на низку білків, зокрема на остеогенний морфогенетичний білок-4 (BMP4). BMP4 відіграє роль у визначенні позиції серця під час ембріонального розвитку серцево-судинної системи. Він бере участь у міграції кардіогенних попередників на ліву частину ембріона [116,118]. NO може впливати на сигнальний шлях BMP4, генеруючи реактивні азотовмісні сполуки, такі як перекиснїтрит. NO викликає органну транспозицію, змінюючи міграцію кардіогенних клітин з кров'яних острівців. NO регулює експресію серцевих генів і також впливає на апоптозні сигнальні шляхи. NO сприяє кардіогенезу як шляхом переключення на кардіогенний фенотип, так і індукції апоптозу в клітинах, які не призначені для кардіогенної диференціації. [119-121].

Відомо також, що індукцибельна NO-синтаза (iNOS) та, особливо, ендотеліальна eNOS значно експресуються на ранніх етапах кардіоміогенезу. Знижена експресія eNOS інгібує дозрівання термінально диференційованих кардіоміоцитів [122]. NO позитивно регулює експресію генів, що беруть участь у морфогенезі серця, а також контролює серцеву контракцію, розвиток кардіальних клітин, кальцієвий сигналінг та структуру і розвиток серця в ембріона [123-125].

1.1.5 Зміни в системі оксиду азоту в серці нащадків після ПГ

Відомо, що зміни рівня NO під час вагітності можуть призвести до виникнення класичних симптомів еклампсії, порушень розвитку плаценти, змін плацентарного кровообігу, ембріопатії та фетопатії, внутрішньоутробної затримки росту та загибелі плоду [126]. NO може виконувати роль як фактору патогенезу, так і як цито- та органопротектора (кардіо- та ендотеліопротектор) [127,128]. NO відіграє центральну роль у рості ендотелію та функціонує як критичний регулятор сімейства білків судинного ендотеліального фактора росту (VEGF), включаючи фактор росту плаценти (PGF), ангіопоетини (ANG-1 і ANG-2) та їх відповідні розчинні рецептори (SFLT-1 і STIE-2). Сімейство білків VEGF є необхідним для правильної васкуляризації плаценти, росту кровоносних судин та їх ремоделювання під час вагітності [129-131].

Продукція NO підвищує рівні проангіогенних VEGF-A і PGF в культурах людини, тоді як інгібування синтезу NO призводить до підвищення рівнів SFLT-1 та гіпертонічних реакцій у вагітних мишей [132-134]. NO також знижує експресію ендотеліальних рецепторів адгезії та про-запальних цитокінів і здатний до швидкої експресії HIF-1 α [135-137]. У умовах ПГ, з одного боку, продукція NO збільшується, а з іншого боку, синтез основних факторів для збереження та транспортування цієї молекули зменшується, що призводить до дефіциту NO в серці та кровоносних судинах. Під час тривалої пренатальної гіпоксії АФК можуть впливати на біодоступність NO [138]. Збільшення АФК під час ПГ та дисбаланс у співвідношенні АФК/NO у плода сприяють периферичному вазоконстрикторному

ефекту, що призводить до гіпоксії життєво важливих органів, таких як серце та мозок [139].

ПГ також підвищує експресію мРНК iNOS та збільшує рівень білка iNOS у шлуночках серця плоду [140]. Ці висновки були підтверджені клінічними дослідженнями, які показали, що гіпоксія знижує активність eNOS і експресію генів у серцевій тканині пацієнтів із ціанотичними вродженими вадами серця. Натомість активність iNOS та її експресія в цій групі дітей збільшуються [141]. ПГ підвищує експресію гомолога NADPH-оксидази 1, що стимулює виробництво супероксиду. Це, в свою чергу, може реагувати з NO, утворюючи стабільний пероксинітрит, що знижує біодоступність NO [142]. Постійні порушення в системі оксиду азоту серця після експериментальної ПГ характеризуються пригніченням експресії eNOS та мРНК eNOS, збільшенням експресії iNOS та мРНК iNOS, зменшенням біодоступності NO та активацією нітрозативного стресу. Це свідчить про зниження мРНК eNOS та білка у кардіоміоцитах дорослих тварин, що зазнали ПГ [143]. Ймовірно, відбувається зниження продукції NO ендотеліальною NO-синтазою, в той час як NO, що продукується під час активації експресії iNOS, перетворюється на пероксинітрит. Порушення в системі NO міокарда щурів після ПГ свідчать про зміни у схемі експресії NOS, зниження біодоступності NO та активацію нітрозативного стресу.

Дефіцит NO призводить до низки серйозних порушень в організмі нащадків після ПГ. Такі зміни в системі оксиду азоту міокарда у нащадків після ПГ узгоджуються з сучасними уявленнями про механізми ушкодження міокарда при ішемії та гіпоксії, як це було показано в експериментальних дослідженнях і клінічних спостереженнях [141,144]. Добре відомо, що ПГ порушує толерантність серця до ішемії/реперфузії, ушкоджує ендотеліально-залежні механізми вазодилатації/вазоконстрикції та сприяє розвитку серцево-судинної патології, такої як гіпертонія, атеросклеротичні захворювання судин і застійна серцева недостатність, що виникають за умов дефіциту NO [145]. Є дані про зниження експресії та активності eNOS у кардіоміоцитах і ендотелії, а також підвищення ризику розвитку ендотеліальної дисфункції після внутрішньоутробної гіпоксії [1].

Порушення активності eNOS можна пояснити змінами в її взаємодії з регуляторними партнерами, такими як кавеолін-1, кальмодулін і Hsp90. Зміни у фосфорилюванні та дефосфорилюванні ключових серинових і треонінових залишків у eNOS також можуть бути причиною дисфункції її активності [1,146]. Порушення ендотеліальної вазодилатації було виявлено в коронарних артеріях як у самців, так і у самок нащадків, які піддавалися ПГ у віці 4 та 9,5 місяців, на фоні зниженої активності eNOS і порушеної функції каналів SKCa та IKC [26]. Низький рівень eNOS призводить до порушення NO-залежної регуляції синтезу глутатіону та зниженої стійкості до окислювального стресу [147]. Зниження рівня eNOS може відбуватись через дефіцит HIF-1 α , оскільки цей фактор активує експресію eNOS шляхом фосфорилювання залишку серину [148].

Після зниження eNOS після ПГ спостерігається підвищена експресія iNOS, що служить для компенсації зниженої продукції NO [149]. ПГ збільшує експресію мРНК iNOS та рівні iNOS-білка у шлуночках серця плодів морських свинок [140]. Висока активність iNOS може бути пов'язана з дефіцитом кофакторів та вивільненням супероксиду та інших реактивних форм NO [150]. Однак, за умов знижених антиоксидантів сульфгідрильних груп це призводить до утворення цитотоксичних похідних NO в «паразитичних реакціях». При прееклампсії низька активність синтезу ендотеліального NO і редокс-залежна трансформація NO в пероксинітрит призводять до зниження рівнів NO в крові [127]. Такі реакції можуть виникати за умов дефіциту L-аргініну, недостатності антиоксидантів, дисфункції мітохондрій і підвищеної експресії iNOS. Неконтрольоване утворення цитотоксичних похідних NO призводить до нітрування найбільш активних ділянок білкових структур, іонних каналів, рецепторів, трансмембранних пор і молекул сигналізації, тобто розвитку нітросативного стресу [151]. Не менш важливим наслідком ішемії міокарда є втрата ефектів, зумовлених NO, таких як інгібування проліферації клітин, агрегації тромбоцитів і, найважливіше, подавлення активації моноцитів за допомогою так званих молекул адгезії [151].

Нітрозативний стрес також призводить до дефіциту HSP70 в клітинах на фоні знецінення шляхів глутатіонової детоксикації в системі тіол–дисульфід.

Цитотоксичні форми NO не тільки змінюють (як оборотно, так і необоротно) макромолекули, включаючи сам HSP70, але й знижують активність експресії генів, які кодують його синтез [152,153]. Роль похідних NO у пригніченні активності генів і зниженні рівня різних транскрипційних факторів була продемонстрована [154]. Ймовірно, що надлишок оксиду азоту, таких як пероксинітрит і нітрозоній-іон, спочатку нітрує тіол-редокс-залежні ділянки цих генів, а потім, із підвищенням концентрації, окислює їх [155].

1.2 Механізми серцево-судинної дисфункції після пренатальної гіпоксії

1.2.1 Порухення енергетичного обміну в міокарді та мітохондріальна дисфункція у нащадків після ПГ

Структурна цілісність та функціональна активність мітохондрій міокарда забезпечують їхню основну роль як клітинної «енергетичної станції» — продукування енергії для підтримання серцевої діяльності [156-158]. Порухення функціональної активності мітохондрій призводить до різноманітних функціональних та патологічних змін у роботі серця (Рис. 1.2.1.). Концепція мітохондріальної дисфункції набула статусу загальнопатологічного поняття. Багато серцево-судинних захворювань пов'язані як з первинною, так і з вторинною мітохондріальною дисфункцією. Мітохондріальна дисфункція асоціюється з розвитком гіпертрофічної кардіоміопатії, реперфузійного ураження після ішемії міокарда, діастолічною дисфункцією, що призводить до серцевої недостатності, раннім розвитком серцевої недостатності, а також артеріальною гіпертензією у жінок під час вагітності [159-162]. Зниження функціональної активності мітохондрій міокарда призводить до дефіциту АТФ та порушення енергетичного обміну серця. Порухення транспорту АТФ супроводжується дефіцитом креатинфосфату, пригніченням механізму креатинфосфатного шатлу та порушенням енергетичного забезпечення, необхідного для швидкої підтримки скорочувальної функції серця. У сукупності ці процеси формують підґрунтя для розвитку серцевої недостатності [114,163-166].

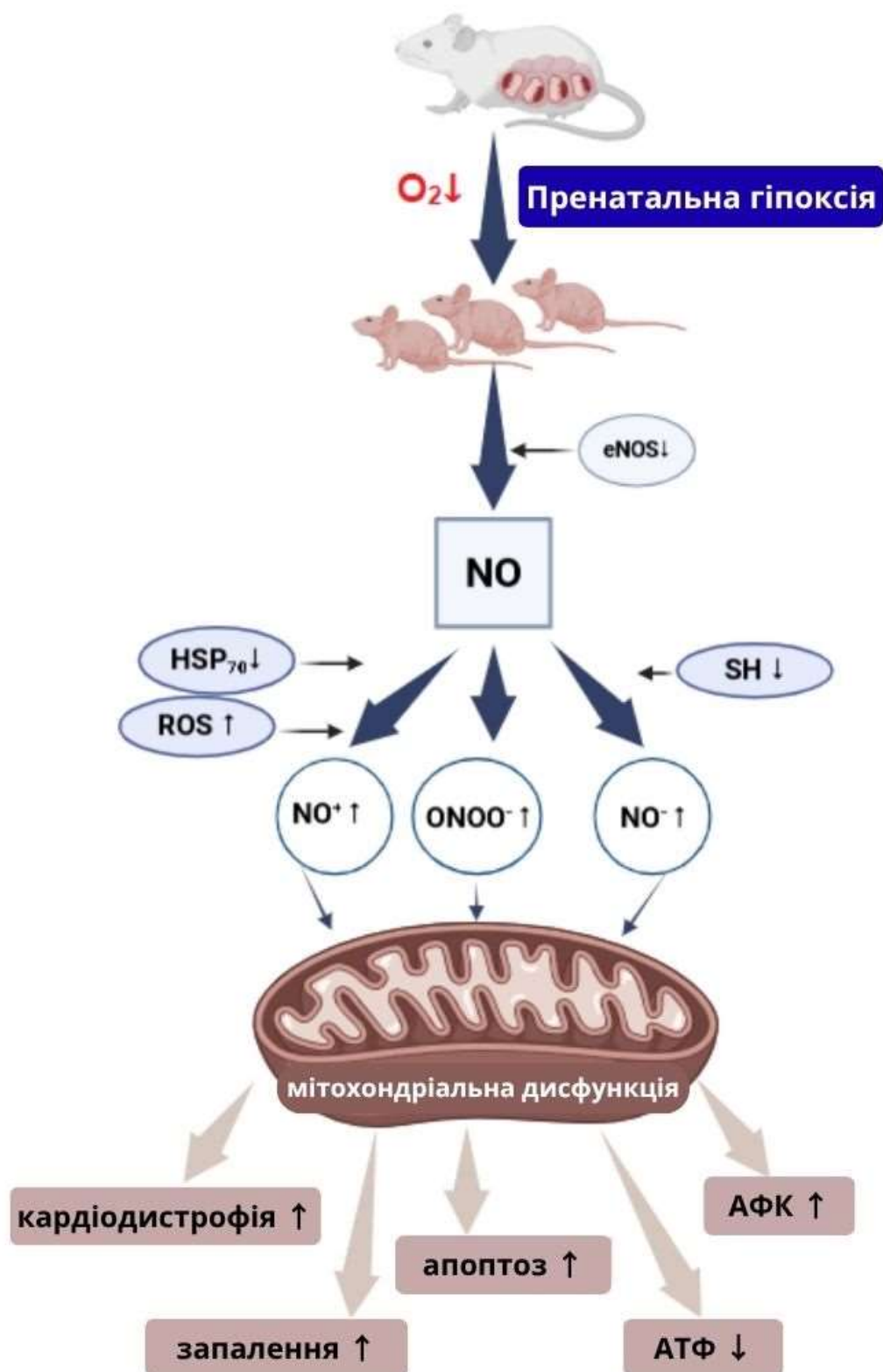


Рис. 1.2.1. NO-залежні механізми формування мітохондріальної дисфункції після пренатальної гіпоксії. Рисунок створено авторкою за допомогою BioRender та узагальнює розділ.

Відомо, що в серці дорослих нащадків після ПГ зберігається стійке порушення активності ферментів та експресії білків у мітохондріальних комплексах окисного фосфорилування в умовах гіпоксії [167]. Найбільш чутливим до впливу ПГ є сукцинатдегідрогеназний комплекс мітохондрій, пов'язаний із циклом Кребса. Зміни у програмуванні розвитку серця, зумовлені ПГ, можуть призводити до порушення складного сукцинатзалежного шляху в плодів жіночої статі та зберігатися у вигляді довготривалих змін мітохондріальної функції серця у молодих дорослих самиць-нащадків [168].

Також відомо, що ПГ призводить до порушення переносу електронів від цитохрому c до кисню в міокардіальних мітохондріях, що зумовлює розвиток мітохондріальної дисфункції та пов'язаних із нею ушкоджень серця, зокрема зниження ударного об'єму та серцевого викиду в самців-нащадків [169]. ПГ знижує експресію мітохондріальних транскриптів коактиватора γ -рецептора, активованого проліфератором пероксисом 1-альфа (PGC-1 α), субодиниці II цитохромс-с оксидази (COXII) та роз'єднувальних білків, що призводить до зменшення дихальної активності мітохондрій серця нащадків [170].

Відомо, що NO може виступати природним короточасним регулятором фізіології мітохондрій, підвищуючи ефективність окисного фосфорилування у процесах редокс, зменшуючи кількість помилок та збоїв у роботі протонних насосів [171]. Тому його дефіцит, зумовлений ПГ, може спричиняти порушення окисних процесів у мітохондріях.

Цитотоксичні продукти метаболізму оксиду азоту відіграють безпосередню роль у формуванні мітохондріальної дисфункції в умовах ПГ – знижують енергопродукуючу функцію мітохондрій, гальмують активність комплексів I/IV та сприяють прогресуванню порушень енергетичного метаболізму [172]. Ці дані узгоджуються з дослідженнями, які показали, що NO, утворений iNOS, перетворюється у пероксинітрит та пригнічує окисне фосфорилування в мітохондріях. Пероксинітрит незворотно інгібує ферменти електронтранспортного ланцюга шляхом їх нітрозилування та вивільнення заліза. Пригнічення мітохондріального дихання призводить до зниження мембранного

потенціалу, що може викликати розвиток мітохондріальної дисфункції та ініціювати апоптичний процес [173,174].

Також існують дані щодо прямої активації NO відкриття мегаканалу мітохондрій, що призводить до вивільнення цитохрому c та запуску каскаду каспаз. NO та його похідні (пероксинітрит, нітрозонієвий іон) можуть спричиняти окислення тіольних груп білків мембрани мітохондрій, що також сприяє вивільненню апоптичних факторів у цитозоль [11,175-177]. Пригнічення синтезу білків у мітохондріях після гіпоксії пов'язане з підвищеною чутливістю клітин до апоптичних стимулів, опосередкованих NO [178-180]. За умов недостатньої активності антиоксидантної системи може формуватися порочне коло між утворенням АФК мітохондріальним електронтранспортним ланцюгом та мутаційними процесами в мітохондріальній ДНК. Наслідком цього є прогресування мітохондріальної дисфункції після ПГ [181-183].

Порушення будь-якої функції мітохондрій — енергопродукуючої, прозапальної або смертоіндукуючої — чи активація утворення АФК мітохондріями можуть бути причиною розвитку функціональних та морфологічних аномалій серця у нащадків після ПГ [168,181,184].

Мітохондріальний апарат вентрикулярних кардіоміоцитів у щурів після ПГ характеризується вираженими процесами деградації органел субсарколемної зони, набуханням «високоенергетичних» мітохондрій у міжміофібрилярних зонах та «низькоенергетичних» мітохондрій у перинуклеарній зоні кардіоміоцитів зі зменшенням кількості асоціацій між мітохондріями. Міофібрили виглядали фрагментованими, а мітохондрії — різнорозмірними. У саркоплазмі виявлялися ліпідні включення. У скорочувальних кардіоміоцитах після ПГ спостерігалися ділянки гіперскорочення міофібрилярного апарату, відомі як «ригідність» (rigor). Ішемізовані, але мінімально змінені клітини серця часто позначаються в літературі як «осцилюючі», оскільки перебувають у стані електричної нестабільності [184,185].

Основним ультраструктурним проявом цього є феномен контрактури міофібрил, зареєстрований під час електронномікроскопічних досліджень

експериментальних тварин після ПГ, що є беззаперечним підтвердженням як гіпоксичного, так і ішемічного ушкодження клітин. Останнє є патогномонічною ознакою порушення проникності сарколеми та руху іонів Ca^{2+} з міжклітинного простору у кардіоміоцит, що свідчить про розвиток іонного дисбалансу. Підтвердженням цього є також поява електронно-щільних включень у мітохондріях та відносне розширення саркоплазматичного ретикулуму. Такі клітини можуть бути джерелом порушень ритму [169,185-188].

Крім того, мітохондріальна дисфункція може призводити до активації імунної системи. Продукція АФК дисфункціональними мітохондріями може зумовлювати ушкодження ліпідів та білків, що активує запальні шляхи [189-192]. Дисфункціональні мітохондрії можуть вивільняти молекулярні патерни ушкодження (DAMPs), включаючи кардіоліпін, N-формільні пептиди, АФК та мтДНК, що активують інфламасоми [193-195]. Активація імунної системи та підвищена експресія прозапальних цитокінів призводять до подальшої активації експресії iNOS, що зумовлює збільшення продукції NO та АФК, що може спричинити подальший негативний вплив на вже дисфункціональні мітохондрії [196-198].

1.2.2 Нітрозативний стрес у серці нащадків після пренатальної гіпоксії

Результати численних досліджень свідчать, що експериментальна ПГ призводить до дисфункції системи оксиду азоту у міокарді як плодів, так і нащадків. Показано, що ПГ пригнічує експресію та активність eNOS і суттєво підвищує експресію iNOS, супроводжуючись збільшенням продукції NO. В такій ситуації NO втрачає свої фізіологічно «корисні» властивості та перетворюється на пероксинітрит й інші цитотоксичні форми. Надмірна генерація NO може спричинювати розвиток нітрозативного стресу, що супроводжується утворенням пероксинітриту, який здатний посилювати експресію матриксних металопротеїназ (MMP). ПГ викликає розвиток оксидативно-нітрозативного стресу та змінює експресію білків позаклітинного матриксу шляхом активації сигнальних шляхів iNOS у шлуночках серця плода. Це характеризує NO, синтезований iNOS, як

ключовий стимул для запуску шкідливих ефектів пероксинітриту у серці плода [140,199-201].

Більшість цитотоксичних ефектів NO насправді належать пероксинітриту (ONOO^-), який утворюється в результаті реакції з супероксидом (O_2^-). Дійсно, пероксинітрит є значно активнішим — він інтенсивно нітрозилує білки та може бути джерелом надзвичайно токсичного гідроксильного радикала OH. За нормальних фізіологічних умов *in vivo* існує баланс між супероксидом та оксидом азоту. NO і супероксид реагують один з одним з дуже високою швидкістю, обмеженою лише дифузією, утворюючи пероксинітрит (ONOO^-), який спричиняє пошкодження клітин шляхом окиснення багатьох біологічних молекул. Крім того, ONOO^- бере участь в інактивації Mn-SOD та Fe-SOD [11,110,114,140].

ПГ сприяє накопиченню пероксинітриту у серці нащадків за рахунок синтезу NO, опосередкованого iNOS. Пероксинітрит активує транслокацію ядерних факторів транскрипції (nuclear factor kappa B та activator protein-1) до промоторної ділянки гену MMP, сприяючи підвищенню їх експресії. Родина генів MMP включає декілька субтипів білків, які беруть участь у ремоделюванні позаклітинного матриксу (ECM), при цьому ключову роль у міокарді відіграють MMP2 та MMP9. Роль MMP як модуляторів ECM у міокарді добре відома при серцево-судинній патології, зокрема при серцевій недостатності, постнатальній гіпоксичній кардіоміопатії, ішемічно-реперфузійному ушкодженні та порушеннях скоротливої функції міокарда [202-204].

Посилена експресія та активація MMP2, MMP9 і MMP13 під впливом реактивних форм азоту стимулює синтез колагену, порушуючи баланс між його синтезом і деградацією, що призводить до накопичення колагену та формування кардіального фіброзу [205-207]. Встановлено, що пероксинітрит є високоактивною молекулою, яка зумовлює численні вторинні ефекти, зокрема модифікацію експресії генів, окиснення та нітрування білків, ушкодження ДНК та пероксидне окиснення ліпідів [208-210]. Також доведено, що пероксинітрит посилює активність MMP9 за рахунок автолітичного розщеплення тіольної групи цистеїну та підвищує експресію MMP9 шляхом транскрипційної активації через

nuclear factor kappa B та activator protein-1 [211-213].

На даний час сформовано узагальнене поняття «нітрозативний стрес». Внаслідок дії реактивних форм NO може розвиватися або нітрозативний стрес (утворення нітрозамінів, S-нітрозотіолів, дезамінування основ ДНК), або оксидативний стрес. NO формує реактивні проміжні продукти, зокрема нітрозоній (NO^+), нітроксил (NO^-) та пероксинітрит (ONOO^-). Більшість цитотоксичних ефектів NO обумовлена саме пероксинітритом, що утворюється у реакції з супероксидом (O_2^-). Пероксинітрит характеризується високою реактивністю, інтенсивно нітрозилує білки та може бути джерелом високо токсичного гідроксильного радикалу ($\bullet\text{OH}$). Нітрозоній (NO^+) є потужним агентом нітрозилування, мішенями якого є нуклеофільні групи активних тіолів, амінів, карбоксильних, гідроксильних груп та ароматичних кілець. NO^+ утворюється з надлишку NO за участю двовалентного заліза та кисню. Нітроксил (NO^-) має відновні властивості та справляє позитивний інотропний і луситропний ефекти на міокард. Однак при ішемії або гіпоксії в умовах розвитку лактатного ацидозу NO^- набуває прооксидантних властивостей по відношенню до тіолів та амінів. Показано, що NO^- знижує рівень глутатіону та порушує електричну активність, пригнічуючи активність натрієвих каналів у серці [11, 214-218].

Ймовірно, подвійна дія NO^- пов'язана з його концентрацією, оскільки підвищення його рівня сприяє утворенню токсичного нітрит-аніону. Триоксид азоту (N_2O_3), що є джерелом NO^+ , проявляє виражені нітрозильні властивості, взаємодіючи з аліфатичними та ароматичними амінами з утворенням N-нітрозамінів. Нітрозаміни, а також їх продукти перетворення за участю ферментів системи цитохрому P450 (наприклад, діазонієві іони та формальдегід), є алкілюючими агентами для нуклеїнових кислот, здійснюють дезамінування пуринів, інгібують O⁶-метилгуанін-ДНК-метилтрансферазу та сприяють утворенню 8-гідроксигуаніну. N_2O_3 взаємодіє з цистеїном з утворенням S-нітроцистеїну та з глутатіоном з утворенням S-нітроглутатіону, який є основною транспортною молекулою для переносу NO [219-223].

Деякі дослідження встановили, що транспорт NO здійснюється шляхом

утворення N_2O_3 , який згодом нітрозилує тіоли. Надалі за участю ізомерази дисульфїду здійснюється вивільнення NO [224-226]. Також існує механізм вивільнення NO із S-нітроглутатіону за участю глутамілтранспептидази з утворенням S-нітроцистеїнілгліцину, з якого вивільняється NO . Цистин бере участь у транспорті S-нітроглутатіону, відновлюючись до цистеїну, який потім реагує з S-нітроглутатіоном з утворенням S-цистеїну. S-цистеїн відіграє роль у швидкій передачі сигналів, формуючи адаптаційні реакції до гіпоксії. Ці реакції регулюються глутатіонредуктазою та глутатіонтрансферазою. За умов ішемії пригнічення активності цих ферментів супроводжується оксидативною модифікацією низькомолекулярних тіолів, що призводить до утворення гомоцистеїну та, відповідно, до порушення транспорту NO з формуванням його цитотоксичних похідних, які ще більше посилюють окиснення тіолів [227-232].

Наявність у клітині достатньо активної тіолової антиоксидантної системи, здатної регулювати транспорт NO , забезпечує стійкість клітини до нітрозативного стресу. NO інгібує окисне фосфорилування у мітохондріях клітин-мішеней шляхом зворотного зв'язування з цитохром-с-оксидазою у мітохондріях. Пригнічення транспорту електронів у мітохондріях призводить до генерації супероксиду, а отже — до утворення ONOO^- (пероксинітриту) [233-235]. Синтез пероксинітриту відбувається у клітинах з високою активністю iNOS та ферментів, що продукують активні форми кисню (ксантинооксидаза, NADH-оксиредуктаза, циклооксигеназа, ліпооксигеназа та ферменти дихального ланцюга мітохондрій). Мішенями нітрозативної атаки пероксинітриту є тіоли, CO_2 , металопротеїни, нуклеїнові кислоти, метаболіти-посередники передачі сигналів та ліпіди [236,237].

Пероксинітрит, будучи відносно стабільною сполукою, за умов зсуву рН у кислий бік швидко протонується з утворенням основного продукту — нітрат-аніону — поряд із гідроксильним радикалом та діоксидом азоту, що й обумовлює його оксидативні властивості. Пероксинітрит пригнічує активність взаємозв'язаних метаболічних циклів метіоніну та цистеїну шляхом гальмування ключових ферментів, які регулюють рівень цистеїну, що сприяє підвищенню утворення гомоцистеїну. Пероксинітрит також взаємодіє з метаболіт-специфічним

посередником передачі сигналу CO_2 з утворенням потужного нітрозилуючого агента — нітропероксикарбонату. Важливим механізмом цитотоксичної дії пероксинітриту є його реакція з тирозином, що призводить до утворення нітротирозину. Пероксинітрит значно інгібує активність Cu-Zn-SOD та Mn-SOD шляхом нітрування 34-го залишку тирозину та зв'язування міді з подальшою зміною її валентності [238-242]

Пероксинітрит є специфічним агентом, який необоротно гальмує мітохондріальне дихання під час ішемії шляхом прямої взаємодії з залізовмісними центрами активних ділянок ключових ферментів, а також нітрозилюванням S-, N- та O-груп тіолів, фенольних, гідроксильних та аміногруп у білкових компонентах цих ферментів. За більш вираженого нітрозативного стресу відбувається їх необоротне окиснення. Спектр активності пероксинітриту також включає нітрозилювання гуаніну та розриви ниток ДНК, що може призводити до мутацій або ініціювати апоптоз. Стосовно пошкодження геному відомий ще один ефект NO: продукти його взаємодії з O_2 інгібують ферменти, відповідальні за репарацію ДНК. Залежно від джерела (різні донори NO), показано ефекти NO на алкілтрансферазу, формамідопіримідин-ДНК-глікозилазу та лігази. Також відомо, що NO може активувати PARP- та ADP-рибозилування, ймовірно внаслідок розривів ДНК, однак це частіше призводить до некрозу через виснаження пулів NAD та АТФ [243-248].

Існують дані про безпосередню активацію відкриття пори мітохондріальної проникності (МРТР) оксидом азоту, що призводить до виходу цитохрому c та ініціації каспазного каскаду [249]. Ці дані отримані при експозиції мітохондрій до цитотоксичних похідних NO, таких як пероксинітрит та нітрозонієвий іон, механізм дії яких пов'язаний з модифікацією тіолових білків у порі мітохондрій. NO та його похідні здатні індукувати перекисне окиснення фосфоліпідів. Під впливом цитотоксичних похідних NO та гідроксильного радикалу відкриваються пори мітохондрій, що супроводжується експресією та вивільненням проапоптичних білків у цитозоль. Відкриття цих пор відбувається за рахунок окиснення або нітрозилювання тіолових груп у цистеїн-залежній ділянці

внутрішньомембранного білка мітохондрій (АТР/АДР-антипортера), що перетворює його на проникний неспецифічний канал або пору. Відкриття пор трансформує мітохондрії з "енергетичних станцій" на "печі" для окиснення субстратів без утворення АТФ [250].

Встановлено суттєве порушення системи оксиду азоту у міокарді щурів після ПГ, що проявлялося дисбалансом співвідношення експресії eNOS/iNOS, супроводжувалося дефіцитом NO та підвищенням рівня нітротирозину [114,249-250] на тлі пригнічення активності глутатіонзалежних ферментів GPX1 та GPX4. Не менш важливим наслідком гіпоксії та активації нітрозативного стресу для міокарда є втрата NO-опосередкованих ефектів, таких як гальмування проліферації клітин, агрегації тромбоцитів та, що особливо важливо, пригнічення активації моноцитів так званими молекулами адгезії [152]. Нітрозативний стрес також призводить до дефіциту HSP70 у клітині на фоні виснаження глутатіону у тіол-дисульфідній системі. Цитотоксичні форми NO не лише модифікують (зворотно та незворотно) макромолекули, включаючи сам HSP70, але й знижують експресійну активність генів, які кодують його синтез [127,153].

1.2.3 NO-залежні механізми ендотеліальної дисфункції після пренатальної гіпоксії

Серцево-судинні порушення, зумовлені гіпоксією, є однією з провідних причин захворюваності новонароджених. За даними літератури, у 40–70% дітей, які зазнали внутрішньоутробної гіпоксії, відзначено різноманітні порушення з боку ССС. Вказані розлади відіграють важливу роль у розвитку численних, часто тяжких захворювань як у дитячому, так і в дорослому віці [1,4,5]. Механізми формування постгіпоксичних порушень функції серця залишаються до кінця не з'ясованими, що визначає актуальність цієї проблеми в педіатричній кардіології. Клінічні прояви цієї патології в гострий період є поліморфними, нерідко нагадують інші захворювання, тому часто виникає необхідність у проведенні диференційної діагностики з вродженими вадами серця, вродженим кардитом та кардіоміопатіями [251,252]. Згідно з сучасними уявленнями, саме ендотеліальна

дисфункція та пов'язані з нею порушення системи NO лежать в основі розвитку багатьох серцево-судинних захворювань [12,146]. ПГ сприяє асиметричній затримці росту плода, гіпертрофічному росту серця й аорти, зміні функції серця, а також посиленню симпатичної іннервації периферичних резистивних артерій у новонароджених. У дорослому віці перенесена ПГ асоціюється з підвищеним ризиком розвитку артеріальної гіпертензії, ішемічної хвороби серця, серцевої недостатності, метаболічного синдрому та підвищеної чутливості до ішемічного ураження [23,252]. Наявність механізмів ендотеліальної дисфункції встановлена при кардіоваскулярній патології, що формується після перенесеної ПГ. Клінічні прояви порушень функціонального стану та недостатньої адаптації серцево-судинної системи після ПГ безпосередньо корелюють із ознаками ендотеліальної дисфункції (змінami продукції ендотеліну-1, NO, VEGF, циркулюючих десквамованих ендотеліальних клітин) як у новонароджених, так і на пізніших етапах життя [60,253-255].

Ендотеліальна дисфункція та серцево-судинна патологія, зокрема після ПГ, частково обумовлені порушеннями в системі оксиду азоту. Встановлено, що ПГ здатна змінювати як продукцію NO, так і його біодоступність. За умов ПГ підвищена концентрація супероксид-аніону та інших активних форм кисню сприяє окисленню NO з утворенням пероксинітриту, що негативно впливає на органи плода [23,254,256]. Гіпоксія знижує експресію eNOS, а також може впливати на її ферментативну активність шляхом модифікацій після трансляції. В умовах дефіциту L-аргініну eNOS може продукувати супероксид-аніон замість NO, що вважається однією з ключових причин розвитку ендотеліальної дисфункції при серцево-судинній патології [11,60].

Надлишок NADPH за умов ПГ сприяє посиленому утворенню АФК, які, реагуючи з NO, формують стабільний аніон пероксинітриту, знижуючи біодоступність NO [244].

ПГ достовірно знижує NO-залежну вазодилатацію, опосередковану ацетилхоліном, у грудних кільцях аорти як плодів, так і дорослих тварин. Встановлено, що у нащадків після ПГ спостерігається зниження експресії eNOS,

що переважно пов'язано з підвищеною експресією NADPH-оксидази 2 типу та надмірною продукцією АФК на фоні підвищеного рівня miR-155-5 у ендотеліальних клітинах судин [257,258]. NADPH-оксидаза 2 типу є ключовим джерелом утворення АФК після ПГ, що підвищує ймовірність окиснення NO, знижуючи його стабільність і ініціюючи формування ендотеліальної дисфункції [81,259].

Надлишок АФК в умовах гіпоксії нейтралізує NO, синтезований eNOS в ендотеліальних клітинах, тим самим обмежуючи його біодоступність. АФК порушують NO-залежну дилатацію коронарних мікросудин за рахунок активації аргінази. Пероксинітрит, що утворюється, окиснює тетрагідробіоптерин (BH₄) — кофактор eNOS, що призводить до «роз'єднання» ферменту та продукції супероксид-аніону замість NO. Крім того, оксидативний стрес порушує баланс між L-аргініном та асиметричним диметиларгініном (ADMA) [60]. Вираженість експресії аргінази в ендотеліальних клітинах під впливом гіпоксії зумовлена активацією АФК через сигнальний шлях RhoA/Rho-кінази [260].

Хронічна ПГ призводить до зниження експресії мРНК HIF-1 у клітинах різних органів щурів [261,262], що, на нашу думку, може свідчити про виснаження компенсаторно-адаптаційних реакцій організму після внутрішньоутробної гіпоксії. Фактори, індуковані гіпоксією (HIF), виконують роль транскрипційних факторів та регулюють експресію генів, які кодують синтез білків, залучених до реалізації фізіологічної відповіді на гіпоксію/ішемію [263]. HIF проявляють цитопротекторні властивості в умовах гіпоксії, стимулюють репаративні процеси, а також підвищують рівень ендогенних депотоксифікуючих молекул (гемоксигеназа-1, VEGF, ангіопостин) [264]. HIF-1 в умовах гіпоксії впливає на енергетичний метаболізм шляхом регуляції компенсаторних шляхів синтезу АТФ, посилює синтез глутатіону та підвищує стійкість клітин до оксидативного стресу. Відомо, що HSP70 пролонгує «тривалість життя» HIF-1. Накопичено достатню кількість даних щодо різноспрямованих змін концентрації HIF-1 та його ізоформ залежно від типу гіпоксії, її тривалості та особливостей органів-мішеней [265]. В умовах нітрозативного стресу та накопичення цитотоксичних продуктів

метаболізму за дефіциту NO й АТФ у тканинах спостерігається зниження рівня HIF, що пов'язано з активацією убіквітин-незалежного шляху деградації окиснено-модифікованого HIF-1 α та пригніченням його синтезу на тлі енергетичного дефіциту. Регуляторна роль NO у контролі експресії мРНК HIF-1 α є добре встановленою [137].

Виявлені порушення у системі оксиду азоту після ПГ на тлі зміни експресії специфічних білків свідчать про зниження толерантності серця до ішемії/реперфузії, дисфункцію ендотелій-залежних механізмів вазодилатації/вазоконстрикції та сприяють подальшому прогресуванню ендотеліальної дисфункції після внутрішньоутробної гіпоксії.

Формування ендотеліальної дисфункції після ПГ відбувається на тлі дефіциту HIF-1 α (фактора, що активує експресію eNOS шляхом серинової фосфориляції) та нітрозативного стресу, який зумовлює дефіцит HSP70, виснаження глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи, зниження біодоступності NO та пригнічення транскрипції генів під дією цитотоксичних продуктів метаболізму NO [153].

Відомо, що рівень EPCR підвищується на ендотеліальних клітинах у процесі постішемічної неоваскуляризації. Важливо зазначити, що екзогенне додавання NO значно посилювало утворення ангіогенних відростків ендотелію з аортальних кілець та первинних ендотеліальних клітин, ізольованих від мишей з мутацією PAR1. Таким чином, підтримання біодоступності NO в процесах ангіогенезу є ключовою функцією ендотеліальної сигнальної системи за участю шляху EPCR-PAR1 [266,267].

Саме оксидативний стрес у серці та судинній системі плода лежить в основі механізмів програмування серцево-судинної патології та ендотеліальної дисфункції у більш пізньому віці [253]. ПГ сприяє потовщенню аорти з підвищеним забарвленням на нітротирозин, підсиленою експресією HSP70 у серці, а також вираженими порушеннями NO-залежної релаксації артерій та підвищенням скоротливості міокарда на тлі домінування симпатичної регуляції [33].

Найважливішим ферментом для захисту клітин в умовах оксидативного стресу є глутатіонпероксидаза-4 (GPX-4), яка безпосередньо відновлює ліпідні гідропероксиди, навіть коли вони інтегровані у мембрани або ліпопротеїни. GPX-4 також здатна відновлювати гідропероксиди жирних кислот, холестеролу та тиміну. Цей фермент відіграє ключову роль у захисті клітин від оксидативного пошкодження шляхом запобігання перекисному окисненню ліпідів у складі мембран. GPX-4 необхідна для запобігання фероптозу — неапоптичній формі клітинної загибелі, що виникає внаслідок залізо залежного накопичення реактивних форм кисню у ліпідах [268,269].

GPx4 є необхідним для запобігання мітохондріальній загибелі клітин шляхом відновлення гідропероксиду кардіоліпіну. GPx4 бере участь у безпосередній детоксикації ліпідних пероксидів у клітинній мембрані та виконує функцію інгібітора фероптозу, індукованого ліпідною пероксидацією. Цитозольна ізоформа GPx4 відіграє ключову роль у пригніченні фероптозу в соматичних клітинах, тоді як мітохондріальна ізоформа GPx4 (mGPx4) може бути залучена до зниження ризиків розвитку мітохондріальної дисфункції [270]. Вперше було виявлено, що ПГ може спричиняти фероптоз трофобластичних клітин людини, що, ймовірно, може призводити до викидня, що підкреслює важливість GPx-4 [271].

GPx-1 є внутрішньоклітинним антиоксидантним ферментом, який каталітично відновлює H_2O_2 до H_2O , обмежуючи його шкідливий вплив, а також регулює H_2O_2 -залежні сигнальні механізми, опосередковані факторами росту, функціонуванням мітохондрій та підтриманням нормального тіол-дисульфідного балансу. Встановлене зниження експресії GPx-1 у міокарді щурів після ПГ може бути зумовлене надмірною кількістю цитотоксичних форм NO на тлі високої експресії iNOS [272]. GPx-1 відіграє важливу роль у підтриманні функції ендотелію та біодоступності NO, а його дефіцит сприяє вираженій вазоконстрикції та формуванню ендотеліальної дисфункції [273].

SOD зазвичай класифікують на чотири групи: марганцевмісна SOD (MnSOD), мідь-цинкова SOD (Cu/ZnSOD), залізовмісна SOD (FeSOD) та

нікельвмісна SOD (NiSOD). Cu/ZnSOD та MnSOD локалізуються у цитоплазмі та є основними нейтралізаторами вільних радикалів у внутрішньоклітинному середовищі, привертаючи значну увагу завдяки своїм фізіологічним функціям та терапевтичному потенціалу [274]. ПГ знижує експресію Cu/ZnSOD як на рівні транскрипції, так і на посттрансляційному рівні. Окрім того, ПГ знижує активність Cu/ZnSOD та може бути однією з причин подальшого розвитку серцево-судинної патології [275] та ендотеліальної дисфункції [276].

Існують переконливі докази встановленого зв'язку між зниженням активності антиоксидантних ферментів та несприятливими наслідками вагітності, оскільки оксидативний стрес чинить негативний вплив на фізіологію матері, перебіг вагітності та розвиток плода. Оксидативний стрес порушує функцію плаценти, ускладнює постачання кисню та поживних речовин до плода, сприяє розвитку дисфункції серцево-судинної системи, зокрема кардіоміопатії та ендотеліальної дисфункції [277].

1.2.4 NO та апоптоз кардіоміоцитів після пренатальної гіпоксії

Оскільки гіпоксія є потужним стресовим фактором, численні дослідження свідчать, що ПГ індукує загибель клітин шляхом активації як апоптотичних, так і некротичних шляхів, залежно від типу клітин [278-281]. Вивчення молекулярних механізмів апоптозу при різних формах патології серця є одним із актуальних напрямів сучасної медичної науки. Тривалий час апоптоз вважався нетиповим для високо диференційованих тканин. Однак упродовж останніх років було доведено наявність апоптозу кардіоміоцитів після ПГ. Водночас специфічні особливості індукції та перебігу апоптозу кардіоміоцитів під час та після внутрішньоутробної гіпоксії залишаються недостатньо з'ясованими.

Відомо, що апоптоз є програмованою формою клітинної смерті, яка, на відміну від некрозу, є активним та високорегульованим процесом. Він включає каскад взаємодіючих між собою сигнальних та ефекторних молекул, які функціонують у чіткій послідовності з високим ступенем селективності [282-287]. У результаті цього процесу відбувається зменшення розмірів клітини та ядра,

фрагментація ДНК, конденсація хроматину з подальшим утворенням так званих «апоптичних тіл» — мембранообмежених фрагментів клітинного вмісту, які згодом фагоцитуються або деградують без розвитку запальної відповіді [283,288-290].

Програмована клітинна смерть бере участь у постнатальному морфогенезі провідної системи серця: синоатріального та атріовентрикулярного вузлів, а також пучка Гіса [291,292]. Апоптоз клітин-пейсмейкерів може відігравати роль у розвитку пароксизмальних аритмій, порушень провідності та формуванні раптової коронарної смерті. Для клітин з термінальною диференціацією, зокрема кардіоміоцитів, апоптоз не є типовим явищем. Як внутрішні (керовані мітохондріальною активністю), так і зовнішні (через активацію рецепторів смерті) шляхи апоптозу спільно регулюють механізми розвитку серця. Під час формування серця багато популяцій клітин залучаються до серця, де вони диференціюються на кардіоміоцити, фібробласти, гладеньком'язові клітини, ендокардіальні та ендотеліальні клітини, що вистилають внутрішні поверхні, а також епікардіальні клітини, які формують зовнішні контури. Зокрема, популяції клітин, що походять із нервового гребеня та мігрують до певних ділянок серця, схильні до апоптозу [33,35,38,288,289]. Проте при кардіоміопатіях, гіпертрофії міокарда та хронічній серцевій недостатності різного генезу часто відзначається прогресуюче зниження скоротливої здатності лівого шлуночка навіть за відсутності ознак ішемії міокарда. Саме тому апоптоз кардіоміоцитів розглядається як одна з гіпотез механізму розвитку серцевої недостатності, що підтверджується рядом експериментальних досліджень [293-298].

На ранніх етапах ішемії апоптоз є переважаючою формою загибелі кардіоміоцитів у новонароджених. Типовою реакцією при гіпоксичних кардіоміопатіях та вроджених вадах серця є активація мітохондріального шляху апоптозу. Серцева недостатність, зумовлена ПГ, супроводжується активацією усіх шляхів програмованої клітинної смерті, при цьому ступінь індукції апоптозу залежить від стадії порушення кровообігу. Динаміка маркерів апоптозу — зокрема кількість лімфоцитів з експресією CD95+ у крові пацієнтів із хронічною серцевою

недостатністю — може використовуватися як критерій оцінки ефективності терапії.

Ініціація апоптозу в кардіоміocyтах за умов гіпоксії може запускатися різноманітними стимулами, однак усі шляхи активації сходяться на активації системи аспартат-специфічних цистеїнових протеаз — каспаз, які експресуються у клітинах у вигляді неактивних попередників (зимогенів). Під впливом індукторів апоптозу каспази активуються шляхом димеризації або специфічного протеолізу й ініціюють каскад протеолітичних реакцій, які забезпечують усі біохімічні та морфологічні зміни, притаманні апоптозу [299-304].

Підвищення рівня апоптозу після ПГ підтверджується дослідженнями, які свідчать, що ПГ посилює сигнальні шляхи клітинної загибелі шляхом активації каспази-3 та експресії Fas мРНК, водночас пригнічуючи шляхи виживання шляхом зниження експресії антиапоптичних білків Bcl-2 та Hsp70 у серці плода [305]. Зниження біодоступності NO та підвищення рівня його цитотоксичних форм підсилює чутливість клітин до сигналів, що передаються через Fas-рецептори. Дані літератури підтверджують роль пероксинітриту в активації апоптозу в умовах зниження рівня CuZn-SOD [306].

Зовнішній шлях апоптозу ініціюється зв'язуванням специфічних лігандів — так званих «лігандів смерті» (наприклад, FasL) із відповідними трансмембранними рецепторами Fas/CD95/Apo1 або з фактором некрозу пухлин α (TNF- α) та його рецептором. У ендотеліальних клітинах після гіпоксії H_2O_2 стимулює активність iNOS, що сприяє оксидативному ушкодженню клітин та індукції апоптозу [147,307,308]. NO та його цитотоксичні форми призводять до відкриття пор мітохондріальної проникності (mPTP), що зумовлює вивільнення цитохрому c та активацію каспазного каскаду апоптозу [309,310].

NO та його похідні можуть спричиняти перекисне окиснення фосфоліпідів та окиснення тіольних груп у білках мембрани мітохондрій, що також сприяє виходу апоптичних факторів у цитозоль [114,311,312]. Також отримано дані, які підтверджують прямий вплив надлишкового NO на індукцію апоптозу шляхом активації cGMP-залежного шляху в ізольованих кардіоміocyтах [313]. У плодів,

які зазнали впливу ПГ, було виявлено зниження експресії мРНК антиапоптичного білка Bcl-2 у лівому шлуночку [314]. Фізіологічні концентрації NO, що продукується eNOS *in vivo*, можуть активувати cGMP-залежні протеїнкінази, які, у свою чергу, впливають на білки, задіяні в апоптичних каскадах (зокрема Bcl-2). Зниження активності eNOS та дефіцит NO можуть впливати на експресію Bcl-2. Білок Bcl-2 може інгібувати апоптоз, опосередкований NO та його похідними, а також розщеплення полі(ADP-рибозо)полімерази [315].

Надлишок NO, зумовлений активністю iNOS, нейтралізує антиапоптичних членів родини BCL-2 шляхом активації сигнального шляху ASK1-JNK1, що призводить до загибелі клітин за BAX/BAK-залежним механізмом. NO та його цитотоксичні форми можуть здійснювати пряме S-нітрозилювання залишків цистеїну у тіоредоксині, вивільняючи ASK1 для індукції клітинної смерті. Механізм, через який NO активує вісь ASK1-JNK1 для ініціації клітинної смерті, пов'язаний із АФК та утворенням пероксинітриду [316-318].

1.3 Молекулярні механізми та стресові відповіді

1.3.1 Взаємодія оксиду азоту (NO) та HIF у міокарді після перинатальної гіпоксії

Фактори, індуковані гіпоксією (HIF), функціонують як транскрипційні регулятори та контролюють експресію генів, що кодують білки, залучені до фізіологічної відповіді на гіпоксію або ішемію [319]. За умов недостатнього кисню HIF виявляють цитопротекторні властивості, стимулюють репаративні процеси та сприяють підвищенню концентрації «пасто» для вільних радикалів (гемоксигеназа-1), а також сприяють експресії VEGF і ангіопоетину [263,264].

HIF-1 за гіпоксичних умов модулює енергетичний метаболізм шляхом активації компенсаторних шляхів синтезу АТФ, стимулює утворення глутатіону й підвищує стійкість клітин до оксидативного стресу [320].

Дослідження показали, що концентрація HIF-1 та його ізоформ змінюється залежно від типу гіпоксії, її тривалості та локалізації в різних органах [320-325].

За умов підвищеного нітрозативного стресу та зростання рівнів цитотоксичних продуктів NO, у поєднанні з виснаженням запасів АТФ у тканинах, відбувається зниження рівня HIF. Це зумовлено активацією убіквітин-незалежного шляху деградації окиснено-модифікованого HIF-1 α , а також гальмуванням його синтезу на фоні дефіциту енергії [326,327].

Активність HIF регулюється складним чином — як через киснезалежні, так і кисненезалежні механізми, спрямовані на α -субодиницю HIF. До кисненезалежних механізмів належать транскрипційна регуляція гена *HIF1A* факторами NF- κ B, SP1 та NRF2, які, своєю чергою, активуються АФК, цитокінами та/або ліпополісахаридами (LPS) через сигнальні шляхи, що включають білкову кінразу C (PKC), кінразу-інгібітор NF- κ B (IKK) та/або PI3K.

Рівень мРНК *HIF1A* та/або його трансляція можуть також контролюватися мікроРНК (miRNA), довгими некодуючими РНК (lncRNA) і сигнальними шляхами, активованими ангіотензином II за участі PI3K. Стабільність і функціональна активність HIF α можуть додатково модулюватися кисненезалежними посттрансляційними модифікаціями — фосфорилюванням, сумоїляцією (SUMO), ацетилюванням (Ac) та S-нітрозилюванням за участю NO [328-332].

Відомо, що HSP70 здатний продовжувати «життєвий цикл» HIF-1 за гіпоксичних умов [333,334]. Факт зниження експресії HIF-1 у серці щурів після тривалої перинатальної гіпоксії підтверджено також іншими дослідниками [261,262]. На нашу думку, це може свідчити про виснаження компенсаторно-адаптаційних механізмів.

Регуляторна роль оксиду азоту у контролі експресії мРНК HIF-1 α є добре відомою. Фізіологічні концентрації NO спричиняють швидке, проте тимчасове накопичення HIF-1 α , на відміну від високих доз того ж донора NO. Цитотоксичні форми NO, навпаки, пригнічують експресію HIF-1 α . Така регуляція з боку NO є додатковим важливим механізмом, через який NO може модулювати клітинні відповіді на гіпоксію в клітинах ссавців. NO не лише модулює відповідь HIF-1 за умов гіпоксії, але також здатен індукувати експресію HIF-1 [335,336].

1.3.2 Оксид азоту (NO) та запалення після перинатальної гіпоксії

Оксид азоту (NO) є сигнальною молекулою, яка відіграє ключову роль у патогенезі запалення. За нормальних фізіологічних умов NO чинить протизапальну дію. Водночас, за патологічних обставин, надмірна продукція NO перетворює його на прозапальний медіатор, що ініціює або підтримує запальну відповідь. NO синтезується ендотеліальними клітинами за участі ферментів синтаз оксиду азоту (NOS), які каталізують перетворення аргініну в цитрулін із утворенням NO. Для цієї реакції критично необхідними є кисень та НАДФН. У серцево-судинній системі NO забезпечує вазодилатацію, а також відіграє значущу роль у регуляції імунної відповіді активованих клітин. Його участь у патогенезі запальних захворювань широко задокументована [11,337].

Цитотоксичні форми NO та активні форми кисню, які утворюються в умовах гіпоксії у новонароджених, можуть індукувати продукцію білка HMGB-1 (High-Mobility Group Box-1), що є ендегенним представником молекулярних структур, асоційованих із пошкодженням (DAMPs). HMGB-1 взаємодіє з Toll-подібним рецептором TLR-4, активуючи сигнальний каскад, що веде до активації ядерного фактора каппа-В (NF-κB) та надмірної продукції прозапальних медіаторів. При цьому пероксинітрит, АФК та інші прозапальні молекули синтезуються не лише імунокомпетентними клітинами, але також ендотеліальними клітинами та кардіоміоцитами [338].

Надмірне запалення, яке виникає внаслідок гіпоксії у новонароджених або після перинатальної гіпоксії, сприяє додатковому пошкодженню тканин та органів через активацію експресії прозапальних генів та білків. Підвищення рівня цитокінів активує численні імунні клітини через рецептори, зокрема TLR, що веде до подальшого посилення запальної реакції. Наприклад, встановлено збільшення концентрації таких прозапальних цитокінів, як інтерлейкін (IL)-1β, IL-6, IL-8 та фактор некрозу пухлин (TNF)-α [339-342]. Індукований гіпоксією IL-1β також підсилює експресію гена NF-κB, що свідчить про здатність як АФК, так і гіпоксії активувати цей ключовий запальний шлях.

Активация шляху NF- κ B, у свою чергу, стимулює експресію генів, відповідальних за синтез прозапальних медіаторів, а також регулює синтез реактивних форм азоту, включаючи індукцибельну синтазу оксиду азоту (iNOS) та продукцію NO. У процесі запалення гіпоксія через активацію HIF-1 спричиняє індукцію iNOS, що супроводжується зниженням рівня L-аргініну, посиленням продукції пероксинітриту (ONOO^-) та гідроксильних радикалів. Це, у свою чергу, сприяє реактивації нітрозативного стресу [343-347].

1.3.3 NO та HSP70 після ПГ

Останнім часом значна кількість досліджень присвячена вивченню ролі білків теплового шоку (HSP) при гіпоксії, зокрема при ПГ [348-351]. HSP синтезуються у клітинах усіх живих організмів у відповідь на дію різноманітних стресорів, включаючи церебральну ішемію. Однак експресія генів цих білків активується не лише в умовах стресу, а й у процесі нормальної життєдіяльності клітини, зокрема під час проліферації, диференціації та апоптозу [352-354]. Білки цього класу залучені до усіх життєво важливих процесів тканин, органів та організму загалом.

Найбільш дослідженим представником родини HSP є білок з молекулярною масою 70 кДа — HSP70, який є індукованим представником родини білків теплового шоку [355-357]. Саме HSP70 вперше було названо шапероном. Функція шаперонів у клітині полягає у зв'язуванні пошкоджених або новосинтезованих поліпептидів та сприянні їх правильному фолдингу, а також у транспортуванні білків до відповідних органел [358-360]. Шаперони здатні розпізнавати гідрофобні ділянки мішеневих білків, що експонуються у пошкоджених білках або відкриваються у нормальних зрілих клітинних білках під час конформаційних змін. Такі зміни можуть виникати, наприклад, внаслідок каскадних модифікацій білків у процесі клітинної сигналізації [361-363].

Білки родини HSP70 є ключовими компонентами клітинної системи контролю якості білків. Шаперонна активність HSP70 тісно пов'язана з його цитопротекторною функцією. Доведено, що цей шаперон захищає клітини від дії

широкого спектра чинників, включно з індукторами апоптозу, за участі АТФ-залежних механізмів, а також забезпечує елімінацію незворотно пошкоджених білків через протеасомальну систему, що підтверджено численними *in vitro* та *in vivo* експериментами з використанням різноманітних моделей [114,364-367].

Результати експериментальних досліджень засвідчили кілька перспективних напрямів практичного використання цитопротекторних властивостей HSP70. По-перше, підвищення вмісту HSP70 у клітині сприяє посиленню резистентності організму до дії стресорів [368-370]. По-друге, перспективним є використання захисних властивостей екзогенного HSP70. Потрапляючи у позаклітинний простір, HSP70 може взаємодіяти з сусідніми клітинами та захищати їх від загибелі. Доведено, що екзогенний HSP70 демонструє подібні до внутрішньоклітинного шаперона захисні властивості [371-374].

Нещодавно з'явилися дані про регуляторний вплив білків теплового шоку на мітохондріальну дисфункцію, яка розвивається при ішемії головного мозку, міокарда та при ПГ внаслідок запуску патобіохімічних каскадних процесів [334,375].

Отже, є підстави припускати, що HSP70 залучений до регуляції сигнальних шляхів клітинної відповіді на гіпоксію, зокрема на рівні HIF-1 α [333,376,377]. Цитопротекторний ефект HSP70 в умовах гіпоксії реалізується завдяки його антиапоптичній та мітохондрієзахисній активності. Відомо, що залежно від концентрації АФК оксидативний стрес зрештою призводить до некрозу або апоптозу [334,378,379]. Високий рівень АФК зумовлює значні пошкодження білків, ліпідів і нуклеїнових кислот, що спричиняє некроз. Помірний рівень оксидативного стресу активує апоптоз. За допомогою пролонгованої дії на синтез антиоксидантних ферментів, шаперонної активності та стабілізації активних філаментів HSP70 і HIF-1 α запобігають розвитку некрозу [380,381].

Ряд авторів вказують на те, що підвищення рівня HSP70 сприяє нормалізації глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи та посиленню стійкості клітин до ішемії [114,334,382,383]. Введення екзогенного HSP70 призводить до підвищення

функціональної активності глутатіонової системи [350,384,385]. Іншими словами, встановлено, що HSP70 як білок з вираженими цитопротекторними властивостями в умовах гіпоксії мобілізує антиоксидантні ресурси клітини, зокрема підвищуючи рівень як цитозольного, так і мітохондріального глутатіону, що запобігає розвитку оксидативного стресу [378,386].

Крім того, відомо, що шляхом модифікації рівня ендogenous відновленого глутатіону може регулюватися експресія білків теплового шоку у клітині [350]. На нашу думку, дефіцит HSP70 у нейронах за умов зниження рівня відновленого глутатіону пов'язаний із гіперпродукцією АФК та цитотоксичних форм оксиду азоту, що призводить не лише до модифікації (зворотної та незворотної) макромолекул, включаючи сам HSP70, але й до зниження експресійної активності генів, що кодують його синтез. Стабілізуючи окиснено пошкоджені макромолекули, HSP70 здатен запобігати відкриттю мітохондріальної пори та, відповідно, виходу цитохрому c з мітохондрій, тим самим здійснюючи безпосередній антиапоптичний вплив [11,387,388].

HSP70 відіграє важливу роль у попередженні оксидативного стресу. Водночас раптове виснаження ендogenous глутатіону може призводити до зниження експресії HSP70 у тканинах/органах в умовах гіпоксії, що супроводжується посиленням оксидативного пошкодження макромолекул та загостренням гіпоксичних змін [389-392]. Встановлено, що *in vitro* HSP70 здатен запобігати агрегації окиснено пошкоджених ферментів — цитратсинтази, глутатіон-S-трансферази, глутатіонредуктази, супероксиддисмутази, лактатдегідрогенази, малатдегідрогенази — та регулювати тіол-дисульфідний баланс [350-351].

Крім того, однією з основних функцій HSP70 є індукція та пролонгація стабільної форми HIF-1 α , що запускає подальші адаптаційні реакції в клітині. У наших дослідженнях встановлено, що HSP70 сприяє «подовженню» активності HIF-1 α , а також незалежно підтримує експресію NAD-MDH-MH, забезпечуючи тим самим тривале функціонування компенсаторного механізму синтезу АТФ — малат-аспартатного шатл-механізму [393].

Таким чином, можна стверджувати, що HSP70 є невід’ємним супутником патобіохімічних реакцій, які розвиваються внаслідок ПГ. Сучасний рівень знань щодо патофізіологічних та патобіохімічних процесів, що відбуваються за умов гіпоксії (ішемії), дозволяє розглядати можливість патогенетичної корекції метаболічних та морфофункціональних змін із застосуванням фармакологічних засобів, мішенню для яких виступатиме HSP70. Активація нітрозативного стресу зумовлює зниження концентрації HSP70. Моделювання нітрозативного стресу *in vitro* проводили шляхом введення у суспензію нейронів динітрозилового залізо-комплексу (DNIC) у цитотоксичній концентрації 250 мкмоль. DNIC — це нестабільний комплекс двовалентного заліза, оксиду азоту та лігандів [350]. DNIC, будучи сильним нітруючим агентом, взаємодіє з -SH групами, глутатіоном, залишками цистеїну у складі білків, ферментів, транскрипційних факторів та ДНК, утворюючи S-нітрозотіоли та N-нітрозотіоли [394]. Після існування протягом кількох хвилин DNIC розпадається з вивільненням великої кількості оксиду азоту та вільного заліза. Вільне залізо каталізує реакцію Габера-Вайса, що призводить до утворення гідроксильних радикалів, здатних окиснювати білки, руйнувати ліпіди клітинних мембран та пошкоджувати ДНК. У свою чергу, велика кількість оксиду азоту, що вивільняється з комплексу, реалізує свою токсичність у вигляді тритоксиду діазоту (N_2O_3) та пероксинітриту (ONOO^-), які при надмірному синтезі *in vivo* призводять організм до стану нітрозативного та оксидативного стресу [395-397].

На 60-й хвилині спостереження вміст білка HSP70 знизився на 51,4% ($p < 0,05$) порівняно з інтактною групою. Результати наших досліджень свідчать, що зниження рівня редукованого глутатіону на 60-й хвилині спостереження супроводжувалося низьким рівнем білка HSP70, що підтверджується тісною кореляцією між редукованим глутатіоном та HSP70 (коефіцієнт множинної кореляції Пірсона ($R = 0,94678$)). Також нами встановлено тісний зворотний кореляційний зв’язок між HSP70 та маркером нітрозативного стресу — нітротирозином (коефіцієнт множинної кореляції Пірсона ($R = -0,8899$)) [398].

Отже, можна припустити, що внутрішньоутробна гіпоксія призводить до

зниження рівня HSP70, який виконує роль ендогенного цитопротекторного фактора, через механізми нітрозативного стресу у відповідь на порушення функціонування системи нітроксидативного гомеостазу.

1.3.4 Оксидативний стрес у пошкодженні міокарда після пренатальної гіпоксії

Моделювання ПГ призводить до розвитку постнатальної дисфункції серця. Кінцевим результатом гіпоксичного ураження серця є вогнищева дистрофія міокарда [23]. Це підтверджується також молекулярно-біологічними методами, зокрема підвищенням концентрації ST2 у крові тварин після ПГ. ST2 є високочутливим маркером ремоделювання міокарда та ризику розвитку серцевої недостатності, концентрація якого може зростати при внутрішньоутробній гіпоксії та прееклампсії [399]. Показано підвищення рівнів маркерів оксидативного стресу в серцевій тканині щурів обох статей після впливу внутрішньоутробної гіпоксії [146,400]. Підвищення активності оксидативного стресу тісно пов'язане з розвитком серцево-судинних захворювань, зокрема артеріальної гіпертензії та ішемічної хвороби серця. Це супроводжується розвитком гіпертрофії, фіброзу та апоптозу кардіоміоцитів, що, врешті-решт, призводить до порушення функції серця [401,402].

Характерною особливістю ураження міокарда після ПГ, за даними багатьох авторів, є пренатальне пошкодження мітохондрій кардіоміоцитів, зумовлене гіпоксією. Це зумовлює перетворення мітохондрій у джерело надлишкової продукції АФК та проапоптотичних білків. На тлі порушення енергозабезпечення (зниження продукції АТФ) це призводить до значної активації процесів оксидативного стресу та апоптозу [169,170,404-406].

Отримані дані низки дослідників демонструють, що у щурів після внутрішньоутробної гіпоксії спостерігається зростання концентрації мітохондріального білка цитохрому с у крові на тлі зменшення середньої щільності мітохондрій, щільності крист та зниження експресії мітохондріальної

Mn-SOD [407-409]. Крім того, низкою досліджень встановлено, що внутрішньоутробна гіпоксія змінює профіль експресії 48 генів, пов'язаних з метаболічними процесами та оксидативним стресом, зокрема субодиниць глутатіон-S-трансферази та цитохром-с-оксидази [201,410-412].

Вплив внутрішньоутробної гіпоксії на експресію eNOS залежить від тривалості гіпоксичного впливу, оскільки підвищене утворення АФК може знижувати біодоступність оксиду азоту та пригнічувати експресію eNOS [23,60].

Баланс між АФК та NO за умов достатньої кількості ендогенних відновлених тіолових сполук визначає тонус судин, оскільки підвищення утворення АФК, низький рівень продукції NO та дефіцит відновлених низькомолекулярних тіолових сполук у плода внаслідок гіпоксії сприяють утворенню цитотоксичних похідних оксиду азоту. Це посилює периферичну вазоконстрикцію та поглиблює ішемію міокарда. Надлишок NADPH у процесі ПГ є ключовим фактором генерації АФК, які здатні взаємодіяти з NO з утворенням стабільного пероксинітритного аніону, що знижує біодоступність NO [413-416].

1.4 Кардіопротекція та терапевтичні підходи

1.4.1 Кардіопротекція після пренатальної гіпоксії

За даними низки дослідників, у моделюванні умов гіпоксично-ішемічного ураження з наступною реперфузією високу ефективність фармакологічної кардіопротекції продемонструвала сполука для транспортування кисню — емульсія перфторану. Середню ступінь ефективності встановлено для розчинів АТФ, кокарбоксилази, сульфату магнію, рибоксину, солкосерилу, цитохрому с та есенціале. Низький ступінь ефективності спостерігався при застосуванні розчину аскорбінової кислоти та L-карнітину хлориду (левокарнітину) [417-425].

Протягом тривалого часу найчисленнішою групою речовин, які розглядалися як регуляторні антигіпоксанти, були неспецифічні активатори ферментативних та коферментних систем. Вони вважалися єдиними клінічно доступними препаратами цього типу. До них належать вітаміни групи В, похідні тіолу та похідні піримідину. Однак навіть ті з них, що раніше користувалися

значною популярністю і мали численні опубліковані докази щодо успішного клінічного застосування, ймовірно, не залишаться в арсеналі лікарів-реаніматологів. Це пов'язано з тим, що кінцевий антигіпоксичний ефект їх дії є слабким та нестійким через потребу в кисні для їх активації. Наприклад, для перетворення нікотинаміду у НАД необхідна низка спрямованих реакцій синтезу, які пригнічуються за умов гіпоксії [426-429].

У 80-ті роки минулого сторіччя були відкриті антигіпоксанти нового покоління, які не знижують температуру тіла чи споживання кисню, не стимулюють глюконеогенез, майже удвічі знижують рівень гліколізу та не мають антиоксидантних властивостей. Механізм їх дії поки що залишається невідомим і не може бути пов'язаний з уже вивченими механізмами, однак їх захисна дія значно перевищує ефективність антигіпоксантів «першого» та «другого» покоління. Одним з таких препаратів є мілдронат (Grindex), синтезований у 1980-х роках в Інституті органічного синтезу Латвії. За структурою мілдронат є синтетичним аналогом попередника у біосинтезі карнітину — гамма-бутиробетаїну. Встановлено, що він бере участь у регуляції енергетичного метаболізму клітин, запобігаючи активації реакцій гліколізу, які домінують за умов тканинної гіпоксії, та проявляє цитопротекторний ефект [426-429].

Антиішемічні та цитопротекторні властивості мілдронат при хірургічних втручаннях на серці або мозку були підтверджені в низці досліджень [434]. Його ефективність є найбільш вираженою за умови початку застосування за 2–3 дні до оперативного втручання та продовження терапії після нього. При одноразовому введенні препарату встановлено позитивний вплив на церебральний кровообіг у випадках порушення реактивності судин головного мозку, а також підвищення системного артеріального тиску та покращення показників гемодинаміки [436,437].

Профілактичне застосування препаратів бурштинової кислоти, амінотіольних антигіпоксантів, таких як гутімін та амтизол, а також їх похідних — гутімін-сукцинату та амтизол-сукцинату — демонструє виражені антигіпоксичні та антиоксидантні властивості [438].

Антигіпоксичний ефект притаманний також препарату Ліпін — модифікованому фосфатидилхоліну яйця (лецитину). Ліпін підвищує швидкість дифузії кисню з легень у кров та з крові в тканини, нормалізує процеси тканинного дихання, відновлює функціональну активність ендотеліальних клітин та стимулює синтез і секрецію ендотелійзалежного релаксуючого фактора. Препарат покращує мікроциркуляцію та реологічні властивості крові, гальмує процеси перекисного окиснення ліпідів у крові та тканинах, підтримує активність антиоксидантної системи організму, проявляє мембраностабілізуючий ефект, діє як неспецифічний детоксикант і стимулює неспецифічний імунітет. При інгаляційному застосуванні Ліпін чинить позитивний вплив на сурфактант легень, покращує вентиляцію альвеол та прискорює транспортування кисню через біологічні мембрани [439-441].

Отже, у серці новонароджених щурів за умов внутрішньоутробної гіпоксії розвиваються оборотні, а у важких випадках — незворотні зміни як у кардіоміоцитах (провідникових та скоротливих), так і у судинах гемомікроциркуляторного русла. Це є проявом не лише гіпоксичного ураження міокарда, але й свідченням ішемічного характеру сформованого пошкодження серцевого м'яза. Тому вивчення шляхів корекції антенатальної гіпоксії залишається актуальним напрямом, у межах якого доцільно досліджувати вплив сучасних антигіпоксантів на міокард в експериментальних умовах, а також можливості їх комбінованого застосування для підвищення ефективності кардіопротекції.

1.4.2 Модулятори оксиду азоту (NO) — перспективні кардіопротектори після пренатальної гіпоксії

На сьогодні у науковій літературі міститься обмежена кількість даних щодо ролі NO-залежної системи у формуванні серцево-судинної патології в новонароджених та кардіопротекторного потенціалу її модуляторів. У низці досліджень встановлено кардіо- та ендотеліопротекторні властивості препаратів,

здатних як стимулювати синтез оксиду азоту, так і підвищувати його біодоступність [442,443]. У цьому контексті становлять інтерес такі сполуки, як L-аргінін, тіотриазолін, ангіолін та мілдронат.

L-аргінін є основним субстратом для утворення NO в ендотеліальних клітинах судин, а також виявляє антиоксидантні, цитопротекторні, антигіпоксанти та мембраностабілізуючі властивості [444].

Тіотриазолін (морфолінію 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат) є специфічним нейтралізатором оксиду азоту та його цитотоксичних форм, що сприяє збереженню біодоступності NO шляхом захисту від активних форм кисню. В умовах ішемії препарат активує компенсаторний малат-аспартатний шатл, зменшує пригнічення окислювальних процесів у циклі Кребса при збереженні внутрішньоклітинного рівня АТФ, а також виявляє гепатопротекторні, кардіопротекторні, антиішемічні та антиоксидантні властивості [445].

Ангіолін ([S]-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат) підвищує експресію VEGF та щільність проліферативно активних ендотеліальних клітин у судинах м'язового типу та мікроциркуляторному руслі. Він підвищує біодоступність NO, зберігає ультраструктуру мітохондрій у стані ішемії, активує вироблення АТФ шляхом стимуляції малат-аспартатного шатлу, а також підвищує експресію eNOS. Ангіолін виявляє ендотеліопротекторні, кардіопротекторні, нейропротекторні, антиоксидантні та антиішемічні властивості [350].

Мілдронат інгібує утворення карнітину з його попередника γ -бутиробетайну, накопичення якого стимулює синтез NO. Він знижує транспортування довголанцюгових жирних кислот через мембрану мітохондрій за участі карнітину, не впливаючи при цьому на метаболізм коротколанцюгових жирних кислот, а також активує альтернативний шлях отримання енергії — окиснення глюкози [446]. Препарат виявляє антиішемічні та кардіопротекторні властивості.

1.4.2.1. Ангіолін ((S)-2,6-діаміно-гексанова кислота 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат)

Ангіолін проявляє виражені ендотеліопротекторні, нейропротекторні, кардіопротекторні, енерготропні, антиоксидантні, антиішемічні та протизапальні властивості. Ангіолін діє як антиішемічний та антиоксидантний засіб з вираженим впливом на ендотелій судин головного мозку й серця, а також на метаболічні процеси. Нейропротекторний ефект препарату зумовлений перетворенням L-лізину на піпеколову кислоту, яка підвищує спорідненість ГАМК-бензодіазепінового рецепторного комплексу, знижуючи прояви глутаматної ексайтотоксичності. Препарат достовірно знижує загибель нейронів при ішемічному та геморагічному інсультах, нормалізує функціонування компенсаторного ГАМК-шунта та підвищує рівень АТФ у тканинах головного мозку. В умовах гострої ішемії головного мозку препарат зберігає функціональну активність мітохондрій нейронів [447,448].

Препарат демонструє виражені антиоксидантні властивості, активує глутатіонову гілку тіол-дисульфідної системи, підвищує активність глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази, знижує утворення активних форм кисню та зменшує накопичення маркерів оксидативного та нітрозативного стресу. Ендотеліопротекторна дія препарату при цереброваскулярних порушеннях і гіпертензії пов'язана зі здатністю регулювати продукцію оксиду азоту, зменшувати утворення пероксинітриту та гомоцистеїну, підвищувати активність супероксиддисмутази й NO-синтази, зберігати відновлені тіольні групи та L-аргінін. Препарат підвищує біодоступність NO та може покращувати його транспорт до клітин-мішеней при порушенні функції ендотелію судин мозку [448].

За наявності цереброваскулярних розладів та в умовах судинних втручань ангіолін зберігає морфофункціональні характеристики ендотеліальних клітин у судинах м'язового типу та капілярах головного мозку, підвищує вміст РНК у ядрах та цитоплазмі ендотеліальних клітин, активує їхню проліферацію, підвищує коефіцієнт зв'язування VEGF з ендотелієм. Препарат має також протизапальну

активність, знижуючи експресію прозапального цитокіну IL-1 β [447,448,449].

Кардіопротекторні властивості препарату спрямовані на підвищення виживаності кардіоміоцитів за умов гострої ішемії міокарда, покращення показників електрокардіограми. Ангіолін покращує загальні та кардіогемодинамічні показники в умовах гострої ішемії міокарда — нормалізує систолічний артеріальний тиск, зменшує ішемічну дисфункцію лівого шлуночка, підвищує тиск у ньому, а також підвищує робочі та систолічні індекси серця при одночасному зниженні загального периферичного опору судин. У разі стенокардії та інфаркту міокарда ангіолін покращує енергетичний метаболізм міокарда шляхом інтенсифікації аеробних реакцій утворення АТФ і активації компенсаторного малат-аспартатного шатлу для продукції АТФ [350, 447-449].

При парентеральному введенні середній час перебування ангіоліну в організмі становить 20 хвилин. Коефіцієнт розподілу препарату в організмі — 464 мкг/г/хв, що свідчить про швидке досягнення органів-мішеней. Із плазмою крові зв'язується 17% уведеної дози. Уже в перші 3–5 хвилин після введення 34,7% дози ангіоліну досягає міокарда. Час досягнення максимальної концентрації в міокарді — 7,8 хв. Максимальна концентрація в міокарді ($C_{\max \text{ cor}}$) — 16,7 мкг/г. Швидкість кліренсу з міокарда становить 324 мкг/хв. Препарат виводиться нирками: 62% — у незміненому вигляді, при нирковому кліренсі 3,6 мг/хв [450].

За результатами досліджень гострої токсичності препарату Ангіолін (на мишах, щурах і кролях), його віднесено до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини, що не мають кумулятивних властивостей згідно з індексом кумуляції). Препарат Ангіолін не спричиняє подразнення шкіри при нанесенні на неушкоджену шкіру щурів, не чинить місцевої подразнювальної дії на кон'юнктиву очей морських свинок, не спричиняє алергічних реакцій і не має ульцерогенного ефекту. У 180-денному дослідженні при внутрішньошлунковому введенні в дозах 100, 500 та 1000 мг/кг не виявлено структурно-функціональних змін, дистрофічних, гемодинамічних або деструктивних порушень у досліджуваних тканинах тварин [450].

Досліджуваний препарат Ангіолін характеризується сприятливим профілем

безпеки, успішно пройшов першу фазу клінічних випробувань і, за погодженням з Державним експертним центром МОЗ України, допущений до проведення другої фази клінічних досліджень. Основна кардіопротекторна дія ангіоліну після внутрішньоутробної гіпоксії, яка зберігається навіть через місяць після завершення введення, може бути зумовлена вищезазначеними властивостями.

В умовах гострої ішемії головного мозку ангіолін проявляє виражені ендотеліопротекторні властивості — зберігає щільність ендотеліальних клітин, підвищує концентрацію РНК у їхніх ядрах, збільшує щільність проліферуючих ендотеліальних клітин (тест BrdU), посилює утилізацію ендогенного L-аргініну, а також підвищує експресію VEGF і ендотеліальної NO-синтази (eNOS). Крім того, наявність двовалентної сірки у структурі молекули надає ангіоліну властивості перехоплювача NO. У поєднанні з вітаміном С ангіолін сприяє утворенню L-карнітину та нормалізує функціонування мітохондрій [450].

Ангіолін чинить протективну дію щодо оксиду азоту, а також підвищує його біодоступність. NO є нестабільним радикалом короткого існування і для подовження його «життя» він утворює більш стабільні S-нітрозильні комплекси з низькомолекулярними сполуками, такими як глутатіон і цистеїн. За дефіциту цих сполук біодоступність NO різко знижується. У разі недостатності низькомолекулярних тіолів, NO під дією активних форм кисню перетворюється на пероксинітрит, який здатен ініціювати розвиток нітрозативного стресу [451]. Ангіолін завдяки своїй хімічній структурі діє як пастка для вільних радикалів та може утворювати комплекс із NO. У міокарді в умовах експериментальної ішемії ангіолін позитивно впливає на стан системи оксиду азоту — підвищує синтез NO шляхом посилення експресії eNOS, збільшує його біодоступність та знижує прояви паразитарних реакцій, зокрема, шляхом зменшення гіперактивності iNOS. Ймовірним механізмом дії ангіоліну на експресію eNOS є його вплив на HSP70 та HIF-1 α . Ангіолін подовжує «тривалість життя» HIF-1 α шляхом активації механізмів, опосередкованих через HSP70. Препарат також позитивно впливає на глутатіонову тіол-дисульфідну систему, функціонально пов'язану з NO-системою. Встановлено, що за умов ішемії міокарда ангіолін підвищує активність

глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази, а також збільшує рівень відновленого глутатіону в цитозолі міокарда щурів [334]. Як відомо, HIF-1 α підвищує експресію eNOS і VEGF за умов гіпоксії та ішемії [452].

Ангіолін, завдяки позитивному впливу на NO-систему, сприятливо впливає на кардіо- та гемодинаміку при експериментальній ішемії міокарда. Введення ангіоліну кролям з оклюзією низхідної гілки коронарної артерії сприяло відновленню функції лівого шлуночка, що проявлялось у підвищенні індексу роботи лівого шлуночка, індексу систолічної роботи лівого шлуночка, збільшенні тиску в лівому шлуночку та зниженні загального периферичного опору судин [453].

Ангіолін має виражений вплив на маркери ендотеліальної дисфункції після ПГ (зниження рівня sEPCR на тлі підвищення Tie-2, VEGF-B, Cu/ZnSOD, GPX), які виконують протективні та антиоксидантні функції. Ангіолін ((S)-2,6-діаміногексанова кислота 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат), завдяки своїм властивостям перехоплювача NO, може утворювати нітротіоли та підвищувати біодоступність NO, нормалізуючи експресію eNOS/iNOS [453]. Дослідження на моделі церебральної ішемії у щурів продемонстрували ендотеліопротекторну активність ангіоліну, яка включає підвищення щільності ендотеліальних клітин у судинах м'язового типу та мікроциркуляторному руслі, збільшення щільності проліферуючих ендотеліальних клітин, а також посилення експресії VEGF та його коефіцієнта зв'язування з рецепторами [11,453].

Існують дані, що VEGF регулює активність ферменту eNOS та індукує біпазову стимуляцію продукції ендотеліального NO [454], що свідчить про можливу опосередковану через VEGF експресію eNOS під впливом ангіоліну. Ангіолін може впливати на експресію ендотелієспецифічних факторів і антиоксидантних ферментів шляхом модуляції тіол-дисульфідної системи, підвищення рівня глутатіону та регуляції посттрансляційних механізмів. На основі проведених досліджень сформовано експериментальне обґрунтування для подальшого доклінічного вивчення ангіоліну як перспективного кардіопротектора після пренатальної гіпоксії.

1.4.2.2. Тіотриазолін (морфолін 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат; морфолінтіазолат)

Історія створення тіотриазоліну бере свій початок з 1960-х років. Доклінічні дослідження, проведені відповідно до вимог Фармакологічного комітету МОЗ СРСР та Державного експертного центру МОЗ України, показали, що тіотриазолін виявляє виражені антиоксидантні, антиішемічні, кардіопротекторні та антигіпоксичні властивості, перевищуючи за ефективністю препарати порівняння. Було встановлено, що тіотриазолін має низьку токсичність при введенні різними шляхами чотирьом видам тварин, що дозволяє віднести препарат до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини). Тіотриазолін не має кумулятивної дії, не чинить подразнювальної дії на неушкоджену шкіру, не викликає алергічних реакцій, а також не має виразкоутворювальної чи імунотоксичної активності [455].

Токсикологічний аналіз, що включав всебічне вивчення поведінкових, фізіологічних, біохімічних показників та патологоморфологічне дослідження внутрішніх органів білих щурів і собак, показав, що внутрішньочеревне, внутрішньовенне та внутрішньошлункове введення тіотриазоліну в терапевтичних, проміжних та субтоксичних дозах протягом 180 днів не викликає структурних змін, дистрофічних чи гемодинамічних порушень, а також деструктивних реакцій у тканинах досліджуваних тварин. Введення препарату не призводить до незворотних змін біохімічних маркерів функціонального стану печінки та нирок. Дослідження також підтвердили відсутність тератогенної, ембріотоксичної, мутагенної та канцерогенної дії тіотриазоліну [455-457].

Тіотриазолін проявляє властивості скевенджера цитотоксичних форм NO і чинить захисну дію на транспорт оксиду азоту, позитивно впливаючи на тіол-дисульфідну рівновагу та підвищуючи рівні відновлених тіолів і глутатіону. Крім того, існує гіпотеза, що тіотриазолін сам може виконувати роль носія NO, утворюючи з ним стабільні S-нітрозильні комплекси [350,458]. Тіотриазолін здатний підвищувати біодоступність NO за умов надлишку активних форм кисню.

Він діє як антиоксидант, скевенджер АФК та NO, підвищуючи активність глутатіонзалежних ферментів і вміст відновленого глутатіону при ішемії міокарда. У концентраціях 10^{-5} – 10^{-7} М *in vitro* тіотриазолін знижував рівні супероксид-аніону та пероксинітриту завдяки наявності тіольної групи в структурі. Тіотриазолін запобігає незворотній інактивації транскрипційного фактора NF- κ B, захищаючи чутливі до АФК залишки цистеїну (Cys252, Cys154, Cys61) у його ДНК-зв'язувальних доменах. Ймовірно, він бере участь у відновленні цих груп при оборотній інактивації, діючи як Redox Factor-1, та посилює активацію експресії редокс-чутливих генів, необхідних для захисту клітин від окисного стресу. Крім того, тіотриазолін знижує інтенсивність нітрозативного стресу та підвищує активність eNOS (ендотеліальної NO-синтази) [350, 459-462].

Кардіопротекторна дія тіотриазоліну реалізується через позитивний вплив на енергетичний обмін в ішемізованому міокарді. Препарат підвищує рівень АТФ при ішемії та гіпоксії шляхом нормалізації циклу Кребса, посилення утилізації глюкози та стимуляції окиснення вільних жирних кислот [462]. Тіотриазолін активує лактатдегідрогеназу, сприяючи перетворенню лактату на піруват, що не лише усуває лактатацидоз та нормалізує внутрішньоклітинний рН, а й стимулює цикл Кребса за рахунок підвищення рівня пірувату. Препарат також проявляє антиоксидантні властивості. У низці досліджень доведено його здатність знижувати утворення кінцевих продуктів окисного та нітрозативного стресу, одночасно підвищуючи активність Cu/Zn-SOD, GPX1 та GPX4 у печінці, серці й головному мозку тварин з експериментальною патологією [350]. Відомо також, що тіотриазолін проявляє кардіопротекторну дію і підвищує витривалість тварин в умовах робочої гіпоксії, збільшуючи рівень HIF-1 та зберігаючи ультраструктуру мітохондрій. Завдяки антиоксидантній активності тіотриазолін підтримує чутливість рецепторів, зберігає плинність мембран і захищає фосфоліпиди від окиснення. Також він підвищує ефективність аргініну в комбінації, що зумовлено позитивним впливом на синтез, транспорт та біодоступність NO, а також на фізіологічні функції цього молекулярного месенджера [463]. У моделі інфаркту міокарда, індукованого ізадрином та

пітуїтрином, тіотриазолін стимулював лактатдегідрогеназу у напрямку утворення пірувату з лактату, усуваючи лактатацидоз, нормалізуючи внутрішньоклітинний рН і активуючи цикл Кребса [464].

У тій самій експериментальній моделі тіотриазолін активував малат-аспартатний шатл у міокарді в гострий період інфаркту міокарда [445]. Звертає на себе увагу масштабне дослідження, в якому взяли участь 8 298 пацієнтів з різними серцево-судинними захворюваннями, зокрема 5 700 осіб з різними формами ішемічної хвороби серця (ІХС). Було доведено, що тіотриазолін значно знижує кількість шлуночкових аритмій та коригує порушення ритму (екстрасистолія, пароксизмальна фібриляція передсердь, дисфункція синусового вузла). Препарат застосовується також при міокардіодистрофіях, оскільки проявляє ефективність як в умовах дефіциту, так і достатнього рівня кисню. Водночас тіотриазолін покращує метаболізм не лише кардіоміоцитів, а й клітин ЦНС, печінки тощо. Важливо, що тіотриазолін покращує якість життя пацієнтів згідно з оцінками за опитувальниками Міннесотського та Ноттінгемського профілю здоров'я: поліпшення загальних показників якості життя, підвищення фізичної активності та покращення емоційного стану [465]. Призначення тіотриазоліну (600 мг/добу) 8 298 пацієнтам зі стабільною стенокардією напруги II–III ФК зменшило кількість нападів стенокардії на 46,32 %; у контрольній групі — на 33,24 % ($p = 0,028$), із вірогідним підвищенням толерантності до фізичного навантаження ($p = 0,031$) [466].

1.4.2.3. Мілдронат

Мілдронат (3-(2,2,2-триметилгідрозин) пропіонат) зворотно блокує γ -бутиробетаїнгідроксилазу — фермент, що каталізує перетворення γ -бутиробетаїну в карнітин, тим самим істотно знижуючи надходження карнітину, відповідального за транспорт жирних кислот через мембрану в м'язові клітини. Такий ефект мілдронату супроводжується зменшенням карнітинзалежного окиснення вільних жирних кислот та, як наслідок, активацією окиснення глюкози,

яке є більш енергоефективним в умовах ішемії. Лікування мілдронатом супроводжується компенсаторним підвищенням експресії низки генів у міокарді, що кодують ферменти, залучені до ліпідного обміну — ліпопротеїнліпазу, транспортер жирних кислот, карнітинпальмітоїлтрансферазу I та ферменти, які беруть участь у синтезі тригліцеридів [446,467,468].

Мілдронат здатен покращувати скоротливу функцію міокарда, підвищувати активність гексокінази та модулювати співвідношення АТФ/АДФ/АМФ шляхом активації АМФ-активованої протеїнкінази (АМРК), що сприяє відновленню рівнів АТФ [469]. Важливою особливістю дії мілдронату, яка вирізняє його серед інших засобів, що впливають на метаболізм міокарда, є відсутність накопичення недоокиснених жирних кислот у мітохондріях і підвищення продукції NO. Це зумовлено тим, що мілдронат інгібує гідроксилювання γ -бутиробетаїну та збільшує внутрішньоклітинний пул γ -бутиробетаїну, який шляхом естерифікації виявляє холіноміметичні властивості. Естери γ -бутиробетаїну здатні активувати NO-синтазу через ацетилхолінові рецептори ендотеліальних клітин. Мілдронат покращує толерантність до фізичного навантаження і якість життя пацієнтів, позитивно впливаючи на функціональні параметри серця — фракцію викиду та систолічний об'єм при ішемії міокарда [436]. Мілдронат достовірно підвищує експресію мРНК iNOS при одночасному зниженні рівня нітротирозину, що вказує на його антиоксидантні властивості [470].

1.4.2.4. L-аргінін

L-аргінін є субстратом для синтезу NO в ендотеліальних клітинах судин, який є основним фактором вазодилатації. NO, що синтезується з аргініну, знижує загальний периферичний опір судин і артеріальний тиск, зменшуючи ступінь гіпоксії, зокрема в тканинах серця [471]. L-аргінін також виявляє антиоксидантні властивості, беручи участь у процесах трансамінування та виведенні продуктів азотистого обміну, таких як аміак, сечовина і сечова кислота — метаболіти білкового катаболізму. Здатність синтезувати сечовину та виводити білкові

відходи залежить від ефективності орнітин-цитрулін-L-аргінінового циклу. Однак оксидативний стрес знижує клінічну ефективність L-аргініну [472].

L-аргінін відіграє важливу роль у синтезі білка, сприяє збільшенню м'язової маси, покращенню регенерації м'язів після фізичного навантаження, прискоренню загоєння ран, виведенню токсичних метаболітів, оптимізації функціонування імунної системи та стимуляції секреції гормону росту [473]. L-аргінін є спільним субстратом як для синтезу NO, так і поліамінів (путресцину, спермідину та сперміну). NO і поліаміни відіграють ключову роль у процесах репродукції, ембріогенезу, зниження неонатальної смертності та ембріонального ангиогенезу. NO регулює експресію генів, синтез білків, сприяє проліферації, росту та диференціації плода [474]. Саме тому значна увага дослідників і клініцистів зосереджена на застосуванні L-аргініну як субстрату для NO задля зменшення негативних наслідків ПГ [475].

Менша ефективність L-аргініну у порівнянні з ангиоліном та тіотриазоліном пояснюється коротким часом життя молекули NO в умовах ішемії та гіпоксії, які супроводжуються оксидативним стресом. Так званий «новонароджений» NO майже миттєво піддається атаці супероксид-аніону з утворенням токсичного пероксинітриту [11,476]. Лише комбінації L-аргініну з донорами SH-груп або антиоксидантами (цистеїном, глутатіоном, тіотриазоліном, ангиоліном) здатні підсилити його NO-модулюючу активність [350]. Комбінована дія L-аргініну та тіотриазоліну спрямована на синтез, стабілізацію та підвищення біодоступності NO [334,477,478].

Це свідчить про важливу роль системи оксиду азоту в регуляції CCC та її участь у патогенезі порушень, спричинених пренатальною гіпоксією. У цьому випадку застосування модюляторів системи NO, зокрема L-аргініну, тіотриазоліну, ангиоліну та мілдронату, є перспективним напрямом кардіопротекції, що потребує подальшого експериментального й клінічного обґрунтування.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Експериментальна модель ПГ та характеристика лабораторних тварин

Проведення експериментального дослідження було схвалене Комісією з питань біоетики Запорізького державного медичного університету (протокол № 33 від 26 червня 2021 року). У дослідженні використано 170 білих щурах лінії Вістар серед яких 50 тварин віком 4,5 місяця з масою тіла 220–240 г, 60 — віком 1 місяць та 60 — віком 2 місяці, отриманих з віварію ДУ «Інститут фармакології та токсикології Національної медичної академії наук України». Щури утримувалися в стандартних умовах віварію, які включали температуру 20-25°C, вологість 50-55%, денне світло, відповідний для цього виду корм та доступ до води.

З метою приручення щурів перед початком експерименту їх утримували в руках по 2–3 хвилини протягом 5 днів, що полегшувало подальші експериментальні дослідження. Протягом усього експерименту з усіма тваринами працював один і той самий дослідник. Для дослідження була використана модель хронічної гемічної нітрит-індукованої ПГ, що призводить до гістологічних, морфометричних та метаболічних порушень у серці нащадків [479,480]. Для отримання нащадків на фіксований термін гестації статевозрілих самців щурів підсаджували до самок, що не мали статевих контактів, у співвідношенні 2:4 (самці:самки). Початок вагітності встановлювали за наявністю сперматозоїдів у вагінальному мазку, що відповідало першому дню гестації.

Гемічну гіпоксію моделювали в пренатальному періоді внутрішньоочеревинним введенням натрію нітриту вагітним самкам із 16-го по 21-й день вагітності. Препарат застосовували щоденно у дозі 50 мг/кг, що забезпечує розвиток помірної форми гіпоксії [481]. Самкам контрольної групи у ті самі терміни вводили еквівалентний об'єм ізотонічного розчину натрію хлориду.

Після народження новонароджених тварин розподіляли на експериментальні групи:

1 – інтактні щурята, отримані від самок із фізіологічним перебігом вагітності, яким вводили фізіологічний розчин, по 10 тварин на кожен із досліджуваних термінів.

2 – тварини, що зазнали внутрішньоутробного впливу пренатальної гемічної гіпоксії, без додаткового медикаментозного втручання (контрольна група після ПГ), по 10 тварин на кожен термін.

3-6 – групи щурят після ПГ, які отримували препарати щодня з 1-го по 30-й день постнатального періоду, (по 10 на кожен термін спостереження).

Перед кожним введенням препарату тварин зважували на електронних вагах AUX 220 (Shimadzu Corporation, Японія). Для внутрішньочеревного введення використовували мікрошприц об'ємом 10 мкл (модель 701 N, 26 G, довжина 51 мм, зовнішній діаметр 0,47 мм; Hamilton, VWR International, Велика Британія, кат. № 549-1135), а також шприц Air-Tite™ Sterile Syringes with Needles, Luer Slip, 27 G, об'ємом 1 мл, з голкою довжиною 13 мм (Китай). У якості ін'єкційних голок застосовували голки розміру 30 G × 1/2" (Becton Dickinson, Іспанія, кат. № 305106).

Введення препаратів у перші дні після народження здійснювали при температурі 38–40 °С, яку підтримували за допомогою електрогрівки для недоношених дітей. Перед маніпуляціями самок тимчасово відсаджували в окремі клітки, куди додавали тирсу з їхньої домашньої клітки; також цією тирсою обтирали рукавички дослідника для зниження рівня стресу у тварин.

Ін'єкції проводили в окремому приміщенні, щоб уникнути стресування самиць та запобігти можливому відмовленню від приплоду. Перед введенням препарату щурят укладали на спину на попередньо підігрітий паперовий рушник, на який також додавали тирсу з клітки, що стимулювало рефлекторне сечовипускання при перевертанні і рухах кінцівок.

Для ін'єкції щурят обережно фіксували за черевце між великим та вказівним пальцями, розташовуючи їх вентральною стороною догори. Голку вводили у черевну порожнину між середньою лінією та жировими відкладеннями, уникаючи

проникнення в печінку або заповнений молоком шлунок, на глибину 2–3 мм під невеликим кутом, щоб не пошкодити внутрішні органи. Препарат вводили повільно, тримаючи голку за основу для запобігання її зміщенню, та витримували 5 секунд після введення для забезпечення рівномірного розподілу препарату. Після цього голку обережно виймали.

Дози тіотриазоліну та ангіоліну були розраховані експериментально в доклінічних дослідженнях і представлені у звітах та інших наукових джерелах [449, 450, 455, 456, 465, 482, 483], у той час як дози аргініну та мілдронату були визначені за відкритими джерелами [469, 484].

2.2 Характеристика обраних препаратів і фармакологічних агентів

1. Нітрит натрію (Sodium nitrite, хімічна формула NaNO_2 , CAS № 7632-00-0; виробник Merck KGaA, Дармштадт, Німеччина). Робочий розчин готували екстемпорально: 500 мг речовини розчиняли у 10 мл 0,9% розчину натрію хлориду. Вводили внутрішньочеревно в дозі 0,1 мл на 100 г маси тіла тварини.

2. Тіотриазолін: метаболітотропний кардіопротектор та антиоксидант (морфоліній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтова кислота), 2,5% розчин для ін'єкцій, виробник «Артеріум», Україна. Препарат вводили внутрішньочеревно в дозі 50 мг/кг. Використовували готовий ампульний розчин, який вводили з розрахунку 0,2 мл на 100 г маси тіла.[482].

3. Ангіолін — похідне ([S]-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат). Субстанцію синтезовано НВП «Фарматрон», Україна, промислове виробництво здійснював Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» НАН України. Це протиішемічний і антиоксидантний засіб з вираженою дією на ендотелій судин головного мозку і серця та метаболічні процеси. Вводили внутрішньочеревно один раз на добу в дозі 50 мг/кг протягом 30 днів з моменту народження. Робочий розчин готували екстемпорально: 500 мг субстанції розчиняли у 20 мл фізіологічного розчину. Вводили з розрахунку 0,2 мл на 100 г маси тіла [483].

4. L-аргінін — попередник NO, антигіпоксанти і цитопротектор (42% розчин для ін'єкцій у флаконі, Тівортін, Юрія-Фарм, Україна). Вводився в дозі 200 мг/кг внутрішньочеревно. Безпосередньо перед введенням препарат розводили фізіологічним розчином у співвідношенні 1:4. Отриманий розчин вводили з розрахунку 0,2 мл на 100 г маси тіла [484].

5. Мілдронат — метаболітотропний засіб (2-(2-карбоксиетил)-1,1,1-триметилгідазиній), 10% розчин для ін'єкцій в ампулах, виробник Grindex, Латвія. Вводився в дозі 100 мг/кг внутрішньочеревно. Безпосередньо перед введенням препарат розводили фізіологічним розчином у співвідношенні 1:2. Вводили з розрахунку 0,2 мл на 100 г маси тіла [469].

Точне зважування субстанцій і хімічних сполук здійснювали на торсійних терезах ВТ–500. Розведення препаратів проводили з використанням електронних мікропіпеток-дозаторів (Brand, Німеччина) та хімічного посуду для аналітичних досліджень.

2.3 Анестезія

Щурів етаназували на 30-й та 60-й день постнатального життя під тіопенталовим наркозом у дозі 40 мг/кг внутрішньочеревно. Для приготування розчину використовували ліофілізат тіопенталу натрію у флаконах по 0,5 г (ТОВ «Київмедпрепарат», Україна). Безпосередньо перед застосуванням точну навіску тіопенталу натрію розчиняли у фізіологічному розчині до отримання 4% розчину. Розчин вводили щурам внутрішньочеревно інсуліновим шприцом у дозі 0,1 мл розчину на 100 г маси тіла. Після проведення наркозу виконували забір серця та крові з черевної аорти для подальших лабораторних досліджень.

2.4 Підготовка біологічного матеріалу

Кров забирали з черевної аорти за допомогою шприца. Сироватку відокремлювали центрифугуванням при +4 °C та 1500 об/хв протягом 20 хвилин на центрифугу Ependorff 5804R [485]. Після видалення надлишку жиру, сполучної

тканини, кровоносних судин серце промивали охолодженим 0,15 М розчином KCl у розведенні 1:10 і витримували при 4°C. Використовуючи торсійні ваги WT500, 100 міліграмів серцевої тканини ретельно зважували, попередньо подрібнивши її в тонкий порошок за допомогою рідкого азоту. Потім 10,0 мл середовища при температурі 2°C ретельно перемішували з подрібненою тканиною. Концентрація наступних інгредієнтів у мілімолях на літр (ммоль/л) була відрегульована до pH 7,4: 250 ммоль/л сахарози, 20 ммоль/л трис-HCl буфера та 1 ммоль/л EDTA. Потім великі фрагменти клітин екстрагували з гомогенату шляхом попереднього центрифугування в охолодженій центрифугі Sigma 3-30 k (Osterode am Harz, Німеччина) протягом 7 хв при 1000×g при +4 °C. Отриманий супернатант обережно збирали і піддавали другому процесу центрифугування на тій самій холодильній центрифугі Sigma 3-30 k (Німеччина) протягом 20 хвилин при 17 000× g за температури +4 °C. Після цієї процедури надосадову рідину збирали та охолоджували при -80 °C. Після ресуспендування густий мітохондріальний осад використовували для додаткових досліджень. Апікальну частину серця поміщали у фіксатор Буена на 24 год. Після стандартної процедури зневоднення тканини та просочення хлороформом і парафіном міокард поміщали в парапласт (MkCormick, Cockeysville, MD, США). Серійні гістологічні зрізи товщиною 5 мкм готували за допомогою ротаційного мікротома Microm-325 (Microm Corp., Мюнхен, Німеччина). Після обробки ксилолом та етанолом зрізи використовували для ПЛР-аналізу в реальному часі та морфометричних досліджень.

2.5 Імуноферментний аналіз

2.5.1 Імуноферментний аналіз, який проводили в сироватці крові

Метод базувався на твердофазному імуноферментному сендвіч-імуносорбентному аналізі. Рівень білка теплового шоку HSP70 вимірювали в сироватці крові за допомогою високочутливого набору AMP'DR HSP70 ELISA каталожний номер ENZ-KIT-101-0001, Enzo, (Швеція). Концентрацію HSP70 виражали в нг/мл.

Також у сироватці крові визначали молекулярний маркер пошкодження міокарда білок ST2 методом твердофазного імуноферментного сендвіч-імуносорбентного аналізу з використанням набору Critical Diagnostics Presage® ST2 Assay kit каталожний номер REF# BC-1065 (США). Концентрацію ST2 виражали в нг/мл.

Активність ендотеліальної NO-синтази (eNOS) визначали в сироватці крові імуноферментним методом з використанням набору Cloud-Clone Corporation kit каталожний номер PAA868Ra01 (США), згідно з інструкцією. Концентрацію eNOS виражали в пг/мл.

Нітритрозин визначали в сироватці крові методом твердофазного імуносорбентного сендвіч-імуноферментного аналізу з використанням набору для ІФА каталожний номер НК 501-02 від Hycult Biotech (Нідерланди), згідно з інструкцією. Результати виражали в нМ/мл.

Всі дослідження виконували з використанням планшетного імуноферментного аналізатора SIRIO S (Равенна, Італія).

2.5.2 Імуноферментний аналіз, що вимірювали в цитозольному гомогенаті серця

Розчинний рецептор ендотеліального протеїну C (sEPCR) вимірювали в цитозольному гомогенаті серця за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА) методом «сендвіч». Аналіз проводили з використанням набору для імуноферментного аналізу розчинного ендотеліального рецептора протеїну C щурів (sEPCR), каталожний номер MBS265381 від MyBioSource, Inc. (США), відповідно до наданих інструкцій.

Активність індукцйбельної синтази оксиду азоту (iNOS) в цитозолі оцінювали за допомогою імуноферментного аналізу з використанням набору номер MBS023874 від MyBioSource, Inc. (США) відповідно до інструкції. Ці аналізи проводили на планшетному імуноферментному аналізаторі (SIRIO-S, Seac, Італія).

Тирозинкіназу Tie2 також визначали в цитозольному гомогенаті серця за

допомогою твердофазного сендвіч-методу ІФА. Аналіз проводили з використанням набору реагентів Rat Tie2 (Rat Tek Tyrosine Kinase) Endothelial ELISA Kit, каталожний номер MBS036226 від MyBioSource, Inc. (США), відповідно до інструкції.

Фактор росту ендотелію судин В (VEGF-B) визначали в цитозолі гомогенату серця методом твердофазного сендвіч-імуноферментного аналізу за допомогою набору реагентів Rat Vascular Endothelial Growth Factor B (VEGF-B) ELISA Kit, каталожний номер MBS269676 від MyBioSource, Inc. (США), згідно з інструкцією.

SOD1/Cu-Zn СОД визначали в цитозолі гомогенату серця методом твердофазного сендвіч-ІФА, набір для визначення супероксиддисмутази [Cu-Zn] щурів, каталожний номер MBS761294 від MyBioSource, Inc. (США), згідно з інструкцією.

Глутатіонпероксидазу 4 (фосфоліпідгідропероксидазу) (GPX4) визначали в цитозолі гомогенату серця методом твердофазного сендвіч-ІФА, набір реагентів Rat Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial, GPX4 ELISA Kit, каталожний № MBS934198 MyBioSource, Inc. (США), відповідно до інструкції.

Глутатіонпероксидазу 1 (GPX1) визначали в цитозолі гомогенату серця методом твердофазного сендвіч-ІФА, набір реагентів Rat Glutathione Peroxidase 1 ELISA Kit, каталожний номер MBS3809062 MyBioSource, Inc. (США), відповідно до інструкції. Всі дослідження проводили з використанням планшетного імуноферментного аналізатора (SIRIO S, Равенна, Італія).

2.6 Полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу

Для кількісного визначення рівня експресії мРНК HIF-1 було проведено ампліфікацію методом ПЛР у реальному часі. Для цього використовували майстер-мікс Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2×) (ThermoScientific, Waltham, MA, США) з ген-специфічними праймерами на системі Biorad CFX 96 Real-Time PCR Detection System. Реакційна суміш містила 10 мкл Maxima SYBR

Green/ROX qPCR Master Mix 2×, по 0,5 мкл кожного ген-специфічного праймера, 2 мкл шаблону кДНК та воду без нуклеаз до кінцевого об'єму 20 мкл.

Дослідження рівнів експресії мРНК VEGF та VEGF-B проводили в апікальній частині міокарда. Підготовка зразків здійснювалась відповідно до опису в розділі «Підготовка біологічного матеріалу». Молекулярно-генетичне дослідження включало кілька етапів. Зразки тканин депарафінували шляхом інкубації в двох послідовних ваннах ксилолу по 5 хв кожна, а потім у двох ваннах 100% етанолу по 5 хв кожна. Після депарафінізації та центрифугування осад висушували на повітрі для видалення залишків етанолу.

Виділення тотальної РНК з тканин щурів проводили за допомогою набору «Тризол РНК Преп 100», що містить реагенти: Trizol та ExtraGene E. РНК виділяли згідно з протоколом набору. Для зворотної транскрипції (синтезу кДНК) використовували «Набір реагентів для зворотної транскрипції (RT-1)». Підготовку та проведення реакції здійснювали згідно з інструкцією виробника.

Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (RT-PCR). Для оцінки рівня транскрипційної активності досліджуваних генів застосовували систему детекції CFX96™ Real-Time PCR Detection System (виробництва «Bio-Rad Laboratories, Inc.», Hercules, CA, США) у поєднанні з комерційним набором реагентів SYBR Green R-402 для qPCR. Реакційна суміш для ампліфікації містила барвник SYBR Green, ДНК-полімеразу SynTaq, активність якої була заблокована специфічними антитілами до початку реакції, дезоксинуклеозидтрифосфати (дНТФ), прямий і зворотний праймери у кількості по 0,2 мкл кожен, а також 1 мкл синтезованої кДНК, що слугувала матрицею. Загальний об'єм реакційної системи становив 25 мкл, до якого додавали деіонізовану воду для досягнення потрібної концентрації компонентів.

Специфічні пари праймерів (5'-3') для аналізу цільових та референтних генів були створені за допомогою програмного забезпечення PrimerBlast (липень 2024 р., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) та виготовлені компанією ThermoScientific, США. Умови ампліфікації: початкова денатурація при 95 °C протягом 10 хв, потім 50 циклів денатурації при 95 °C протягом 15 с, відпал

праймеру при 58-63 °C протягом 30 с та елонгація при 72 °C протягом 30 с. Інтенсивність флуоресценції автоматично реєструвалась у кінці фази елонгації кожного циклу за допомогою каналу SYBR Green.

Ген бета-актину (Actb) використовували як референтний ген для визначення відносних змін рівнів експресії досліджуваних генів.

Тотальну РНК екстрагували із зразків серця за стандартним протоколом з використанням NucleoZOL (Macherey-Nagel, Düren, Німеччина). Виділену РНК розчиняли у воді без РНКаз до концентрації 2 мкг/мкл. Вага фрагментів серця становила 30-80 мг. Синтез кДНК проводили за допомогою набору для синтезу кДНК RevertAid First Strand (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США; K1621) згідно з інструкцією виробника. Зразки тканин гомогенізували за допомогою роторно-статорного гомогенізатора, використовуючи до 100 мг тканини на 1 мл NucleoZOL. Для тканин з високим вмістом ДНК рекомендується використовувати 50 мг тканини/мл реагенту. Гомогенат обробляли в мікроцентрифужних пробірках об'ємом 1,5 мл або 2 мл, використовуючи 880 мкл гомогенату (80 мг тканини + 800 мкл NucleoZOL). Залишок гомогенату збирали при -20 °C або -70 °C протягом щонайменше одного року для подальшого використання.

Для кількісного визначення рівнів експресії мРНК iNOS та eNOS проводили ампліфікацію методом RT-PCR з використанням майстер-міксу Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2×) (ThermoScientific, Waltham, MA, США) з ген-специфічними праймерами на системі детектування ПЛР в реальному часі Biorad CFX 96. Специфічні пари праймерів для β-актину, iNOS та eNOS були підібрані за допомогою інструменту PrimerBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast, доступ 1 червня 2023 р.) та придбані у компанії ThermoScientific. Реакційна суміш містила 10 мкл 2 × Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, 0,5 мкл кожного ген-специфічного праймера, 2 мкл шаблону кДНК і воду без нуклеаз до кінцевого об'єму 20 мкл.

Умови проведення ПЛР: початкова денатурація при 95 °C протягом 10 хвилин, далі 45 циклів: денатурація при 95 °C протягом 15 с, відпал праймеру при 60 °C протягом 40 с, елонгація при 72 °C протягом 40 с. Інтенсивність

флуоресценції реєструвалась автоматично в кінці кожного циклу елонгації за допомогою каналу SYBR Green.

Ген актину бета (Actb) використовували як референтний ген для нормалізації рівнів експресії генів-мішеней. Рівні експресії генів-мішеней кількісно оцінювали відносно експресії референтного гена за допомогою методу порівняльного C_t ($2^{-\Delta C_t}$). Значення C_t переводили у відносні значення експресії за формулою $2^{-\Delta C_t}$, де $\Delta C_t = (C_t \text{ гена-мішені} - C_t \text{ референтного гена})$. Відносну експресію перераховували у значення Log2 за формулою Log2 (відносна експресія).

2.7 Біохімічні методи

Рівні метаболітів NO (NOx) в серці оцінювались за методом Грісса. Супернатант, отриманий як зазначено вище (1,0 мл), депротейнізували додаванням 100 мкл 0,092 М сульфату цинку та 100 мкл 1 М NaOH, ретельно перемішали і залишили на 30–40 хв. Потім пробу центрифугували при $4000 \times g$ протягом 10 хв (при 5 °C) за допомогою центрифуги Eppendorf™ 5430 G (Гамбург, Німеччина). Наступним кроком 100 мкл отриманого супернатанту переносили в лунку мікропробірки, і до кожної лунки додавали 0,5 мМ хлориду ванадію (III) для відновлення нітрату до нітриту. Потім додавали 50 мкм сульфонамідів і 0,2 мкм N-1-(нафтил)етилендіаміна. Загальний об'єм інкубаційної суміші становив 300 мкл. Далі зразки інкубували протягом 30 хв при 37 °C, і оптичну густину вимірювали при 540 нм. Концентрацію NOx визначали за допомогою лінійної стандартної кривої в межах 0–50 мкмоль/л нітрату натрію. Рівні NOx в тканинах виражали в мкмоль/л.

2.8 Морфометричні дослідження

Гістологічні зрізи фарбували гематоксиліном та еозином і заливали в полімерне середовище EUKITT (O. Kindler GmbH, Фрайбург, Німеччина) для мікроскопії. У гістологічних препаратах вимірювали площу поперечного перерізу ядер ендотеліоцитів в артеріолах діаметром 30-50 мкм при збільшенні $\times 400$. Дослідження проводили за допомогою мікроскопа Carl Zeiss Axio Scope.A1 (Німеччина) в парі з цифровою камерою Jenoptik Progres Gryphax® Subra (Єна, Німеччина) та програмного забезпечення GRYPHAX (версія 2.2.0.1234). Вимірювання проводили в 10 полях зору з використанням програмного забезпечення VideoTest-Morphology версії 5.2.0.158.

Площу поперечного перерізу ядер ендотеліоцитів в артеріолах діаметром 30-50 мкм та площу ядер кардіоміоцитів визначали на гістологічних препаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином при збільшенні $\times 400$. Дослідження виконували за допомогою мікроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Німеччина), оснащеного камерою Jenoptik Progress Gryphax® серії SUBRA (Німеччина) (рис. 2.8.1. та 2.8.2.).

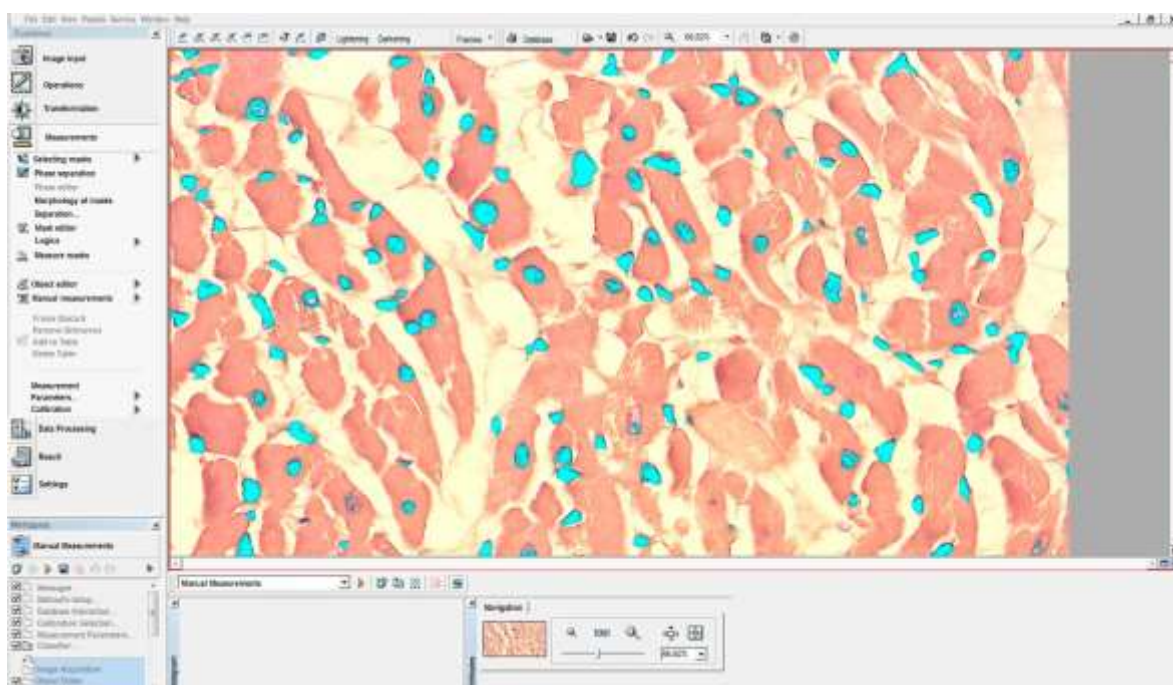


Рис. 2.8.1. Виділені ядра кардіоміоцитів (виділені об'єкти) на основі градієнта оптичної густини. Рисунок зроблено із програми авторкою.

Specimen	Sex	Age	Head length	Body length	...
1	♂	1	11.713	3.561	...
2	♂	1	11.713	3.561	...
3	♂	1	11.713	3.561	...
4	♂	1	11.713	3.561	...
5	♂	1	11.713	3.561	...
6	♂	1	11.713	3.561	...
7	♂	1	11.713	3.561	...
8	♂	1	11.713	3.561	...
9	♂	1	11.713	3.561	...
10	♂	1	11.713	3.561	...
11	♂	1	11.713	3.561	...
12	♂	1	11.713	3.561	...
13	♂	1	11.713	3.561	...
14	♂	1	11.713	3.561	...
15	♂	1	11.713	3.561	...
16	♂	1	11.713	3.561	...
17	♂	1	11.713	3.561	...
18	♂	1	11.713	3.561	...
19	♂	1	11.713	3.561	...
20	♂	1	11.713	3.561	...
21	♂	1	11.713	3.561	...
22	♂	1	11.713	3.561	...
23	♂	1	11.713	3.561	...
24	♂	1	11.713	3.561	...
25	♂	1	11.713	3.561	...
26	♂	1	11.713	3.561	...
27	♂	1	11.713	3.561	...
28	♂	1	11.713	3.561	...
29	♂	1	11.713	3.561	...
30	♂	1	11.713	3.561	...
31	♂	1	11.713	3.561	...
32	♂	1	11.713	3.561	...
33	♂	1	11.713	3.561	...
34	♂	1	11.713	3.561	...
35	♂	1	11.713	3.561	...
36	♂	1	11.713	3.561	...
37	♂	1	11.713	3.561	...
38	♂	1	11.713	3.561	...
39	♂	1	11.713	3.561	...
40	♂	1	11.713	3.561	...
41	♂	1	11.713	3.561	...
42	♂	1	11.713	3.561	...
43	♂	1	11.713	3.561	...
44	♂	1	11.713	3.561	...
45	♂	1	11.713	3.561	...
46	♂	1	11.713	3.561	...
47	♂	1	11.713	3.561	...
48	♂	1	11.713	3.561	...
49	♂	1	11.713	3.561	...
50	♂	1	11.713	3.561	...
51	♂	1	11.713	3.561	...
52	♂	1	11.713	3.561	...
53	♂	1	11.713	3.561	...
54	♂	1	11.713	3.561	...
55	♂	1	11.713	3.561	...
56	♂	1	11.713	3.561	...
57	♂	1	11.713	3.561	...
58	♂	1	11.713	3.561	...
59	♂	1	11.713	3.561	...
60	♂	1	11.713	3.561	...
61	♂	1	11.713	3.561	...
62	♂	1	11.713	3.561	...
63	♂	1	11.713	3.561	...
64	♂	1	11.713	3.561	...
65	♂	1	11.713	3.561	...
66	♂	1	11.713	3.561	...
67	♂	1	11.713	3.561	...
68	♂	1	11.713	3.561	...
69	♂	1	11.713	3.561	...
70	♂	1	11.713	3.561	...
71	♂	1	11.713	3.561	...
72	♂	1	11.713	3.561	...
73	♂	1	11.713	3.561	...
74	♂	1	11.713	3.561	...
75	♂	1	11.713	3.561	...
76	♂	1	11.713	3.561	...
77	♂	1	11.713	3.561	...
78	♂	1	11.713	3.561	...
79	♂	1	11.713	3.561	...
80	♂	1	11.713	3.561	...
81	♂	1	11.713	3.561	...
82	♂	1	11.713	3.561	...
83	♂	1	11.713	3.561	...
84	♂	1	11.713	3.561	...
85	♂	1	11.713	3.561	...
86	♂	1	11.713	3.561	...
87	♂	1	11.713	3.561	...
88	♂	1	11.713	3.561	...
89	♂	1	11.713	3.561	...
90	♂	1	11.713	3.561	...
91	♂	1	11.713	3.561	...
92	♂	1	11.713	3.561	...
93	♂	1	11.713	3.561	...
94	♂	1	11.713	3.561	...
95	♂	1	11.713	3.561	...
96	♂	1	11.713	3.561	...
97	♂	1	11.713	3.561	...
98	♂	1	11.713	3.561	...
99	♂	1	11.713	3.561	...
100	♂	1	11.713	3.561	...

Рис. 2.8.2. Результати кількісних вимірювань, отримані за допомогою програми VideoTest Morphology 5.2.0.158. Рисунок зроблено із програми авторкою.

2.9 Підготовка тварини до реєстрації ЕКГ та її проведення

Особливості реєстрації електрокардіографія (ЕКГ) у дрібних лабораторних тварин. ЕКГ у щурів є широко використовуваним експериментальним методом дослідження ССС. Запис ЕКГ відображає електричну активність серця і може надати важливу інформацію про функціональні та структурні характеристики міокарда. Техніка реєстрації ЕКГ у лабораторних тварин досить проста, але інтерпретація електрокардіографічних параметрів є складним завданням. Це пов'язано з тим, що, на відміну від людини, у щурів не існує усталених критеріїв норми ЕКГ: існують значні відмінності в параметрах ЕКГ між дослідженнями у цих тварин. На думку більшості вчених, це пов'язано з різними експериментальними умовами, такими як тип анестезії, вид використаної лінії щурів, стать, вік тварин і частота серцевих скорочень (ЧСС) [486,487].

Реєстрація ЕКГ у щурів за допомогою системи ECG TUNNEL усуває більшість описаних вище проблем, оскільки тварини не піддаються наркозу, а

знаходяться в іммобілізаційному тунелі. Важливими умовами ефективності реєстрації ЕКГ є попередня, протягом 2-3 днів, підготовка тварини до адаптації та виключення стресових реакцій, створення максимальної шумоізоляції в діапазоні температур навколишнього середовища близьк 24-26 °С. Велику складність при реєстрації ЕКГ у щурів створює висока частота серцевих скорочень, що перевищує 500 ударів на хвилину, а в деяких експериментальних моделях досягає 700-800 ударів. Для вирішення цієї проблеми система ECG TUNNEL оснащена стандартними фільтрами, що зменшують шуми і електричні артефакти, а також програмно регульованими фільтрами високих і низьких частот. Це дозволяє виділити певні патерни електричної активності серця. При записі ЕКГ здійснюється одночасний запис в шести відведеннях: стандартних (I, II, III) і розширених (AVR, AVL, AVF). Це дає можливість, крім стандартних параметрів (тривалість і конфігурація інтервалів і піку комплексу PQRS), за допомогою програмного забезпечення встановити величину зсуву інтервалу ST, площу зубця S і амплітуду його піку, розрахувати показник ефективності (% відношення зареєстрованих імпульсів до загальної кількості сигналів за один сеанс); розрахувати середню кількість зареєстрованих імпульсів протягом одного сеансу.

Для дослідження ЕКГ з нащадків було відібрано по 10 тварин у кожній групі двомісячного віку, які за фізіологічними показниками були найбільш придатними для електрофізіологічних експериментів. Відповідно до зазначених критеріїв, частіше відбиралися самці щурів.

Були визначені та розраховані наступні параметри:

- 1) корекція тренду амплітуди сигналу Ramp;
- 2) нормалізація сигналу Ramp відносно середнього значення Ramp за період:

$$R_{\text{norm}}(i) = R(i) - \Delta R \cdot i,$$

де $\Delta R = R_n - R_0$, i - порядковий номер циклу перезапису, з подальшою централізацією значень, за умови, що його середнє значення становить 1000 мВ (значення стандартного калібрувального сигналу). В подальшому R_{norm} коригували з урахуванням положення ізолінії Iso (I);

- 3) розрахунок додаткового параметра « $\pm RR$ » (мс), що відображає різницю в

тривалості послідовних RR-циклів (розраховується в абсолютних одиницях мс);

4) формування вибірки для статистичних досліджень на основі безперервного запису 10-секундних інтервалів у кожному індивідуальному епізоді представленої ЕКГ.

Усі дані вихідних файлів подано в таблицях на аркушах книги з назвою серії досліджень (за назвою папок). Багато файлів записів містять кілька епізодів записів, а якщо є якісь тривалі, то вони зібрані в окрему таблицю.

Параметри, отримані при записі ЕКГ:

File		Ім'я файлу запису;
#		Порядковий номер RR-циклів;
period- time	s	Час запису RR циклу;
Ramp	mV	Ненормована амплітуда зубця R;
		Час між двома послідовними R- хвилями;
RR	ms	Тривалість систоли шлуночків;
QRS	ms	Положення ізолінії;
Iso	mV	Положення сегмента ST відносно ізолінії;
STE	mV	Площа під зубцем S;
Sarea	mV·ms	Амплітуда зубця S;
Sampl	mV	Частота серцевих скорочень.
HR	bpm (уд./хв)	

Параметри ЕКГ отримані методами математичних розрахунків:

normRamp	mV	Нормована амплітуда R-хвилі;
mRR	ms	Середнє статистичне відхилення послідовних циклів RR;
MoRR	ms	Мода - найбільш поширене значення кардіоінтервалу в даному динамічному ряді;
AMo	%	Амплітуда моди - відображає стабілізуючий ефект централізації контролю серцевого ритму, який в основному обумовлений ступенем активності симпатичного відділу вегетативної нервової системи;
pNN50	%	Відсоток послідовних інтервалів R-R, відстань між якими перевищує 50 мс. Показник активності парасимпатичної ланки вегетативної регуляції;
normR-Iso	mV	Нормована амплітуда зубця R з урахуванням положення ізолінії Iso. Відсоток значення середньостатистичного відхилення послідовних циклів RR по відношенню до тривалості циклів RR;
pmRR	%RR	Відсоток тривалості систоли шлуночків по відношенню до тривалості циклів RR;
pQRS	%RR	Відсоток тривалості систоли шлуночків по відношенню до тривалості циклів RR;
Rarea	V*ms	$Rarea = normR - Iso \cdot QRS$ Величина, що характеризує потужність систоли шлуночків.

У представлених даних параметри RR і HR взаємопов'язані. Очевидно, було також корисно оцінити вплив препаратів на тривалість систоли QRS шлуночків. Ми також звернули увагу на часове відхилення послідовних циклів RR «mRR» (аналогічно статистичній похибці середнього значення для RR). Оскільки при «рівному» стабільному ритмі параметр має мінімальне значення. Однак поява епізодів екстрасистолії, або блокад провідності, або нестабільності (слабкості) синусового вузла призводить до збільшення цього параметра.

Для записів був проведений попередній статистичний аналіз:

- Count - розмір вибірки;
- max - максимальне значення у вибірці;
- min - мінімальне значення у вибірці;
- MEAN - середнє значення;
- sigma - стандартне відхилення;
- S.E.M. - середня похибка;
- var% - коефіцієнт варіації;
- $M \pm m$;
- дельта - сервісний параметр;
- NORM - показник нормальності розподілу;
- Me - медіана;
- Q1 - 1-й кuartиль;
- Q3 - 3-й кuartиль.

2.10 Статистичний аналіз

Експериментальні дані були проаналізовані за допомогою програм «Statistica® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5), «SPSS 16.0» та «Microsoft Office Excel 2010». Перед проведенням статистичних тестів результати перевіряли на нормальність розподілу з використанням критеріїв Шапіро-Уїлка та Колмогорова-Смірнова.

Для даних з нормальним розподілом міжгрупові відмінності оцінювалися за

допомогою параметричного t-критерію Стюдента. Якщо розподіл даних не був нормальним, порівняльний аналіз проводився з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні. Для порівняння незалежних змінних у більш ніж двох групах використовували дисперсійний аналіз ANOVA для нормального розподілу та тест Крускала-Уолліса для ненормального розподілу.

Кореляційний аналіз застосовувався для визначення взаємозв'язків між параметрами, використовуючи коефіцієнти кореляції Пірсона або Спірмена в залежності від розподілу даних. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважалися відмінності при $p < 0,05$ (95% рівень значущості).

У кожному випадку проводили морфометричний аналіз структурних компонентів міокарда в 10 полях зору з використанням програмного забезпечення VideoTest Morphology, версія 5.2.0.158. Перед дослідженням проводили калібрування, яке відповідало робочому збільшенню мікроскопа, що використовувався для отримання гістологічних зображень. Наступним етапом було виділення масок об'єктів, що відрізнялися параметрами оптичної щільності. Далі автоматично вимірювали площі об'єктів, виключаючи внутрішні порожнини.

Проаналізовані параметри були представлені у вигляді таблиці та експортовані в Excel для подальшої графічної обробки. Статистичний аналіз отриманих даних також проводили за допомогою програмного пакету Statistica® for Windows 13.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA, ліцензія № JPZ804I382130ARCN10-J).

РОЗДІЛ 3

ХАРАКТЕРИСТИКИ БІОЕЛЕКТРИЧНОЇ АКТИВНОСТІ СЕРЦЯ ЩУРІВ ПІСЛЯ ПРЕНАТАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ ТА ЇЇ ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ

Багато хронічних, інвалідизуючих або смертельних патологічних станів у дорослих, зокрема захворювання ССС, часто мають своє походження в період перинатального та неонатального розвитку. Крім того, деякі захворювання, що виникають у неонатальному, немовлячому та старшому віці, можуть бути проявами затяжної патології ембріона та плоду [488]. Одним із найбільш важливих факторів, що впливають на розвиток таких захворювань, є фетальна гіпоксія, яка призводить до порушення автономної регуляції коронарних судин, погіршення енергетичного обміну — дефіциту АТФ, АДФ і креатинфосфату, дезорганізації циклу Кребса та активації анаеробного гліколізу. Це також викликає порушення ультраструктури мітохондрій як у кардіоміоцитах, так і в клітинах провідної системи серця [488,489].

Порушення метаболічних процесів, таких як метаболічний ацидоз, гіпоглікемія, окислювальний стрес та погіршення реологічних властивостей крові, відіграють вирішальну роль у патогенезі гіпоксичних ушкоджень ССС у новонароджених. Це сприяє зниженню скорочувальної функції міокарда та порушенню нормального функціонування синусового вузла [489]. У тканинах скорочувального міокарда та провідної системи можна виявити клітини з ознаками апоптозу та дистрофії, причому спостерігається певна залежність між тяжкістю морфологічних змін і порушеннями біоелектричного ритму та провідності [489,490].

Кінцевим результатом гіпоксичного ушкодження серця може стати вогнищева дистрофія, що в подальшому призводить до розвитку вогнищового кардіосклерозу при недостатньому лікуванні [490]. Були отримані дані, які вказують на важливу роль системи NO у ормуванні післягіпоксичної

кардіоміопатії. Так, у дітей, які зазнали ПГ, було виявлено дефіцит стабільних метаболітів NO в крові на фоні інгібіції ендотеліальної NO-синтази (eNOS) [23].

Представлений розділ присвячений аналізу особливостей біоелектричної активності серця у щурів двомісячного віку після пренатальної гіпоксії та оцінці ефективності фармакологічної корекції цих змін.

3.1 Характеристика параметрів автоматизму міокарда

Аналіз автоматизму за зовнішнім виглядом вихідних графічних записів ЕКГ проводили на основі наступних параметрів (табл. 3.1.1.) Частота серцевих скорочень у всіх групах тварин двомісячного віку була більше 250 уд/хв, що свідчить про домінування синусового ритму в обстежених щурів. При цьому в регуляції електричної активності серця інтактних тварин домінуючу роль відіграє дія симпатичного відділу НС ($A_{mo} = 42,553 \pm 3,68$) на тлі майже повної відсутності ознак парасимпатичної регуляції ($p_{NN50} = 0,425 \pm 0,425$) (рис. 3.1).

Перенесений ПГ призводить до зниження серцевого ритму та значної домінування парасимпатичної іннервації в регуляції електричної активності серця. Через відсутність графічних записів ЕКГ не можна виключити, що зниження серцевого ритму при патології може бути викликане блокадою синуса, що також може бути відображенням парасимпатичної регуляції серця замість симпатичної регуляції електричної активності в нормі.

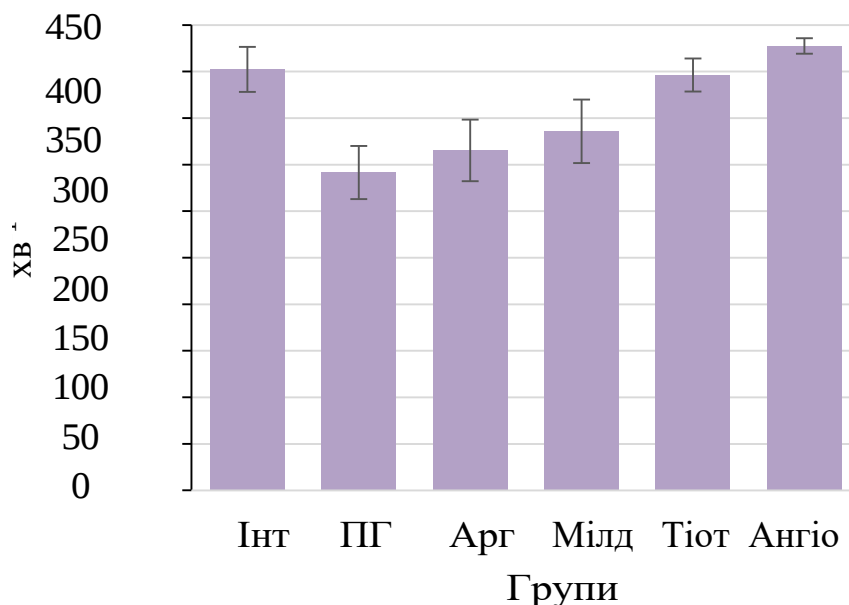


Рисунок А.

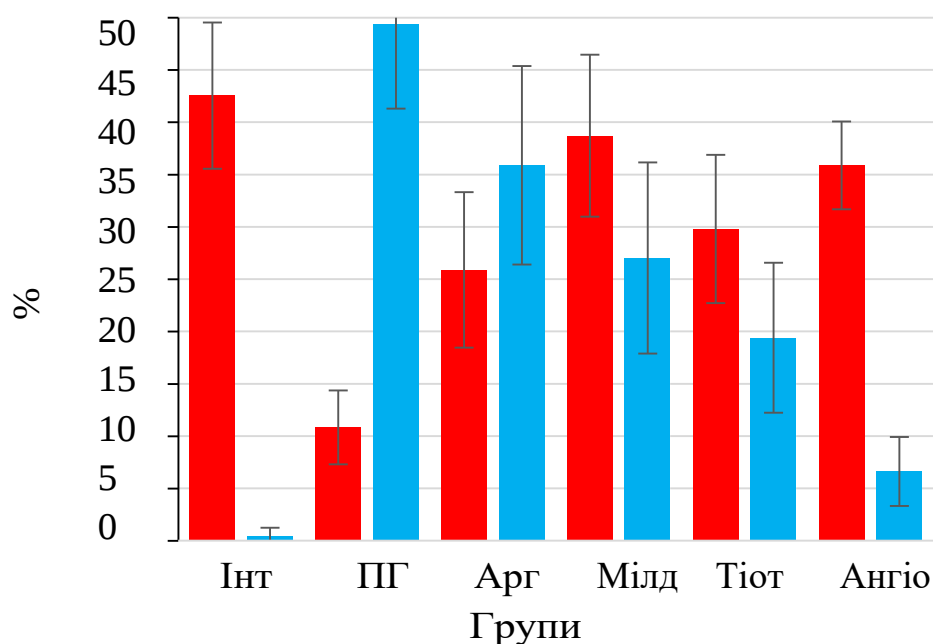


Рисунок Б

Рис. 3.1.1. Зміни параметрів автоматизму серця в експериментальній патології та їх фармакологічна корекція на 2 місяць життя: частота серцевих скорочень (■ HR, хв^{-1}) (а), яка була більшою за 250 уд/хв, що свідчить про домінування синусового ритму у досліджених щурів. Другий рисунок (б) – частка симпатичної (■ Амо, %) та парасимпатичної (■ pNN50, %) нервової регуляції серця. Показано середні значення та їх довірчі інтервали.

Примітка. Інтактна група – відносно здорові щурята, яким вводили фізіологічний розчин ($n = 10$); ПГ – контрольна група щурята після ПГ, яким вводили фізіологічний розчин протягом 30 днів ($n = 10$); Арг – щурята після ПГ, яким вводили L-аргінін у дозі 200 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів ($n = 10$); Мілд – щурята після ПГ, яким вводили мілдронат у дозі 100 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів ($n = 10$); Тіот – щурята після ПГ, яким вводили тіотриазолін у дозі 50 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів ($n = 10$); Ангіо – щурята після ПГ, яким вводили ангіолін у дозі 50 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів ($n = 10$).

Параметри автоматизму міокарда після пренатальної гіпоксії та курсового лікування (2-ий місяць життя), в кожній групі по $n = 10$.

Експериментальні групи	HR, min^{-1}	Амо, %	pNN50, %
Інтакт ($n = 10$)	452,365 ± 12,724	42,553 ± 3,68	0,425 ± 0,425
ПГ (контроль) ($n = 10$) P(2-1)	341,649 ± 15,01 2,71642E-07	10,826 ± 1,859 8,46191E-11	49,405 ± 4,262 5,50739E-14
ПГ + L-аргінін ($n = 10$) P(3-1) P(3-2)	365,374 ± 17,404 0,000118295 0,286948401	25,885 ± 3,913 0,002542564 0,001137	35,885 ± 4,993 5,81529E-09 0,036969604
ПГ + мілдронат ($n = 10$) P(4-1) P(4-2) P(4-3)	385,897 ± 17,935 0,002536642 0,065358247 0,433885002	38,723 ± 4,076 0,400424198 7,79898E-08 0,035733524	27,021 ± 4,808 7,29728E-07 0,000904463 0,225882523
ПГ + тіотриазолін ($n = 10$) P(5-1) P(5-2) P(5-3) P(5-4)	446,366 ± 9,335 0,704754111 1,28032E-07 0,00010663 0,002845163	29,8 ± 3,73 0,016828487 2,15454E-05 0,470797223 0,144898626	19,4 ± 3,773 7,43932E-06 1,08073E-06 0,009959525 0,184087745
ПГ + ангіолін ($n = 10$) P(6-1) P(6-2) P(6-3) P(6-4) P(6-5)	477,526 ± 4,38 0,066679777 3,78752E-11 7,25338E-08 7,98052E-06 0,003501716	35,882 ± 2,209 0,124276365 6,08384E-14 0,029065662 0,541964713 0,164459375	6,617 ± 1,735 0,000879916 1,50107E-12 7,6557E-07 0,000186665 0,002982466

Експериментальна терапія після ПГ продемонструвала різний ступінь впливу лікарських засобів на параметри електричної активності серця. Зокрема, лікування з використанням ангіоліну та тіазотичної кислоти у 2-місячному віці виявилось найбільш ефективним, оскільки ці препарати сприяли майже повній нормалізації серцевого ритму. У випадку застосування ангіоліну також було відновлено нейрогенну регуляцію автоматизму функції синусового вузла, що підтвердило високий терапевтичний ефект цих лікарських засобів у покращенні серцевої діяльності після ПГ.

Зміни серцевого ритму, які спостерігалися в ході експерименту, чітко відображались на показниках тривалості серцевого циклу (інтервал RR) та статистичному розподілі стабільності ритму (параметр mRR). Таким чином, у випадку патології серцевий ритм характеризувався найменшим значенням у групі спостережень і поєднувався з найдовшою тривалістю серцевого циклу RR і статистичним розподілом mRR. Зважаючи на різні показники тривалості циклу RR, ми вважали правильним виражати параметр mRR не в абсолютних величинах, а як відсоток відповідної тривалості серцевого циклу – параметр pmRR (табл. 3.1.2).

Аналіз параметра pmRR показує, що розвиток експериментальної патології призводить до 20-кратного збільшення статистичного розкиду інтервалу RR, що свідчить про порушення стабільності роботи синусового вузла. Швидше за все, цьому сприяло переважання парасимпатичної регуляції серцевого ритму при експериментальній патології, можливо навіть елементи синусової блокади, але без графічної реєстрації ЕКГ довести це неможливо. Отримані дані про статистичну стабільність серцевого ритму демонструють найвищу терапевтичну ефективність ангіоліну щодо відновлення електричної активності серця при експериментальній патології. Це підтверджується відповідними графічними даними, які наведені на рис. 3.1.2.

**Параметри серцевого циклу після пренатальної гіпоксії та
курсного лікування (2 місяці життя).**

Експериментальні групи	RR, ms	mRR, ms	pmRR, %RR
Інтакт (1)	138,485 ± 4,031	3,687 ± 0,796	2,653 ± 0,613
ПГ (контроль) (2)	253,432 ± 30,798	120,964 ± 25,01	42,738 ± 4,119
P(2-1)	0,000657788	3,50078E-05	6,24501E-12
ПГ + L-аргінін (3)	201,263 ± 22,792	64,646 ± 10,898	25,357 ± 2,738
P(3-1)	0,009141925	1,129E-06	9,57121E-11
P(3-2)	0,172169031	0,040473061	0,000789553
ПГ + мілдронат (4)	218,002 ± 18,396	51,017 ± 9,604	16,238 ± 2,394
P(4-1)	6,09904E-05	6,39447E-06	1,18586E-06
P(4-2)	0,341782567	0,012514139	6,00376E-07
P(4-3)	0,538069821	0,369520943	0,01393969
ПГ + тіотриазолін (5)	159,798 ± 6,926	27,974 ± 4,6	14,172 ± 1,965
P(5-1)	0,00949499	3,40084E-06	6,17845E-07
P(5-2)	0,004965243	0,000726762	6,11112E-08
P(5-3)	0,087272708	0,002887234	0,001330304
P(5-4)	0,00316411	0,02713264	0,506571563
ПГ + ангіолін (6)	132,273 ± 1,474	12,786 ± 2,085	9,372 ± 1,419
P(6-1)	0,153224278	0,000102154	3,65563E-05
P(6-2)	0,000346199	0,000109029	8,09883E-10
P(6-3)	0,004057375	2,23748E-05	1,92459E-06
P(6-4)	2,80236E-05	0,00029474	0,015841722
P(6-5)	0,000282697	0,003682098	0,050619784

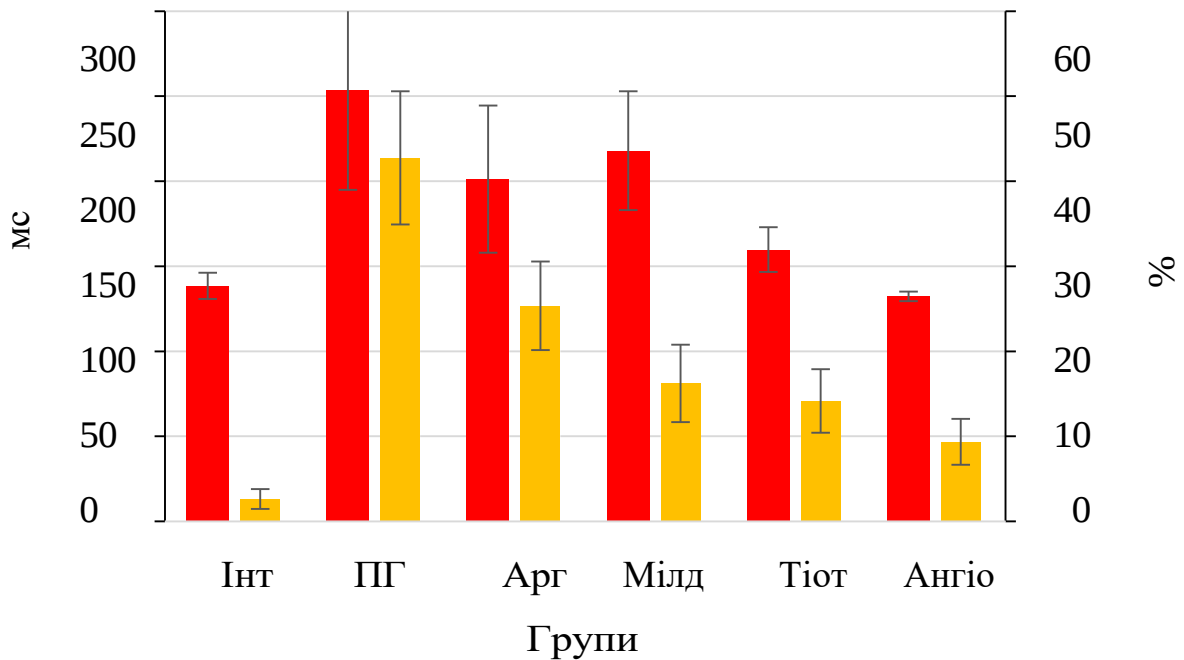


Рис. 3.1.2. Зміни параметрів автоматизму синусового вузла при пренатальній гіпоксії та їх фармакологічна корекція у віці двох місяців. Тривалість інтервалів RR, мс (■) представлена на основній шкалі, а відсоток середнього статистичного відхилення послідовних циклів RR pmRR, % (■) – на допоміжній шкалі (праворуч). Показано середні значення та їх довірчі інтервали.

Примітка. Інтактна група – відносно здорові щурята, яким вводили фізіологічний розчин (n = 10); ПГ – контрольна група щурята після ПГ, яким вводили фізіологічний розчин протягом 30 днів (n = 10); Арг – щурята після ПГ, яким вводили L-аргінін у дозі 200 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів (n = 10); Мілд – щурята після ПГ, яким вводили мілдронат у дозі 100 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів (n = 10); Тіот – щурята після ПГ, яким вводили тіотриазолін у дозі 50 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів (n = 10); Ангіо – щурята після ПГ, яким вводили ангіолін у дозі 50 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів (n = 10).

3.2 Характеристика параметрів збудливості міокарда

Можливі порушення збудливості міокарда при патології часто проявляються екстрасистолічною активністю, що є характерним для порушення нормального серцевого ритму. Однак для підтвердження наявності екстрасистолії необхідна графічна реєстрація, наприклад, за допомогою електрокардіографії (ЕКГ), яка дозволяє зафіксувати конкретні епізоди передчасних скорочень серця. Враховуючи це, можна припустити, що надзвичайно високий параметр $pmRR$ у тварин з експериментальною патологією може непрямо свідчити про наявність «екстрасистолічного вибуху» після епізодів синусової блокади, коли серце намагається відновити нормальний ритм після тимчасових порушень.

Ключовими критеріями для визначення порушень проведення збудження міокардом є параметри, що характеризують тривалість систоли шлуночків, зокрема інтервал QRS, а також потужність електричної реполяризації шлуночків, яку можна оцінити через площу під інтервалом ST (параметр $Sarea$). Ці параметри є важливими індикаторами для визначення ступеня порушень проведення збудження в міокарді, що дозволяє оцінити тяжкість патологічних змін у серцевому ритмі та збудливості (табл. 3.2.1).

Розвиток порушень біоелектричної активності серця після ПГ призвів до подовження електричної систоли шлуночків, що може бути спричинене порушенням проведення збудження в шлуночковому міокарді. За цих умов потужність електричної реполяризації шлуночків збільшилася в 5,5 разів, що свідчило про серйозні проблеми з відновленням мембранного потенціалу кардіоміоцитів шлуночків. Серед фармакологічних засобів, які вводили тваринам після ПГ, аргінін не продемонстрував терапевтичної ефективності, оскільки параметри провідності під час його застосування статистично не відрізнялися від аналогічних показників у контрольній групі тварин з патологією (рис. 3.2.1).

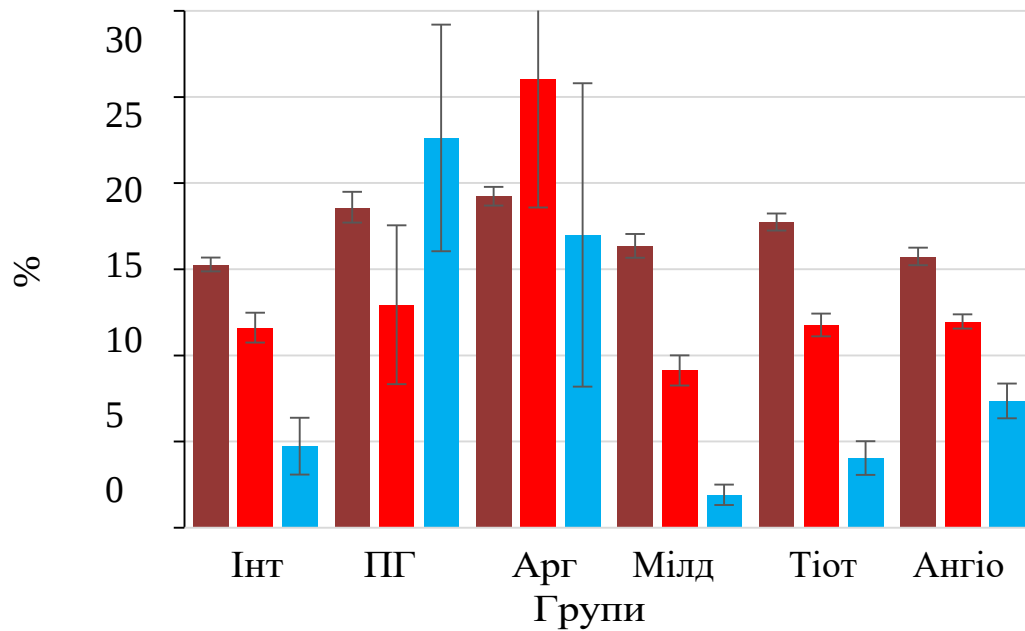


Рис. 3.2.1. Зміни параметрів проведення серцевого імпульсу при при пренатальній гіпоксії та її фармакологічній корекції у віці двох місяців: тривалість електричної систоли шлуночків (■ інтервал QRS, мс), відсоткове співвідношення електричної систоли шлуночків до тривалості серцевого циклу (■ pQRS, %), площа під хвилею деполяризації міокарда S (■ Sarea, мВ·мс). Показано середні значення та їх довірчі інтервали.

Примітка. Інтактна група – відносно здорові щурята, яким вводили фізіологічний розчин ($n = 10$); ПГ – контрольна група щурята після ПГ, яким вводили фізіологічний розчин протягом 30 днів ($n = 10$); Арг – щурята після ПГ, яким вводили L-аргінін у дозі 200 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів ($n = 10$); Мілд – щурята після ПГ, яким вводили мілдронат у дозі 100 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів ($n = 10$); Тіот – щурята після ПГ, яким вводили тіотриазолін у дозі 50 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів ($n = 10$); Ангіо – щурята після ПГ, яким вводили ангіолін у дозі 50 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів ($n = 10$).

**Параметри збудливості міокарда після пренатальної гіпоксії та
курсного лікування (2 місяці життя)**

Експериментальні групи	QRS, ms	pQRS, % RR	Sarea, mV·* ms
Інтакт (1)	15,263 ± 0,21	11,598 ± 0,455	4,722 ± 0,867
ПГ (контроль) (2)	18,584 ± 0,469	12,926 ± 2,425	22,606 ± 3,46
P(2-1)	3,46051E-08	0,593382255	9,81422E-06
ПГ + L-аргінін (3)	19,221 ± 0,285	26,034 ± 3,931	16,979 ± 4,632
P(3-1)	2,02676E-18	0,000647564	0,012186394
P(3-2)	0,294590287	0,005821539	0,289514294
ПГ + мілдронат (4)	16,34 ± 0,363	9,114 ± 0,46	1,9 ± 0,312
P(4-1)	0,007368916	0,000228865	0,004575077
P(4-2)	0,000525758	0,13019552	6,67186E-07
P(4-3)	3,78291E-08	8,95564E-05	0,002269736
ПГ + тіотриазолін (5)	17,726 ± 0,26	11,753 ± 0,347	4,034 ± 0,514
P(5-1)	7,95188E-11	0,787897723	0,497735058
P(5-2)	0,115304012	0,634582553	4,50753E-06
P(5-3)	0,000197918	0,000713036	0,007790156
P(5-4)	0,00485397	1,55854E-05	0,00115104
ПГ + ангіолін (6)	15,729 ± 0,267	11,957 ± 0,217	7,348 ± 0,529
P(6-1)	0,174366332	0,480402933	0,011651766
P(6-2)	1,70494E-06	0,692634198	8,9741E-05
P(6-3)	1,26251E-14	0,00081794	0,044262923
P(6-4)	0,178895493	4,71645E-07	2,47219E-14
P(6-5)	4,65807E-07	0,620234869	1,73411E-05

3.3 Характеристика параметрів контрактильності міокарда

Параметри, що характеризують контрактильність міокарда, включають амплітуду хвилі R, нормалізовану відносно ізолінії (яка відображає силу електричної систоли шлуночків) та площу під кривою QRS — параметр Rarea (який відображає потужність електричної систоли). Вираз для Rarea виглядає так: $R\ area = normR-Iso * QRS/2$. У результаті формування експериментальної патології спостерігалось зменшення амплітуди хвилі R, що свідчить про зниження сили електричної систоли шлуночків на 1%, у поєднанні з одночасним збільшенням її потужності (параметр Rarea) на 20%. Це може вказувати на певні зміни в енергетичному забезпеченні серця під час патологічного процесу. Ми припускаємо, що таке збільшення параметра Rarea при адекватному або підвищеному енергозабезпеченні міокарда може бути проявом адаптивної відповіді міокарда на підвищене навантаження, що дозволяє серцю ефективно компенсувати зміни в роботі. Однак, якщо енергозабезпечення міокарда зменшується, це може свідчити про несприятливий режим роботи серця, що вказує на можливу недостатність функціонування серцевого м'яза.

У випадку експериментальної патології таке значне збільшення потужності електричної систоли (параметр Rarea) може вказувати на високу енергоспоживаність міокарда під час систолічного навантаження, що також підтверджується результатами в табл. 3.3.1.

Що стосується фармакологічної корекції, то використання ангіоліну показало найкращий терапевтичний ефект для відновлення контрактильності міокарда. Ангіолін не лише нормалізував параметри електричної систоли, а й сприяв покращенню енергетичних процесів у міокарді, що відобразилося в покращенні якості систолічного навантаження. Водночас використання аргініну не продемонструвало такого ж ефекту, що вказує на відсутність істотного терапевтичного впливу цього препарату на контрактильність міокарда в умовах експериментальної патології (рис. 3.3).

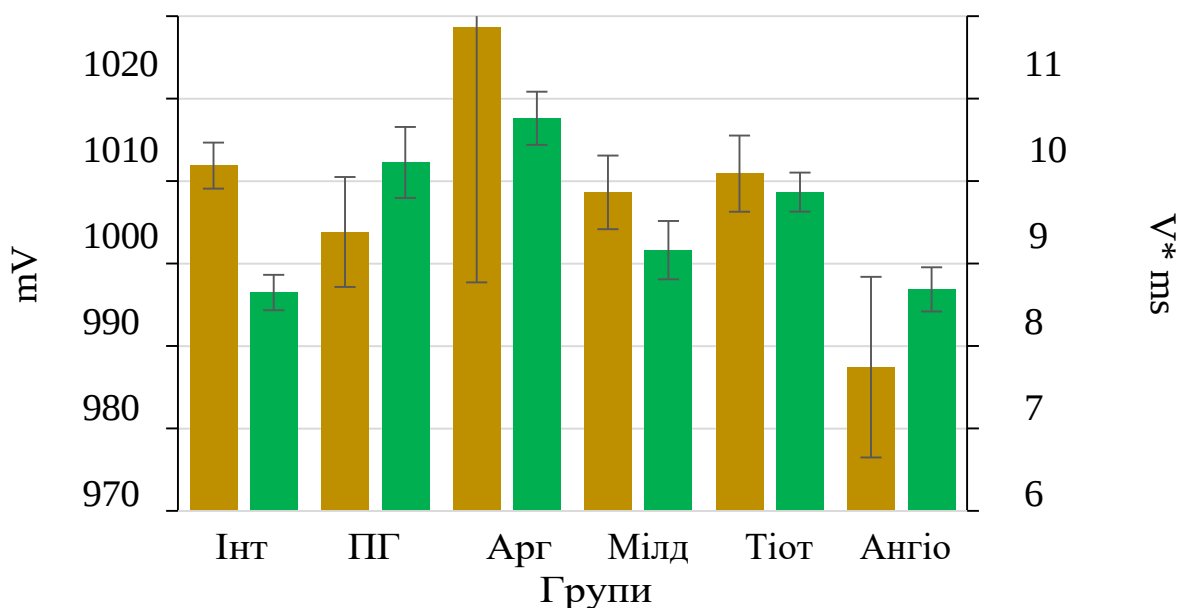


Рис. 3.3.1. Зміни параметрів контрактильності міокарда при пренатальній гіпоксії патології та її фармакологічна корекція у 2-місячному віці. Амплітуда тривалості нормалізованої хвилі R (mV) представлена на основній шкалі, а площа під хвилею R (Rarea, V*ms) – на додатковій шкалі (праворуч). Показано середні значення та їхні довірчі інтервали; ■ – норма R-Iso, ■ – Rarea.

Примітка. Інтактна група – відносно здорові щурята, яким вводили фізіологічний розчин (n = 10); ПГ – контрольна група щурята після ПГ, яким вводили фізіологічний розчин протягом 30 днів (n = 10); Арг – щурята після ПГ, яким вводили L-аргінін у дозі 200 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів (n = 10); Мілд – щурята після ПГ, яким вводили мілдронат у дозі 100 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів (n = 10); Тіот – щурята після ПГ, яким вводили тіотриазолін у дозі 50 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів (n = 10); Ангіо – щурята після ПГ, яким вводили ангіолін у дозі 50 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів (n = 10).

**Параметри контрактильності міокарда після пренатальної гіпоксії та
курсного лікування (2 місяці життя)**

Експериментальні групи	normR-Iso, mV	Rarea, V * ms
Інтакт (1)	1001,876 ± 1,47	7,65 ± 0,112
ПГ (контроль) (2) P(2-1)	993,819 ± 3,514 0,039314832	9,226 ± 0,226 6,15159E-08
ПГ + L-аргінін (3) P(3-1) P(3-2)	1018,617 ± 16,256 0,310248773 0,140916916	9,761 ± 0,169 1,53007E-16 0,06231457
ПГ + мілдронат (4) P(4-1) P(4-2) P(4-3)	998,638 ± 2,349 0,244768084 0,251504111 0,230394047	8,163 ± 0,185 0,020833929 0,00050824 8,09769E-09
ПГ + тіотриазолін (5) P(5-1) P(5-2) P(5-3) P(5-4)	1000,914 ± 2,429 0,7355655 0,101227388 0,286729867 0,505395399	8,866 ± 0,124 1,16678E-10 0,169311886 5,33509E-05 0,002333149
ПГ + ангіолін (6) P(6-1) P(6-2) P(6-3) P(6-4) P(6-5)	977,454 ± 5,762 0,000100776 0,017098624 0,020238737 0,00100339 0,000312717	7,688 ± 0,14 0,833632383 2,16729E-07 1,90332E-15 0,044418598 6,38326E-09

3.4 Функціональна ефективність ЕКГ міокарда (RANKS) після експериментальної терапії наслідків пренатальної гіпоксії

Для комплексної оцінки терапевтичного ефекту препаратів на параметри електричної активності серця при фармакологічній корекції експериментальної патології ми запропонували ранжувати виміряні параметри та провести парне порівняння в експериментальних групах за непараметричним ранговим критерієм U (Тест Вілкоксона–Манна–Уїтні). При цьому ефективність терапевтичного ефекту препаратів оцінювалася за одностороннім критерієм, тобто нас цікавила тільки максимальна апроксимація до нормальних параметрів (табл. 3.4.1, рис. 3.4.1).

Таблиця 3.4.1.

Функціональна ефективність ЕКГ міокарда (RANKS) після пренатальної гіпоксії та курсової медикації (2 місяці життя)

Експериментальні групи	HR	AMo	pNN50	RR	pmRR	QRS	Sarea	norm R-	Rarea	Ranks
Інтакт (1)	5,5	6	6	5,5	6	5,5	4,5	4,5	5,5	49,0
ПГ (контроль) (2)	1,5	1	1	2	1	2	1	2	1,5	13,0
ПГ + L-аргінін (3)	1,5	2,5	2,5	2	2	2	2	4,5	1,5	20,5
ПГ + мілдронат (4)	3	4,5	2,5	2	4	4	6	4,5	4	34,5
ПГ + тіотриазолін (5)	4	2,5	4	4	4	2	4,5	4,5	3	32,5
ПГ + ангіолін (6)	5,5	4,5	5	5,5	4	5,5	3	1	5,5	39,5

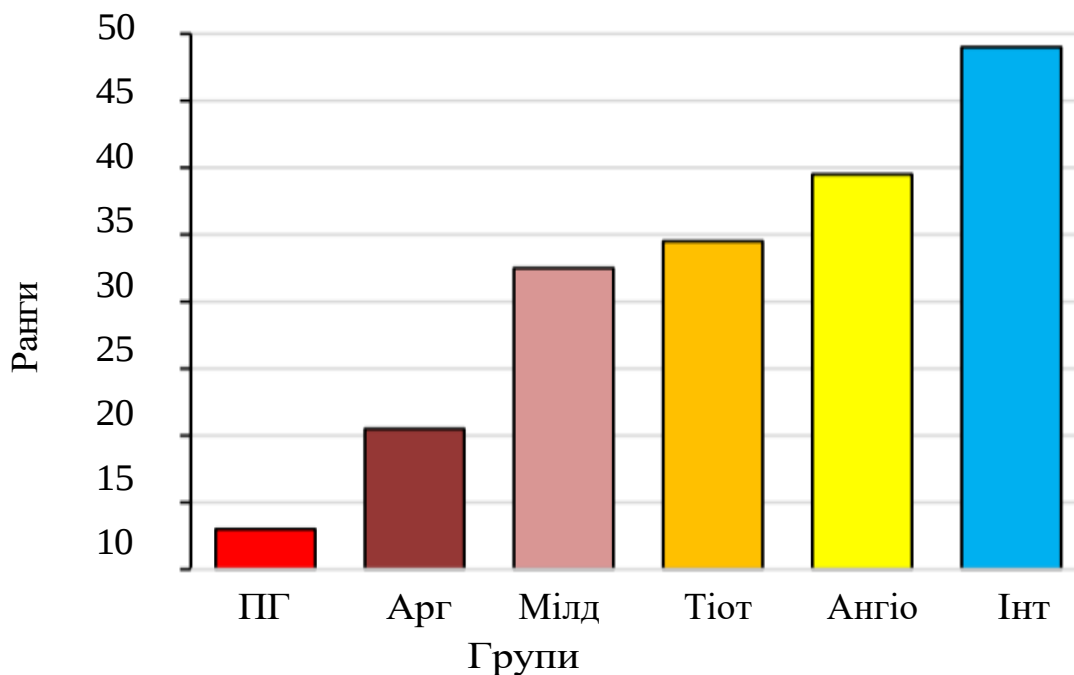


Рис. 3.4.1. Рангові показники функціональної ефективності ЕКГ при пренатальній гіпоксії та її фармакологічній корекції у віці двох місяців.

Примітка. Інтактна група – відносно здорові щурята, яким вводили фізіологічний розчин ($n = 10$); ПГ – контрольна група щурята після ПГ, яким вводили фізіологічний розчин протягом 30 днів ($n = 10$); Арг – щурята після ПГ, яким вводили L-аргінін у дозі 200 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів ($n = 10$); Мілд – щурята після ПГ, яким вводили мілдронат у дозі 100 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів ($n = 10$); Тіот – щурята після ПГ, яким вводили тіотриазолін у дозі 50 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів ($n = 10$); Ангіо – щурята після ПГ, яким вводили ангіолін у дозі 50 мг/кг, внутрішньочеревно протягом 30 днів ($n = 10$).

Отримані результати дозволили оцінити терапевтичну ефективність застосованих препаратів у порядку спадання: ангіолін > тіотриазолін > мілдронат. Незважаючи на те, що ангіолін виявився більш ефективним, ніж тіазотична кислота в нормалізації електричної активності серця при патології, в порівнянних парах ангіолін– тіотриазолін та тіотриазолін – мілдронат препарати мають приблизно однаковий (статистично незначний) терапевтичний ефект. Препарат аргінін не продемонстрував ефективності у ліквідації порушень електричної активності серця при експериментальній патології (табл. 3.4.2).

Таблиця 3.4.2.

**Порівняння ефективності препаратів у нормалізації ЕКГ після
пренатальної гіпоксії та курсу медикаментозного лікування
(2 місяці життя) (за непараметричним ранговим критерієм U)**

Експериментальні групи	Інтакт	ПГ (конт- роль)	ПГ + Ангіолін	ПГ + Аргінін	ПГ + Мілдронат
ПГ (контроль) (2)	<0,05				
ПГ + L-аргінін (3)	<0,05	>0,05	—	—	—
ПГ + мілдронат (4)	<0,05	<0,05	<0,05	—	—
ПГ + тіотриазолін (5)	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05	—
ПГ + ангіолін (6)	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05

Введення препаратів, що позитивно впливають на систему NO, продемонструвало позитивний ефект на біоелектричну активність серця щуренят після пренатальної гіпоксії. Зокрема, ці препарати сприяли відновленню нормальної функції серцевого ритму та покращенню скорочувальної здатності міокарда.

Виявлений первинний кардіопротекторний ефект ангіоліну при його призначенні після ПГ, з утриманням ефекту навіть після місячної відміни, можна пояснити його наступними властивостями. Ангіолін у умовах гострої ішемії міокарда збільшує експресію eNOS, підвищує NO, має властивість захоплювача NO, що продовжує його «тривалість життя» [491]. Нормалізація нітроксидергічної системи під дією ангіоліну може мати позитивний вплив не лише на функцію збудливості та скорочувальної здатності міокарда, бути основою ендотеліопротекторної дії, але й позитивно впливати на функцію мітохондрій міокарда. NO обмежує надмірне навантаження мітохондрій кальцієм (Ca^{2+}), нормалізує мітохондріальний потенціал ($\Delta\Psi\text{m}$) під час ішемії.

Дослідження показали, що ангіолін здатний, разом із вітаміном С,

утворювати L-карнітин та нормалізувати роботу мітохондрій, що сприяє поліпшенню енергетичного обміну в кардіоміоцитах [492]. Власні дослідження підтвердили, що ангіолін нормалізує амплітуди R-хвилі в шлуночках і амплітуду хвилі реполяризації T при ішемії міокарда. Це пов'язано з поліпшенням енергетичного забезпечення міокарда та більш ефективним використанням макроергій для підтримки скорочувальної функції серця.

Ангіолін збільшує експресію HSP70, що «продовжує» дію HIF-1 α , а також самостійно підтримує експресію NAD-MDH-mx, тим самим зберігаючи активність компенсаторного механізму виробництва АТФ – механізму шунтування малат-аспартат на тривалий час. Наші дослідження показали, що ангіолін може активувати механізм шунтування малат-аспартат в міокарді під час ішемії [493].

Тіазотична кислота проявляє властивості захоплювача цитотоксичних форм NO, має захисний ефект на транспортування NO завдяки позитивному впливу на баланс тіол-дисульфід та підвищенню рівня відновлених тіолів. Крім того, ми припускаємо, що тіазотична кислота сама по собі може бути переносником NO, утворюючи стабільні S-нітрозильні комплекси з ним [34]. Тіазотична кислота проявляє кардіопротекторний ефект, позитивно впливаючи на енергетичний обмін в ішемічному міокарді – збільшує рівень АТФ під час ішемії та гіпоксії завдяки нормалізації циклу Кребса, збільшує використання глюкози, вільних жирних кислот, активує перетворення лактату на піруват. Завдяки антиоксидантній дії тіазотична кислота підтримує порогову чутливість рецепторів, зберігає рідкість мембран і захищає фосфоліпіди від окиснення [445].

L-аргінін є субстратом для утворення NO в клітинах судинного ендотелію, фактором периферичної судинної дилатації. З нього утворюється NO, що знижує загальний периферичний судинний опір і артеріальний тиск, зменшує кисневу недостатність, особливо в тканинах серця [488]. Продукція NO тіазотичною кислотою збільшує проангіогенний VEGF-A та PGF у культурах людини, в той час як інгібування синтезу NO призводить до підвищення рівня SFLT-1 і гіпертензивних реакцій у вагітних щурів [494].

Мілдронат є інгібітором біосинтезу, транспорту та реабсорбції L-карнітину,

запобігає накопиченню токсичних ацилкарнітинів в ішемічних тканинах і сприяє зміні клітинного метаболізму на підвищене споживання глюкози, що є корисним за ішемічних умов. Мілдронат компенсаторно збільшує активність ацил-КоА синтетази та карнітинпалмітоїлтрансферази I в мітохондріях і підвищує окислення жирних кислот у пероксисомах. Лікування мілдронатом супроводжується компенсаторним збільшенням експресії в міокарді низки генів, які кодують ферменти метаболізму ліпідів – ліпопротеїнліпази, транспортерів жирних кислот, карнітинпалмітоїлтрансферази I та ферментів синтезу триацилгліцеролів [491,495]. Мілдронат здатен покращувати контрактильну здатність міокарда, активність гексокінази, а також співвідношення АТР/АДР/АМР завдяки активації АМР-активованої протеїнкінази, що відновлює рівень АТФ [489]. Мілдронат може збільшувати продукцію NO в ішемічному міокарді та головному мозку, змінюючи запаси естерів γ -бутиробетаїну [491]. Введення мілдронату інгібує гідроксилювання ГББ і збільшує внутрішньоклітинні запаси γ -бутиробетаїну, який проявляє холіноміметичні властивості під час етерифікації. Естери γ -бутиробетаїну через рецептори ацетилхоліну на клітинах ендотелію можуть активувати eNOS. Однак у ряді досліджень ефект мілдронату на продукцію NO не був підтверджений [495].

L-аргінін, попередник синтезу NO, проявляє кардіопротекторні, антиішемічні, ендотеліальні захисні властивості, що асоціюються з підвищенням рівня NO. Існують дані про деякий ефект L-аргініну при ПГ. Незначний ефект L-аргініну на біоелектричну активність серця, виявлений нами, може бути пояснений тим, що частина утвореного NO може втрачати свої властивості під дією АФК. Крім того, ймовірно, що для підтримання активності міокарда після ПГ також необхідні їх властивості, зокрема антиоксидантні, енергетичні модулятори тощо.

Резюме

ПГ супроводжується подовженням систоли та зростанням потужності реполяризації (Sarea), що свідчить про порушення мембранного потенціалу кардіоміоцитів і підвищену енергозатратність.

Встановлено зниження амплітуди хвилі R при одночасному зростанні її потужності (Rarea), що вказує на компенсаторне підвищення енергоспоживання міокарда при ПГ.

Найефективнішим засобом корекції патологічних змін виявився ангіолін, який повністю або частково нормалізував усі ключові параметри електричної активності серця. Ефективність інших препаратів розташовується в такій послідовності: ангіолін > тіотриазолін > мілдронат > аргінін.

Матеріали даного розділу відображені в наступних публікаціях:

1. Popazova O.O., Belenichev I.F., Abramov A.V., Bukhtiyarova N.V., Cheresniuk I.L., Skoryna D.Yu. Indicators of bioelectrical activity of the rat heart after prenatal hypoxia and pharmacological correction. Innov Biosyst Bioeng, 2023, 6 (3-4):148–160 <http://dx.doi.org/10.20535/ibb.2022.6.3-4.268504>. Scopus Q3. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, експериментальні дослідження, обговорення результатів та підготовку тексту статті до друку).*

2. Popazova O. O. ECG changes in rats after prenatal hypoxia and course treatment with modulators of NO. Друк. Збірник тез доповідей 83 науково-практичної конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2023» (Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, 25-26 травня 2023 р.). – Запоріжжя: ЗДМУ, 2023.

РОЗДІЛ 4

ДІЯ РІЗНИХ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ЗАСОБІВ НА СИСТЕМУ ОКСИДУ АЗОТУ У ЩУРІВ ПІСЛЯ ПРЕНАТАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ

Даний розділ присвячений дослідженню впливу фармакологічних препаратів із кардіопротекторними властивостями на продукцію та біодоступність оксиду азоту (NO), а також на біомаркери окисного стресу, фактично та гіпоксії в серці щурів у ранньому постнатальному періоді після перенесеної внутрішньоутробної гіпоксії.

У цьому розділі розглядаються стійкі порушення нітроксидергічної системи серця, які виникають після пренатальної гіпоксії, зокрема зниження експресії eNOS, підвищення iNOS, зниження біодоступності NO та активація нітрозативного стресу. Аналізуються зміни рівнів спеціальних біомаркерів (ST2, HSP70, HIF-1), що відображають процеси ремоделювання міокарда, окисного стресу та адаптації до гіпоксії.

Особливо увага приділяється оцінці ефективності різних фармакологічних засобів (ангіолін, тіотриазолін, L-аргінін, мілдронат) у відновленні функцій нітроксидергічної системи, зниженні окисного стресу та підвищенні кардіопротекторних властивостей серця після гіпоксичного ушкодження. Порівнюються їхні терапевтичні ефекти як після курсу лікування, так і через місяць після його завершення.

4.1 Кардіопротекторний вплив фармакологічних препаратів на продукцію та біодоступність оксиду азоту в постнатальному періоді після внутрішньоутробної гіпоксії у щурів

Стійкі порушення нітроксидергичної системи серця після експериментальної ПГ полягають у пригніченні експресії eNOS з одночасним підвищенням експресії її iNOS, зниженні NO та активації нітрозативного стресу, що підтверджується збільшенням рівня нітротирозину (рис. 4.1.1). Виявлені порушення відповідають сучасним уявленням про механізми ушкодження міокарда під час ішемії та гіпоксії, які були встановлені за допомогою експериментальних досліджень та клінічних спостережень [144]. Відомо, що ПГ знижує кардіальну толерантність до ішемії/реперфузії, пошкоджує механізми васодилатації/васозвуження, залежні від ендотелію, і сприяє розвитку серцево-судинних патологій, таких як гіпертонія, атеросклероз та серцева недостатність [145]. Є дані, що після внутрішньоутробної гіпоксії спостерігається зниження експресії та активності eNOS у кардіоміоцитах та ендотелії, що може призвести до ризику ендотеліальної дисфункції. Порушення активності eNOS можна пояснити змінами в взаємодії eNOS з її регуляторними партнерами, такими як кавеолін-1, кальмодулін та Hsp90. Зміни в фосфорилюванні та дефосфорилюванні ключових серинових та треонінових залишків в eNOS також можуть бути причиною порушення її активності [1,146].

У ході дослідження проаналізовано рівень летальності щурів після перенесеної пренатальної гіпоксії за умов застосування різних фармакологічних засобів. Встановлено, що в інтактній групі, яка не піддавалася гіпоксії, летальність становила 5%, тоді як у контрольній гіпоксичній групі без лікування — 68%, що підтверджує тяжкість наслідків внутрішньоутробної гіпоксії. Застосування препаратів виявило виражений протекторний ефект: найнижчу летальність відзначено у групах ангіоліну — 30% та тіотриазоліну — 32%. У тварин, що отримували мілдронат і L-аргінін, летальність становила відповідно 50 і 56%, що свідчить про помірний захисний ефект цих препаратів.

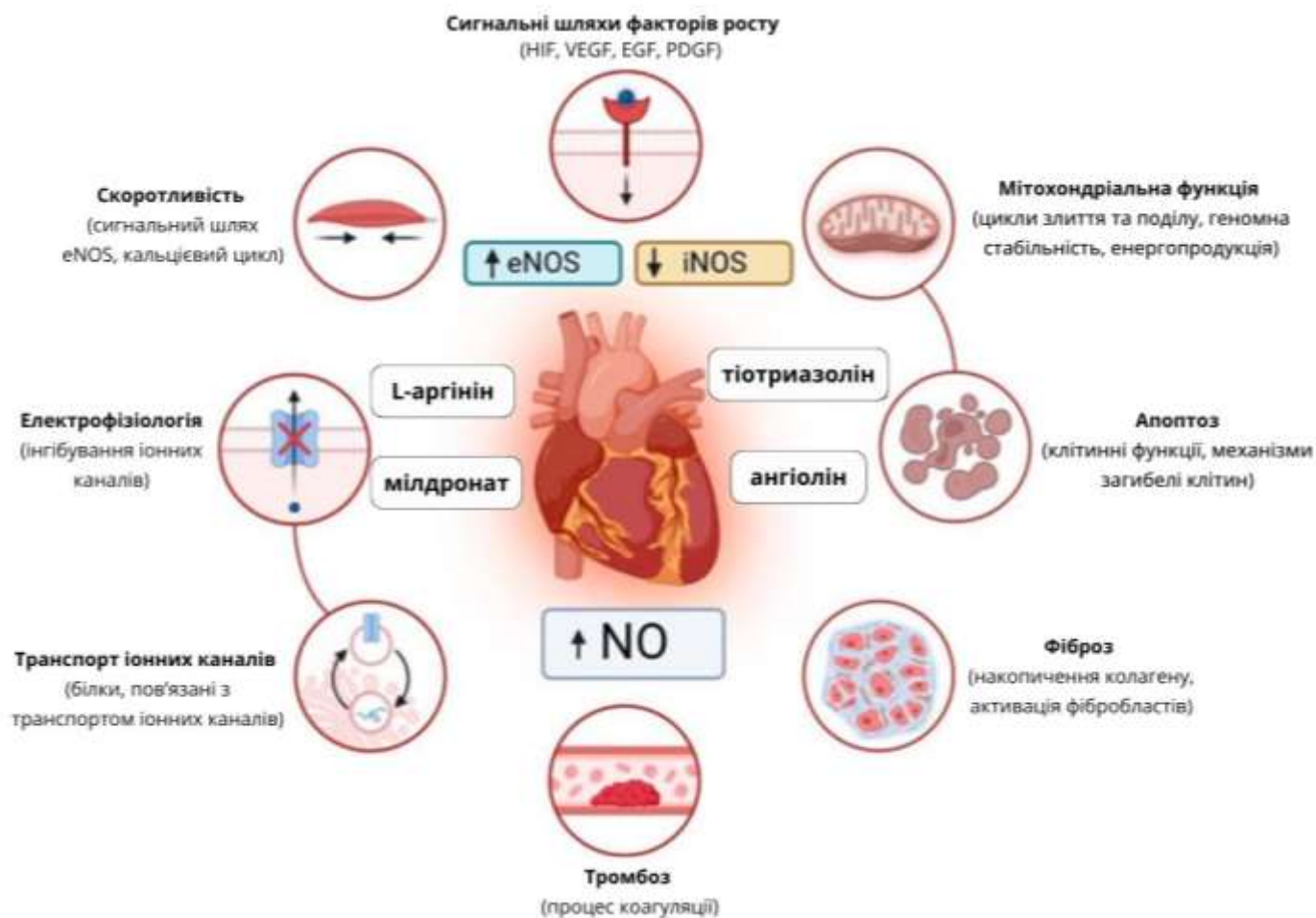


Рис. 4.1.1. Показники серцево-судинної системи в крові та серці щурів, які зазнали пренатальної гіпоксії та подальшої фармакологічної модуляції. Рисунок створено авторкою за допомогою BioRender.

Моделювання ПГ призводить до стійких порушень нітросидергічної системи серця у нащадків у 1 і 2 місяці життя. Так, у серцях 1-місячних щурів після ПГ було виявлено зменшення eNOS на 55% порівняно зі здоровими тваринами тієї ж вікової групи. Крім того, тварини цієї групи показали подвійне збільшення iNOS порівняно з здоровими тваринами (табл. 4.1.1). Ми також виявили підвищення мРНК-експресії iNOS у серцях 1-місячних щурів після ПГ в 7,2 рази і 85%-ве зменшення мРНК eNOS порівняно з групою здорових 1-місячних тварин (табл. 4.1.2). У серцях 1-місячних тварин після ПГ було зафіксовано значне зменшення метаболітів NO на 49,2% порівняно з групою 1-місячних щурів,

народжених від матерів з нормальними вагітностями. Це зменшення свідчить про зниження продукції NO eNOS, при цьому NO, який утворюється через активацію експресії iNOS, перетворюється на пероксинітрит. Окисне перетворення NO підтверджується 4,5-кратним збільшенням концентрації нітротирозину порівняно з групою здорових щурів (табл. 4.1.1). Ці результати свідчать про значні порушення в системі NO міокарда щурів після ПГ, включаючи зміни в патернах експресії NOS, зниження біодоступності NO та активацію нітрозативного стресу.

Таблиця 4.1.1.

**Вплив лікування на показники нітросидергічної системи в
цитозольній фракції гомогенатів 1-місячних щурів після пренатальної
гіпоксії та лікування.**

Експериментальні групи (n = 10)	eNOS, пг/мл	iNOS, пг/мл	Нітротирозин, пг/мл	Метаболіти NO (NOx), мкмоль/л
Інтактна група	22,4 ± 1,77	13,1 ± 1,36	12,1 ± 1,10	6,3 ± 0,54
ПГ (контроль)	10,1 ± 1,44 ¹	26,7 ± 2,55 ¹	54,2 ± 4,12 ¹	3,2 ± 0,43 ¹
ПГ + L-аргінін	18,4 ± 1,45 [*]	24,1 ± 4,55 ^{1,*}	44,5 ± 3,41 ^{1,*}	4,6 ± 0,53 [*]
ПГ + тіотриазолін	15,2 ± 1,75 ^{1,*}	20,7 ± 2,55 ^{1,*}	35,3 ± 2,61 ^{1,*}	5,2 ± 0,35 [*]
ПГ + ангіолін	29,2 ± 2,76 ^{1,*}	17,7 ± 1,35 ^{1,*}	22,3 ± 1,42 ^{1,*}	5,8 ± 0,54 [*]
ПГ + мілдронат	12,4 ± 2,45 ¹	28,8 ± 2,44 ¹	52,7 ± 4,34 ¹	3,7 ± 0,47

Примітка. * — достовірність між контрольною групою (p<0,05);

¹ — достовірність між інтактною групою (p<0,05).

Вплив лікування на експресію мРНК eNOS та iNOS у міокардіальних тканинах 1-місячних щурів після пренатальної гіпоксії.

Експериментальні групи (n = 10)	mRNA eNOS, од.в.	mRNA iNOS, од.в
Інтактна група	1,000 ± 0,0032	1,000 ± 0,011
ПГ (контроль)	0,15 ± 0,00019 ¹	7,22 ± 0,0313 ¹
ПГ + L-аргінін	0,790 ± 0,00011 ^{1,*}	4,82 ± 0,0045 ^{1,*}
ПГ + тіотриазолін	2,295 ± 0,0093 ^{1,*}	3,88 ± 0,0017 ^{1,*}
ПГ + ангіолін	4,876 ± 0,0214 ^{1,*}	1,89 ± 0,016 ^{1,*}
ПГ + мілдронат	0,164 ± 0,0017 ¹	8,11 ± 0,0061 ^{1,*}

Примітка. * — достовірність між контрольною групою (p<0,05);

¹ — достовірність між інтактною групою (p<0,05).

Подібні зміни в нітроксидергичній системі серця зберігалися й через 2 місяці після ПГ (табл. 4.1.3 та 4.1.4). Так, у серці 2-місячних щурів після ПГ було зареєстровано зниження eNOS на 54,8% та мРНК eNOS на 77% порівняно з групою здорових 2-місячних щурів. Також були зафіксовані вищі значення iNOS, у 2 рази, та мРНК iNOS, у 6,9 рази, порівняно з групою здорових тварин. У 2-місячних щурів спостерігався дефіцит стабільних метаболітів NO в міокарді з суттєвим зниженням на 38,8% порівняно з інтактними значеннями. Концентрація нітротирозину в серці 2-місячних щурів після ПГ залишалася високою і перевищувала значення здорових 2-місячних щурів у 3,4 рази.

Протягом 30 днів після народження, під час проведення терапії фармакологічними препаратами з властивостями модулювати рівень оксиду азоту (NO) у щурів після ПГ, спостерігали зміни в індексах кардіального нітроксидергичного системи (табл. 4.1.1-4.1.4). Так, одразу після припинення експериментальної терапії, найкращі результати були в групі, що отримувала

ангіолін. Введення ангіоліну призводить до збільшення рівня ендотеліальної NO-синтази (eNOS) у 2,9 рази, а мРНК eNOS — у 32 рази, з одночасним зниженням рівня індукційної NO-синтази (iNOS) на 50,4% та мРНК iNOS — у 3,8 рази у серці щурів у віці 1 місяця після ПГ порівняно з контрольними щурами того ж віку без лікування. Застосування ангіоліну призвело до значного зменшення рівня нітротирозину в міокарді щурів на 60% після пренатальної гіпоксії. Крім того, спостерігалось суттєве збільшення стабільних метаболітів NO на 81,2%. Це спостереження свідчить про те, що ангіолін ефективно підвищує як вироблення, так і біодоступність NO.

Таблиця 4.1.3.

**Вплив лікування на показники нітросидергічної системи в
цитозольній фракції гомогенатів 2-місячних щурів після пренатальної
гіпоксії та лікування.**

Експериментальні групи (n = 10)	eNOS, пг/мл	iNOS, пг/мл	Нітротирозин, пг/мл	Метаболіти NO (NOx), мкмоль/л
Інтактна група	31,2 ± 2,65	16,1 ± 1,42	14,1 ± 1,31	7,2 ± 0,67
ПГ (контроль)	14,1 ± 1,54 ¹	33,7 ± 3,74 ¹	48,3 ± 3,88 ¹	4,4 ± 0,35 ¹
ПГ + L-аргінін	26,2 ± 2,22 ^{1,*}	29,1 ± 2,32 ¹	40,2 ± 2,67 ^{1,*}	5,8 ± 0,44 [*]
ПГ + тіотриазолін	21,2 ± 1,8 ^{1,*}	19,7 ± 2,23 [*]	28,1 ± 1,44 ^{1,*}	6,5 ± 0,57 [*]
ПГ + ангіолін	40,2 ± 3,65 ^{1,*}	16,7 ± 1,47 [*]	18,0 ± 2,05 [*]	6,9 ± 0,72 [*]
ПГ + мілдронат	18,4 ± 2,22 ¹	27,8 ± 4,77 ¹	40,3 ± 3,32 ^{1,*}	4,8 ± 0,53

Примітка. * — достовірність між контрольною групою (p<0,05);

¹ — достовірність між інтактною групою (p<0,05).

Вплив лікування на експресію мРНК eNOS та iNOS у міокардіальних тканинах 2-місячних щурів після пренатальної гіпоксії.

Експериментальні групи (n = 10)	mRNA eNOS, од.в..	mRNA iNOS, од.в
Інтактна група	1,000 ± 0,0078	1,000 ± 0,0076
ПГ (контроль)	0,23 ± 0,0002 ¹	6,89 ± 0,0093 ¹
ПГ + L-аргінін	0,718 ± 0,0002 ^{1,*}	3,90 ± 0,0022 ^{1,*}
ПГ + тіотриазолін	2,770 ± 0,0113 ^{1,*}	3,011 ± 0,0021 ^{1,*}
ПГ + ангіолін	5,410 ± 0,037 ^{1,*}	1,272 ± 0,0081 ^{1,*}
ПГ + мілдронат	0,27 ± 0,0082 ¹	6,7103 ± 0,009 ¹

Примітка. * — достовірність між контрольною групою (p<0,05);

¹ — достовірність між інтактною групою (p<0,05).

Введення тіотриазоліну також мало позитивний вплив на стан нітродоксидергічної системи серця щурів у віці 1 місяць після ПГ. У цій групі, одразу після завершення курсу тіотриазоліну, було зафіксовано збільшення рівня eNOS на 50%, мРНК eNOS — у 15 разів, стабільних метаболітів NO — на 62,5%, а також зниження рівня iNOS на 22,5%, мРНК iNOS — на 73,8% та нітротирозину — на 35%, порівняно з контрольними щурами. Можна зробити висновок, що тіотриазолін, так само як і його структурний аналог ангіолін, здатен підвищувати вироблення NO та його біодоступність.

Ефекти аргініна на індекси нітродоксидергічної системи серця щурів після ПГ виявилися порівняними з результатами групи, яка отримувала тіотриазолін. Одразу після курсу введення мілдронату у щурів після ПГ не було виявлено суттєвих змін у концентрації нітротирозину та експресії мРНК eNOS, а експресія мРНК iNOS у серці цієї групи була значно вищою, ніж у контрольній групі.

Дослідження серця у 2-місячних тварин після ПГ показали стійкий

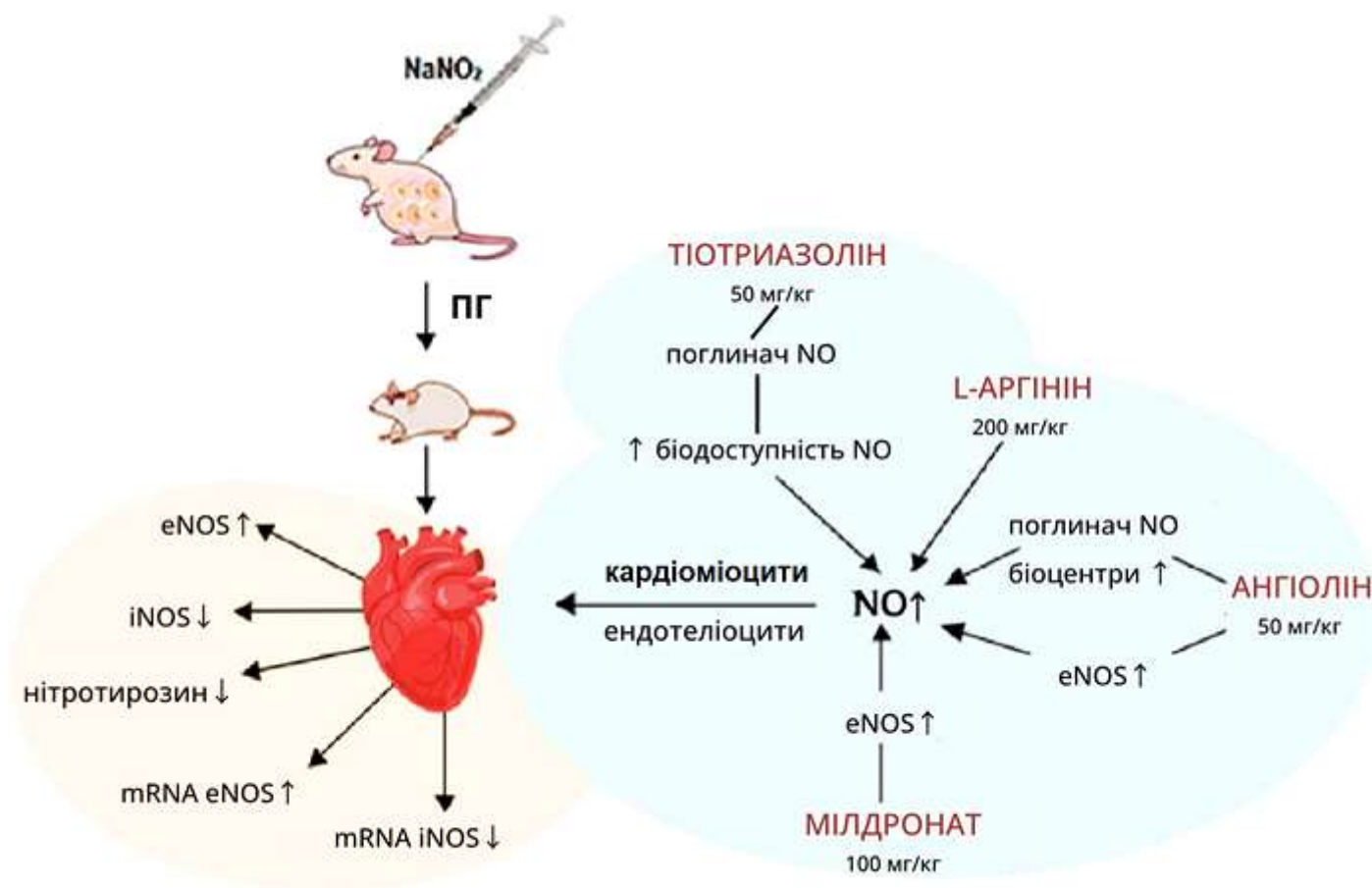
терапевтичний ефект після використання модулюючих NO препаратів. Так, як і в попередньому спостереженні, застосування ангіоліну залишалося найбільш ефективним. У серці 2-місячних щурів через місяць після 30-денного курсу ангіоліну рівні eNOS і мРНК eNOS перевищували контрольні значення у 2,85 та 23 рази відповідно, рівень iNOS знизився на 50%, а мРНК iNOS — на 81,5% порівняно з контролем. Введення ангіоліну призвело до збільшення рівня стабільних метаболітів NO на 56,8%. Рівень нітротирозину в серці цієї групи не відрізнявся від рівня в здорових 2-місячних щурів.

Аргінін і, особливо, тіотриазолін також продемонстрували стійкий ефект стосовно нормалізації нітроксидергичної системи серця після ПГ. Через місяць після курсу введення тіотриазоліну були зафіксовані більш високі значення порівняно з контролем (eNOS — на 50%, мРНК eNOS — у 12 разів), а також нижчі значення (iNOS — на 41,5%, мРНК iNOS — на 56%). У цій групі концентрація стабільних метаболітів NO в серці була на 47,7% вищою, а рівень нітротирозину в серці був нижчим на 41,7%, ніж у контрольній групі. Через місяць після курсу введення мілдронату показники нітроксидергичної системи не відрізнялися від контрольних значень. Єдина відмінність полягала у зниженні рівня нітротирозину в серці 2-місячних щурів після ПГ.

Таким чином, ми встановили позитивний вплив ангіоліну, тіотриазоліну та аргініну на індекси нітроксидергичної системи серця щурів після ПГ, як безпосередньо після 30-денної експериментальної терапії, так і через місяць після її припинення (рис. 4.1.2).

Порушення ендотеліально-залежної вазодилатації в коронарних артеріях у самців і самок, які перенесли ПГ в 4 і 9,5 місяців, на фоні зниження eNOS та порушення функції каналів SKCa (калієвий канал малого провідності, активований кальцієм) та IKC (калієвий канал середнього провідності, активований кальцієм), були виявлені в ряді досліджень [26]. Низькі рівні eNOS призводять до порушення NO-залежної регуляції синтезу глутатіону та зниженої стійкості до окислювального стресу [147]. Зниження eNOS може бути пов'язане з дефіцитом HIF-1 α , оскільки цей фактор активує експресію eNOS через

фосфорилування серинового залишку [148]. Підвищення експресії iNOS виявляється при зниженні eNOS після ПГ, що спрямоване на компенсацію вироблення NO [149]. Висока активність iNOS може бути пов'язана з дефіцитом кофакторів та виділенням супероксиду та інших реактивних форм NO [150].



Ангіолін > тіотриазолін > L-аргінін > мілдронат

Рис. 4.1.2. Показники серцево-судинної системи в крові та серці щурів, які зазнали пренатальної гіпоксії та подальшої фармакологічної модуляції системи NO. Рисунок створено авторкою.

Водночас, при умовах зниженого антиоксидантного захисту, це може призвести до утворення цитотоксичних похідних NO в «паразитичних» реакціях. Інші дослідження показали, що при прееклампсії низька активність ендотеліального синтезу NO та редокс-залежна трансформація NO в

пероксинітрит призводять до зниження рівня NO в крові [127]. Подібні реакції можуть відбуватися за умов дефіциту L-аргініну, антиоксидантів, дисфункції мітохондрій та підвищеної експресії iNOS. Неконтрольоване утворення цитотоксичних похідних NO веде до нітрозилування найбільш активних частин білкових структур іонних каналів, рецепторів, трансмембранних пор та молекул сигналіngu, тобто до розвитку нітрозативного стресу.

Менш значним наслідком міокардіальної ішемії є втрата таких ефектів, опосередкованих NO, як пригнічення проліферації клітин і агрегації тромбоцитів, а також, найголовніше, інгібування активації моноцитів через молекули адгезії [151]. Нітрозативний стрес також призводить до дефіциту HSP70 в клітині, разом із позбавленням глутатіонового ланцюга системи тіол-дисульфід. Цитотоксичні форми NO не лише модифікують (зворотну й незворотну) макромолекули, зокрема сам HSP70, але й знижують активність генів, що кодують синтез цього білка [152,334]. Було показано, що похідні NO відіграють роль у пригніченні генної активності та зменшенні рівнів різних транскрипційних факторів. Ймовірно, надмірні форми оксиду азоту, такі як пероксинітрит та іони нітрозонію, спочатку нітрозилують редокс-залежні ділянки цих генів, а потім, при збільшенні концентрації, окислюють їх [154,155].

Це виправдовує використання фармакологічних агентів — модуляторів системи NO — для захисту міокарда після ПГ. L-аргінін є звичайним субстратом для NO та поліамінів (путресцину, сперміну та спермідина). NO та поліаміни відіграють важливу роль у репродукції, ембріогенезі, зниженні неонатальної смертності та ембріональній ангіогенезі. NO регулює експресію генів, синтез білків, проліферацію, ріст та диференціацію плода [474]. Тому увага дослідників та клініцистів звернена на використання субстрату NO, L-аргініну, для зменшення негативних ефектів ПГ [475].

Проте субстрат NO поступався олекулам — тіотриазоліну та ангіоліну. Можливо, в умовах ішемії NO, утворений з аргініна за дефіциту тіолових антиоксидантів, взаємодіє з АФК і перетворюється на пероксинітрит [476]. У зв'язку з цим фармакологічні агенти, які поєднують властивості позитивних

модуляторів NO та його транспортерів, є перспективними.

Тіотриазолін здатний збільшувати біодоступність NO при надлишку АФК. Тіотриазолін є антиоксидантом і поглиначем АФК, і NO підвищує активність глутатіон-залежних ферментів та рівень відновленого глутатіону під час ішемії міокарда. Тіотриазолін (10^{-5} – 10^{-7} М) *in vitro* знижував рівні супероксидних радикалів та пероксинітриту завдяки наявності тіольної групи в його структурі. Тіотриазолін запобігає необоротній інактивації транскрипційного фактору NF- κ B, захищаючи чутливі цистеїнові залишки — Cys 252, Cys 154 і Cys 61 у його ДНК-зв'язувальних доменах — від надлишку АФК. Тіотриазолін може брати участь у відновленні цих груп у разі оборотної інактивації, виконуючи роль Redox Faktor-1. Тіотриазолін посилює активацію експресії редокс-чутливих генів, які є необхідними для клітинного захисту від окислювального стресу. Тіотриазолін знижує інтенсивність нітрозативного стресу та підвищує активність eNOS [460,461].

Тіотриазолін збільшує ефективність аргініна при спільному застосуванні. Фармакологічний ефект комбінації зумовлений позитивним впливом на синтез, транспортування та біодоступність NO, а також фізіологічні функції цього молекулярного посланця [463]. У щурів, у яких було змодельовано інфаркт міокарда ізадрином-пітюїтрином, тіотриазолін стимулював ЛДГ (лактатдегідрогеназа) у напрямку утворення пірувату з лактату, що усувало молочнокислий ацидоз та нормалізувало внутрішньоклітинний рН, а також стимулювало цикл Кребса, збільшуючи рівень пірувату [464]. У тому ж експериментальному режимі тіотриазолін активував малат-аспартатний канал у міокарді в гострий період інфаркту міокарда. Введення тіотриазоліну (600 мг/добу) пацієнтам із стабільною стенокардією II–III класу зменшила кількість тижневих нападів стенокардії на 46,32%, а в контрольній групі — на 33,24% ($p = 0,028$), а також покращила толерантність до фізичних навантажень [466].

Експериментальні дослідження встановили, що ангіолін збільшує експресію mPHK eNOS та активність eNOS у ішемічному міокарді щурів. Ангіолін збільшує експресію VEGF та коефіцієнт зв'язування VEGF з ендотелієм судин, а також

щільність ендотеліоцитів і проліферуючих ендотеліоцитів капілярної мережі та судинної стінки, підвищує концентрацію РНК в ендотеліоцитах під час гіпоксії та циркуляторної ішемії [453]. Ангіолін має захисний ефект на NO і також збільшує його біодоступність; NO є нестабільним радикалом з коротким періодом існування, і для подовження його «життя» передбачається утворення більш стабільних S-нітрозольних комплексів з низькомолекулярними сполуками (глутатіон, цистеїн), а при дефіциті цих сполук біодоступність NO різко зменшується.

При дефіциті низькомолекулярних тіолів NO під впливом АФК перетворюється на пероксинітрит і може бути причиною ініціації нітрозативного стресу. Завдяки своїй хімічній структурі ангіолін виступає як спін-ловушка та може утворювати комплекс з NO [451]. Ангіолін позитивно впливає на стан нітроксидергичної системи міокарда при експериментальній ішемії — збільшує синтез NO, підвищує біодоступність NO та зменшує паразитні реакції шляхом зниження гіперактивності iNOS. Механізм впливу на експресію eNOS можна пояснити через ефект ангіоліну на HSP70 та HIF-1a. Ангіолін подовжує «життя» HIF-1a через механізми, пов'язані з HSP70. Ангіолін також має позитивний ефект на глутатіоновий ланцюг тіол-дисульфідної системи, який взаємодіє з системою NO. Було виявлено, що при експериментальній ішемії міокарда Ангіолін збільшує активність глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази, а також підвищує концентрацію відновленого глутатіону в цитозолі міокарда щурів [334]. HIF-1a також відомий тим, що підвищує експресію eNOS та VEGF під час гіпоксії та ішемії [452]. Ангіолін завдяки позитивному впливу на систему NO позитивно вплинув на кардіо- та гемодинаміку в експериментальній ішемії міокарда. Введення ангіоліну кроликам з оклюзією низхідної коронарної артерії призвело до відновлення лівошлуночкової дисфункції, що проявлялося в збільшенні індексу роботи лівого шлуночка та індексу робочого удару лівого шлуночка, підвищенні тиску в лівому шлуночку та зниженні загального периферійного судинного опору [453].

4.2 Дослідження біомаркерів окисного стресу, запалення та гіпоксії в експериментальних умовах

Моделювання пренатальної гіпоксії призводить до розвитку серцевих захворювань після народження. Було виявлено, що використання цієї моделі ПГ призводить до зниження контрактильності міокарда та дисфункції синусового вузла. Основою патологічних процесів при дії натрію нітриту є гіпоксія змішаного генезу, гемічна гіпоксія через утворення метгемоглобіну, яка поєднується з тканинною гіпоксією через дисоціацію окислювальних і фосфориляційних процесів. Порухення функції транспорту кисню в крові у вагітних самок щурів призводить до порушення матково-плацентарного кровообігу [496] і, як наслідок, до кисневого голодування плода або ембріона. Введення натрію нітриту в дозі 50 мг/кг призводить до гіпоксії середнього ступеня у дорослих, згідно з критеріями, запропонованими Н.Ф. Іваніцькою [497]. Як у новонароджених, так і в дорослих тварин, наша модель дозволяє оцінити фізіологічний розвиток нащадків та ефективність експериментальної кардіопротекторної терапії після ПГ. Введення натрію нітриту вагітним щурам призводить до підвищення рівня метгемоглобіну [498], а саме гіпоксичного ушкодження органів-мішеней плода.

Кінцевим результатом гіпоксичних ушкоджень серця може бути фокальна дистрофія [23]. Це було підтверджено молекулярними методами, а саме, збільшенням концентрації ST2 (Suppression of tumorigenicity 2, Growth Stimulation expressed gene 2, стимулюючий фактор росту, експресований геном 2, також відомий як IL1RL1) в крові тварин після ПГ. ST2 є високочутливим маркером ремоделювання міокарду, і ризик розвитку серцевої недостатності може збільшуватися при пренатальній гіпоксії (пreeклампсія) [399].

Результати нашого дослідження підтвердили, що щури, які перенесли внутрішньоутробну гіпоксію, мають значне збільшення концентрації специфічного кардіомаркера ST2 в крові через 1 місяць (в 6,28 рази) та через 2 місяці (в 3,63 рази) після народження. ST2 є членом суперсімейства рецепторів IL-1. ST2, який є рецептором IL-33 та маркером фіброзу та ремоделювання

серцевої тканини, експресується кардіоміоцитами та фібробластами [499]. Підвищення рівня ST2 може вказувати на розвиток ішемічної кардіоміопатії та порушення скоротливої функції серця. Як видно з табл. 4.2.1 та 4.2.2, навіть на другому місяці життя концентрація цього маркера залишається досить високою.

Таблиця 4.2.1.

Вміст у крові кардіоваскулярних маркерів та експресія мРНК HIF-1α в серці тварин після ПГ та введення препаратів (1 місяць життя).

Експериментальні групи (n = 10)	3-нітротирозин нМ/мл	ST2 нг/мл	eNOS, пг/мл	HSP ₇₀ , нг/мл	mRNA HIF-1, о.о.
Інтактна група	4,5 ± 0,82	16,7 ± 0,08	37,41 ± 0,88	14,42 ± 0,21	1,00 ± ± 0,0016
ПГ (контроль)	23,7 ± ± 1,23 ¹	105,0 ± ± 3,94 ¹	14,6 ± 0,26 ¹	2,57 ± ± 0,12 ¹	0,211 ± ± 0,0001 ¹
ПГ + ангіолін	10,3 ± ± 0,87 ^{1,*}	24,33 ± 2,35 ^{1,*}	54,73 ± ± 1,02 ^{1,*}	5,37 ± ± 0,17 ^{1,*}	4,87 ± ± 0,005 ^{1,*}
ПГ + тіотриазолін	14,1 ± ± 1,18 ^{1,*}	33,4 ± 0,56 ^{1,*}	25,63 ± ± 1,31 ^{1,*}	2,27 ± ± 0,12 ¹	1,89 ± ± 0,001 ^{1,*}
ПГ + L-аргінін	18,4 ± ± 1,12 ^{1,*}	28,33 ± ± 1,08 ^{1,*}	32,4 ± 1,08 [*]	5,76 ± ± 0,19 ^{1,*}	1,88 ± ± 0,001 ^{1,*}
ПГ + мілдронат	20,2 ± ± 1,85 ¹	32,17 ± ± 0,87 ^{1,*}	28,4 ± 0,76 ^{1,*}	3,73 ± ± 0,15 ¹	0,37 ± ± 0,001 ¹

Примітка. * — достовірність між контрольною групою (p<0,05);

¹ — достовірність між інтактною групою (p<0,05).

Наша робота показала послідовне зниження експресії білка теплового шоку 70 кДа (HSP70) після внутрішньоутробної гіпоксії. Це зниження складало близько 5,6 разів у щурів у віці 1 місяць та 3,44 рази у тих, які вже мали 2 місяці. Ми

прийшли до висновку, що внутрішньоутробна гіпоксія може викликати програмування гена HSP70 в ранньому віці, що призводить до пригнічення його відповіді на тепловий стрес та зменшення ендogenous кардіопротектора у подальшому віці. Дослідження виявили пригнічення експресії мРНК HIF-1 у серці щурів у віці 1 місяць на 79% та у тих, що мали 2 місяці, на 61,1%. Наші дослідження виявили стійке підвищення рівнів нітротирозину в крові щурів після впливу внутрішньоутробної гіпоксії. У щурів віком 1 місяць рівень нітротирозину зростав приблизно в 5,5 разів, тоді як у щурів віком 2 місяці він досяг 3,8 разів. Також було виявлено стійке зниження експресії eNOS після внутрішньоутробної гіпоксії — в 2,5 рази у тварин віком 1 місяць та в 2 рази у щурів віком 2 місяці.

Таблиця 4.2.2.

**Вміст у крові кардіоваскулярних маркерів та експресія мРНК
HIF-1a в серці тварин після ПГ та введення препаратів (2 місяця життя).**

Експериментальні групи (n = 10)	3-нітро-тирозин нМ/мл	ST2 нг/мл	eNOS, пг/мл	HSP70, нг/мл	mRNA HIF-1, о.о.
Інтактна група	4,8 ± 0,77	14,7 ± 0,50	54,03 ± 0,47	14,9 ± 0,37 1	1,00 ± ± 0,0003
ПГ (контроль)	18,2 ± 1,65 ¹	53,33 ± 0,62 1	26,43 ± 0,90 1	4,33 ± 0,11	0,389 ± ± 0,0005 ¹
ПГ + ангиолін	6,23 ± 0,76 *	12,1 ± 0,54 *	65,9 ± 0,65 1,*	8,07 ± 0,15 1,*	3,19 ± 0,001 1,*
ПГ + тіотриазолін	9,47 ± 1,14 1,*	18,07 ± 0,88 1,*	36,5 ± 1,04 1,*	6,63 ± 0,13 1,*	2,41 ± ± 0,0002 ^{1,*}
ПГ + L-аргінін	15,7 ± 1,35 1,*	23,8 ± 1,00 1,*	43,7 ± 1,30 1,*	4,5 ± 0,19 ¹	1,08 ± 0,00 1,*
ПГ + мілдронат	16,4 ± 1,42 ¹	26,33 ± 1,29 ^{1,*}	26,2 ± 1,27 ¹	6,33 ± 0,13 ^{1,*}	1,88 ± 0,0005 ^{1,*}

Примітка. * — достовірність між контрольною групою (p<0,05);

¹ — достовірність між інтактною групою (p<0,05).

Таким чином, введення лікарських засобів тваринам після пренатальної гіпоксії протягом 30 днів мало терапевтичний ефект різного ступеня виразності як безпосередньо після закінчення їх введення, так і через місяць після припинення терапії. Найбільш виражений терапевтичний ефект проявився при застосуванні ангіоліну. У групах тварин, яким був введений ангіолін, спостерігалось зменшення ST2 на 77% безпосередньо після закінчення його введення порівняно з контролем, а через місяць після припинення введення ангіоліну значення ST2 в цій групі не відрізнялися статистично від значень інтактної групи. Все це свідчить про значний кардіопротекторний ефект ангіоліну. Введення ангіоліну сприяло значному збільшенню експресії eNOS у 3,74 рази безпосередньо після введення і в 2,5 рази через місяць після його відміни порівняно з контролем, а також на 58,8% і 153,8% порівняно з інтактною групою при зниженні рівня нітротирозину (зниження на 56,5% безпосередньо після введення і нормалізація цього показника через місяць порівняно з контролем).

Ангіолін підвищував експресію HSP70 (збільшення в 2 рази безпосередньо після введення і на 1,84 рази через місяць після введення порівняно з контролем). Ангіолін збільшував експресію мРНК HIF-1 в серці щурів віком 1 місяць, що зазнали внутрішньоутробної гіпоксії, у 23 рази і в 2-місячних щурів у 8,2 рази. Позитивний ефект на систему NO та зниження окислювального стресу при збільшенні мРНК HIF-1 і HSP70, ймовірно, забезпечують кардіопротекторну дію ангіоліну після внутрішньоутробної гіпоксії. Варто зазначити, що кардіопротекторний ефект ангіоліну зберігався навіть через місяць після припинення застосування препарату. Подібний, але менш виражений ефект спостерігався при введенні тіотриазоліну та L-аргініну. Таким чином, у групах, яким вводили тіотриазолін, спостерігалось значне зменшення ST2 на 68,2% та 66,2% залежно від терміну спостереження, а в групах, яким вводили L-аргінін, цей показник зменшився на 73% та 55,3% відповідно.

Введення тіотриазоліну та L-аргініну мало антиоксидантну дію і призводило до зниження окислювального стресу. У групах, яким вводили тіотриазолін, спостерігалось значне зменшення нітротирозину на 41% і 48% в залежності від

терміну спостереження, а в групах, яким вводили L-аргінін, цей показник значно знизився на 22% лише безпосередньо після 30-денної терапії препаратом. Тіотриазолін і L-аргінін позитивно впливали на експресію eNOS. У групі, яка отримувала L-аргінін, показник eNOS нормалізувався безпосередньо після припинення введення препарату, а його експресія збільшилась на 65,5% через місяць після припинення лікування.

Введення тіотриазоліну забезпечило значне збільшення експресії eNOS на 75,3% і 38% відповідно до періоду спостереження. Введення тіотриазоліну та L-аргініну значно підвищило концентрацію HSP70 в крові щурів після внутрішньоутробної гіпоксії в різні терміни спостереження — L-аргінін безпосередньо після припинення введення (на 124% порівняно з контролем), а тіотриазолін через 30 днів після припинення введення (на 53% порівняно з контролем). Тіотриазолін значно збільшив експресію мРНК HIF-1 як у 1-місячних тварин, так і найбільше (у 6,2 рази порівняно з контролем) у 2-місячних тварин. Введення L-аргініну значно підвищувало експресію мРНК HIF-1 безпосередньо після припинення введення препарату (у 9 разів порівняно з контролем). Очевидно, це пов'язано з впливом на різні частини NO/SN-механізму активації експресії мРНК HIF-1.

Мілдронат мав значний кардіопротекторний ефект протягом курсу його застосування у щурів після внутрішньоутробної гіпоксії — зниження ST2 на 69,5% і 50,6% для різних періодів спостереження. За ступенем впливу на цей показник мілдронат не відрізнявся від L-аргініну і тіотриазоліну, але поступався ангіоліну. Мілдронат не проявив антиоксидантної дії і не зменшив концентрацію нітротирозину в крові щурів після внутрішньоутробної гіпоксії. Мілдронат підвищив експресію eNOS в крові експериментальних тварин лише безпосередньо після курсу застосування, а через місяць після відміни препарату ефект не був значущим. Мілдронат також значно підвищив концентрацію HSP70 та експресію мРНК HIF-1 протягом місяця після завершення курсу лікування. За ступенем впливу на цей показник мілдронат поступався L-аргініну і ангіоліну, залишаючись конкурентом для тіотриазоліну.

Відомо, що збільшення окислювального стресу тісно пов'язано з серцево-судинними захворюваннями, такими як гіпертонія та ішемічна хвороба серця, і призводить до гіпертрофії, фіброзу та апоптозу, що спричиняє порушення функції серця [403]. Окислювальний стрес у антенатальний період може бути наслідком ушкодження мітохондрій під час гіпоксії, що робить їх джерелом АФК [1]. Дані, отримані рядом дослідників, демонструють, що у щурів після внутрішньоутробної гіпоксії відбувається підвищення рівня білка цитохрому с в крові, з одночасним зниженням середньої щільності мітохондрій і щільності крист, а також зниженням експресії мітохондріальної Mn-SOD, що може надати додаткову інформацію щодо специфіки активації окислювального стресу після ПГ. Також кілька робіт встановили, що внутрішньоутробна гіпоксія змінює профіль експресії 48 генів, пов'язаних з метаболічним і окислювальним стресом, таких як субодиниця глутатіон-S-трансферази та цитохром-с-оксидаза [181].

Зниження експресії eNOS, яке ми виявили при значному підвищенні рівня нітротирозину як у 1-, так і в 2-місячних щурів після внутрішньоутробної гіпоксії, має пояснення. Збільшене виробництво АФК при ПГ призводить до зниження біодоступності NO та пригнічення експресії eNOS [500,501]. Надлишок NADPH під час ПГ є причиною утворення АФК, які можуть реагувати з NO, утворюючи стабільний аніон пероксинітриту, що знижує біодоступність NO [244].

Тривала ПГ призводить до зниження експресії мРНК HIF-1 в клітинах інших органів щурів [261,262], це може вказувати на виснаження компенсаторно-адаптивних реакцій після внутрішньоутробної гіпоксії. Фактори, спричинені гіпоксією (HIF) виконують роль транскрипційних факторів і регулюють експресію генів, що кодують синтез білків, які беруть участь у фізіологічному відповіді на гіпоксію/ішемію [263]. HIF проявляють цитопротекторні властивості при гіпоксії, стимулюють репаративні процеси і підвищують концентрацію радикалових захисників (гем-гідроксилаза-1, гем-оксигеназа-1, VEGF, ангіопоєтин) [264]. HIF-1 в умовах гіпоксії впливає на енергетичний метаболізм, регулюючи компенсаторні шунти синтезу АТФ, збільшує синтез глутатіону і підвищує стійкість клітин до окислювального стресу. Відомо, що HSP70 пролонгує

«тривалість життя» HIF-1. Ми виявили, що пригнічення експресії мРНК HIF-1 після внутрішньоутробної гіпоксії відбувається на фоні дефіциту HSP70. Досить велика кількість досліджень показала багатонаправлені зміни в концентрації HIF-1, його форм при різних типах гіпоксії, її тривалості та в різних органах [265]. В умовах нітрозативного стресу і підвищення рівня цитотоксичних продуктів NO і дефіциту АТФ в тканинах відбувається зниження HIF, що пов'язано з активацією неубіквітинного шляху деградації окислено-модифікованого HIF-1 α і пригніченням його синтезу на етапі дефіциту АТФ. Відомо, що NO регулює експресію мРНК HIF-1 α [137, 502-503].

Таким чином, однією з терапевтичних стратегій для зменшення серцевої дисфункції, яка розвивається після ПГ, може бути нормалізація системи NO і зниження окислювального стресу (рис. 4.2.1). Терапевтичний ефект досліджуваних фармакологічних агентів після ПГ можна пояснити наступним чином. Виявлений первинний кардіопротекторний ефект ангіоліну, при введенні після внутрішньоутробної гіпоксії, збереження ефекту навіть після місячного відміни, пояснюється його наступними властивостями. Ангіолін, в умовах гострої церебральної ішемії, виявляє виражені ендотеліопротекторні властивості; він зберігає щільність ендотеліоцитів, підвищує концентрацію РНК в ядрах, збільшує щільність проліферуючих ендотеліоцитів (BrdU-тест), збільшує ефективність використання ендогенного L-аргініну, підвищує експресію VEGF, а також eNOS, і наявність двовалентної сірки в його структурі визначає його властивість поглинача NO [375].

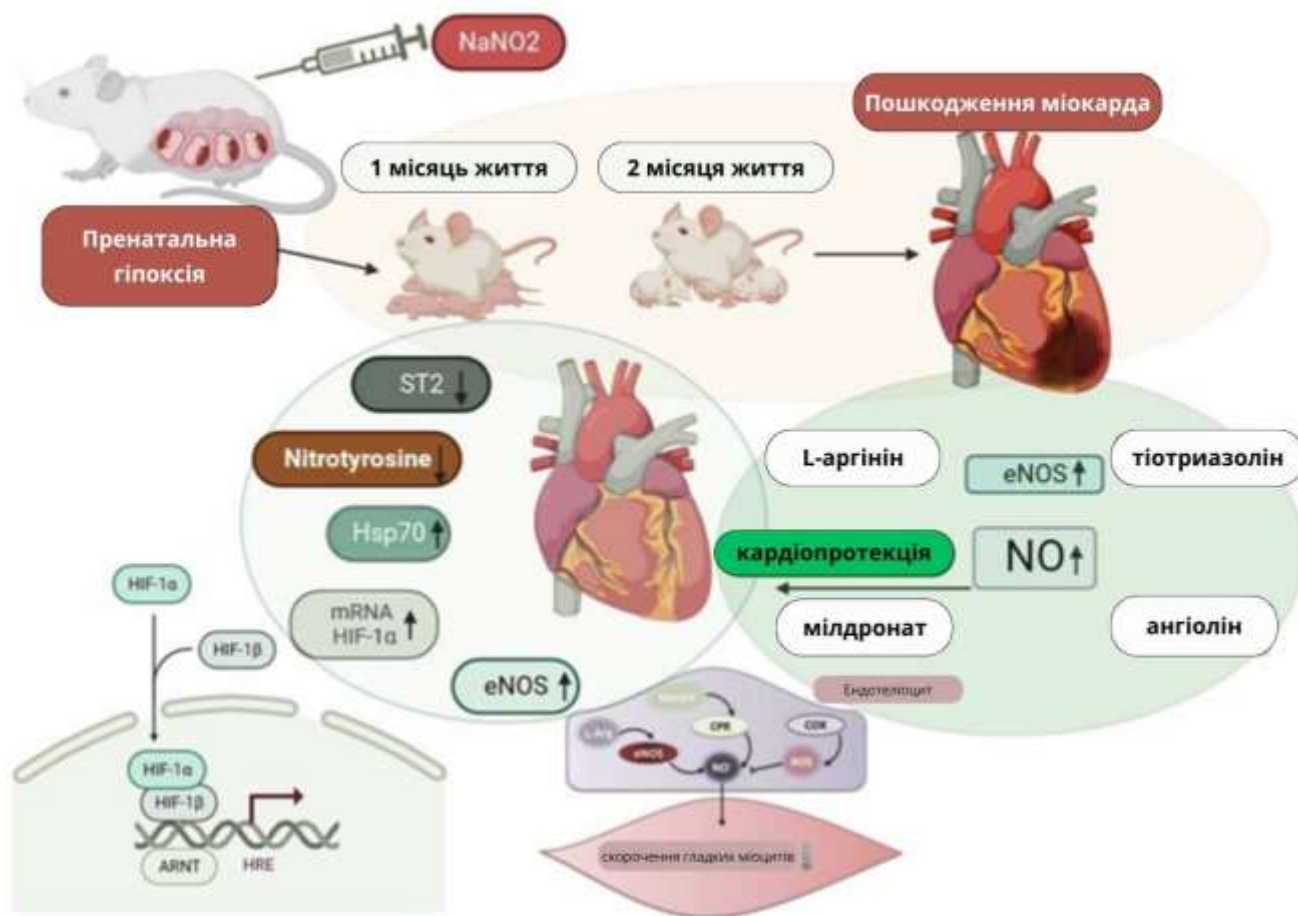


Рис. 4.2.1. Маркери стану серцево-судинної системи в крові та серці щурів після пренатальної гіпоксії та подальшої фармакологічної модуляції NO-системи. Рисунок створено авторокою за допомогою BioRender та узагальнює підрозділ.

Виявлено, що ангіолін покращує ультраструктуру нейронів СА1-зони гіпокампу в умовах хронічної церебральної ішемії (зменшує руйнування крист, нерівномірну електронну щільність матриксу, збільшує щільність мітохондрій), а також знижує концентрацію внутрішньомітохондріального iNOS і підвищує концентрацію цитоплазматичного та внутрішньомітохондріального HSP70. Відомо, що теплові шоківі білки розміром 70 кДа є ендогенними цитопротекторами під час ішемії, гіпоксії, дії токсинів. В експериментах *in vitro* у суспензії нейронів у щурів було виявлено, що введення HSP70 зменшує ступінь ушкодження ключових ферментів енергетичного метаболізму та ферментів антиоксидантного захисту нейронів. Також було виявлено, що HSP70 бере участь у регулюванні функціонування компенсаторних енергетичних шунтів під час

гострої ішемії. Ми з'ясували, що HSP70 пролонгує дію HIF-1 α і також самостійно підтримує експресію NAD-MDH-mx, тим самим підтримуючи активність компенсаторного механізму синтезу АТФ — механізму малат-аспартатного шунта — протягом тривалого часу [351]. Показано, що ангіолін може активувати механізм малат-аспартатного шунта в міокарді під час ішемії [375].

Тіотриазолін має властивості поглинача цитотоксичних форм NO та має захисний ефект на транспортування NO, завдяки позитивному впливу на тіол-дисульфідний баланс і підвищенню рівня відновлених тіолів та глутатіону. Крім того, ми припускаємо, що тіотриазолін сам може бути переносником NO, утворюючи стабільні S-нітрозильні комплекси з ним [463]. Тіотриазолін проявляє кардіопротекторний ефект, позитивно впливаючи на енергетичний метаболізм в ішемічному міокарді, збільшує рівень АТФ під час ішемії та гіпоксії завдяки нормалізації циклу Кребса, збільшує використання глюкози та вільних жирних кислот, активує перетворення лактату на піруват [464]. Відомо також, що тіотриазолін проявляє кардіопротекторний ефект і збільшує витривалість тварин в умовах робочої гіпоксії, підвищуючи рівень HIF-1 та зберігаючи ультраструктуру мітохондрій. Завдяки антиоксидантній дії, тіотриазолін підтримує порогову чутливість рецепторів, зберігає рідину мембран і захищає фосфоліпіди від окислення [504].

L-Аргінін є субстратом для утворення NO в ендотеліальних клітинах судин, фактором периферичної судинної дилатації. NO, що утворюється з аргініна, знижує загальний периферичний судинний опір і артеріальний тиск, зменшує кисневе голодування, особливо в тканинах серця [505]. Відомо, що NO відіграє важливу роль в механізмах проліферації ендотеліоцитів та регулюванні експресії VEGF, PGF, ангіопоеїтинів (ANG-1, ANG-2) і рецепторних білків (SFLT-1, STIE-2). Було показано, що VEGF відіграє важливу роль у фізіологічній вагітності, регулюючи плацентарну ангіогенезу, знижуючи частоту плацентарної недостатності [506]. Відомо, що фізіологічні концентрації NO регулюють експресію проангіогенних VEGF-A і PGF в людських тробластах *in vitro*. Введення інгібіторів iNOS та зниження рівня NO у вагітних мишей призводить до

підвищення артеріального тиску. NO при фізіологічних концентраціях може знижувати експресію прозапальних цитокінів та ендотеліальних адгезійних рецепторів і здатен до термінової експресії HIF-1 α [507].

Відомо, що мілдронат через транспортер органічних катіонів карнітину 2 може знижувати рівень L-карнітину та гальмувати транспортування жирних кислот через мітохондріальні мембрани під час гострої ішемії чи гіпоксії. Мілдронат запобігає накопиченню токсичних метаболічних проміжних продуктів ацилкарнітину та ацил-КоА, які пошкоджують клітинні мембрани та блокують транспортування АТФ з мітохондрій до клітинних органел [507]. Лікування мілдронатом супроводжується компенсаторним збільшенням експресії в міокарді ряду генів, що кодують ферменти ліпідного метаболізму — ліпопротеїнліпазу, транслоказу жирних кислот, карнітингемпалмітоїлтрансферазу I та ферменти синтезу тригліцеридів. Мілдронат здатний покращити контрактильність міокарда, активність гексокінази і співвідношення АТФ/АДФ/АМФ шляхом активації АМФ-активованої протеїнкінази, що відновлює рівень АТФ [508].

Мілдронат може збільшувати вироблення NO в ішемічному міокарді та мозку шляхом модифікації пулів γ -бутиробетаїну естерів. Введення мілдронату гальмує гідроксильовання γ -бутиробетаїну і збільшує внутрішньоклітинний пул γ -бутиробетаїну, естеризація якого виявляє холіноміметичні властивості. Естери γ -бутиробетаїну через ацетилхолінові рецептори на ендотеліальних клітинах можуть активувати eNOS. Однак у ряді досліджень ефект мілдронату на вироблення NO не був підтверджений [12].

Отже, отримані результати підтверджують первинний кардіопротекторний ефект модуляторів системи NO з різними механізмами дії — тіотриазоліну, мілдронату, L-аргініну та особливо ангіоліну — після ПГ.

4.3 Можливість застосування модуляторів NO для фармакокорекції ендотеліальної дисфункції після пренатальної гіпоксії

Після ПГ в міокарді щурів спостерігається суттєве порушення функціонування нитрергічної системи, що проявляється дисбалансом експресії eNOS та iNOS, дефіцитом оксиду азоту та підвищенням рівня нітротирозину. Це свідчить про порушену серцеву толерантність до ішемії/реперфузії та ураження ендотеліально-залежних механізмів вазодилатації/вазоконстрикції, що може сприяти подальшому розвитку ендотеліальної дисфункції після внутрішньоутробної гіпоксії. Ендотеліальна дисфункція після ПГ розвивається на фоні дефіциту HIF-1 α (фактор, що активує експресію eNOS через фосфорилування серинових залишків) та нітрозативного стресу, що також призводить до дефіциту HSP70, виснаження глутатіонової системи, зниження біодоступності NO та пригнічення транскрипції генів за допомогою цитотоксичних продуктів NO [153].

Модель ПГ призводить до патологічних змін в серцево-судинній системі новонароджених та розвитку ендотеліальної дисфункції. Рівні EPCR збільшуються в ендотеліальних клітинах під час постішемичної неоваскуляризації. Важливо зазначити, що екзогенне введення NO значно підсилює утворення ангіогенних паростків ендотелію з аортальних кілець та первинних ендотеліальних клітин, ізольованих від мишей з мутацією PAR1. Таким чином, підтримка біодоступності NO під час ангіогенезу є основною функцією ендотеліального сигналіngu EPCR-PAR1 [266,267].

Вивільнення EPCR з ендотелію часто призводить до утворення його розчинної форми (sEPCR). Було виявлено, що у мишей SS рівні розчинної форми EPCR (sEPCR) у плазмі були вищими порівняно з їхніми AA-потомками. EPCR відіграє ключову роль в антикоагулянтних та протизапальних ефектах шляху білка C, тоді як його розчинна форма (sEPCR) проявляє протилежні властивості. Високі рівні sEPCR у плазмі та тканинах спостерігаються у осіб з гаплотипом A3 гена PROCR (гена EPCR). Підвищені рівні sEPCR у плазмі також були нещодавно

виявлені у жінок з прееклампсією (ПЕ) — мультисистемним синдромом, що включає запалення, ендотеліальну дисфункцію та тромбоз [509].

Tie2 відіграє важливу роль у забезпеченні бар'єрного захисту для запобігання надмірній проникності судин та підтримці антикоагулянтної поверхні для покращення кровообігу. Він залишається активованим протягом здорової судинної системи дорослої тварини завдяки безперервній секреції ангіопоетину-1 з периваскулярних клітин та тромбоцитів, що сприяє стабільності ендотелію шляхом інгібування запального NF-κB [510]. У тваринних моделях, що моделюють критичні захворювання, рівні Tie2 в органах тимчасово знижуються. Функціональні наслідки цих знижених рівнів Tie2 для поведінки мікросудинних ендотеліальних клітин пов'язані з підвищенням мікросудинного запалення [511]. Було показано, що миші з нульовим Tie-2 мають важке пошкодження судин та серцеві аномалії, що призводять до ембріональної летальності, оскільки Tie-2 необхідний для підтримки розвитку та стабілізації фетоплацентарних судин та регулювання продукції NO [506]. Дані також демонструють потенціал активації Tie2 за допомогою фармакологічного агента, що призводить до зменшення тромбо-запального стану ендотелію при COVID-19 [510].

VEGF-B є потужним фактором виживання для різних типів клітин, інгібуючи апоптоз шляхом пригнічення експресії апоптозозалежних білків та генів і є важливим для виживання судин; однак він не індукує ріст судин. Фармакологічна модифікація VEGF-B призводить до сильного цитопротекторного та антиапоптотичного ефекту без запуску загальної ангіогенної активності [512]. Серце виражає високий рівень VEGF-B, що чинить потужний антиапоптотичний ефект на кардіоміоцити шляхом пригнічення експресії проапоптотичних генів (BMF, BAD, BID, BAX, CASP9, DCN, TP53INP1, TNF). VEGF-B індукує кілька антиоксидантних генів (GPX1, GPX4, SOD-1, SOD-2 тощо) та пригнічує гени, відповідальні за окислювальний стрес. VEGF-B знижує вміст холестерину в ендотелії шляхом інгібування рециркуляції рецепторів ліпопротеїдів низької щільності, впливає на їхнє споживання та збільшує використання жирних кислот міокардом для вироблення енергії [513].

Моделювання ПГ призводить до змін концентрації різних білків у цитозолі серця експериментальних тварин, що може вказувати на розвиток ендотеліальної дисфункції (табл. 4.3.1 та 4.3.2). Ми спостерігали значне збільшення концентрації розчинної форми рецептора ендотеліального білка С (sEPCR), яка зросла в 1,92 рази на 1-му місяці життя та в 2,14 рази на 2-му місяці життя порівняно з групою здорових тварин відповідного віку ($p \leq 0,05$). Крім того, ми виявили значне зниження концентрації рецептора тирозинкінази Tie-2, на 42,3% на 1-му місяці життя та на 37,9% на 2-му місяці життя.

Таблиця 4.3.1.

**Системні параметри цитозольної фракції в 1-місячних щурах після
пренатальної гіпоксії та лікування.**

Експериментальні групи (n = 10)	sEPCR, пг/мл	Tie-2, пг/мл	VEGF-B, пг/мл	Cu/ZnSO D, пг/мл	GPX1, пг/мл	GPX4, пг/мл
Інтактна група	22,5 ± ± 0,411	17,7 ± ± 0,348	44,7 ± ± 1,012	87,7 ± ± 1,802	43,3 ± ± 1,044	67,8 ± ± 1,676
ПГ (контроль)	43,2 ± ± 1,360 ¹	10,2 ± ± 0,275 ¹	32,1 ± ± 1,012 ¹	63,5 ± ± 1,360 ¹	21,1 ± ± 0,538 ¹	34,2 ± ± 0,537 ¹
ПГ + L-аргінін	38,0 ± ± 0,854 ^{1*}	14,2 ± ± 0,348 ^{1*}	34,7 ± ± 1,486 ¹	62,7 ± ± 1,739 ¹	22,8 ± ± 0,696 ¹	38,3 ± ± 1,328 ^{1*}
ПГ + тіотриазолін	33,5 ± ± 1,012 ^{1*}	12,7 ± ± 0,316 ^{1*}	36,8 ± ± 1,170 ^{1*}	77,8 ± ± 1,961 ^{1*}	38,8 ± ± 0,696 ^{1*}	57,7 ± ± 0,949 ^{1*}
ПГ + ангіолін	28,2 ± ± 0,538 ^{1*}	16,4 ± ± 0,380 ^{1*}	47,8 ± ± 0,885 ^{1*}	79,7 ± ± 1,676 ^{1*}	40,7 ± ± 1,012 [*]	62,8 ± ± 1,803 [*]
ПГ + мілдронат	40,5 ± ± 2,119 ¹	11,0 ± ± 0,231 ^{1*}	31,1 ± ± 1,170 ¹	65,2 ± ± 1,961 ¹	22,7 ± ± 0,348 ¹	37,3 ± ± 0,601 ^{1*}

Примітка. * — достовірність між контрольною групою ($p < 0,05$);

¹ — достовірність між інтактною групою ($p < 0,05$).

Концентрація фактора росту ендотелію судин В (VEGF-B) також була значно знижена після ПГ, зменшившись на 28,1% та 35,2% на 1-му та 2-му місяцях відповідно, у експериментальних тварин. Ми також виявили зниження експресії мРНК VEGF на 2,9 рази та зниження експресії мРНК VEGF-B на 5,8 рази в серцях 1-місячних щурів порівняно з групою здорових 1-місячних тварин. У серцях 2-місячних щурів зниження експресії мРНК VEGF та VEGF-B було ще більш вираженим порівняно з групою здорових 1-місячних щурів, зменшившись на 3,3 та 6,4 рази відповідно.

Таблиця 4.3.2.

Системні параметри цитозольної фракції в 2-місячних щурах після пренатальної гіпоксії та лікування.

Експериментальні групи (n = 10)	sEPCR, пг/мл	Tie-2, пг/мл	VEGF-B, пг/мл	Cu/ZnS OD, пг/мл	GPX1, пг/мл	GPX4, пг/мл
Інтактна група	21,2 ± ± 0,348	18,2 ± ± 0,253	48,8 ± ± 1,012	91,9 ± ± 2,308	46,4 ± ± 0,664	72,4 ± ± 1,676
ПГ (контроль)	45,4 ± ± 0,727 ¹	11,3 ± ± 0,221 ¹	31,6 ± ± 0,696 ¹	62,8 ± ± 1,581 ¹	21,2 ± ± 0,949 ¹	37,8 ± ± 0,569 ¹
ПГ + L-аргінін	35,2 ± ± 0,537 ^{1*}	15,2 ± ± 0,348 ^{1*}	32,7 ± ± 0,854 ¹	66,7 ± ± 1,328 ¹	24,3 ± ± 0,569 ^{1*}	39,4 ± ± 0,443 ¹
ПГ + тіотриазолін	32,2 ± ± 0,569 ^{1*}	15,7 ± ± 0,243 ^{1*}	37,8 ± ± 1,075 ^{1*}	78,7 ± ± 1,992 ^{1*}	42,6 ± ± 0,791 ^{1*}	68,7 ± ± 1,360 ^{1*}
ПГ + ангіолін	21,2 ± ± 0,632*	18,4 ± ± 0,379*	52,8 ± ± 1,202* ¹	88,7 ± ± 2,625*	48,8 ± ± 1,075*	77,8 ± ± 1,834 ^{1*}
ПГ + мілдронат	44,9 ± ± 1,676 ¹	10,4 ± ± 0,127 ^{1*}	34,7 ± ± 0,601 ^{1*}	64,4 ± ± 1,391 ¹	27,4 ± ± 0,601 ^{1*}	42,5 ± ± 1,518 ^{1*}

Примітка. * — достовірність між контрольною групою (p<0,05);

¹ — достовірність між інтактною групою (p<0,05).

Крім того, ми спостерігали, що ПГ призводить до більш вираженого пригнічення експресії мРНК VEGF-B (табл. 4.3.3 та 4.3.4). Ознакою ендотеліальної дисфункції в мікросудинах міокарда стало зменшення площі ядер ендотеліальних клітин, що зменшилась на 42,6% у 1-місячних щурів та на 43,4% у 2-місячних щурів (табл. 4.3.5). Крім того, ми виявили зниження експресії антиоксидантних ферментів, які відіграють важливу роль у обмеженні шкідливих ефектів проміжних продуктів окислювального стресу, таких як супероксидні радикали, гідропероксидази та ліпідні пероксидази. У цитозолі серця щурів після ПГ було зафіксовано значне зниження концентрації Cu/Zn-залежної ізоформи супероксиддисмутази (Cu/ZnSOD) на 27,6% (на 1-му місяці життя) та на 31,6% (на 2-му місяці життя). Також було виявлено зниження концентрації глутатіонпероксидази 4 (фосфоліпідгідропероксидази) (GPX4) на 49,5% та 47,8% на 1-му і 2-му місяці життя відповідно. Концентрація глутатіонпероксидази 1 (GPX1) також знизилася на 51,2% на 1-му місяці життя та на 54,3% на 2-му.

Таблиця 4.3.3.

**Експресія мРНК VEGF та мРНК VEGF-B у тканинах міокарда
1-місячних щурів після пренатальної гіпоксії та лікування.**

Експериментальні групи (n = 10)	VEGF мРНК, од.	VEGF-B мРНК, од.
Інтактна група	1,000 ± 0,0017	1,000 ± 0,009
ПГ (контроль)	0,34 ± 0,00012 ¹	0,170 ± 0,00011 ¹
ПГ + L-аргінін	0,31 ± 0,00012 ¹	0,18 ± 0,0022 ¹
ПГ + тіотриазолін	0,812 ± 0,0055 ^{1,*}	1,17 ± 0,0011 ^{1,*}
ПГ + ангіолін	1,731 ± 0,0121 ^{1,*}	2,13 ± 0,0021 ^{1,*}
ПГ + мілдронат	0,331 ± 0,0021 ¹	0,18 ± 0,0022 ¹

Примітка. * — достовірність між контрольною групою (p<0,05);

¹ — достовірність між інтактною групою (p<0,05).

**Експресія мРНК VEGF та мРНК VEGF-B у тканинах міокарда
2-місячних щурів після пренатальної гіпоксії та лікування.**

Експериментальні групи (n = 10)	VEGF мРНК, од.	VEGF-B мРНК, од.
Інтактна група	1,000 ± 0,0012	1,000 ± 0,0015
ПГ (контроль)	0,30 ± 0,00014 ¹	0,156 ± 0,0003 ¹
ПГ + L-аргінін	0,31 ± 0,00021 ¹	0,161 ± 0,0014 [*]
ПГ + тіотриазолін	1,17 ± 0,0011 ^{1,*}	2,00 ± 0,0021 ^{1,*}
ПГ + ангіолін	1,87 ± 0,0023 ^{1,*}	3,05 ± 0,0023 ^{1,*}
ПГ + мілдронат	0,31 ± 0,0011 ¹	0,143 ± 0,0001 ¹

Примітка. * — достовірність між контрольною групою (p<0,05);

¹ — достовірність між інтактною групою (p<0,05).

Курс введення лікарських засобів, що є модуляторами системи оксиду азоту, протягом 30 днів безпосередньо після народження призводить до різного ступеня нормалізації експресії цих білків (sEPCR, Tie-2, VEGF-B, Cu/ZnSOD, GPX) (табл. 4.3.1 та 4.3.2). Введення L-аргініну спричинило значне зниження рівня sEPCR на 12,0% безпосередньо після припинення лікування та на 22,4% через місяць після завершення лікування L-аргініном, що вказує на стійкий ефект. Введення L-аргініну суттєво збільшило концентрацію Tie-2 в цитозолі експериментальних тварин в 1,4 рази як безпосередньо після припинення препарату, так і через місяць після завершення курсу лікування. Однак введення L-аргініну не вплинуло на концентрацію та експресію VEGF-B і Cu/ZnSOD у цитозолі серця експериментальних тварин. Лікування L-аргініном призвело до збільшення ядерної порожнини ендотеліоцитів у 28% мікросудин міокарда після ПГ через місяць після введення препарату (табл. 4.3.5).

Поперечна площа ядер ендотеліальних клітин у верхівці міокарда 1- і 2-місячних щурів після пренатальної гіпоксії та лікування.

Експериментальні групи (n = 10)	Поперечна площа ядер ендотеліальних клітин, μm^2	
	1-місячні щури	2-місячні щури
Інтактна група	$15,23 \pm 2,34$	$16,17 \pm 2,65$
ПГ (контроль)	$8,77 \pm 0,76^1$	$9,15 \pm 0,67^1$
ПГ + L-аргінін	$8,98 \pm 1,23^1$	$11,71 \pm 1,10^{1,*}$
ПГ + тіотриазолін	$12,34 \pm 1,24^{1,*}$	$14,82 \pm 1,58^{1,*}$
ПГ + ангіолін	$14,11 \pm 2,35^*$	$15,61 \pm 1,76^*$
ПГ + мілдронат	$8,34 \pm 0,714^1$	$8,77 \pm 1,11^1$

Примітка. * — достовірність між контрольною групою ($p < 0,05$);

¹ — достовірність між інтактною групою ($p < 0,05$).

Введення L-аргініну призвело до значного збільшення експресії GPX4 безпосередньо після введення препарату, тоді як експресія GPX1 збільшилася через місяць після завершення курсу лікування (табл. 4.3.1 та 4.3.2). Тіотриазолін значно знижував рівень sEPCR у цитозолі серця щурів після ПГ на обох етапах спостереження (1 та 2 місяці життя експериментальних тварин) на 22,4% та 29,0% відповідно. Курс введення тіотриазоліну призвів до значного збільшення Tie-2 на 24,5% та 39,0% на відповідні етапи спостереження (1 та 2 місяці після ПГ). Крім того, тіотриазолін сприяв значному збільшенню VEGF-B на 14,6% і 19,6% на відповідні періоди спостереження (табл. 4.3.1 та 4.3.2). Тіотриазолін підвищив експресію VEGF мРНК і VEGF-B мРНК в 2,61 і 6,8 разів відповідно в серцях 1-місячних щурів після ПГ, та в 3,9 і 12,8 разів відповідно в серцях 2-місячних щурів після ПГ (табл. 4.3.3 та 4.3.4). Тіотриазолін значно підвищив експресію антиоксидантних ферментів у цитозолі міокарда експериментальних тварин— Cu/ZnSOD на 22,5% і 25,3%, GPX1 на 83,8% і 200%, а GPX4 на 68,7% і 87,7% на

відповідні періоди спостереження після введення препарату. Як видно, тіотриазолін має більший вплив на GPX1, що відповідає його раніше встановленим антиоксидантним властивостям. Тіотриазолін продемонстрував прямі ендотеліо-захисні властивості, значно збільшуючи ядерну площу ендотеліальних клітин у міокарді 1- та 2-місячних щурів після ПГ на 40,7% і 62% відповідно порівняно з не лікованою групою (табл. 4.3.5).

Варто зазначити, що виміряні показники в групі тварин з ПГ, які отримували Тіотриазолін, не відрізнялися суттєво від показників групи тварин, народжених після нормально протікаючої вагітності. Ангіолін продемонстрував найвиразніший терапевтичний ефект серед усіх вивчених препаратів (табл. 4.3.1 та 4.3.2). Зокрема, ангіолін значно знизив рівень sEPCR у цитозолі серця щурів після ПГ на обох періодах спостереження — безпосередньо після курсу введення та через 1 місяць після його припинення (1 і 2 місяці життя експериментальних тварин) — на 34,7% та 53,3% відповідно.

Важливо зазначити, що рівні sEPCR у цитозолі міокарда 2-місячних тварин з ПГ після отримання ангіоліну були порівнянні з показниками тварин, народжених після фізіологічно нормальної вагітності. Курс введення ангіоліну призвів до значного збільшення Tie-2 на 60,7% та 62,8% для відповідних періодів спостереження (1 і 2 місяці після ПГ). Показники sEPCR у цитозолі міокарда 2-місячних тварин після ПГ, які отримували ангіолін, були на рівні тварин, народжених після фізіологічно нормальної вагітності. Введення ангіоліну також призвело до значного збільшення VEGF-B на 48,9% та 67,0% для відповідних періодів спостереження. Важливо зазначити, що концентрація VEGF-B у цитозолі міокарда 1- і 2-місячних щурів після ПГ була значно вищою, ніж у тварин, народжених після фізіологічно нормальної вагітності. Ангіолін збільшив експресію мРНК VEGF та мРНК VEGF-B у серцях 1-місячних щурів після ПГ у 5,7 і 12,5 разів відповідно, а у серцях 2-місячних щурів після ПГ — у 6,2 і 19 разів.

Серед усіх досліджених фармакологічних агентів, ангіолін продемонстрував найбільш виражені прямі ендотеліально-протекторні властивості, значно збільшуючи площу ядер ендотеліальних клітин у міокарді 1- і 2-місячних щурів

після ПГ на 60,8% і 70% відповідно порівняно з групою, що не отримувала лікування. Морфометричні параметри ядер ендотеліальних клітин у тварин, що отримували ангіолін після ПГ, були порівнянні з показниками здорових щурів (табл. 4.3.5).

Використання ангіоліну також призвело до збільшення експресії антиоксидантних ферментів: Cu/ZnSOD на 25,5% і 41,2%, GPX1 на 92,8% і 130,1%, GPX4 на 83,6% і 105,8% для відповідних періодів спостереження після введення препарату — що свідчить про значний антиоксидантний механізм дії препарату. (табл. 4.3.1 та 4.3.2).

Мілдронат, при введенні курсом після ПГ, мав найменш виражений ефект порівняно з іншими вивченими препаратами (табл. 4.3.1 та 4.3.2). Ми спостерігали значну зміну в групі, що отримувала мілдронат, порівняно з контрольною групою в рівнях Tie-2 та GPX4 безпосередньо після одразу одного місяця курсу введення, а також значну зміну порівняно з контрольною групою в рівнях VEGF-B, Tie-2, GPX1 і GPX4 через місяць після курсу препарату.

ПГ призводить до ендотеліальної дисфункції, зниження продукції NO, зменшення експресії та концентрації VEGF, потовщення та відкладення фібрилів в інтимі, а також міграції та проліферації клітин гладкої мускулатури в інтимі судин міокарда [23]. Морфологічні зміни в серці зумовлені ендотеліальною дисфункцією. Придушення експресії VEGF-B призводить до мітохондріальної дисфункції, метаболічних розладів і підвищеного ризику розвитку серцевої недостатності [514].

Можливою причиною пригнічення експресії мРНК VEGF-B при ПГ може бути надмір АФК [515]. Преклінічні дослідження продемонстрували терапевтичний потенціал VEGF-B для реваскуляризації ішемічного міокарда шляхом модуляції проліферації та міграції ендотеліальних клітин [516]. Встановлено, що VEGF-B переважно взаємодіє з Flt-1 (рецептором фактору росту судинного ендотелію) та sFlt-1 (розчинним рецептором фактору росту судинного ендотелію-2) і інгібує судинно-ендотеліальну дисфункцію при прееклампсії. Введення рекомбінантної підготовки VEGF-B у гризунів з експериментальною

пreeкламписією відновило ангіогенне середовище в плазмі, нормалізувало кров'яний тиск і зменшило тяжкість ішемії [517].

VEGF є привабливою мішенню для наших модуляторів NO (L-аргінін, тіотриазолін та ангіолін), оскільки описано механістичне регулювання експресії VEGF, що залежить від NO [518]. Зниження експресії основних антиоксидантів, яке було виявлено в дослідженні через підвищення рівня нітротирозину в міокарді 1- та 2-місячних щурів після ПГ, вказує на значну активацію окислювального стресу після ПГ. Окислювальний стрес в серці та судинах плоду лежить в основі механізму, за допомогою якого ПГ програмиє серцево-судинну патологію та ендотеліальну дисфункцію в майбутньому [252].

Наше поточне дослідження та раніше опубліковані результати не суперечать роботам інших дослідників, які показали, що ПГ сприяло потовщенню аорти з підвищенням забарвлення нітротирозином, підвищенням експресії кардіального HSP70, а також значним порушенням NO-залежної релаксації в артеріях і підвищенням скорочувальної функції міокарда з симпатичним домінуванням [33].

GPX-4 є найбільш важливим для клітинного захисту під час окислювального стресу, безпосередньо знижуючи гідропероксиди фосфоліпідів, навіть коли вони вбудовуються в мембрани та ліпопротеїни. GPX-4 також може відновлювати гідропероксид жирної кислоти, холестероловий гідропероксид та гідропероксид тиміну. Він відіграє ключову роль у захисті клітин від окислювального пошкодження, запобігаючи пероксидному окисненню мембранних ліпідів. GPX-4 необхідний для запобігання загибелі клітин через фероптоз — неапоптозну загибель клітин, що виникає через накопичення ліпідних реактивних кисневих видів, залежних від заліза [268,369]. GPx-4 необхідний для запобігання загибелі мітохондріальних клітин, спричиненої зниженням гідропероксидів кардіоліпінів. GPx-4 бере участь у безпосередній детоксикації ліпідних пероксидів в клітинній мембрані та є інгібітором фероптозу, індукованого ліпідним пероксидуванням. Цитозольна ізоформа GPx-4 відіграє ключову роль в інгібуванні фероптозу в соматичних клітинах, в той час як мітохондріальна ізоформа GPx-4 (mGPx4) може знижувати ризик мітохондріальної дисфункції [270]. Вперше було виявлено, що

ПГ може призводити до фероптозу в клітинах людського трофобласту, що може спричинити викидень. Це підкреслює важливість GPX-4 [271].

GPx-1 — це внутрішньоклітинний антиоксидантний фермент, який каталізує розщеплення H_2O_2 до H_2O та O_2 , обмежуючи його шкідливі ефекти, а також регулює H_2O_2 -залежні сигнальні механізми, опосередковані факторами росту, мітохондріальною функцією та підтриманням нормального тиолового редокс-стану. Наші результати вказують на те, що зниження експресії GPx-1 в серці щурів після ПГ може бути пов'язане з надлишком цитотоксичних форм NO на фоні високої експресії iNOS. GPx-1 відіграє важливу роль у підтриманні ендотеліальної функції та біодоступності NO [272]. Дефіцит GPx-1 призводить до вираженого вазоконстрикційного ефекту та формує ендотеліальну дисфункцію [273].

СОД загалом класифікуються на чотири групи: мангановий СОД (MnSOD), мідно-цинковий СОД (Cu/ZnSOD), залізний СОД (FeSOD) та нікелевий СОД (NiSOD). Cu/ZnSOD та MnSOD локалізуються в цитоплазмі, служать основними радикало-поглинальними ферментами в клітинному середовищі та привертають багато уваги завдяки своїй фізіологічній функції та терапевтичному потенціалу [274]. Наші дослідження, що показують низьку концентрацію Cu/ZnSOD в цитозолі щурів після ПГ, підтримуються іншими дослідженнями, які демонструють, що ПГ знижує експресію Cu/ZnSOD як на транскрипційному, так і на посттрансляційному рівнях. Крім того, ПГ знижує активність Cu/ZnSOD і може бути причиною наступних серцево-судинних захворювань [275] та ендотеліальної дисфункції [276]. Є значні докази зв'язку між зниженими рівнями активності антиоксидантних ферментів та виникненням несприятливих наслідків вагітності, оскільки окислювальний стрес має шкідливий вплив на фізіологію матері, вагітність та розвиток плоду, погіршуючи функцію плаценти та порушуючи доставку кисню та поживних речовин розвиваючомуся плоду, сприяючи серцево-судинним розладам, зокрема кардіоміопатії та ендотеліальній дисфункції [277].

Позитивні модульовані засоби NO, збільшуючи фізіологічні концентрації даного месенджера, беруть участь у механізмах S-нітрозилювання залишку

цистеїну та регулюють посттрансляційні модифікації різних білків, включаючи eNOS [519]. Усе це дозволяє обґрунтувати використання позитивних модулаторів NO в експериментальній терапії серцево-судинних ускладнень після ПГ. Фармакологічні агенти, що підвищують рівень оксиду азоту (NO) та розширюють його активність, можуть стимулювати NO-залежні механізми, що беруть участь у рості ендотелію. Ці агенти регулюють експресію білків сімейства VEGF, включаючи фактор росту плаценти (PGF), ангіопоедини (ANG-1 і ANG-2) та їхні розчинні рецептори (sFLT-1 і sTIE-2). Крім того, вони сприяють NO-залежному вираженню проангіогенних факторів, таких як VEGF-A, кардіопротекторний VEGF-B та PGF, водночас знижуючи NO-залежне вираження молекул адгезії ендотелію та провоспалювальних цитокінів. Найбільшу активність у цьому дослідженні продемонстрував ангіолін (S)-2,6-діаміногексаноїва кислота 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат, що має властивості зв'язування NO, в якому беруть участь фрагменти хімічної структури молекули. Ангіолін може формувати нітротіоли та збільшувати біодоступність NO. Взаємодії між молекулою ангіоліну та NO можуть здійснюватися шляхом електронного переносу від вищезаповненого молекулярного орбіталю «спінової пастки» до нижнього незаповненого молекулярного орбіталю радикалу азотного монооксиду для формування більш стабільного комплексного сполучення.

Ангіолін нормалізує експресію eNOS/iNOS. У дослідженнях на моделі церебральної ішемії у щурів також була продемонстрована ендотеліопротекторна активність ангіоліну, а саме: збільшення щільності ендотеліоцитів судин м'язового типу та мікроциркуляторних каналів, збільшення щільності проліферуючих ендотеліоцитів та підвищення експресії VEGF і коефіцієнта зв'язування рецепторів [256,453]. Існують свідчення, що VEGF посилює регуляцію ферменту eNOS і індукує двохетапну стимуляцію продукції NO в ендотелію [454]; це вказує на можливе VEGF-опосередковане вираження eNOS під дією ангіоліну. Ангіолін може впливати на експресію ендотеліотропних факторів та антиоксидантних компонентів через вплив на тіолово-дисульфідну систему, збільшуючи рівень глутатіону та регулюючи посттрансляційні механізми. Є дані про позитивний

вплив на активність Cu/ZnSOD, GPX1 та GPX4 в цитозолі міокарда та головного мозку щурів під час кардіальної або церебральної ішемії. Це може бути пов'язано з пригніченням NO-залежних механізмів подавлення експресії цих ферментів [256,398].

Тіотриазолін, препарат, зареєстрований у багатьох країнах як метаболітропний кардіопротектор, також має властивості зв'язувати NO, але проявляє більш помірні ефекти на експресію eNOS у кардіоцитах за умов ішемії міокарда. Тіотриазолін може збільшувати ендотеліопротекторні властивості L-аргініну шляхом збільшення біодоступності NO. Тіотриазолін збільшує біодоступність NO, запобігаючи його взаємодії з АФК і перетворенню в пероксинітрит. Ця захист реалізується завдяки співзберіганню відновлених тіолів. Тіотриазолін сам по собі може бути носієм NO, формуючи стабільні S-нітрозильні комплекси з ним. Тіотриазолін інактивує АФК завдяки сильним відновлювальним властивостям тіолової групи. Регулюючи рівень АФК, тіотриазолін може запобігати інактивації ферментів, включаючи eNOS, а також впливати на редокс-залежні механізми регуляції експресії генів (рис. 4.3.1) [350,520]. Тіотриазолін проявляє антиоксидантні властивості; в численних дослідженнях встановлено його здатність знижувати утворення кінцевих продуктів окислювального та нітрозативного стресу та підвищувати активність Cu/ZnSOD, GPX1 і GPX4 в печінці, серці та мозку тварин з різними експериментальними патологіями [398].

Тіотриазолін запобігає окисненню цистеїну та утворенню цистеїнової сульфоксидної форми, а також пригнічує утворення нітротирозину. Завдяки цьому тіотриазолін перешкоджає незворотній інактивації транскрипційного фактора NF-карра В, захищаючи чутливі до АФК залишки цистеїну — Cys 252, Cys 154 та Cys 61 — у його ДНК-зв'язувальних доменах. Крім того, тіотриазолін може брати участь у відновленні цих груп під час зворотної інактивації, виконуючи роль Redox Factor-1. Пригнічуючи окиснювальну інактивацію транскрипційного фактора NF-карра В в умовах надлишку АФК, тіотриазолін, ймовірно, сприяє активації експресії генів, чутливих до редокс-змін, що необхідна для захисту клітин від токсичної дії оксидативного стресу. До таких генів належать, зокрема,

гени, відповідальні за синтез супероксиддисмутази.

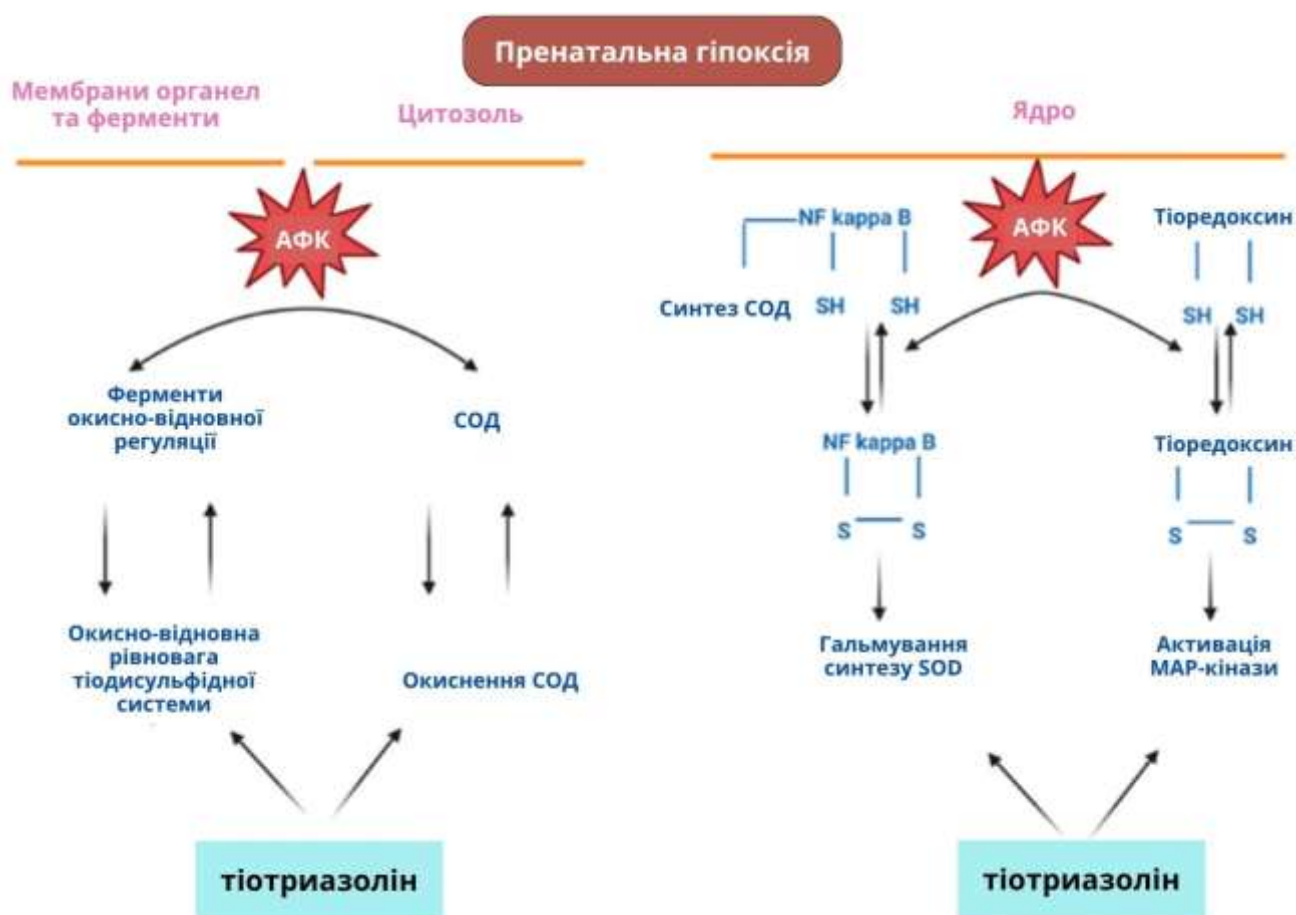


Рис. 4.3.1. Вплив тіотриазоліну на редокс-залежні механізми експресії генів.
Рисунок створено авторкою.

Було вивчено захисний вплив тіотриазоліну на сульфгідрильні групи цистеїнових і метіонінових фрагментів білкових молекул. Тіотриазолін конкурує з цими структурами за супероксидний радикал, тим самим запобігаючи як зворотним, так і незворотним модифікаціям. Пригнічуючи зворотні модифікації, він перешкоджає утворенню дисульфідних зв'язків (-S-S-) у цистеїнових ділянках. Ще більш значущим з точки зору ефективності є вплив тіотриазоліну на незворотні модифікації сульфгідрильних груп білкових молекул під впливом АФК. Тіотриазолін пригнічує утворення незворотних сульфоксидів та сульфонових груп у білках, які в подальшому піддаються окисненню. Впливаючи на незворотну окиснювальну модифікацію сульфгідрильних груп у цистеїнових

фрагментах білкових молекул, тіотриазолін нормалізує зсуви редокс-регуляції в умовах оксидативного стресу. Передусім тіотриазолін запобігає порушенню рівноваги тіол-дисульфідної системи в умовах гіперпродукції АФК, забезпечуючи такі важливі функції, як передача клітинного сигналу через рецепторно-іонні канальні комплекси, підтримання активності білків, ферментів і транскрипційних факторів, а також збереження цілісності клітинних мембран.

Мілдронат (3-(2,2,2,2-триметилгідазин) пропіонат) оборотно блокує гамма-бутиробетаїн гідроксилазу, яка каталізує перетворення гамма-бутиробетаїну в карнітин, і тим самим значно пригнічує вхід карнітину, який забезпечує транспортування жирних кислот через мембрану в клітини м'язової тканини. Цей ефект мілдронату супроводжується зниженням карнітинозалежного окислення вільних жирних кислот, і, відповідно, призводить до активації окислення глюкози, що є більш економним в умовах ішемії. Важливою особливістю дії мілдронату, яка відрізняє його від інших препаратів, що впливають на метаболізм міокарда, є відсутність накопичення недоокислених жирних кислот у мітохондріях, що збільшує вироблення NO [436]. Ендотеліопротекторний ефект мілдронату не був встановлений в результатах наших досліджень та цього дослідження. Курс введення мілдронату щурам після ПГ призвів до підвищення експресії різних форм глутатіонпероксидази, що узгоджується з іншими дослідженнями щодо його антиоксидантної активності [256,470].

Однак цього недостатньо для досягнення захисного ефекту на серцево-судинну систему. У цьому дослідженні ми не спостерігали значного позитивного ефекту мілдронату на параметри системи NO в міокарді тварин, які перенесли ПГ. L-аргінін є загальним субстратом для NO і поліамінів (путресцину, сперміну та спермідину). NO та поліаміни відіграють важливу роль у репродукції, ембріогенезі, зниженні неонатальної смертності та ембріональному ангіогенезі. NO регулює експресію генів та синтез білків, сприяє проліферації, росту та диференціації тканин плоду [474]. На даний момент тривають дослідження, і вже отримано початкові результати щодо використання L-аргініну в неонатології як гіпоксичного і ендотелієспецифічного агента [475]. Ймовірно, NO, утворене з

введеного L-аргініну, стає мішенню для АФК у контексті дефіциту тіолових сполук, тим самим не здійснюючи захисного ефекту [474]. Виявлено певний позитивний ефект L-аргініну на молекулярні показники ендотеліальної дисфункції в серці щурів після ПГ. Слабший ефект L-аргініну порівняно з ангіоліном та тіотриазоліном можна пояснити з погляду тривалості життя NO за умов ішемії та гіпоксії, що супроводжуються окислювальним стресом (рис. 4.3.2). «Новонароджений» NO негайно ризикує бути «покусаним» супероксидрадикалами [256,476] і перетворитися на зловісний пероксинітрит. Тільки комбінації L-аргініну з донорами SH-груп або антиоксидантами можуть підвищити його NO-модулюючу активність [520].

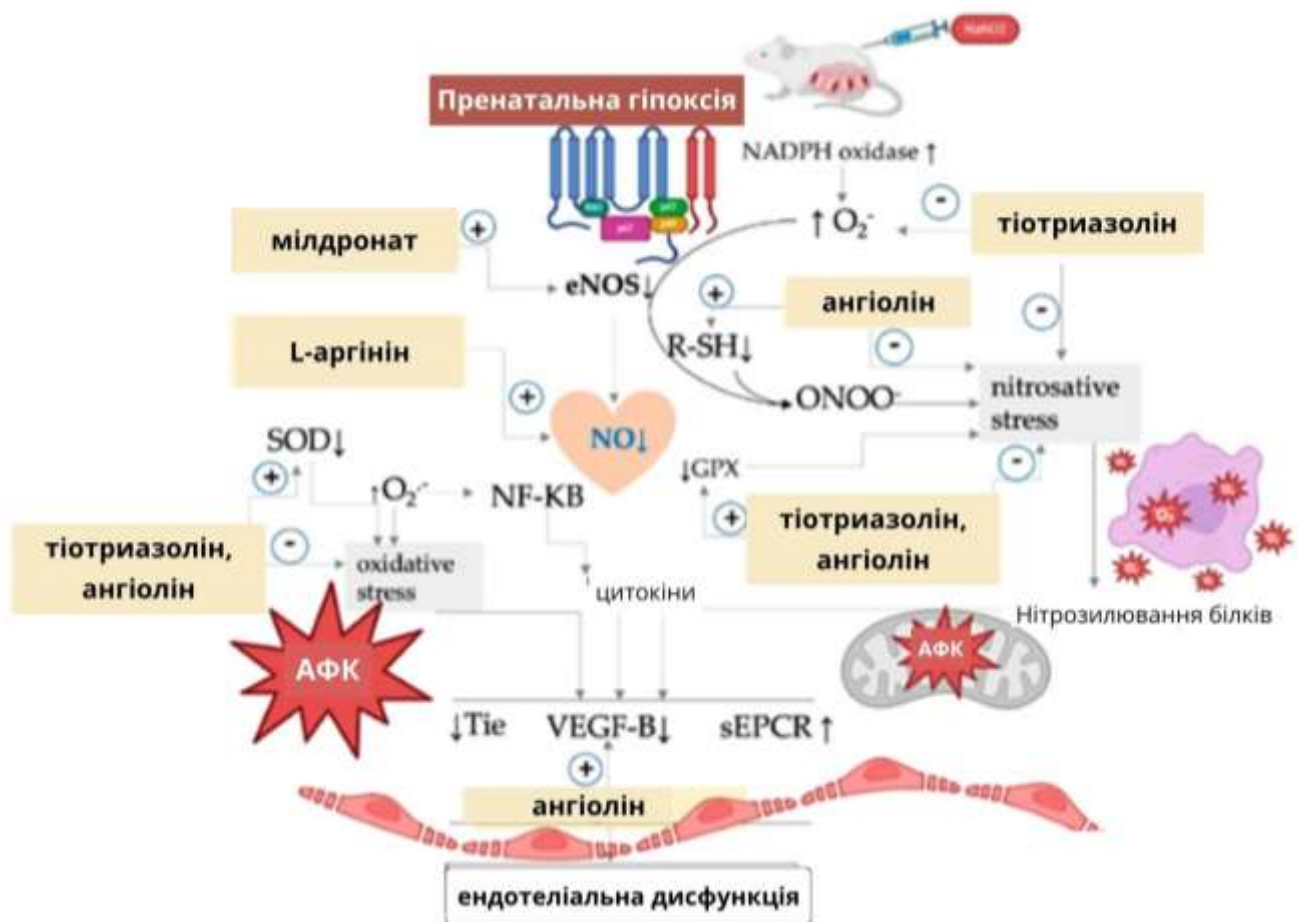


Рис. 4.3.2. Схема механізму ендотеліопротекторної дії модулюючих агентів системи NO — аргініну, мілдронату, тіотриазоліну та ангіоліну. Рисунок створено авторкою за допомогою BioRender та узагальнює підрозділ.

Результати дослідження обґрунтовують доцільність застосування модулюючих агентів системи оксиду азоту (NO) у міокарді — ангіоліну ((S)-2,6-діаміно-гексанової кислоти 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетату), тіотриазоліну (морфоліно-тіазолату), мілдронату та L-аргініну — які мають різні механізми дії на концентрацію NO після ПГ. Регулюючи рівень NO у міокарді різними шляхами, можна перервати NO-залежні механізми ендотеліальної дисфункції та кардіодеструкції після ПГ. Показано, що фармакологічний рівень NO та його біодоступність можуть бути підвищені за рахунок: стимуляції синтезу NO, наприклад, шляхом терапії субстратом eNOS — L-аргініном, а також кофактором eNOS — мілдронатом; прямого захисту NO та навіть білка eNOS від впливу АФК за допомогою тіолвмісних антиоксидантів, таких як тіотриазолін та ангіолін.

Продемонстровано, що всі досліджені модулі NO-системи здатні впливати на маркери ендотеліальної дисфункції в міокарді після ПГ, хоча й у різному ступені. Помірний ефект було виявлено у L-аргініну та мілдронату, що пов'язано з швидкою втратою ендогенного NO в умовах оксидативного стресу та низьким рівнем антиоксидантного захисту в міокарді після ПГ.

Особливо перспективними в плані ефективності виявились тіотриазолін та ангіолін, які захищали NO від АФК, підвищували його біодоступність, подовжували період напіврозпаду та оптимізували його використання різними клітинними системами, спрямованими на подолання ендотеліальної дисфункції. Вони також захищали eNOS від окиснювальної модифікації та втрати активності. Тіотриазолін та, особливо, ангіолін проявляли як прямий (через утворення комплексів), так і непрямий (через підвищення експресії супероксиддисмутази, SOD) захисний ефект щодо NO від АФК. Через NO-залежний механізм дії ангіолін і тіотриазолін сприяли збільшенню ядерної щільності ендотеліальних клітин у судинах міокарда, нормалізували експресію маркерних білків, таких як sEPCR, Tie-2 та VEGF, і посилювали антиоксидантний захист.

Резюме

Внутрішньоутробна гіпоксія викликає стійкі порушення нітроксидергічної системи серця у щурів, що проявляється зниженням експресії eNOS, підвищенням iNOS, зниженням біодоступності NO та активацією нітрозативного стресу.

Порушення супроводжуються підвищенням маркерів ремоделювання міокарда ST2, зниженням HSP70 та HIF-1, що знижує про підвищений ризик розвитку серцевої недостатності та фіброзу.

Застосування ангіоліну, тіотриазоліну та L-аргініну сприяє відновленню експресії eNOS, зниженню iNOS, підвищенню біодоступності NO, зниженню ST2, нітротирозину, а також підвищенню HSP70 та HIF-1, що забезпечує виражений кардіопротекторний ефект.

Ангіолін продемонстрував найсильніший і тривалий кардіопротекторний вплив, зберігаючи позитивний ефект навіть через місяць після відміни препарату. Тіотриазолін і L-аргінін також проявили значну ефективність, знижуючи окислювальний стрес та покращуючи функціональні показники серця. Мілдронат має більший кардіопротекторний ефект, але всі інші препарати впливають на антиоксидантний статус та біодоступність NO.

Матеріали даного розділу відображені в наступних публікаціях:

1. Попазова О. О. Особливості порушень у нітроксидергічній системі міокарду щурів після внутрішньоутробної гіпоксії. Збірник тез доповідей 82 науково-практичної конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2022» (Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, 17 травня 2022 р.). – Запоріжжя: ЗДМУ, 2022. – с. 77.

2. Popazova O., Belenichev I., Bukhtiyarova N., Ryzhenko V., Oksenyich V., Kamyshnyi A. Cardioprotective Activity of Pharmacological Agents Affecting NO Production and Bioavailability in the Early Postnatal Period after Intrauterine Hypoxia

in Rats. Друк. Biomedicines 2023, 11, 2854. 155
<https://doi.org/10.3390/biomedicines11102854>. Scopus Q1. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, експериментальні дослідження, обговорення результатів та підготовку тексту статті до друку).*

3. Popazova, O., Belenichev, I., Yadlovskiy, O., Oksenych, V., Kamyshnyi, A. Altered blood molecular markers of cardiovascular function in rats after intrauterine hypoxia and drug therapy. Current Issues in Molecular Biology, 2023, 45(11), 8704–8715. <https://doi.org/10.3390/cimb45110547>. Scopus Q2. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, експериментальні дослідження, обговорення результатів та підготовку тексту статті до друку).*

4. Popazova O. O. Disruption of cardiac bioelectrical activity after intrauterine hypoxia and approaches to cardioprotection in the postnatal period. Збірник тез доповідей 84 науково-практичної конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2024» (Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, м. Запоріжжя, 23-24 травня 2024 р.). – Запоріжжя: ЗДМФУ, 2024, с.125. (найкраща доповідь)

5. Попазова О. О., Беленічев І.Ф., Ядловський О.Є. Вплив модуляторів системи оксиду азоту на порушення серцево-судинної системи у щурів після пренатальної гіпоксії. Актуальні питання фармакології та лікарської токсикології: матеріали науково-практичної конференції молодих вчених із міжнародною участю (№137), вересень 2024, м. Київ.

6. Popazova O. O. Development of approaches to pharmacological correction of endothelial dysfunction in newborns after prenatal hypoxia: Focus on NO system modulators. Збірник тез доповідей 85 науково-практичної конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2025» (Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, м. Запоріжжя, 15-16 травня 2025 р.). – Запоріжжя: ЗДМФУ, 2025, с 231. (найкраща доповідь).

7. Belenichev, I., Popazova, O., Yadlovskiy, O., Bukhtiyarova, N., Ryzhenko, V., Pavlov, S., Oksenych, V., Kamyshnyi, O. Possibility of using NO modulators for pharmacocorrection of endothelial dysfunction after prenatal hypoxia. *Pharmaceuticals*, 2025, 18(1), 106. <https://doi.org/10.3390/ph18010106>. Scopus Q1. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, експериментальні дослідження, обговорення результатів та підготовку тексту статті до друку).*

ВИСНОВКИ

1. Курсове призначення модуляторів системи оксиду азоту — ангіоліну (50 мг/кг), тіотриазоліну (50 мг/кг), мілдронату (100 мг/кг) та L-аргініну (200 мг/кг) — тваринам, що перенесли пренатальну гіпоксію, упродовж 30 діб одразу після народження сприяло нормалізації показників ЕКГ у 2-місячних щурят. Найбільш виражену ефективність продемонстрував ангіолін, який нормалізував серцевий ритм, відновлював нейрогенну регуляцію синусового вузла, знижував варіабельність ритму до контрольного рівня, покращував параметри електричної систоли (зниження Rarea на 20% при нормалізації normR-Iso) та зменшував рівень маркера ушкодження серця ST2 на 77% ($p \leq 0,05$) порівняно з контрольною групою.

2. Курсове призначення ангіоліну, тіотриазоліну, мілдронату та L-аргініну тваринам після пренатальної гіпоксії сприяло покращенню стану нітроксидергічної системи міокарда у 1- та 2-місячному віці. Найактивнішим виявився ангіолін: рівень eNOS у серці підвищився у 2,9 раза ($p \leq 0,05$), експресія мРНК eNOS — у 32 рази ($p \leq 0,05$), рівень стабільних метаболітів NO зріс на 81% ($p \leq 0,05$), при цьому рівень iNOS знизився на 50,4%, а нітротирозину — на 60% порівняно з контролем ($p \leq 0,05$).

3. Призначення ангіоліну, тіотриазоліну, мілдронату та L-аргініну після пренатальної гіпоксії сприяло зростанню експресії антиоксидантних ферментів та чинників ендогенної цитопротекції. Найбільш виражений ефект спостерігався при застосуванні ангіоліну: достовірно зростали рівні Cu/ZnSOD на 25,5% і 41,2%, GPX1 на 92,8% і 130,1%, GPX4 на 83,6% і 105,8% у місячних і двомісячних тварин відповідно порівняно з контрольною групою ($p \leq 0,05$). Ангіолін також достовірно підвищував експресію HSP70 у 2 рази та у 1,84 раза відповідно, а експресію мРНК HIF-1 у серці щурів після внутрішньоутробної гіпоксії — у 23 рази в 1-місячних і в 8,2 рази в 2-місячних тварин ($p \leq 0,05$).

4. Призначення модуляторів ангіоліну, тіотриазоліну, мілдронат та L-аргініну після пренатальної гіпоксії у різному ступені сприяло зниженню маркерів ендотеліальної дисфункції та покращенню морфометричних характеристик

ендотеліоцитів судин міокарда у щурят 1- та 2-місячного віку. Найефективнішим було застосування ангіоліну, що зумовлювало зниження sEPCR на 53,3%, підвищення Tie-2 на 62,8% та VEGF-B — на 67,0%. Експресія мРНК VEGF та VEGF-B зросла у 6,2 та 19 разів відповідно, а площа ядер ендотеліоцитів також суттєво зросла ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контрольною групою.

5. Отримані результати експериментально підтверджують ефективність застосування тіотриазоліну, мілдронату, L-аргініну та, особливо, ангіоліну як засобів кардіопротекції після пренатальної гіпоксії, дія яких спрямована на відновлення нітроксидергічної системи міокарда та нормалізацію NO-залежних механізмів регуляції серцево-судинної системи.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Patterson, A.J.; Zhang, L. Hypoxia and fetal heart development. *Curr Mol Med.* **2010**, 10(7):653-66. doi: 10.2174/156652410792630643.
2. Ream, M.; Ray, A.M.; Chandra, R.; Chikaraishi, D.M. Early fetal hypoxia leads to growth restriction and myocardial thinning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **2008**, 295(2):R583-95. doi: 10.1152/ajpregu.00771.2007.
3. Thompson, L.P. Effects of chronic hypoxia on fetal coronary responses. *High Alt Med Biol.* **2003**, 4(2):215-24. doi: 10.1089/152702903322022811.
4. Zhang, L. Prenatal hypoxia and cardiac programming. *J Soc Gynecol Investig.* **2005**, Jan;12(1):2-13. doi: 10.1016/j.jsig.2004.09.004.
5. Нарохан, М.В.; Баженова, Л.К.; Капранова, Є.І.; Мельникова, Є.В.; Белоусова, Н.А. Післягіпоксична дисфункція серцево-судинної системи у новонароджених. *Актуальні проблеми педіатрії.* **2007**, 6:42–46.
6. Zhao, Y.; Xiong, W.; Li, C. *et al.* Hypoxia-induced signaling in the cardiovascular system: pathogenesis and therapeutic targets. *Sig Transduct Target Ther.* **2023**, (8) 431. doi: 10.1038/s41392-023-01652-9.
7. Lazzarin, T.; Tonon, C.R.; Martins, D.; Fávero, E.L.Jr.; Baumgratz, T.D. *et al.* Post-Cardiac Arrest: Mechanisms, Management, and Future Perspectives. *J Clin Med.* **2022**, 12(1):259. doi: 10.3390/jcm12010259.
8. Lucero García Rojas, E.Y.; Villanueva, C.; Bond, R.A. Hypoxia Inducible Factors as Central Players in the Pathogenesis and Pathophysiology of Cardiovascular Diseases. *Front. Cardiovasc. Med.* **2021**, 8:709509. doi: 10.3389/fcvm.2021.709509.
9. Sun, R.; Liu, M.; Lu, L.; Zheng, Y.; Zhang, P. Congenital Heart Disease: Causes, Diagnosis, Symptoms, and Treatments. *Cell Biochem Biophys.* **2015**, 72(3):857-60. doi: 10.1007/s12013-015-0551-6.
10. Chlif, M.; Ammar, M.M.; Said, N.B.; Sergey, L.; Ahmaidi, S.; Alassery, F.; Hamam, H. Mechanism of Dyspnea during Exercise in Children with Corrected Congenital Heart Disease. *Int J Environ Res Public Health.* **2021**, 19(1):99. doi: 10.3390/ijerph19010099.

11. Belenichev, I.; Popazova, O.; Bukhtiyarova, N.; Savchenko, D.; Oksenysh, V.; Kamyshnyi, O. Modulating Nitric Oxide: Implications for Cytotoxicity and Cytoprotection. *Antioxidants (Basel)*. **2024**, Apr 23;13(5):504. doi: 10.3390/antiox13050504.
12. Sun, H.J.; Wu, Z.Y.; Nie, X.W.; Bian, J.S. Role of Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Link Between Inflammation and Hydrogen Sulfide. *Front Pharmacol*. **2020**, Jan 21;10:1568. doi: 10.3389/fphar.2019.01568.
13. Bhutta, B.S.; Alghoula, F.; Berim, I. Hypoxia. [Updated 2024 Mar 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): *StatPearls Publishing*; **2025**, Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482316>.
14. Okada, Y.; Paton, J.F.R.; López-Barneo, J.; Wilson, R.J.A.; Marina, N.; Pokorski, M. Editorial: Hypoxia and Cardiorespiratory Control. *Front. Physiol*. **2021**, 12:820815. doi: 10.3389/fphys.2021.820815.
15. Belenichev, I.F.; Bak, P.G.; Popazova, O.O.; Bukhtiyarova, N.V.; Yadlovsky, O.E. Nitric oxide-dependent mechanism of endothelial dysfunction formation is a promising target link for pharmacological management Biopolym. *Cell*. **2022**, 38(3):145-157. doi: 10.7124/bc.000A79.
16. Belenichev, I.; Kucherenko, L.; Pavlov, S.; Bukhtiyarova, N.; Popazova, O.; Derevianko, N.; Nimenko, G. Therapy of post-COVID-19 syndrome: improving the efficiency and safety of basic metabolic drug treatment with tiazotic acid (thiotriazoline). *Pharmacia* **2022**, 69(2): 509-516. doi: 10.3897/pharmacia.69.e82596.
17. Kiani, A.K.; Bonetti, G.; Medori, M.C.; Caruso, P.; Manganotti, P.; Fioretti, F.; Nodari, S.; Connelly, S.T.; Bertelli, M. Dietary supplements for improving nitric-oxide synthesis. *J Prev Med Hyg*. **2022**, Oct 17;63(2 Suppl 3):E239-E245. doi: 10.15167/2421-4248/jpmh2022.63.2S3.2766.
18. Bryan, N.S. Nitric oxide enhancement strategies. *Future Sci OA*. **2015**, Aug 1;1(1):FSO48. doi: 10.4155/FSO.15.48.
19. Ignarro, L.J.; Napoli, C.; Loscalzo, J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. *Circ Res*. **2002**, Jan 11;90(1):21-8. doi: 10.1161/hh0102.102330.

20. Gando-y-Fieiras, N.; Gonzalez-Juanatey, J.R.; Eiras, S. Myocardium Metabolism in Physiological and Pathophysiological States: Implications of Epicardial Adipose Tissue and Potential Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* **2020**, Apr 10;21(7):2641. doi: 10.3390/ijms21072641.
21. Leone, A. Morphology of coronary arteries in relation to ischemic heart disease. *J Cardiol Curr Res.* **2021**, 14(2):27-32. doi: 10.15406/jccr.2021.14.00504.
22. Peng, X.; Du, J.; Wang, Y. Metabolic signatures in post-myocardial infarction heart failure, including insights into prediction, intervention, and prognosis. *Biomed Pharmacother.* **2024**, Jan;170:116079. doi: 10.1016/j.biopha.2023.116079.
23. Sutovska, H.; Babarikova, K.; Zeman, M.; Molcan, L. Prenatal Hypoxia Affects Foetal Cardiovascular Regulatory Mechanisms in a Sex- and Circadian-Dependent Manner: A Review. *Int J Mol Sci.* **2022**, Mar 7;23(5):2885. doi: 10.3390/ijms23052885.
24. Frasch, M.G.; Giussani, D.A. Impact of Chronic Fetal Hypoxia and Inflammation on Cardiac Pacemaker Cell Development. *Cells* **2020**, 9, 733. doi: 10.3390/cells9030733.
25. Wang, B.; Zeng, H.; Liu, J.; Sun, M. Effects of Prenatal Hypoxia on Nervous System Development and Related Diseases. *Front. Neurosci.* **2021**, 15:755554. doi: 10.3389/fnins.2021.755554.
26. Hula, N.; Liu, R.; Spaans, F.; Pasha, M.; Quon, A.; Kirschenman, R.; Cooke, C.-L.M.; Davidge, S.T. The Long-Term Effects of Prenatal Hypoxia on Coronary Artery Function of the Male and Female Offspring. *Biomedicines* **2022**, 10, 3019. doi: 10.3390/biomedicines10123019
27. Salameh, A.; Zöbisch, H.; Schröder, B.; Vigelahn, J.; Jahn, M.; Abraham, G.; Seeger, J.; Dähnert, I.; Dhein, S. Effects of Hypoxia and Acidosis on Cardiac Electrophysiology and Hemodynamics. Is NHE-Inhibition by Cariporide Still Advantageous? *Front Physiol.* **2020**, Mar 19;11:224. doi: 10.3389/fphys.2020.00224.
28. Neubert, E.; Rassler, B.; Hoschke, A.; Raffort, C.; Salameh, A. Effects of Normobaric Hypoxia and Adrenergic Blockade over 72 h on Cardiac Function in Rats. *Int J Mol Sci.* **2023**, Jul 13;24(14):11417. doi: 10.3390/ijms241411417. Erratum in: *Int J Mol Sci.* **2024**, Aug 01;25(15):8408. doi: 10.3390/ijms25158408.

29. Takahashi, C.; Hinson, H.E.; Baguley, I.J. Autonomic dysfunction syndromes after acute brain injury. *Handb Clin Neurol.* **2015**, 128:539-51. doi: 10.1016/B978-0-444-63521-1.00034-0.
30. Mehra, R.; Tjurmina, O.A.; Ajijola, O.A.; Arora, R.; Bolser, D.C.; Chapleau, M.W.; Chen, P.S. et al. Opportunities in Autonomic Neural Mechanisms of Cardiopulmonary Regulation: A Report From the National Heart, Lung, and Blood Institute and the National Institutes of Health Office of the Director Workshop. *JACC Basic Transl Sci.* **2022**, Jan 26;7(3):265-293. doi: 10.1016/j.jacbts.2021.11.003.
31. Grune, J.; Yamazoe, M.; Nahrendorf, M. Electroimmunology and cardiac arrhythmia. *Nat Rev Cardiol.* **2021**, Aug;18(8):547-564. doi: 10.1038/s41569-021-00520-9.
32. Dwyer, K.D.; Snyder, C.A.; Coulombe, K.L.K. Cardiomyocytes in Hypoxia: Cellular Responses and Implications for Cell-Based Cardiac Regenerative Therapies. *Bioengineering* **2025**, 12, 154. doi: 10.3390/bioengineering12020154.
33. Giussani, D.A.; Camm, E.J.; Niu, Y.; Richter, H.G.; Blanco, C.E.; Gottschalk, R.; et al. Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress. *PLoS ONE* **2012**, 7(2):e31017. doi: 10.1371/journal.pone.0031017.
34. Hutter, D.; Kingdom, J.; Jaeggi, E. Causes and mechanisms of intrauterine hypoxia and its impact on the fetal cardiovascular system: a review. *Int J Pediatr.* **2010**, 2010:401323. DOI: 10.1155/2010/401323;
35. Nerheim, P.; Krishnan, S.C.; Olshansky, B.; Shivkumar, K. Apoptosis in the genesis of cardiac rhythm disorders. *Cardiol Clin.* **2001**, 19(1):155-63. doi: 10.1016/s0733-8651(05)70201-0.
36. Lipshultz, S.E.; Law, Y.M.; Asante-Korang, A.; Austin, E.D.; Dipchand, A.I.; Everitt, M.D.; Hsu, D.T.; Lin, K.Y.; Price, J.F.; Wilkinson, J.D.; Colan, S.D. Cardiomyopathy in Children: Classification and Diagnosis: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* **2019**, 140(1):e9-e68. doi: 10.1161/CIR.0000000000000682.
37. Luan, Y.; Zhu, X.; Jiao, Y. et al. Cardiac cell senescence: molecular mechanisms, key proteins and therapeutic targets. *Cell Death Discov.* **2024**, 10, 78. doi: 10.1038/s41420-023-01792-5.

38. Sisakian, H. Cardiomyopathies: Evolution of pathogenesis concepts and potential for new therapies. *World J Cardiol.* **2014**, 6(6):478-94. doi: 10.4330/wjc.v6.i6.478.
39. Frangogiannis, N.G. Cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res.* **2021**, May 25;117(6):1450-1488. doi: 10.1093/cvr/cvaa324.
40. Yamada, T.; Nomura, S. Recent Findings Related to Cardiomyopathy and Genetics. *Int J Mol Sci.* **2021**, Nov 20;22(22):12522. doi: 10.3390/ijms222212522.
41. Ahluwalia, M.; Kpodonu, J.; Agu, E. Risk Stratification in Hypertrophic Cardiomyopathy: Leveraging Artificial Intelligence to Provide Guidance in the Future. *JACC Adv.* **2023**, Aug 14;2(7):100562. doi: 10.1016/j.jacadv.2023.100562.
42. Ducsay, C.A.; Goyal, R.; Pearce, W.J.; Wilson, S.; Hu, X.Q.; Zhang, L. Gestational Hypoxia and Developmental Plasticity. *Physiol Rev.* **2018**, 98(3):1241-1334. doi: 10.1152/physrev.00043.2017.
43. McCartan, C.; Mason, R.; Jayasinghe, S.R.; Griffiths, L.R. Cardiomyopathy classification: ongoing debate in the genomics era. *Biochem Res Int.* **2012**, 2012:796926. doi: 10.1155/2012/796926.
44. Oh, K.S.; Bender, T.M.; Bowen, A.; Godine, L.; Park, S.C. Transient myocardial ischemia of the newborn infant. *Pediatr Radiol.* **1985**, 15(1):29-33. doi: 10.1007/BF02387849.
45. Flores-Nava, G.; Echevarría-Ybargüengoitia, J.L.; Navarro-Barrón, J.L.; García-Alonso, A. Isquemia miocárdica transitoria en el recién nacido con asfíxia perinatal (miocardiopatía hipóxica) [Transient myocardial ischemia in newborn babies with perinatal asphyxia (hypoxic cardiomyopathy)]. *Bol Med Hosp Infant Mex.* **1990**, 47(12):809-14. Spanish. PMID: 2098033.
46. Posthypoxic myocardial ischemia in newborn: diagnosis and treatment of severe type. *Anesteziol Reanimatol.* **2012**, (1):65-8. Russian. PMID: 22702162.
47. Ovali, F. Hemodynamic changes and evaluation during hypoxic-ischemic encephalopathy and therapeutic hypothermia. *Early Hum Dev.* **2022**, Apr;167:105563. doi: 10.1016/j.earlhumdev.

48. Davey, B.; Szwast, A.; Rychik, J. Diagnosis and management of heart failure in the fetus. *Minerva Pediatr.* **2012**, Oct;64(5):471-92.
49. Ding, H.; Luo, Y.; Hu, K.; Huang, H.; Liu, P.; Xiong, M.; Zhu, L.; Yi, J.; Xu, Y. Hypoxia in utero increases the risk of pulmonary hypertension in rat offspring and is associated with vasopressin type-2 receptor upregulation. *Mol Med Rep.* **2020**, 22(5):4173-4182. doi: 10.3892/mmr.2020.11533.
50. Nguyen, T.N.; Lewis, C.V.; Hidalgo, D.C.; Posey, J.N.; Jordan, M.; Porfilio, T.E.; Grayck, M.R.; Wright, C.J.; Delaney, C.; Nozik, E.S. A maternal hypoxia mouse model to study the effect of late gestational hypoxia on offspring lung outcomes, *Frontiers in Physiology*, **2025**, 16. doi: 10.3389/fphys.2025.1513703.
51. Bhasin, H.; Kohli, C. Myocardial dysfunction as a predictor of the severity and mortality of hypoxic ischaemic encephalopathy in severe perinatal asphyxia: a case-control study. *Paediatr Int Child Health.* **2019**, Nov;39(4):259-264. doi: 10.1080/20469047.2019.1581462.
52. Neary, M.T.; Breckenridge, R.A. Hypoxia at the heart of sudden infant death syndrome? *Pediatr Res.* **2013**, 74(4):375-9. doi: 10.1038/pr.2013.122.
53. Joglar, J.A.; Kapa, S.; Saarel, E.V.; Dubin, A.M.; Gorenek, B.; Hameed, A.B.; Lara de Melo, S.; et al. HRS expert consensus statement on the management of arrhythmias during pregnancy. *Heart Rhythm.* **2023**, 20(10):e175-e264. doi: 10.1016/j.hrthm.2023.05.017.
54. Waypa, G.B.; Schumacker, P.T. Hypoxia-induced changes in pulmonary and systemic vascular resistance: where is the O₂ sensor? *Respir Physiol Neurobiol.* **2010**, Dec 31;174(3):201-11. doi: 10.1016/j.resp.2010.08.007.
55. Liang, Y.; Ruan, W.; Jiang, Y.; Smalling, R.; Yuan, X.; Eltzschig, H.K. Interplay of hypoxia-inducible factors and oxygen therapy in cardiovascular medicine. *Nat Rev Cardiol.* **2023**, 20(11):723-737. doi: 10.1038/s41569-023-00886-y.
56. Giussani, D.A. Breath of Life: Heart Disease Link to Developmental Hypoxia. *Circulation.* **2021**, Oct 26;144(17):1429-1443. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.054689;

57. Bo, B.; Li, S.; Zhou, K.; Wei, J. The Regulatory Role of Oxygen Metabolism in Exercise-Induced Cardiomyocyte Regeneration. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*:664527. doi: 10.3389/fcell.2021.664527;
58. Hula, N.; Spaans, F.; Vu, J.; Quon, A.; Kirschenman, R.; Cooke, C.M.; Phillips, T.J.; Case, C.P.; Davidge, S.T. Placental treatment improves cardiac tolerance to ischemia/reperfusion insult in adult male and female offspring exposed to prenatal hypoxia. *Pharmacol Res.* **2021**, *165*:105461. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105461.
59. Rock, C.R.; Miller, S.L.; Allison, B.J. The Use of Antioxidants for Cardiovascular Protection in Fetal Growth Restriction: A Systematic Review. *Antioxidants* **2024**, *13*, 1400. doi: 10.3390/antiox13111400.
60. Janaszak-Jasiecka, A.; Siekierzycka, A.; Płoska, A.; Dobrucki, I.T.; Kalinowski, L. Endothelial Dysfunction Driven by Hypoxia-The Influence of Oxygen Deficiency on NO Bioavailability. *Biomolecules.* **2021**, *11*(7):982. doi: 10.3390/biom11070982.
61. Roy, R.; Wilcox, J.; Webb, A.J.; O’Gallagher, K. Dysfunctional and Dysregulated Nitric Oxide Synthases in Cardiovascular Disease: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 15200. doi: 10.3390/ijms242015200.
62. Niewinski, P.; Tubek, S.; Josiak, K. *et al.* Cardiac parasympathetic denervation reduces hypoxic tachycardia, baroreflex sensitivity and heart rate variability in humans. *Sci Rep* **2025**, *15*, 6633. doi: 10.1038/s41598-025-91214-6
63. Mitrică, M.; Lorusso, L.; Badea, A.-A.; Sîrbu, C.-A.; Pleșa, A.; Stănescu, A.-M.A.; Pleșa, F.C.; Sîrbu, O.M.; Munteanu, A.E. The Hidden Heart: Exploring Cardiac Damage Post-Stroke: A Narrative Review. *Medicina* **2024**, *60*, 1699. doi: 10.3390/medicina60101699.
64. Horenstein, M.S.; Diaz-Frias, J.; Guillaume, M. Tetralogy of Fallot. [Updated 2024 Dec 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; **2025**. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513288>.
65. D’cunha, C.; Sankaran, K. Persistent fetal circulation. *Paediatr Child Health.* **2001**, *6*(10):744-50. doi: 10.1093/pch/6.10.744.

66. Malhotra, A.; Allison, B.J.; Castillo-Melendez, M.; Jenkin, G.; Polglase, G.R.; Miller, S.L. Neonatal Morbidities of Fetal Growth Restriction: Pathophysiology and Impact. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **2019**, Feb 7;10:55. doi: 10.3389/fendo.2019.00055.
67. Nalivaeva, N.N.; Turner, A.J.; Zhuravin, I.A. Role of Prenatal Hypoxia in Brain Development, Cognitive Functions, and Neurodegeneration. *Front. Neurosci.* **2018**, 12:825. doi: 10.3389/fnins.2018.00825;
68. Romanowicz, J.; Guerrelli, D.; Dhari, Z.; Mulvany, C.; Reilly, M.; Swift, L.; Vasandani, N.; Ramadan, M.; Leatherbury, L.; Ishibashi, N.; Posnack, N.G. Chronic perinatal hypoxia delays cardiac maturation in a mouse model for cyanotic congenital heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2021**, 320(5):H1873-H1886. doi: 10.1152/ajpheart.00870.2020.
69. Su, Z.; Liu, Y.; Zhang, H. Adaptive Cardiac Metabolism Under Chronic Hypoxia: Mechanism and Clinical Implications. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, 9:625524. doi: 10.3389/fcell.2021.625524.
70. Lawrence, K.M.; McGovern, P.E.; Mejaddam, A.; Rossidis, A.C.; Baumgarten, H.; Kim, A. et al. Chronic intrauterine hypoxia alters neurodevelopment in fetal sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **2019**, May;157(5):1982-1991. doi: 10.1016/j.jtcvs.2018.12.093.
71. Bhatt, A.B.; Foster, E.; Kuehl, K.; Alpert, J.; Brabeck, S.; Crumb, S.; Davidson, W.R.Jr.; Earing, M.G.; Ghoshhajra, B.B.; Karamlou, T.; Mital, S.; Ting, J.; Tseng, Z.H. American Heart Association Council on Clinical Cardiology. Congenital heart disease in the older adult: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* **2015**, May 26;131(21):1884-931. doi: 10.1161/CIR.0000000000000204. Epub 2015 Apr 20. Erratum in: *Circulation.* **2015**, May 26;131(21):e510. doi: 10.1161/CIR.0000000000000216.
72. Li, Q.; Zhang, S.; Yang, G.; Wang, X.; Liu, F.; Li, Y.; Chen, Y.; Zhou, T.; Xie, D.; Liu, Y.; Zhang, L. Energy metabolism: A critical target of cardiovascular injury. *Biomed Pharmacother.* **2023**, Sep;165:115271. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115271.

73. Elia, A.; Fossati, S. Autonomic nervous system and cardiac neuro-signaling pathway modulation in cardiovascular disorders and Alzheimer's disease. *Front. Physiol.* **2023**, 14:1060666. doi: 10.3389/fphys.2023.1060666.
74. Reece, E.A.; Hobbins, J.C. Clinical obstetrics : the fetus & mother 3rd ed. 2007 by Blackwell Publishing Ltd
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9780470753293.anw1>.
75. Szklarz, M.; Gontarz-Nowak, K.; Matuszewski, W.; Bandurska-Stankiewicz, E. Can Iron Play a Crucial Role in Maintaining Cardiovascular Health in the 21st Century? *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, 19, 11990. doi: 10.3390/ijerph191911990
76. Floria, M.; Parteni, N.; Neagu, A.I.; Sascau, R.A.; Statescu, C.; Tanase, D.M. Incomplete right bundle branch block: Challenges in electrocardiogram diagnosis. *Anatol J Cardiol.* **2021**, Jun;25(6):380-384. doi: 10.5152/AnatolJCardiol.2021.84375.
77. Doundoulakis, I.; Tsiachris, D.; Kordalis, A.; Soulaïdopoulos, S.; Arsenos, P.; Xintarakou, A.; Koliastasis, L.; Vlachakis, P.K.; Tsioufis, K.; Gatzoulis, K.A. Management of Patients With Unexplained Syncope and Bundle Branch Block: Predictive Factors of Recurrent Syncope. *Cureus.* **2023**, Mar 6;15(3):e35827. doi: 10.7759/cureus.35827.
78. Sun, Y.; Deng, X.M.; Cai, Y.; Shen, S.E.; Dong, L.Y. Post-cardiopulmonary bypass hypoxaemia in paediatric patients undergoing congenital heart disease surgery: risk factors, features, and postoperative pulmonary complications. *BMC Cardiovasc Disord.* **2022**, 22(1):430. doi: 10.1186/s12872-022-02838-9.
79. Li, T.; Li, K.; Zhang, S. *et al.* Overexpression of apoptosis inducing factor aggravates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. *Cell Death Dis* **2020**, 11, 77. doi: 10.1038/s41419-020-2280-z.
80. Liu, M.; Galli, G.; Wang, Y.; Fan, Q.; Wang, Z.; Wang, X.; Xiao, W. Novel Therapeutic Targets for Hypoxia-Related Cardiovascular Diseases: The Role of HIF-1. *Front Physiol.* **2020**, 11:774. doi: 10.3389/fphys.2020.00774.
81. Cyr, A.R.; Huckaby, L.V.; Shiva, S.S.; Zuckerbraun, B.S. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin.* **2020**, Apr;36(2):307-321. doi: 10.1016/j.ccc.2019.12.009.

82. Förstermann, U.; Sessa, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* **2012**, Apr;33(7):829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
83. Andrabi, S.M.; Sharma, N.S.; Karan, A.; Shahriar, S.M.S.; Cordon, B.; Ma, B.; Xie, J. Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications. *Adv Sci (Weinh).* **2023**, Oct;10(30):e2303259. doi: 10.1002/adv.202303259.
84. Kurhaluk, N.; Tkaczenko, H. L-Arginine and Nitric Oxide in Vascular Regulation—Experimental Findings in the Context of Blood Donation. *Nutrients* **2025**, *17*, 665. doi: 10.3390/nu17040665.
85. Boycott, H.E.; Nguyen, M.N.; Vrellaku, B.; Gehmlich, K.; Robinson, P. Nitric Oxide and Mechano-Electrical Transduction in Cardiomyocytes. *Front Physiol.* **2020**, Dec 15;11:606740. doi: 10.3389/fphys.2020.606740;
86. Huang, C.L.; Lei, M. Cardiomyocyte electrophysiology and its modulation: current views and future prospects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **2023**, Jun 19;378(1879):20220160. doi: 10.1098/rstb.2022.0160.
87. Chemin, J.; Girard, C.; Duprat, F.; Lesage, F.; Romey, G.; Lazdunski, M. Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K⁺ channels. *EMBO J.* **2003**, 22(20):5403-11. doi: 10.1093/emboj/cdg528.
88. Shi, X.; Qiu, H. Post-Translational S-Nitrosylation of Proteins in Regulating Cardiac Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel).* **2020**, Oct 28;9(11):1051. doi: 10.3390/antiox9111051
89. Lundberg, J.O.; Weitzberg, E. Nitric oxide signaling in health and disease. *Cell.* **2022**, 185(16):2853-2878. doi: 10.1016/j.cell.2022.06.010.
90. Fernando, V.; Zheng, X.; Walia, Y.; Sharma, V.; Letson, J.; Furuta, S. S-Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling. *Antioxidants (Basel).* **2019**, Sep 17;8(9):404. doi: 10.3390/antiox8090404.
91. Yang, N.J.; Hinner, M.J. Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins. *Methods Mol Biol.* **2015**, 1266:29-53. doi: 10.1007/978-1-4939-2272-7_3.

92. Lkhagva, B.; Lee, T.-W.; Lin, Y.-K.; Chen, Y.-C.; Chung, C.-C.; Higa, S.; Chen, Y.-J. Disturbed Cardiac Metabolism Triggers Atrial Arrhythmogenesis in Diabetes Mellitus: Energy Substrate Alternate as a Potential Therapeutic Intervention. *Cells* **2022**, *11*, 2915. doi: 10.3390/cells11182915.
93. Woo, S.-H.; Kim, J.-C.; Eslenur, N.; Trinh, T.N.; Do, L.N.H. Modulations of Cardiac Functions and Pathogenesis by Reactive Oxygen Species and Natural Antioxidants. *Antioxidants* **2021**, *10*, 760. doi: 10.3390/antiox10050760).
94. Francis, S.H.; Busch, J.L.; Corbin, J.D.; Sibley, D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev.* **2010**, Sep;62(3):525-63. doi: 10.1124/pr.110.002907.
95. Liu, Y.; Chen, J.; Fontes, S.K.; Bautista, E.N.; Cheng, Z. Physiological and pathological roles of protein kinase A in the heart. *Cardiovasc Res.* **2022**, Jan 29;118(2):386-398. doi: 10.1093/cvr/cvab008.
96. Li, Y.; Li, Wj.; Du, Jm.; Wu, Hh.; Zhou, Sy.; Li, M.; Li, Yy.; Wang, Sy.; Wang, Hy.; Zheng, Y.; Zhang, Qy.; Li, Lm.; Meng, Fl.; Su, Gh. Downregulation of PGAM2 alleviates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by destabilizing HSP90 and inactivating the mTOR/IKK α signaling pathway. *Int J Biol Sci* **2025**, 21(3):1308-1321. doi:10.7150/ijbs.102251.
97. Guo, B.; Li, Y.; Jin, X.; Liu, S.; Miao, C. Nitric oxide/cyclic GMP pathway mediates the endothelin-1-upregulation of adiponectin expression in rat cardiomyocytes. *Biomed Rep.* **2017**, 7(3):267-271. doi: 10.3892/br.2017.953.
98. Kayki-Mutlu, G.; Koch, W.J. Nitric Oxide and S-Nitrosylation in Cardiac Regulation: G Protein-Coupled Receptor Kinase-2 and β -Arrestins as Targets. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 521. doi: 10.3390/ijms22020521.
99. Doul, J.; Minaříková, M.; Charvátová, Z.; Maxová, H. Nitric oxide is involved in the cardioprotection of neonatal rat hearts, but not in neonatal ischemic postconditioning. *Physiol Rep.* **2024**, Aug;12(15):e16147. doi: 10.14814/phy2.16147. ;
100. Sherlock, L.G.; Wright, C.J.; Kinsella, J.P.; Delaney, C. Inhaled nitric oxide use in neonates: Balancing what is evidence-based and what is physiologically sound. *Nitric Oxide.* **2020**, 95:12-16. doi: 10.1016/j.niox.2019.12.001.

101. Uray, I.P.; Uray, K. Mechanotransduction at the Plasma Membrane-Cytoskeleton Interface. *Int J Mol Sci.* **2021**, 22(21):11566. doi: 10.3390/ijms222111566.
102. Katoh, K. Signal Transduction Mechanisms of Focal Adhesions: Src and FAK-Mediated Cell Response. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* **2024**, 29(11), 392. doi: 10.31083/j.fbl2911392.
103. Ławkowska, K.; Bonowicz, K.; Jerka, D.; Bai, Y.; Gagat, M. Integrins in Cardiovascular Health and Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Biomolecules* **2025**, 15, 233. doi: 10.3390/biom15020233.
104. Zhang, F.; Xia, Y.; Su, J. *et al.* Neutrophil diversity and function in health and disease. *Sig Transduct Target Ther* **2024**, 9, 343. doi: 10.1038/s41392-024-02049-y.
105. Spiers, J.G.; Steinert, J.R. Nitroergic modulation of ion channel function in regulating neuronal excitability. *Channels (Austin)*. **2021**, Dec;15(1):666-679. doi: 10.1080/19336950.2021.2002594.
106. Orfali, R.; Alwatban, A.Z.; Orfali, R.S.; Lau, L.; Chea, N.; Alotaibi, A.M.; Nam, Y.W.; Zhang, M. Oxidative stress and ion channels in neurodegenerative diseases. *Front Physiol.* **2024**, 15:1320086. doi: 10.3389/fphys.2024.1320086.
107. Kalinina, E.V.; Novichkova, M.D. S-Glutathionylation and S-Nitrosylation as Modulators of Redox-Dependent Processes in Cancer Cell. *Biochemistry Moscow* **2023**, 88, 924–943. doi: 10.1134/S0006297923070064.
108. Song, T.; Hui, W.; Huang, M.; Guo, Y.; Yu, M.; Yang, X.; Liu, Y.; Chen, X. Dynamic Changes in Ion Channels during Myocardial Infarction and Therapeutic Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25, 6467. doi: 10.3390/ijms25126467).
109. Tran, N.; Garcia, T.; Aniq, M.; Ali, S.; Ally, A.; Nauli, S.M. Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and the Cardiovascular System: in Physiology and in Disease States. *Am J Biomed Sci Res.* **2022**, 15(2):153-177.
110. Wang, W.L.; Ge, T.Y.; Chen, X.; Mao, Y.; Zhu, Y.Z. Advances in the Protective Mechanism of NO, H₂S, and H₂ in Myocardial Ischemic Injury. *Front Cardiovasc Med.* **2020**, 7:588206. doi: 10.3389/fcvm.2020.588206.
111. Wei, X.; Yohannan, S.; Richards, J.R. Physiology, Cardiac Repolarization Dispersion and Reserve. [Updated 2023 Apr 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island

112. Pappas, G.; Wilkinson, M.L.; Gow, A.J. Nitric oxide regulation of cellular metabolism: Adaptive tuning of cellular energy. *Nitric Oxide*. **2023**, Feb 1;131:8-17. doi: 10.1016/j.niox.2022.11.006.

113. Palmieri, E.M.; McGinity, C.; Wink, D.A.; McVicar, D.W. Nitric Oxide in Macrophage Immunometabolism: Hiding in Plain Sight. *Metabolites*. **2020**, Oct 26;10(11):429. doi: 10.3390/metabo10110429.

114. Belenichev, I.; Popazova, O.; Bukhtiyarova, N.; Ryzhenko, V.; Pavlov, S.; Suprun, E.; Oksenych, V.; Kamyshnyi, O. Targeting Mitochondrial Dysfunction in Cerebral Ischemia: Advances in Pharmacological Interventions. *Antioxidants* **2025**, *14*, 108. doi: 10.3390/antiox14010108.

115. Chirkov, Y.Y.; Nguyen, T.H.; Horowitz, J.D. Impairment of Anti-Aggregatory Responses to Nitric Oxide and Prostacyclin: Mechanisms and Clinical Implications in Cardiovascular Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1042. doi: 10.3390/ijms23031042.

116. Siamwala, J.H.; Kumar, P.; Veeriah, V.; Muley, A.; Rajendran, S.; Konikkat, S.; Majumder, S.; Mani, K.P.; Chatterjee, S. Nitric Oxide Reverses the Position of the Heart during Embryonic Development. *Int J Mol Sci.* **2019**, Mar 7;20(5):1157. doi: 10.3390/ijms20051157.

117. Dougherty, J.A.; Patel, N.; Kumar, N.; Rao, S.G.; Angelos, M.G.; Singh, H.; Cai, C.; Khan, M. Human Cardiac Progenitor Cells Enhance Exosome Release and Promote Angiogenesis Under Physoxia. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*:130. doi: 10.3389/fcell.2020.00130.

118. Tsaytler, P.; Liu, J.; Blaess, G.; Schifferl, D.; Veenvliet, J.V.; Wittler, L.; Timmermann, B.; Herrmann, B.G.; Koch, F. BMP4 triggers regulatory circuits specifying the cardiac mesoderm lineage. *Development*. **2023**, *150*(10):dev201450. doi: 10.1242/dev.201450.

119. Kovács, T.; Halasy, V.; Pethő, C.; Szőcs, E.; Soós, Á.; Dóra, D.; de Santa Barbara, P.; Faure, S.; Stavely, R.; Goldstein, A.M.; et al. Essential Role of BMP4 Signaling

in the Avian Ceca in Colorectal Enteric Nervous System Development. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 15664. doi: 10.3390/ijms242115664.

120. Govier-Cole, A.E.; Wood, R.J.; Fletcher, J.L.; Gonsalvez, D.G.; Merlo, D.; Cate, H.S.; Murray, S.S.; Xiao, J. Inhibiting Bone Morphogenetic Protein 4 Type I Receptor Signaling Promotes Remyelination by Potentiating Oligodendrocyte Differentiation. *eNeuro*. **2019**, May 14;6(2):ENEURO.0399-18.2019. doi: 10.1523/ENEURO.0399-18.2019.

121. Pirahanchi, Y.; Dimri, M. Biochemistry, Guanylate Cyclase. [Updated 2023 Jul 30]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; **2025** Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53715>).

122. Bloch, W.; Fleischmann, B.K.; Lorke, D.E.; Andressen, C.; Hops, B.; Hescheler, J.; Addicks, K. Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res.* 1999 Aug 15;43(3):675-84. doi: 10.1016/s0008-6363(99)00160-1.

123. Kumar, P.; Ghosh, A.; Sundaresan, L. et al. Ectopic release of nitric oxide modulates the onset of cardiac development in avian model. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* **2020**, *56*, 593–603. doi: 10.1007/s11626-020-00495-w.

124. Li, Y.; Du, J.; Deng, S. et al. The molecular mechanisms of cardiac development and related diseases. *Sig Transduct Target Ther* **2024**, *9*, 368. doi: 10.1038/s41392-024-02069-8.

125. Mensah, I.K.; Gowher, H. Epigenetic Regulation of Mammalian Cardiomyocyte Development. *Epigenomes* **2024**, *8*, 25. doi: 10.3390/epigenomes8030025.

126. Acauan Filho, B.J.; Pinheiro da Costa, B.E.; Ogando, P.B.; Vieira, M.C.; Antonello, I.C.; Poli-de-Figueiredo, C.E. Serum nitrate and NOx levels in preeclampsia are higher than in normal pregnancy. *Hypertens Pregnancy*. **2016**, May;35(2):226-33. doi: 10.3109/10641955.2016.1139718.

127. Хецуріані Т., Чабашвілі Н., Санікідзе Т. Роль ендотеліну-1 та рівня оксиду азоту в патогенезі прееклампсії. *Georgian Med News*. **2006**, (141):17-21. PMID: 17261879.

128. Vural, P. Nitric oxide/endothelin-1 in preeclampsia. *Clin Chim Acta*. **2002**, Mar;317(1-2):65-70. doi: 10.1016/s0009-8981(01)00751-3.
129. Guo, X.; Yi, H.; Li, T.C.; Wang, Y.; Wang, H.; Chen, X. Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Human Embryo Implantation: Clinical Implications. *Biomolecules* **2021**, *11*, 253. doi: 10.3390/biom11020253.
130. Ivanina, A.V.; Borah, B.; Rimkevicius, T.; Macrander, J.; Piontkivska, H.; Sokolova, I.M.; Beniash, E. The Role of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling in Biomineralization of the Oyster *Crassostrea gigas*. *Front. Mar. Sci.* **2018**, *5*:309. doi: 10.3389/fmars.2018.00309.
131. Boldeanu, L.; Dijmărescu, A.L.; Radu, M.; Siloși, C.A.; Popescu-Drigă, M.V.; Poenariu, I.S.; Siloși, I.; Boldeanu, M.V.; Novac, M.B.; Novac, L.V. The role of mediating factors involved in angiogenesis during implantation. *Rom J Morphol Embryol*. **2020**, Jul-Sep;61(3):665-672. doi: 10.47162/RJME.61.3.04.
132. Groesch, K.A.; Torry, R.J.; Wilber, A.C.; Abrams, R.; Bieniarz, A.; Guilbert, L.J.; Torry, D.S. Nitric oxide generation affects pro- and anti-angiogenic growth factor expression in primary human trophoblast. *Placenta*. **2011**, Dec;32(12):926-31. doi: 10.1016/j.placenta.2011.08.008.
133. Opichka, M.A.; Rappelt, M.W.; Gutterman, D.D.; Grobe, J.L.; McIntosh, J.J. Vascular Dysfunction in Preeclampsia. *Cells* **2021**, *10*, 3055. doi: 10.3390/cells10113055.
134. Rana, S.; Burke, S.D.; Karumanchi, S.A. Imbalances in circulating angiogenic factors in the pathophysiology of preeclampsia and related disorders. *Am J Obstet Gynecol*. **2022**, Feb;226(2S):S1019-S1034. doi: 10.1016/j.ajog.2020.10.022.
135. Liu, Q.; Guan, C.; Liu, C.; Li, H.; Wu, J.; Sun, C. Targeting hypoxia-inducible factor-1alpha: A new strategy for triple-negative breast cancer therapy. *Biomed Pharmacother*. **2022**, 156:113861. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113861.
136. De Caterina, R.; Libby, P.; Peng, H.B.; Thannickal, V.J.; Rajavashisth, T.B.; Gimbrone, M.A.Jr.; Shin, W.S.; Liao, J.K. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*. **1995**, Jul;96(1):60-8. doi: 10.1172/JCI118074,

137. Olson, N.; van der Vliet, A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. *Nitric Oxide*. **2011**, Aug 1;25(2):125-37. doi: 10.1016/j.niox.2010.12.010
138. Rood, K.; Lopez, V.; La Frano, M.R.; Fiehn, O.; Zhang, L.; Blood, A.B.; Wilson, S.M. Gestational Hypoxia and Programing of Lung Metabolism. *Front Physiol*. **2019**, 10:1453. doi: 10.3389/fphys.2019.01453. PMID: 31849704; PMCID: PMC6895135.
139. Kane, A.D.; Kothmann, E.; Giussani, D.A. Detection and response to acute systemic hypoxia. *BJA Educ*. **2020**, Feb;20(2):58-64. doi: 10.1016/j.bjae.2019.10.004.
140. Evans, L.C.; Liu, H.; Pinkas, G.A.; Thompson, L.P. Chronic hypoxia increases peroxynitrite, MMP9 expression, and collagen accumulation in fetal guinea pig hearts. *Pediatr Res*. **2012**, 71(1):25-31. doi: 10.1038/pr.2011.10.
141. Ferreiro, C.R.; Chagas, A.C.; Carvalho, M.H.; Dantas, A.P.; Jatene, M.B.; Bento De Souza, L.C.; Lemos Da Luz, P. Influence of hypoxia on nitric oxide synthase activity and gene expression in children with congenital heart disease: a novel pathophysiological adaptive mechanism. *Circulation*. **2001**, 103(18):2272-6. doi: 10.1161/01.cir.103.18.2272.
142. Dikalova, A.E.; Góngora, M.C.; Harrison, D.G.; Lambeth, J.D.; Dikalov, S.; Griendling, K.K. Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium-dependent relaxation via eNOS uncoupling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2010**, 299(3):H673-9. doi: 10.1152/ajpheart.00242.2010.
143. Dong, Y.; Thompson, L.P. Differential expression of endothelial nitric oxide synthase in coronary and cardiac tissue in hypoxic fetal guinea pig hearts. *J Soc Gynecol Investig*. **2006**, 13(7):483-90. doi: 10.1016/j.jsg.2006.06.005.
144. Liu, J.; Gao, Y.; Negash, S.; Longo, L.D.; Raj, J.U. Long-term effects of prenatal hypoxia on endothelium-dependent relaxation responses in pulmonary arteries of adult sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **2009**, Mar;296(3):L547-54. doi: 10.1152/ajplung.90333.2008.
145. Niu, Y.; Kane, A.D.; Lusby, C.M.; Allison, B.J.; Chua, Y.Y.; Kaandorp, J.J.; Nevin-Dolan, R.; Ashmore, T.J.; Blackmore, H.L.; Derks, J.B.; et al. Maternal Allopurinol Prevents Cardiac Dysfunction in Adult Male Offspring Programmed by Chronic Hypoxia

During Pregnancy. *Hypertension* **2018**, 72, 971–978doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11363

146. Hauton, D.; Ousley, V. Prenatal hypoxia induces increased cardiac contractility on a background of decreased capillary density. *BMC Cardiovasc Disord* **2009**, 9, 1. doi: 10.1186/1471-2261-9-1

147. De Pascali, F.; Hemann, C.; Samons, K.; Chen, C.A.; Zweier, J.L. Hypoxia and reoxygenation induce endothelial nitric oxide synthase uncoupling in endothelial cells through tetrahydrobiopterin depletion and S-glutathionylation. *Biochemistry*. **2014**, 10;53(22):3679-88. doi: 10.1021/bi500076r

148. Zhang, Z.; Yao, L.; Yang, J.; Wang, Z.; Du, G. PI3K/Akt and HIF 1 signaling pathway in hypoxia ischemia (Review). *Molecular Medicine Reports*, **2018**, 18, 3547-3554. doi: 10.3892/mmr.2018.9375

149. Jung, F.; Palmer, L.A.; Zhou, N.; Johns, R.A. Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circ Res*. **2000**, Feb 18;86(3):319-25. doi: 10.1161/01.res.86.3.319.].

150. Stamler, J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*. **1994**, Sep 23;78(6):931-6. doi: 10.1016/0092-8674(94)90269-0)

151. Pérez-Torres, I.; Manzano-Pech, L.; Rubio-Ruíz, M.E.; Soto, M.E.; Guarner-Lans, V. Nitrosative Stress and Its Association with Cardiometabolic Disorders. *Molecules*. **2020**, 25(11):2555. doi: 10.3390/molecules25112555

152. Dattilo, S.; Mancuso, C.; Koverech, G. et al. Heat shock proteins and hormesis in the diagnosis and treatment of neurodegenerative diseases. *Immun Ageing* **2015**, 12, 20. doi: 10.1186/s12979-015-0046-8.

153. Aengwanich, W.; Wandee, J. The effect of increased ambient temperature on Hsp70, superoxide dismutase, nitric oxide, malondialdehyde, and caspase activity in relation to the intrinsic and extrinsic apoptosis pathway of broiler blood cells. *J Therm Biol* **2022**, 105:103211. doi: 10.1016/j.jtherbio.2022.103211].

154. Bogdan, C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol*. **2001**, Feb;11(2):66-75. doi: 10.1016/s0962-8924(00)01900-0. PMID: 11166214

155. Kröncke, K.D. Nitrosative stress and transcription. *Biol Chem.* **2003**, Oct-Nov;384(10-11):1365-77. doi: 10.1515/BC.2003.153. PMID: 14669980.].
156. Sun, X.; Alford, J.; Qiu, H. Structural and Functional Remodeling of Mitochondria in Cardiac Diseases. *Int J Mol Sci.* **2021**, Apr 17;22(8):4167. doi: 10.3390/ijms22084167.;
157. Nguyen, B.Y.; Ruiz-Velasco, A.; Bui, T.; Collins, L.; Wang, X.; Liu, W. Mitochondrial function in the heart: the insight into mechanisms and therapeutic potentials. *Br J Pharmacol.* **2019**, Nov;176(22):4302-4318. doi: 10.1111/bph.14431.;
158. Brown, D.; Perry, J.; Allen, M. *et al.* Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nat Rev Cardiol* **2017**, 14, 238–250. doi: 10.1038/nrcardio.2016.203).
159. Paraskevaidis, I.; Kourek, C.; Farmakis, D.; Tsougos, E. Mitochondrial Dysfunction in Cardiac Disease: The Fort Fell. *Biomolecules* **2024**, 14, 1534. doi: 10.3390/biom14121534.
160. Wu, Y.; Jiang, T.; Hua, J.; Xiong, Z.; Dai, K.; Chen, H.; Li, L.; Peng, J.; Peng, X.; Zheng, Z.; Xiong, W. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in cardiovascular disease: From pathogenesis to novel therapy. *Int J Cardiol.* **2022**, 361:61-69. doi: 10.1016/j.ijcard.2022.05.025.
161. Parker, A.M.; Tate, M.; Prakoso, D.; Deo, M.; Willis, A.M.; Nash, D.M.; Donner, D.G.; Crawford, S.; Kiriazis, H.; Granata, C.; Coughlan, M.T.; De Blasio, M.J.; Ritchie, R.H. Characterisation of the Myocardial Mitochondria Structural and Functional Phenotype in a Murine Model of Diabetic Cardiomyopathy. *Front. Physiol.* **2021**, 12:672252. doi: 10.3389/fphys.2021.672252.
162. Ravindran, S.; Rau, C.D. The multifaceted role of mitochondria in cardiac function: insights and approaches. *Cell Commun Signal* **2024**, 22, 525. doi: 10.1186/s12964-024-01899-x.
163. Zhou, B.; Tian, R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J Clin Invest.* **2018**, Aug 31;128(9):3716-3726. doi: 10.1172/JCI120849.

164. Chang, X.; Liu, R.; Li, R.; Peng, Y.; Zhu, P.; Zhou, H. Molecular Mechanisms of Mitochondrial Quality Control in Ischemic Cardiomyopathy. *Int J Biol Sci.* **2023**, Jan 1;19(2):426-448. doi: 10.7150/ijbs.76223,
165. McClellan, G.; Weisberg, A.; Winegrad, S. Energy transport from mitochondria to myofibril by a creatine phosphate shuttle in cardiac cells. *Am J Physiol.* **1983**, Nov;245(5 Pt 1):C423-7. doi: 10.1152/ajpcell.1983.245.5.C423.
166. Schlattner, U.; Tokarska-Schlattner, M.; Wallimann, T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta.* **2006**, Feb;1762(2):164-80. doi: 10.1016/j.bbadis.2005.09.004.
167. Xin, Y.; Zhang, X.; Li, J.; Gao, H.; Li, J.; Hu, W.; Li, H. New Insights Into the Role of Mitochondria Quality Control in Ischemic Heart Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* **2021**, 8:774619. doi: 10.3389/fcvm.2021.774619.
168. Chatterjee, P.; Holody, C.D.; Kirschenman, R.; Graton, M.E.; Spaans, F.; Phillips, T.J.; Case, C.P.; Bourque, S.L.; Lemieux, H.; Davidge, S.T. Sex-Specific Effects of Prenatal Hypoxia and a Placental Antioxidant Treatment on Cardiac Mitochondrial Function in the Young Adult Offspring. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 13624. doi: 10.3390/ijms241713624.
169. Thompson, L.P.; Chen, L.; Polster, B.M.; Pinkas, G.; Song, H. Prenatal hypoxia impairs cardiac mitochondrial and ventricular function in guinea pig offspring in a sex-related manner. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **2018**, 315(6):R1232-R1241. doi: 10.1152/ajpregu.00224.2018.
170. Al-Hasan, Y.M.; Pinkas, G.A.; Thompson, L.P. Prenatal Hypoxia Reduces Mitochondrial Protein Levels and Cytochrome c Oxidase Activity in Offspring Guinea Pig Hearts. *Reprod Sci.* **2014**, Jul;21(7):883-891. doi: 10.1177/1933719113518981.
171. Clerc, P.; Rigoulet, M.; Leverve, X.; Fontaine, E. Nitric oxide increases oxidative phosphorylation efficiency. *J Bioenerg Biomembr.* **2007**, 39(2):158-66. doi: 10.1007/s10863-007-9074-1.
172. Song, H.; Telugu, B.P.; Thompson, L.P. Sexual dimorphism of mitochondrial function in the hypoxic guinea pig placenta. *Biol Reprod.* **2019**, Jan 1;100(1):208-216. doi: 10.1093/biolre/iyoy167.

173. Shao, Y.; Li, X.; Wood, J.W.; Ma, J.X. Mitochondrial dysfunctions, endothelial progenitor cells and diabetic retinopathy. *J Diabetes Complications*. **2018**, Oct;32(10):966-973. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2018.06.015.
174. Hüttemann, M.; Helling, S.; Sanderson, T.H.; Sinkler, C.; Samavati, L.; Mahapatra, G.; Varughese, A.; Lu, G.; Liu, J.; Ramzan, R.; Vogt, S.; Grossman, L.I.; Doan, J.W.; Marcus, K.; Lee, I. Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. **2012**, 1817(4):598-609. doi: 10.1016/j.bbabbio.2011.07.001.
175. Shemarova, I.; Nesterov, V.; Emelyanova, L.; Korotkov, S. Mitochondrial mechanisms by which gasotransmitters (H₂S, NO and CO) protect cardiovascular system against hypoxia. *Front. Biosci. (Schol Ed)* **2021**, 13(2), 105–130. doi: 10.52586/S556.
176. Zong, Y.; Li, H.; Liao, P. *et al.* Mitochondrial dysfunction: mechanisms and advances in therapy. *Sig Transduct Target Ther* **2024**, 9, 124. doi: 10.1038/s41392-024-01839-8.
177. Poderoso, J.J.; Helfenberger, K.; Poderoso, C. The effect of nitric oxide on mitochondrial respiration. *Nitric Oxide*. **2019**, Jul 1;88:61-72. doi: 10.1016/j.niox.2019.04.005.
178. Ramachandran, A.; Moellering, D.R.; Ceaser, E.; Shiva, S.; Xu, J.; Darley-Usmar, V. Inhibition of mitochondrial protein synthesis results in increased endothelial cell susceptibility to nitric oxide-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002**, May 14;99(10):6643-8. doi: 10.1073/pnas.102019899.
179. McCarty, M.F.; Lerner, A. Nutraceuticals Targeting Generation and Oxidant Activity of Peroxynitrite May Aid Prevention and Control of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. **2020**, 21(10):3624. doi: 10.3390/ijms21103624.
180. Batty, M.; Bennett, M.R.; Yu, E. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Cells* **2022**, 11, 3843. doi: 10.3390/cells11233843.
181. Hu, X.-Q.; Zhang, L. Hypoxia and Mitochondrial Dysfunction in Pregnancy Complications. *Antioxidants* **2021**, 10, 405. doi: 10.3390/antiox10030405.

182. Gasparre, G.; Porcelli, A.M.; Lenaz, G.; Romeo, G. Relevance of mitochondrial genetics and metabolism in cancer development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2013**, Feb 1;5(2):a011411. doi: 10.1101/cshperspect.a011411.;
183. Xia, D.; Liu, Y.; Wu, P.; Wei, D. Current Advances of Mitochondrial Dysfunction and Cardiovascular Disease and Promising Therapeutic Strategies. *Am J Pathol.* **2023**, Oct;193(10):1485-1500. doi: 10.1016/j.ajpath.2023.06.013.
184. Vangrieken, P.; Al-Nasiry, S.; Bast, A.; Leermakers, P.A.; Tulen, C.B.M.; Janssen, G.M.J.; Kaminski, I.; Geomini, I.; Lemmens, T.; Schiffrers, P.M.H.; van Schooten, F.J.; Remels, A.H.V. Hypoxia-induced mitochondrial abnormalities in cells of the placenta. *PLoS One.* **2021**, 16(1):e0245155. doi: 10.1371/journal.pone.0245155.
185. Glancy, B.; Balaban, R.S. Energy metabolism design of the striated muscle cell. *Physiol Rev.* **2021**, Oct 1;101(4):1561-1607. doi: 10.1152/physrev.00040.2020. 33733879;
186. Твердохліб І.В. Гетерогенність мітохондріального апарату міокарда та механізми його формування в ранньому онтогенезі щурів. *Цитологія і Генетика*, **1998**, том 32, с. 8–12.
187. Лейтан Є.Б. Патоморфологія та ультраструктура міокарда у плодів і новонароджених з асфіксією. *Автореферат дисертації на здобуття ступеня кандидата медичних наук; Новосибірськ*, **1981**, 16 с.
188. Song, H.; Thompson, L.P. Effects of Gestational Hypoxia on PGC1 α and Mitochondrial Acetylation in Fetal Guinea Pig Hearts. *Reprod. Sci.* **2023**, 30, 2996–3009 (2023). doi: 10.1007/s43032-023-01245-5.
189. Orekhov, A.N.; Summerhill, V.I.; Khotina, V.A.; Popov, M.A.; Uzokov, J.K.; Sukhorukov, V.N. Role of Mitochondria in the Chronification of Inflammation: Focus on Dysfunctional Mitophagy and Mitochondrial DNA Mutations. *Gene Expr.* **2023**, 22(4):329-344. doi: 10.14218/GE.2023.00061.
190. Masenga, S.K.; Kabwe, L.S.; Chakulya, M.; Kirabo, A. Mechanisms of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 7898. doi: 10.3390/ijms24097898.

191. Nesci, S.; Spagnoletta, A.; Oppedisano, F. Inflammation, Mitochondria and Natural Compounds Together in the Circle of Trust. *Int J Mol Sci.* **2023**, 24(7):6106. doi: 10.3390/ijms24076106.
192. Li, P.; Zhou, M.; Wang, J.; Tian, J.; Zhang, L.; Wei, Y.; Yang, F.; Xu, Y.; Wang, G. Important Role of Mitochondrial Dysfunction in Immune Triggering and Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis. *J Inflamm Res.* **2024**, 17:11631-11657. doi: 10.2147/JIR.S499473.
193. Nakahira, K.; Hisata, S.; Choi, A.M. The Roles of Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns in Diseases. *Antioxid Redox Signal.* **2015**, Dec 10;23(17):1329-50. doi: 10.1089/ars.2015.6407.
194. Dela Cruz, C.S.; Kang, M.J. Mitochondrial dysfunction and damage associated molecular patterns (DAMPs) in chronic inflammatory diseases. *Mitochondrion.* **2018**, Jul;41:37-44. doi: 10.1016/j.mito.2017.12.001.
195. Vringer, E.; Tait, S.W.G. Mitochondria and cell death-associated inflammation. *Cell Death Differ* **2023**, 30, 304–312. doi: 10.1038/s41418-022-01094-w.
196. Fischer, R.; Maier, O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxid Med Cell Longev.* **2015**, 2015:610813. doi: 10.1155/2015/610813.
197. Simpson, D.S.A.; Oliver, P.L. ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. *Antioxidants (Basel).* **2020**, Aug 13;9(8):743. doi: 10.3390/antiox9080743.
198. Lugrin, J.; Rosenblatt-Velin, N.; Parapanov, R.; Liaudet, L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biological Chemistry*, **2014**, 395:2(203-230). doi: 10.1515/hsz-2013-0241.
199. Pacher, P.; Schulz, R.; Liaudet, L.; Szabó, C. Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. *Trends Pharmacol Sci.* **2005**, 26(6):302-10. doi: 10.1016/j.tips.2005.04.003.
200. Cai, Z.; Hutchins, J.B.; Rhodes, P.G. Intrauterine hypoxia-ischemia alters nitric oxide synthase expression and activity in fetal and neonatal rat brains. *Brain Res Dev Brain Res.* **1998**, 109(2):265-9. doi: 10.1016/s0165-3806(98)00080-7.

201. Silvestro, S.; Calcaterra, V.; Pelizzo, G.; Bramanti, P.; Mazzon, E. Prenatal Hypoxia and Placental Oxidative Stress: Insights from Animal Models to Clinical Evidences. *Antioxidants (Basel)*. **2020**, May 12;9(5):414. doi: 10.3390/antiox9050414.
202. Matsubara, K.; Higaki, T.; Matsubara, Y.; Nawa, A. Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 4600-4614. doi: 10.3390/ijms16034600.
203. Migita, K.; Maeda, Y.; Abiru, S.; Komori, A.; Yokoyama, T.; Takii, Y.; Nakamura, M.; Yatsushashi, H.; Eguchi, K.; Ishibashi, H. Peroxynitrite-mediated matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic stellate cells. *FEBS Lett.* **2005**, *579*(14):3119-25. doi: 10.1016/j.febslet.2005.04.071.
204. Vincenti, M.P.; Brinckerhoff, C.E. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* **2002**, *4*(3):157-64. doi: 10.1186/ar401.
205. Wang, X.; Khalil, R.A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Adv Pharmacol.* **2018**, *81*:241-330. doi: 10.1016/bs.apha.2017.08.002.
206. Quintero-Fabián, S.; Arreola, R.; Becerril-Villanueva, E.; Torres-Romero, J.C.; Arana-Argáez, V.; Lara-Riegos, J.; Ramírez-Camacho, M.A.; Alvarez-Sánchez, M.E. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. *Front Oncol.* **2019**, Dec 6;9:1370. doi: 10.3389/fonc.2019.01370.
207. Pittayapruerk, P.; Meephansan, J.; Prapapan, O.; Komine, M.; Ohtsuki, M. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 868. doi: 10.3390/ijms17060868.
208. Islam, B.U.; Habib, S.; Ahmad, P.; Allarakha, S.; Moinuddin; Ali, A. Pathophysiological Role of Peroxynitrite Induced DNA Damage in Human Diseases: A Special Focus on Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP). *Indian J Clin Biochem.* **2015**, *30*(4):368-85. doi: 10.1007/s12291-014-0475-8.
209. Pérez de la Lastra, J.M.; Juan, C.A.; Plou, F.J.; Pérez-Lebeña, E. The Nitration of Proteins, Lipids and DNA by Peroxynitrite Derivatives-Chemistry Involved and Biological Relevance. *Stresses* **2022**, *2*, 53-64. doi: 10.3390/stresses2010005.

210. Arunachalam, G.; Samuel, S.M.; Ding, H.; Triggle, C.R. Peroxynitrite Biology. In: Laher, I. (eds) Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants. *Springer*, **2014**, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-30018-9_5.
211. Bencsik, P.; Kupai, K.; Giricz, Z.; Görbe, A.; Pipis, J.; Murlasits, Z.; Kocsis, G.F.; Varga-Orvos, Z.; Puskás, L.G.; Csonka, C.; Csont, T.; Ferdinandy, P. Role of iNOS and peroxynitrite-matrix metalloproteinase-2 signaling in myocardial late preconditioning in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2010**, Aug;299(2):H512-8. doi: 10.1152/ajpheart.00052.2010.
212. Capobianco, E.; White, V.; Sosa, M.; Di Marco, I.; Basualdo, M.N.; Faingold, M.C.; Jawerbaum, A. Regulation of matrix metalloproteinases 2 and 9 activities by peroxynitrites in term placentas from type 2 diabetic patients. *Reprod Sci*. **2012**, 19(8):814-22. doi: 10.1177/1933719111434544.
213. Hadler-Olsen, E.; Fadnes, B.; Sylte, I.; Uhlin-Hansen, L.; Winberg, J.O. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J*. **2011**, 278(1):28-45. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07920.x.
214. Membrino, V.; Di Paolo, A.; Di Crescenzo, T.; Cecati, M.; Alia, S.; Vignini, A. Effects of Animal-Based and Plant-Based Nitrates and Nitrites on Human Health: Beyond Nitric Oxide Production. *Biomolecules* **2025**, 15, 236. doi: 10.3390/biom15020236.
215. Heinrich, T.A.; da Silva, R.S.; Miranda, K.M.; Switzer, C.H.; Wink, D.A.; Fukuto, J.M. Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *Br J Pharmacol*. **2013**, Aug;169(7):1417-29. doi: 10.1111/bph.12217.
216. Rubbo, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Telleri, R.; Kalyanaraman, B.; Barnes, S.; Kirk, M.; Freeman, B.A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*. **1994**, Oct 21;269(42):26066-75. PMID: 7929318.
217. Jourdain, D.; Jourdain, F.L.; Kutchukian, P.S.; Musah, R.A.; Wink, D.A.; Grisham, M.B. Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. Implications for peroxynitrite-mediated oxidation reactions in vivo. *J Biol Chem*. **2001**, Aug 3;276(31):28799-805. doi: 10.1074/jbc.M102341200.

218. Filipovic, M.R.; Zivanovic, J.; Alvarez, B.; Banerjee, R. Chemical Biology of H₂S Signaling through Persulfidation. *Chem Rev.* **2018**, Feb 14;118(3):1253-1337. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00205.
219. Wichitnithad, W.; Nantaphol, S.; Noppakhunsomboon, K.; Rojsitthisak, P. An update on the current status and prospects of nitrosation pathways and possible root causes of nitrosamine formation in various pharmaceuticals. *Saudi Pharm J.* **2023**, Feb;31(2):295-311. doi: 10.1016/j.jsps.2022.12.010.
220. Fahrer, J.; Christmann, M. DNA Alkylation Damage by Nitrosamines and Relevant DNA Repair Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 4684. doi: 10.3390/ijms24054684.
221. Grossi, L.; Montevecchi, P.C. S-nitrosocysteine and cystine from reaction of cysteine with nitrous acid. A kinetic investigation. *J Org Chem.* **2002**, Nov 29;67(24):8625-30. doi: 10.1021/jo026154.
222. Abalenikhina, Y.V.; Shchulkin, A.V.; Suchkova, O.N.; Ananyeva, P.D.; Mylnikov, P.Y.; Yakusheva, E.N.; Suchkov, I.A.; Kalinin, R.E. S-Nitrosoglutathione Is Not a Substrate of OATP1B1, but Stimulates Its Expression and Activity. *Biomolecules* **2025**, 15, 428. doi: 10.3390/biom15030428.
223. Broniowska, K.A.; Diers, A.R.; Hogg, N. S-nitrosoglutathione. *Biochim Biophys Acta.* **2013**, 1830(5):3173-81. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.004.
224. Belenichev, I.F.; Gorbacheva, S.V.; Demchenko, A.V. *et al.* The thiol-disulfide balance and the nitric oxide system in the brain tissue of rats subjected to experimental acute impairment of cerebral blood flow: The therapeutic effects of nootropic drugs. *Neurochem. J.* **2014**, 8, 24–27. doi: 10.1134/S181971241401005.
225. Tejero, J.; Shiva, S.; Gladwin, M.T. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiol Rev.* **2019**, Jan 1;99(1):311-379. doi: 10.1152/physrev.00036.2017.
226. Salvagno, M.; Sterchele, E.D.; Zaccarelli, M.; Mrakic-Sposta, S.; Welsby, I.J.; Balestra, C.; Taccone, F.S. Oxidative Stress and Cerebral Vascular Tone: The Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Int J Mol Sci.* **2024**, Mar 5;25(5):3007. doi: 10.3390/ijms25053007.

227. Hogg, N.; Singh, R.J.; Konorev, E.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B. S-Nitrosoglutathione as a substrate for gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochem J.* **1997**, Apr 15;323 (Pt 2)(Pt 2):477-81. doi: 10.1042/bj3230477;
228. Zhang, Y.; Hogg, N. The mechanism of transmembrane S-nitrosothiol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004**, 101(21):7891-6. doi: 10.1073/pnas.0401167101.
229. Paulsen, C.E.; Carroll, K.S. Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chem Rev.* **2013**, Jul 10;113(7):4633-79. doi: 10.1021/cr300163e.
230. Boutin, C.; Clément, C.; Rivoal, J. Post-Translational Modifications to Cysteine Residues in Plant Proteins and Their Impact on the Regulation of Metabolism and Signal Transduction. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25, 9845. doi: 10.3390/ijms25189845.
231. Tian, Y.M.; Holdship, P.; To, T.Q.; Ratcliffe, P.J.; Keeley, T.P. Comparative analysis of N-terminal cysteine dioxygenation and prolyl-hydroxylation as oxygen-sensing pathways in mammalian cells. *J Biol Chem.* **2023**, Sep;299(9):105156. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105156.
232. Mishra, S.; Kumar, G.; Chhabra, A.; Sethy, N.K.; Jain, N.; Meena, R.N.; Tulsawani, R.; Prasad, D.N.; Kumar, B.; Sharma, M. Cysteine becomes conditionally essential during hypobaric hypoxia and regulates adaptive neuro-physiological responses through CBS/H₂S pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* **2020**, Jul 1;1866(7):165769. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165769.
233. Erusalimsky, J.D.; Moncada, S. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2007**, Dec;27(12):2524-31. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.151167.
234. Brown, G.C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta.* **2001**, Mar 1;1504(1):46-57. doi: 10.1016/s0005-2728(00)00238-3.
235. Li, X.; Fang, P.; Mai, J. *et al.* Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol* **2013**, 6, 19. doi: 10.1186/1756-8722-6-19.

236. Juan, C.A.; Pérez de la Lastra, J.M.; Plou, F.J.; Pérez-Lebeña, E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci.* **2021**, *22*(9):4642. doi: 10.3390/ijms22094642.
237. Weidinger, A.; Kozlov, A.V. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules.* **2015**, *5*(2):472-84. doi: 10.3390/biom5020472.
238. Abu-Soud, H.M.; Camp, O.G.; Ramadoss, J.; Chatzicharalampous, C.; Kofinas, G.; Kofinas, J.D. Regulation of nitric oxide generation and consumption. *Int J Biol Sci.* **2025**, Jan 13;21(3):1097-1109. doi: 10.7150/ijbs.105016.
239. Radi, R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem.* **2013**, *288*(37):26464-72. doi: 10.1074/jbc.R113.472936.
240. Koppenol, W.H. Chemistry of peroxynitrite and its relevance to biological systems. *Met Ions Biol Syst.* **1999**, *36*:597-619. PMID: 10093937.
241. Makarov, S.V.; Horváth, A.K.; Makarova, A.S. Reactivity of Small Oxoacids of Sulfur. *Molecules* **2019**, *24*, 2768. doi: 10.3390/molecules24152768.
242. Goldstein, S.; Merényi, G. The chemistry of peroxynitrite: implications for biological activity. *Methods Enzymol.* **2008**, *436*:49-61. doi: 10.1016/S0076-6879(08)36004-2. PMID: 18237627.
243. Radi, R.; Cassina, A.; Hodara, R.; Quijano, C.; Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med.* **2002**, Dec 1;33(11):1451-64. doi: 10.1016/s0891-5849(02)01111-5.
244. Pacher, P.; Beckman, J.S.; Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* **2007**, *87*(1):315-424. doi: 10.1152/physrev.00029.2006.
245. Pérez-Torres, I.; Soto, M.E.; Castrejón-Tellez, V.; Rubio-Ruiz, M.E.; Manzano Pech, L.; Guarner-Lans, V. Oxidative, Reductive, and Nitrosative Stress Effects on Epigenetics and on Posttranslational Modification of Enzymes in Cardiometabolic Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* **2020**, 2020:8819719. doi: 10.1155/2020/8819719.

246. Alnajjar, K.S.; Sweasy, J.B. A new perspective on oxidation of DNA repair proteins and cancer. *DNA Repair (Amst)*. **2019**, 76:60-69. doi: 10.1016/j.dnarep.2019.02.006.
247. Gilboa, R.; Zharkov, D.O.; Golan, G.; Fernandes, A.S.; Gerchman, S.E.; Matz, E.; Kycia, J.H.; Grollman, A.P.; Shoham, G. Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA. *J Biol Chem*. **2002**, 277(22):19811-6. doi: 10.1074/jbc.M202058200.
248. Jacobs, A.L.; Schär, P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma*. **2012**, 121(1):1-20. doi: 10.1007/s00412-011-0347-4. Epub **2011** Nov 3. PMID: 22048164.
249. Rodrigues, F.P.; Pestana, C.R.; Polizello, A.C.; Pardo-Andreu, G.L.; Uyemura, S.A.; Santos, A.C.; Alberici, L.C.; da Silva, R.S.; Curti, C. Release of NO from a nitrosyl ruthenium complex through oxidation of mitochondrial NADH and effects on mitochondria. *Nitric Oxide*. **2012**, 26(3):174-81. doi: 10.1016/j.niox.2012.02.001.
250. Murray, J.; Taylor, S.W.; Zhang, B.; Ghosh, S.S.; Capaldi, R.A. Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite: identification of reactive tyrosines by mass spectrometry. *J Biol Chem*. **2003**, 278(39):37223-30. doi: 10.1074/jbc.M305694200.
251. Lipshultz, S.E.; Wilkinson, J.D.; Messiah, S.E.; Miller, T.L. Clinical research directions in pediatric cardiology. *Curr Opin Pediatr*. **2009**, 21(5):585-93. doi: 10.1097/MOP.0b013e32832e48df.
252. Giussani, D.A.; Niu, Y.; Herrera, E.A.; Richter, H.G.; Camm, E.J.; Thakor, A.S.; Kane, A.D.; Hansell, J.A.; Brain, K.L.; Skeffington, K.L.; Itani, N.; Wooding, F.B.; Cross, C.M.; Allison, B.J. Heart disease link to fetal hypoxia and oxidative stress. *Adv Exp Med Biol*. **2014**, 814:77-87. doi: 10.1007/978-1-4939-1031-1_7.
253. Kornacki, J.; Gutaj, P.; Kalantarova, A.; Sibiak, R.; Jankowski, M.; Wender-Ozegowska, E. Endothelial Dysfunction in Pregnancy Complications. *Biomedicines*. **2021**, 9(12):1756. doi: 10.3390/biomedicines9121756.
254. McElwain, C.J.; Tuboly, E.; McCarthy, F.P.; McCarthy, C.M. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Pre-eclampsia and Gestational Diabetes Mellitus: Windows Into

Future Cardiometabolic Health? *Front Endocrinol (Lausanne)*. **2020**, 11:655. doi: 10.3389/fendo.2020.00655.

255. Ilbritton-King, J.D.; García-Cardena, G. Endothelial cell dysfunction in cardiac disease: driver or consequence?. *Front. Cell Dev. Biol.* **2023**, 11:1278166. doi: 10.3389/fcell.2023.1278166.

256. Zhang, C.; Guo, Y.; Yang, Y.; Du, Z.; Fan, Y.; Zhao, Y.; Yuan, S. Oxidative stress on vessels at the maternal-fetal interface for female reproductive system disorders: Update. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **2023**, Mar 10;14:1118121. doi: 10.3389/fendo.2023.1118121.

257. Paz, A.A.; Jiménez, T.A.; Ibarra-Gonzalez, J.; Astudillo-Maya, C.; Beñaldo, F.A.; Figueroa, E.G.; Llanos, A.J.; Gonzalez-Candia, A.; Herrera, E.A. Gestational hypoxia elicits long-term cardiovascular dysfunction in female guinea pigs. *Life Sciences*, **2025**, 361, (123282).doi: 10.1016/j.lfs.2024.123282.

258. Zhao, M.; Lei, J.; Deng, F.; Zhao, C.; Xu, T.; Ji, B.; Fu, M.; Wang, X.; Sun, M.; Zhang, M.; Gao, Q. Gestational Hypoxia Impaired Endothelial Nitric Oxide Synthesis Via miR-155-5p/NADPH Oxidase/Reactive Oxygen Species Axis in Male Offspring Vessels. *J Am Heart Assoc.* **2024**, 13(3):e032079. doi: 10.1161/JAHA.123.032079.

259. Ritchie, R.H.; Drummond, G.R.; Sobey, C.G.; De Silva, T.M.; Kemp-Harper, B.K. The opposing roles of NO and oxidative stress in cardiovascular disease. *Pharmacol Res.* **2017**, 116:57-69. doi: 10.1016/j.phrs.2016.12.017.

260. Chandra, S.; Romero, M.J.; Shatanawi, A.; Alkilany, A.M.; Caldwell, R.B.; Caldwell, R.W. Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *Br J Pharmacol.* **2012**, 165(2):506-19. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01584.x.

261. Uchida, T.; Rossignol, F.; Matthay, M.A.; Mounier, R.; Couette, S.; Clottes, E.; Clerici, C. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J Biol Chem.* **2004**, 279(15):14871-8. doi: 10.1074/jbc.M400461200.

262. Wang, G.L.; Jiang, B.H.; Rue, E.A.; Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5510–5514. doi: 10.1073/pnas.92.12.5510.
263. Dengler, V.L.; Galbraith, M.; Espinosa, J.M. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **2014**, *49*(1):1-15. doi: 10.3109/10409238.2013.838205.
264. Kurihara, T.; Westenskow, P.D.; Friedlander, M. Hypoxia-inducible factor (HIF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in the retina. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *801*:275-81. doi: 10.1007/978-1-4614-3209-8_35.
265. Ziello, J.E.; Jovin, I.S.; Huang, Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J. Biol. Med.* **2007**, *80*, 51–60
266. Bochenek, M.L.; Gogiraju, R.; Großmann, S.; Krug, J.; Orth, J.; Reyda, S.; Georgiadis, G.S.; Spronk, H.M.; Konstantinides, S.; Münzel, T.; Griffin, J.H.; Wild, P.; Espinola-Klein, C.; Ruf, W.; Schäfer, K. EPCR-PAR1 biased signaling regulates perfusion recovery and neovascularization in peripheral ischemia. *JCI Insight.* **2022**, *7*(14):e157701. doi: 10.1172/jci.insight.157701.
267. Ireland, H.; Konstantoulas, C.J.; Cooper, J.A.; Hawe, E.; Humphries, S.E.; Mather, H.; Goodall, A.H.; Hogwood, J.; Juhan-Vague, I.; Yudkin, J.S.; di Minno, G.; Margaglione, M.; Hamsten, A.; Miller, G.J.; Bauer, K.A.; Kim, Y.T.; Stearns-Kurosawa, D.J.; Kurosawa, S. EPCR Ser219Gly: elevated sEPCR, prothrombin F1+2, risk for coronary heart disease, and increased sEPCR shedding in vitro. *Atherosclerosis.* **2005**, *183*(2):283-92. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.02.028.
268. Arai, M.; Imai, H.; Koumura, T.; Yoshida, M.; Emoto, K.; Umeda, M.; Chiba, N.; Nakagawa, Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells. *J Biol Chem.* **1999**, *274*(8):4924-33. doi: 10.1074/jbc.274.8.4924.
269. Roveri, A.; Casasco, A.; Maiorino, M.; Dalan, P.; Calligaro, A.; Ursini, F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J Biol Chem.* **1992**, *267*(9):6142-6.

270. Oh, S.J.; Ikeda, M.; Ide, T. et al. Mitochondrial event as an ultimate step in ferroptosis. *Cell Death Discov.* **2022**, *8*, 414. doi: 10.1038/s41420-022-01199-8.
271. Tian, P.; Xu, Z.; Guo, J.; Zhao, J.; Chen, W.; Huang, W.; Wang, M.; Mi, C.; Zhang, Y.; Yang, Y.; Zhang, H. Hypoxia causes trophoblast cell ferroptosis to induce miscarriage through lnc-HZ06/HIF1 α -SUMO/NCOA4 axis. *Redox Biol.* **2024**, *70*:103073. doi: 10.1016/j.redox.2024.103073. Epub 2024 Feb 2.
272. Lubos, E.; Loscalzo, J.; Handy, D.E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* **2011**, *15*(7):1957-97. doi: 10.1089/ars.2010.3586.
273. Forgione, M.A.; Weiss, N.; Heydrick, S.; Cap, A.; Klings, E.S.; Bierl, C.; Eberhardt, R.T.; Farber, H.W.; Loscalzo, J. Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2002**, *282*(4):H1255-61. doi: 10.1152/ajpheart.00598.2001.
274. Kong, X.; Qiao, D.; Zhao, X.; Wang, L.; Zhang, J.; Liu, D.; Zhang, H. The molecular characterizations of Cu/ZnSOD and MnSOD and its responses of mRNA expression and enzyme activity to *Aeromonas hydrophila* or lipopolysaccharide challenge in Qihe crucian carp *Carassius auratus*. *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *67*:429-440. doi: 10.1016/j.fsi.2017.06.03.
275. Giles, B.L.; Suliman, H.; Mamo, L.B.; Piantadosi, C.A.; Oury, T.D.; Nozik-Grayck, E. Prenatal hypoxia decreases lung extracellular superoxide dismutase expression and activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2002**, *283*(3):L549-54. doi: 10.1152/ajplung.00018.2002.
276. Sherlock, L.G.; Trumpie, A.; Hernandez-Lagunas, L.; McKenna, S.; Fisher, S.; Bowler, R.; Wright, C.J.; Delaney, C.; Nozik-Grayck, E. Redistribution of Extracellular Superoxide Dismutase Causes Neonatal Pulmonary Vascular Remodeling and PH but Protects Against Experimental Bronchopulmonary Dysplasia. *Antioxidants (Basel).* **2018**, *7*(3):42. doi: 10.3390/antiox7030042.
277. Grzeszczak, K.; Łanocha-Arendarczyk, N.; Malinowski, W.; Ziętek, P.; Kosik-Bogacka, D. Oxidative Stress in Pregnancy. *Biomolecules* **2023**, *13*, 1768. doi: 10.3390/biom13121768.

278. Luo, Z.; Tian, M.; Yang, G. *et al.* Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics. *Sig Transduct Target Ther* **2022**, *7*, 218. doi: 10.1038/s41392-022-01080-1;
279. Malhotra, R.; Lin, Z.; Vincenz, C.; Brosius, F.C.3rd. Hypoxia induces apoptosis via two independent pathways in Jurkat cells: differential regulation by glucose. *Am J Physiol Cell Physiol*. **2001**, Nov;281(5):C1596-603. doi: 10.1152/ajpcell.2001.281.5.C1596.
280. Bertheloot, D.; Latz, E.; Franklin, B.S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol* **2021**, *18*, 1106–1121. doi: 10.1038/s41423-020-00630-3.
281. Kari, S.; Subramanian, K.; Altomonte, I.A. *et al.* Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis* **2022**, *27*, 482–508. doi: 10.1007/s10495-022-01735-y.
282. Fink, S.L.; Cookson, B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*. **2005**, Apr;73(4):1907-16. doi: 10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005.
283. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. **2007**, Jun;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337.
284. Ren, D.; Li, F.; Gao, A.; Cao, Q.; Liu, Y.; Zhang, J. Hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes is restricted by ginkgolide B-downregulated microRNA-29. *Cell Cycle*. **2020**, *19*(10):1067-1076. doi: 10.1080/15384101.2020.1731651.
285. Statement of Retraction: Hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes is restricted by ginkgolide B-downregulated microRNA-29. *Cell Cycle*. **2022**, *21*(7):757. doi: 10.1080/15384101.2021.2014708.
286. Qiu, Z.; Wang, Y.; Liu, W. *et al.* CircHIPK3 regulates the autophagy and apoptosis of hypoxia/reoxygenation-stimulated cardiomyocytes via the miR-20b-5p/ATG7 axis. *Cell Death Discov*. **2021**, *7*, 64. doi: 10.1038/s41420-021-00448-6.
287. Mustafa, M.; Ahmad, R.; Tantry, I.Q.; Ahmad, W.; Siddiqui, S.; Alam, M.; Abbas, K.; Moinuddin; Hassan, M.I.; Habib, S.; et al. Apoptosis: A Comprehensive

Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications. *Cells* **2024**, *13*, 1838. doi: 10.3390/cells13221838.

288. Kholodenko, I.V.; Kholodenko, R.V.; Majouga, A.G.; Yarygin, K.N. Apoptotic MSCs and MSC-Derived Apoptotic Bodies as New Therapeutic Tools. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2022**, *44*, 5153-5172. doi: 10.3390/cimb44110351.

289. Miller, M.A.; Zachary, J.F. Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. **2017**, 2–43.e19. doi: 10.1016/B978-0-323-35775-3.00001-1. Epub 2017 Feb 17.

290. Geatrell, J.C.; Gan, P.M.; Mansergh, F.C.; Kisiswa, L.; Jarrin, M.; Williams, L.A.; Evans, M.J.; Boulton, M.E.; Wride, M.A. Apoptosis gene profiling reveals spatio-temporal regulated expression of the p53/Mdm2 pathway during lens development. *Exp Eye Res.* **2009**, *88*(6):1137-51. doi: 10.1016/j.exer.2009.01.020.

291. James, T.N. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation*. **1994**, *90*(1):556-73. PMID: 8026044.

292. Oh, Y.; Abid, R.; Dababneh, S.; Bakr, M.; Aslani, T.; Cook, D.P.; Vanderhyden, B.C.; Park, J.G.; Munshi, N.V.; Hui, C.C.; Kim, K.H. Transcriptional regulation of the postnatal cardiac conduction system heterogeneity. *Nat Commun.* **2024**, *15*(1):6550. doi: 10.1038/s41467-024-50849-1.

293. Torella, D.; Indolfi, C.; Nadal-Ginard, B. Generation of new cardiomyocytes after injury: de novo formation from resident progenitors vs. replication of pre-existing cardiomyocytes. *Ann Transl Med.* **2015**, *3*(Suppl 1):S8. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.02.17.

294. James, T.N. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart: from postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* **1994**, *105*:145-77; discussion 177-8. PMID: 7974966; PMCID: PMC2376730.

295. Deng, J.; Jiang, Y.; Chen, Z.B.; Rhee, J.-W.; Deng, Y.; Wang, Z.V. Mitochondrial Dysfunction in Cardiac Arrhythmias. *Cells* **2023**, *12*, 679. doi: 10.3390/cells12050679.

296. Yehya, A.; Azar, J.; Al-Fares, M.; Boeuf, H.; Abou-Kheir, W.; Zeineddine, D.; Hadadeh, O. Cardiac differentiation is modulated by anti-apoptotic signals in murine embryonic stem cells. *World J Stem Cells*. **2024**, May 26;16(5):551-559. doi: 10.4252/wjsc.v16.i5.551.
297. Bennett, M.R. Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart*. **2002**, 87(5):480-7. doi: 10.1136/heart.87.5.480.
298. Van Empel, V.P.M.; Bertrand, A.T.A.; Hofstra, L.; Crijns, H.J.; Doevendans, P.A.; De Windt, L.J. Myocyte apoptosis in heart failure, *Cardiovascular Research*, **2005**, 67(1):21–29. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.04.012.
299. Kim, N.H.; Kang, P.M. Apoptosis in cardiovascular diseases: mechanism and clinical implications. *Korean Circ J*. **2010**, 40(7):299-305. doi: 10.4070/kcj.2010.40.7.299;
300. Krijnen, P.A.; Nijmeijer, R.; Meijer, C.J.; Visser, C.A.; Hack, C.E.; Niessen, H.W. Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *J Clin Pathol*. **2002**, 55(11):801-11. doi: 10.1136/jcp.55.11.801.
301. Crow, M.T.; Mani, K.; Nam, Y.J.; Kitsis, R.N. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res*. **2004**, Nov 12;95(10):957-70. doi: 10.1161/01.RES.0000148632.35500.d9.
302. Koehler, R.C.; Yang, Z.J.; Lee, J.K.; Martin, L.J. Perinatal hypoxic-ischemic brain injury in large animal models: Relevance to human neonatal encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab*. **2018**, 38(12):2092-2111. doi: 10.1177/0271678X18797328.
303. Griffith, T.S.; Yu, X.; Herndon, J.M.; Green, D.R.; Ferguson, T.A. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity*. **1996**, 5(1):7-16. doi: 10.1016/s1074- 7613(00)80305-2.
304. Le Hingrat, Q.; Sereti, I.; Landay, A.L.; Pandrea, I.; Apetrei, C. The Hitchhiker Guide to CD4+ T-Cell Depletion in Lentiviral Infection. A Critical Review of the Dynamics of the CD4+ T Cells in SIV and HIV Infection. *Front. Immunol*. **2021**, 12:695674. doi: 10.3389/fimmu.2021.695674.
305. Bae, S.; Xiao, Y.; Li, G.; Casiano, C.A.; Zhang, L. Effect of maternal chronic hypoxic exposure during gestation on apoptosis in fetal rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2003**, 285(3):H983-90. doi: 10.1152/ajpheart.00005.2003.

306. Troy, C.M.; Derossi, D.; Prochiantz, A.; Greene, L.A.; Shelanski, M.L. Downregulation of Cu/Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway. *J Neurosci.* **1996**, 16(1):253-61. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-01-00253.1996.
307. Jan, R.; Chaudhry, G.E. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull.* **2019**, 9(2):205-218. doi: 10.15171/apb.2019.024.
308. Guicciardi, M.E.; Gores, G.J. Life and death by death receptors. *FASEB J.* **2009**, 23(6):1625-37. doi: 10.1096/fj.08-111005.
309. Hussar, P. Apoptosis Regulators Bcl-2 and Caspase-3. *Encyclopedia* **2022**, 2, 1624-1636. doi: 10.3390/encyclopedia2040111.
310. Crimi, M.; Esposti, M.D. Apoptosis-induced changes in mitochondrial lipids. *Biochim Biophys Acta.* **2011**, 1813(4):551-7. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.09.014.
311. Marí, M.; Morales, A.; Colell, A.; García-Ruiz, C.; Kaplowitz, N.; Fernández-Checa, J.C. Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease. *Biochim Biophys Acta.* **2013**, 1830(5):3317-28. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.10.018.
312. Korotkov, S.M. Mitochondrial Oxidative Stress Is the General Reason for Apoptosis Induced by Different-Valence Heavy Metals in Cells and Mitochondria. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 14459. doi: 10.3390/ijms241914459.
313. Taimor, G.; Hofstaetter, B.; Piper, H.M. Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. *Cardiovascular Research*, **2000**, 45(3):588–594. doi: 10.1016/S0008-6363(99)00272-2.
314. Botting, K.J.; McMillen, I.C.; Forbes, H.; Nyengaard, J.R.; Morrison, J.L. Chronic hypoxemia in late gestation decreases cardiomyocyte number but does not change expression of hypoxia-responsive genes. *J Am Heart Assoc.* **2014**, 3(4):e000531. doi: 10.1161/JAHA.113.000531.
315. Mělková, Z.; Lee, S.B.; Rodriguez, D.; Esteban, M. Bcl-2 prevents nitric oxide-mediated apoptosis and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage. *FEBS Lett.* **1997**, Feb 24;403(3):273-8. doi: 10.1016/s0014-5793(97)00065-3.

316. Gotoh, Y.; Cooper, J.A. Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J Biol Chem.* **1998**, 273(28):17477-82. doi: 10.1074/jbc.273.28.17477.
317. Mendelson, K.G.; Contois, L.R.; Tevosian, S.G.; Davis, R.J.; Paulson, K.E. Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1996**, 93(23):12908-13. doi: 10.1073/pnas.93.23.12908.
318. Ing, D.J.; Zang, J.; Dzau, V.J.; Webster, K.A.; Bishopric, N.H. Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x. *Circ Res.* **1999**, Jan 8-22;84(1):21-33. doi: 10.1161/01.res.84.1.21.
319. Yfantis, A.; Mylonis, I.; Chachami, G.; Nikolaidis, M.; Amoutzias, G.D.; Paraskeva, E.; Simos, G. Transcriptional Response to Hypoxia: The Role of HIF-1-Associated Co-Regulators. *Cells* **2023**, 12, 798. doi: 10.3390/cells12050798.
320. Taylor, C.T.; Scholz, C.C. The effect of HIF on metabolism and immunity. *Nat Rev Nephrol.* **2022**, 18(9):573-587. doi: 10.1038/s41581-022-00587-8. Epub 2022 Jun 20. PMID: 35726016.
321. Jaśkiewicz, M.; Moszyńska, A.; Króliczewski, J.; Cabaj, A.; Bartoszewska, S.; Charzyńska, A.; Gebert, M.; Dąbrowski, M.; Collawn, J.F.; Bartoszewski, R. The transition from HIF-1 to HIF-2 during prolonged hypoxia results from reactivation of PHDs and HIF1A mRNA instability. *Cell Mol Biol Lett.* **2022**, 27(1):109. doi: 10.1186/s11658-022-00408-7.
322. Vranesić-Bender, D. The role of nutraceuticals in anti-aging medicine. *Acta Clin Croat.* **2010**, 49(4):537-44. PMID: 21830469.
323. Xu, L.; Song, H.; Qiu, Q.; Jiang, T.; Ge, P.; Su, Z.; Ma, W.; Zhang, R.; Huang, C.; Li, S.; et al. Different Expressions of HIF-1 α and Metabolism in Brain and Major Visceral Organs of Acute Hypoxic Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 6705. doi: 10.3390/ijms22136705.
324. Serocki, M.; Bartoszewska, S.; Janaszak-Jasiecka, A. *et al.* miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target. *Angiogenesis* **2018**, 21, 183–202 (2018). doi: 10.1007/s10456-018-9600-2.

325. Ke, Q.; Costa, M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* **2006**, Nov;70(5):1469-80. doi: 10.1124/mol.106.027029. Epub **2006** Aug 3. PMID: 16887934.
326. Madai, S.; Kilic, P.; Schmidt, R.M.; Bas-Orth, C.; Korff, T.; Büttner, M.; Klinke, G.; Poschet, G.; Marti, H.H.; Kunze, R. Activation of the hypoxia-inducible factor pathway protects against acute ischemic stroke by reprogramming central carbon metabolism. *Theranostics.* **2024**, Apr 29;14(7):2856-2880. doi: 10.7150/thno.88223.
327. Mijatović, S.; Savić-Radojević, A.; Plješa-Ercegovac, M.; Simić, T.; Nicoletti, F.; Maksimović-Ivanić, D. The Double-Faced Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Solid Tumors. *Antioxidants* **2020**, 9, 374. doi: 10.3390/antiox9050374.
328. Brocato, J.; Chervona, Y.; Costa, M. Molecular responses to hypoxia-inducible factor 1 α and beyond. *Mol Pharmacol.* **2014**, 85(5):651-7. doi: 10.1124/mol.113.089623.
329. McGettrick, A.F.; O'Neill, L.A.J. The Role of HIF in Immunity and Inflammation. *Cell Metab.* **2020**, 32(4):524-536. doi: 10.1016/j.cmet.2020.08.002.
330. Zhang, P.; Yao, Q.; Lu, L.; Li, Y.; Chen, P.J.; Duan, C. Hypoxia-inducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia. *Cell Rep.* **2014**, 6(6):1110-1121. doi: 10.1016/j.celrep.2014.02.011.
331. Zhang, J.; Yao, M.; Xia, S. et al. Systematic and comprehensive insights into HIF-1 stabilization under normoxic conditions: implications for cellular adaptation and therapeutic strategies in cancer. *Cell Mol Biol Lett* **2025**, 30, 2. doi: 10.1186/s11658-024-00682-7.
332. Toth, R.K.; Warfel, N.A. Strange Bedfellows: Nuclear Factor, Erythroid 2-Like 2 (Nrf2) and Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) in Tumor Hypoxia. *Antioxidants* **2017**, 6, 27. doi: 10.3390/antiox6020027.
333. Luo, S.Y.; Wang, J.Q.; Liu, C.; Gao, X.M.; Zhang, Y.B.; Ding, J.; Hou, C.C.; Zhu, J.Q.; Lou, B.; Shen, W.L.; Wu, X.F.; Zhang, C.D.; Tang, D.J. Hif-1 α /Hsf1/Hsp70 signaling pathway regulates redox homeostasis and apoptosis in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under environmental hypoxia. *Zool Res.* **2021**, 42(6):746-760. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2021.224.

334. Belenichev, I.F.; Aliyeva, O.G.; Popazova, O.O.; Bukhtiyarova, N.V. Involvement of heat shock proteins HSP70 in the mechanisms of endogenous neuroprotection: the prospect of using HSP70 modulators. *Front Cell Neurosci.* **2023**, *17*:1131683. doi: 10.3389/fncel.2023.1131683.
335. Agani, F.H.; Puchowicz, M.; Chavez, J.C.; Pichiule, P.; LaManna, J. Role of nitric oxide in the regulation of HIF-1alpha expression during hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2002**, *283*(1):C178-86. doi: 10.1152/ajpcell.00381.2001.
336. Sandau, K.B.; Fandrey, J.; Brüne, B. Accumulation of HIF-1alpha under the influence of nitric oxide. *Blood.* **2001**, Feb 15;97(4):1009-15. doi: 10.1182/blood.v97.4.1009.
337. Sharma, J.N.; Al-Omran, A.; Parvathy, S.S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology.* **2007**, Dec;15(6):252-9. doi: 10.1007/s10787-007-0013-x.
338. Okazaki, K.; Nakamura, S.; Koyano, K.; Konishi, Y.; Kondo, M.; Kusaka, T. Neonatal asphyxia as an inflammatory disease: Reactive oxygen species and cytokines. *Front Pediatr.* **2023**, Jan 27;11:1070743. doi: 10.3389/fped.2023.1070743
339. Serdar, M.; Walther, KA.; Gallert, M. *et al.* Prenatal inflammation exacerbates hyperoxia-induced neonatal brain injury. *J Neuroinflammation* **2025**, *22*, 57. doi: 10.1186/s12974-025-03389-4.
340. Kany, S.; Vollrath, J.T.; Relja, B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci.* **2019**, *20*(23):6008. doi: 10.3390/ijms20236008;
341. Manik, M.; Singh, R.K. Role of toll-like receptors in modulation of cytokine storm signaling in SARS-CoV-2-induced COVID-19. *J Med Virol.* **2022**, *94*(3):869-877. doi: 10.1002/jmv.27405.
342. Bhol, N.K.; Bhanjadeo, M.M.; Singh, A.K.; Dash, U.C.; Ojha, R.R.; Majhi, S.; Duttaroy, A.K.; Jena, A.B. The interplay between cytokines, inflammation, and antioxidants: mechanistic insights and therapeutic potentials of various antioxidants and anti-cytokine compounds. *Biomed Pharmacother.* **2024**, *178*:117177. doi: 10.1016/j.biopha.2024.117177.

343. Scholz, C.C.; Cavadas, M.A.; Tambuwala, M.M.; Hams, E.; Rodríguez, J.; von Kriegsheim, A.; Cotter, P.; Bruning, U.; Fallon, P.G.; Cheong, A.; Cummins, E.P.; Taylor, C.T. Regulation of IL-1 β -induced NF- κ B by hydroxylases links key hypoxic and inflammatory signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2013**, 110(46):18490-5. doi: 10.1073/pnas.1309718110.
344. Korbecki, J.; Simińska, D.; Gąssowska-Dobrowolska, M.; Listos, J.; Gutowska, I.; Chlubek, D.; Baranowska-Bosiacka, I. Chronic and Cycling Hypoxia: Drivers of Cancer Chronic Inflammation through HIF-1 and NF- κ B Activation: A Review of the Molecular Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 10701. doi: 10.3390/ijms221910701.
345. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* **2017**, 2:17023–. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
346. Brüne, B.; Dehne, N.; Grossmann, N.; Jung, M.; Namgaladze, D.; Schmid, T.; von Knethen, A.; Weigert, A. Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid Redox Signal.* **2013**, Aug 20;19(6):595-637. doi: 10.1089/ars.2012.4785.
347. D'Oria, R.; Schipani, R.; Leonardini, A.; Natalicchio, A.; Perrini, S.; Cignarelli, A.; Laviola, L.; Giorgino, F. The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. *Oxid Med Cell Longev.* **2020**, 2020:5732956. doi: 10.1155/2020/5732956.
348. Stetler, R.A.; Gan, Y.; Zhang, W.; Liou, A.K.; Gao, Y.; Cao, G.; Chen, J. Heat shock proteins: cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* **2010**, 92(2):184-211. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.05.002.
349. Baird, N.A.; Turnbull, D.W.; Johnson, E.A. Induction of the heat shock pathway during hypoxia requires regulation of heat shock factor by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem.* **2006**, 281(50):38675-81. doi: 10.1074/jbc.M608013200.
350. Беленічев І.Ф., Чорний В.І., Нагорна Є.А., Бухтіярова Н.В., Кучеренко В.І. Нейропротекція та нейропластичність. Київ: Логос, 2015. 510 с.
351. Belenichev, I.F., Kolesnik, Y.M., Pavlov, S.V. *et al.* Disturbance of HSP70 chaperone activity is a possible mechanism of mitochondrial dysfunction. *Neurochem. J.* **2011**, 5, 251–256. doi: 10.1134/S1819712411040040.

352. Hu, C.; Yang, J.; Qi, Z.; Wu, H.; Wang, B.; Zou, F.; Mei, H.; Liu, J.; Wang, W.; Liu, Q. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm (2020)*. **2022**, Aug 2;3(3):e161. doi: 10.1002/mco2.161.
353. Kim, J.Y.; Kim, J.W.; Yenari, M.A. Heat shock protein signaling in brain ischemia and injury. *Neurosci Lett*. **2020**, Jan 10;715:134642. doi: 10.1016/j.neulet.2019.134642;
354. Liu, S.; Liu, Y.; Bao, E.; Tang, S. The Protective Role of Heat Shock Proteins against Stresses in Animal Breeding. *Int. J. Mol. Sci*. **2024**, 25, 8208. doi: 10.3390/ijms25158208.
355. Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther*. **1998**, 80(2):183-201. doi: 10.1016/s0163-7258(98)00028-x.
356. Singh, M.K.; Shin, Y.; Ju, S.; Han, S.; Choe, W.; Yoon, K.-S.; Kim, S.S.; Kang, I. Heat Shock Response and Heat Shock Proteins: Current Understanding and Future Opportunities in Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci*. **2024**, 25, 4209. doi: 10.3390/ijms25084209.
357. Chen, Y-J.; Cheng, S-Y.; Liu, C-H.; Tsai, W-C.; Wu, H-H.; Huang, M-D. Exploration Of The Truncated Cytosolic Hsp70 In Plants - Unveiling The Diverse T1 Lineage And The Conserved T2 Lineage. *Front. Plant Sci*. **2023**, 14:1279540. doi: 10.3389/Fpls.2023.1279540.
358. Mayer, M.P.; Bukau, B. Hsp70 Chaperones: Cellular Functions And Molecular Mechanism. *Cell Mol Life Sci*. **2005**, Mar; 62(6):670-84. doi: 10.1007/S00018-004-4464-6.
359. Muronetz, V.I.; Kudryavtseva, S.S.; Leisi, E.V.; Kurochkina, L.P.; Barinova, K.V.; Schmalhausen, E.V. Regulation By Different Types Of Chaperones Of Amyloid Transformation Of Proteins Involved In The Development Of Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci*. **2022**, 23, 2747. doi: 10.3390/Ijms23052747.
360. Storey, J.M.; Storey, K.B. Chaperone Proteins: Universal Roles In Surviving Environmental Stress. *Cell Stress Chaperones*. **2023**, 28(5):455-466. Doi: 10.1007/S12192-022-01312-X.

361. Díaz-Villanueva, J.F.; Díaz-Molina, R.; García-González, V. Protein Folding And Mechanisms Of Proteostasis. *Int J Mol Sci.* **2015**, Jul 28; 16(8):17193-230. Doi: 10.3390/Ijms160817193.
362. Verghese, J.; Abrams, J.; Wang, Y.; Morano, K.A. Biology Of The Heat Shock Response And Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces Cerevisiae*) As A Model System. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2012**, Jun; 76(2):115-58. Doi: 10.1128/Mmbr.05018-11.
363. Hu, S.; Tan, J.; Qin, L.; Lv, L.; Yan, W.; Zhang, H.; Tang, B.; Wang, C. Molecular Chaperones And Parkinson's Disease. *Neurobiol Dis.* **2021**, 160:105527. Doi: 10.1016/J.Nbd.2021.105527.
364. Serlidaki, D.; Van Waarde, M.A.W.H.; Rohland, L.; Wentink, A.S.; Dekker, S.L.; Kamphuis, M.J.; Boertien, J.M.; Brunsting, J.F.; Nillegoda, N.B.; Bukau, B.; Mayer, M.P.; Kampinga, H.H.; Bergink, S. Functional Diversity Between HSP70 Paralogs Caused By Variable Interactions With Specific Co-Chaperones. *J Biol Chem.* **2020**, 295(21):7301-16. Doi: 10.1074/Jbc.Ra119.012449.
365. Reddy, R.K.; Mao, C.; Baumeister, P.; Austin, R.C.; Kaufman, R.J.; Lee, A.S. Endoplasmic Reticulum Chaperone Protein GRP78 Protects Cells From Apoptosis Induced By Topoisomerase Inhibitors: Role Of ATP Binding Site In Suppression Of Caspase-7 Activation. *J Biol Chem.* **2003**, 278(23):20915-24. Doi: 10.1074/Jbc.M212328200.
366. Beere, H.M.; Wolf, B.B.; Cain, K.; Mosser, D.D.; Mahboubi, A.; Kuwana, T.; Tailor, P.; Morimoto, R.I.; Cohen, G.M.; Green, D.R. Heat-Shock Protein 70 Inhibits Apoptosis By Preventing Recruitment Of Procaspase-9 To The Apaf-1 Apoptosome. *Nat Cell Biol.* **2000**, Aug; 2(8):469-75. Doi: 10.1038/35019501.
367. Zia, A.; Pourbagher-Shahri, A.M.; Farkhondeh, T.; Samarghandian, S. Molecular And Cellular Pathways Contributing To Brain Aging. *Behav Brain Funct.* **2021**, 17(1):6. Doi: 10.1186/S12993-021-00179-9.
368. Nagai, M.; Kaji, H. Thermal Effect On Heat Shock Protein 70 Family To Prevent Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Biomolecules.* **2023**, 13(5):867. Doi: 10.3390/Biom13050867.

369. Niinuma, S.A.; Lubbad, L.; Lubbad, W.; Moin, A.S.M.; Butler, A.E. The Role Of Heat Shock Proteins In The Pathogenesis Of Polycystic Ovarian Syndrome: A Review Of The Literature. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1838. Doi: 10.3390/Ijms24031838.

370. Evgen'ev, M.B.; Onikienko, S.B.; Chuvakova, L.N.; Garbuz, D.G.; Zatsepina, O.G. The Role Of Hsp70 In Adaptation To Adverse Conditions And Its Possible Medical Application. *Front Biosci (Landmark Ed)*. **2023**, *28*(2):25. Doi: 10.31083/J.Fbl2802025.

371. Hulina, A.; Grdić Rajković, M.; Jakšić Despot, D.; Jelić, D.; Dojder, A.; Čepelak, I.; Rumora, L. Extracellular Hsp70 Induces Inflammation And Modulates LPS/LTA-Stimulated Inflammatory Response In THP-1 Cells. *Cell Stress Chaperones*. **2018**, *23*(3):373-84. doi: 10.1007/S12192-017-0847-0.

372. Alberti, G.; Paladino, L.; Vitale, A.M.; Caruso Bavisotto, C.; Conway De Macario, E.; Campanella, C.; Macario, A.J.L.; Marino Gammazza, A. Functions And Therapeutic Potential Of Extracellular Hsp60, Hsp70, And Hsp90 In Neuroinflammatory Disorders. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 736. doi: 10.3390/app11020736.

373. Shevtsov, M.A.; Komarova, E.Y.; Meshalkina, D.A.; Bychkova, N.V.; Aksenov, N.D.; Abkin, S.V.; Margulis, B.A.; Guzhova, I.V. Exogenously Delivered Heat Shock Protein 70 Displaces Its Endogenous Analogue And Sensitizes Cancer Cells To Lymphocytes-Mediated Cytotoxicity. *Oncotarget*. **2014**, May 30; *5*(10):3101-14. doi: 10.18632/Oncotarget.1820.

374. Demyanenko, S.V.; Kalyuzhnaya, Y.N.; Bachurin, S.S.; Khaitin, A.M.; Kunitsyna, A.E.; Batalshchikova, S.A.; Evgen'ev, M.B.; Garbuz, D.G. Exogenous Hsp70 Exerts Neuroprotective Effects In Peripheral Nerve Rupture Model. *Exp Neurol*. **2024**, Mar; *373*:114670. Doi: 10.1016/J.Expneurol.2023.114670;

375. Aliyeva, O.; Belenichev, I.; Bukhtiyarova, N.; Semenov, D.; Voloshchuk, S. Comparative Assessment Of The Effectiveness Of HSP70 / HIF-1 α System Modulators After Prenatal Hypoxia. *Biomed Pharmacol J.* **2024**, *17*(1). doi: <https://dx.doi.org/10.13005/Bpj/2850>.

376. Cao, J.; Yang, L.; Wang, L.; Zhao, Q.; Wu, D.; Li, M.; Mu, Y. Heat Shock Protein 70 Attenuates Hypoxia Induced Apoptosis Of Pulmonary Microvascular Endothelial

Cells Isolated From Neonatal Rats. *Mol Med Rep.* **2021**, 24(4):690. doi: 10.3892/Mmr.2021.12327.

377. Fu, H.; Li, Y.; Tian, J.; Et Al. Contribution Of HIF-1 α To Heat Shock Response By Transcriptional Regulation Of HSF1/HSP70 Signaling Pathway In Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas*. *Mar Biotechnol.* **2023**, 25, 691–700. doi: 10.1007/S10126-023-10231-6.

378. Ikwegbue, P.C.; Masamba, P.; Oyinloye, B.E.; Kappo, A.P. Roles Of Heat Shock Proteins In Apoptosis, Oxidative Stress, Human Inflammatory Diseases, And Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*. **2017**, Dec 23; 11(1):2. doi: 10.3390/Ph11010002.

379. Sulzbacher, M.M.; Ludwig, M.S.; Heck, T.G. Oxidative Stress And Decreased Tissue HSP70 Are Involved In The Genesis Of Sepsis: HSP70 As A Therapeutic Target. *Rev Bras Ter Intensiva.* **2020**, 32(4):585-591. Doi: 10.5935/0103-507X.20200084.

380. Checa, J.; Aran, J.M. Reactive Oxygen Species: Drivers Of Physiological And Pathological Processes. *J Inflamm Res.* **2020**, 13:1057-1073. doi: 10.2147/Jir.S275595.

381. Giorgi, C.; Marchi, S.; Simoes, I.C.M.; Ren, Z.; Morciano, G.; Perrone, M.; Patalas-Krawczyk, P. et al. Mitochondria And Reactive Oxygen Species In Aging And Age-Related Diseases. *Int Rev Cell Mol Biol.* **2018**; 340:209-344. doi: 10.1016/Bs.Ircmb.2018.05.006.

382. Forman, H.J.; Zhang, H. Targeting Oxidative Stress In Disease: Promise And Limitations Of Antioxidant Therapy. *Nat Rev Drug Discov.* **2021**, 20:689–709. doi: 10.1038/S41573-021-00233-1.

383. Ahmad, S.; White, C.W.; Chang, L.Y.; Schneider, B.K.; Allen, C.B. Glutamine Protects Mitochondrial Structure And Function In Oxygen Toxicity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2001**, 280(4):L779-91. doi: 10.1152/Ajplung.2001.280.4.L779.

384. Calabrese, V.; Testa, G.; Ravagna, A.; Bates, T.E.; Stella, A.M. HSP70 Induction In The Brain Following Ethanol Administration In The Rat: Regulation By Glutathione Redox State. *Biochem Biophys Res Commun.* **2000**, 269(2):397-400. Doi: 10.1006/Bbrc.2000.2311.

385. Singh, J.; Kaur, G. HSP70 Induction And Oxidative Stress Protection Mediated By A Subtoxic Dose Of NMDA In The Retinoic Acid-Differentiated C6 Glioma Cell Line. *Brain Res Bull.* **2006**, 69(1):37-47. doi: 10.1016/J.Brainresbull.2005.10.011.

386. Kawana, K.; Miyamoto, Y.; Tanonaka, K.; Han-No, Y.; Yoshida, H.; Takahashi, M.; Takeo, S. Cytoprotective Mechanism Of Heat Shock Protein 70 Against Hypoxia/Reoxygenation Injury. *J Mol Cell Cardiol.* **2000**, 32(12):2229-37. doi: 10.1006/Jmcc.2000.1250.
387. Zhang, H.; Gong, W.; Wu, S.; Perrett, S. Hsp70 In Redox Homeostasis. *Cells.* **2022**, 11(5):829. doi: 10.3390/Cells11050829.
388. Kim, J.Y.; Barua, S.; Huang, M.Y.; Park, J.; Yenari, M.A.; Lee, J.E. Heat Shock Protein 70 (HSP70) Induction: Chaperonotherapy For Neuroprotection After Brain Injury. *Cells.* **2020**, 9(9):2020. doi: 10.3390/Cells9092020.
389. Guo, S.; Wharton, W.; Moseley, P.; Shi, H. Heat Shock Protein 70 Regulates Cellular Redox Status By Modulating Glutathione-Related Enzyme Activities. *Cell Stress Chaperones.* **2007**, 12(3):245-54. Doi: 10.1379/Csc-265.1.
390. Chen, S.; Wu, S.; Lin, B. The Potential Therapeutic Value Of The Natural Plant Compounds Matrine And Oxymatrine In Cardiovascular Diseases. *Front. Cardiovasc. Med.* **2024**, 11:1417672. doi: 10.3389/Fcvm.2024.1417672.
391. Urban-Chmiel, R.; Puchalski, A.; Wernicki, A.; Dec, M.; Paluch, E. Characterization Of Hsp70 Proteins In Bovine Leukocytes Induced By The Temperature 41 Degrees C. *Pol J Vet Sci.* **2009**, 12(3):323-28.
392. Ferreira-Cravo, M.; Moreira, D.C.; Hermes-Lima, M. Glutathione Depletion Disrupts Redox Homeostasis In An Anoxia-Tolerant Invertebrate. *Antioxidants.* **2023**, 12, 1197. doi: 10.3390/Antiox12061197.
393. Belenichev, I.F.; Kolesnik, Y.M.; Pavlov, S.V.; Et Al. Malate-Aspartate Shunt In Neuronal Adaptation To Ischemic Conditions: Molecular-Biochemical Mechanisms Of Activation And Regulation. *Neurochem. J.* **2012**, 6, 22–28. doi: 10.1134/S1819712412010023.
394. Vanin, A.F. Dinitrosyl Iron Complexes With Thiol-Containing Ligands As A "Working Form" Of Endogenous Nitric Oxide. *Nitric Oxide.* **2016**, 54:15-29. doi: 10.1016/J.Niox.2016.01.006.
395. Henard, C.A.; Vázquez-Torres, A. Nitric Oxide And Salmonella Pathogenesis. *Front Microbiol.* **2011**, Apr 20; 2:84. doi: 10.3389/Fmicb.2011.00084.

396. Thompho, S.; Fritzsche, S.; Chokbunpiam, T.; Et Al. Adsorption And The Chemical Reaction $\text{N}_2\text{O}_4 \leftrightarrow 2\text{NO}_2$ In The Presence Of N_2 In A Gas Phase Connected With A Carbon Nanotube. *ACS Omega*. **2021**, 6(27):17342-17352. doi: 10.1021/Acsomega.1c01459. PMID: 34278120; PMCID: PMC8280629.
397. Möller, M.N.; Vitturi, D.A. The Chemical Biology Of Dinitrogen Trioxide. *Redox Biochem Chem*. **2024**, Jun; 8:100026. Doi: 10.1016/J.Rbc.2024.100026.
398. Belenichev, I.F.; Shah, F.; Chekman, I.S.; Nagornaya, E.A.; Gorbacheva, S.V.; Gorchakova, N.A.; Bukhtiyarova, N.V. Thiol-Disulfide System: Role In Endogenous Cyto- And Organoprotection, Pathways Of Pharmacological Modulation. *Kyiv: Yuston Publishing House*, **2020**, 232.
399. Granne, I.; Southcombe, J.H.; Snider, J.V.; Tannetta, D.S.; Child, T.; Redman, C.W.; Sargent, I.L. ST2 And IL-33 In Pregnancy And Pre-Eclampsia. *PLoS One*. **2011**; 6(9):E24463. doi: 10.1371/Journal.Pone.0024463.
400. Shah, A.; Reyes, L.M.; Morton, J.S.; Fung, D.; Schneider, J.; Davidge, S.T. Effect Of Resveratrol On Metabolic And Cardiovascular Function In Male And Female Adult Offspring Exposed To Prenatal Hypoxia And A High-Fat Diet. *J Physiol*. **2016**, 594(5):1465-82. doi: 10.1113/Jp271133.
401. Qian, S.; Chen, G.; Li, R.; Ma, Y.; Pan, L.; Wang, X.; Wang, X. Disulfide Stress And Its Role In Cardiovascular Diseases. *Redox Biol*. **2024**, 75:103297. doi: 10.1016/J.Redox.2024.103297.
402. Dubois-Deruy, E.; Peugnet, V.; Turkieh, A.; Pinet, F. Oxidative Stress In Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel)*. **2020**; 9(9):864. doi: 10.3390/Antiox9090864.
403. Senoner, T.; Dichtl, W. Oxidative Stress In Cardiovascular Diseases: Still A Therapeutic Target? *Nutrients*. **2019**, Sep 4; 11(9):2090. doi: 10.3390/Nu11092090.
404. Kowalczyk, P.; Krych, S.; Kramkowski, K.; Jęczmyk, A.; Hrapkowicz, T. Effect Of Oxidative Stress On Mitochondrial Damage And Repair In Heart Disease And Ischemic Events. *Int. J. Mol. Sci*. **2024**, 25, 12467. doi: 10.3390/Ijms252212467.
405. Guo, Z.; Tian, Y.; Liu, N.; Chen, Y.; Chen, X.; Yuan, G.; Chang, A.; Chang, X.; Wu, J.; Zhou, H. Mitochondrial Stress As A Central Player In The Pathogenesis Of

Hypoxia-Related Myocardial Dysfunction: New Insights. *Int J Med Sci.* **2024**, 21(13):2502-2509. doi: 10.7150/Ijms.99359.

406. Guo, Z.; Tian, Y.; Gao, J.; Zhou, B.; Zhou, X.; Chang, X.; Zhou, H. Enhancement Of Mitochondrial Homeostasis: A Novel Approach To Attenuate Hypoxic Myocardial Injury. *Int J Med Sci.* **2024**, 21(15):2897-2911. doi: 10.7150/Ijms.103986.

407. Song, H.; Polster, B.M.; Thompson, L.P. Chronic Hypoxia Alters Cardiac Mitochondrial Complex Protein Expression And Activity In Fetal Guinea Pigs In A Sex-Selective Manner. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **2021**, 321(6):R912-R924. doi: 10.1152/Ajpregu.00004.2021.

408. Zorov, D.B.; Juhaszova, M.; Sollott, S.J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) And ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev.* **2014**, 94(3):909-50. doi: 10.1152/Physrev.00026.2013.

409. Miriyala, S.; Spasojevic, I.; Tovmasyan, A.; Salvemini, D.; Vujaskovic, Z.; St Clair, D.; Batinic-Haberle, I. Manganese Superoxide Dismutase, MnSOD And Its Mimics. *Biochim Biophys Acta.* **2012**, 1822(5):794-814. doi: 10.1016/J.Bbadis.2011.12.002.

410. Yuen, R.K.; Chen, B.; Blair, J.D.; Robinson, W.P.; Nelson, D.M. Hypoxia Alters The Epigenetic Profile In Cultured Human Placental Trophoblasts. *Epigenetics.* **2013**, 8(2):192-202. doi: 10.4161/Epi.23400.

411. Yan, X.; Fang, Y.; Yuan, Y.; Ding, Y.; Yu, H.; Li, Y.; Shi, Q.; Gao, Y.; Zhou, X.; Zhang, D.; Yuan, E.; Zhou, H.; Zhao, X.; Zhang, L. Combined Analysis Of The Effects Of Hypoxia And Oxidative Stress On DNA Methylation And The Transcriptome In HTR-8/SVneo Trophoblast Cells. *J Cell Mol Med.* **2024**, 28(12):E18469. doi: 10.1111/Jcmm.18469.

412. Leonard, M.O.; Cottell, D.C.; Godson, C.; Brady, H.R.; Taylor, C.T. The Role Of HIF-1 Alpha In Transcriptional Regulation Of The Proximal Tubular Epithelial Cell Response To Hypoxia. *J Biol Chem.* **2003**, Oct 10; 278(41):40296-304. doi: 10.1074/Jbc.M302560200.

413. Mendoza, E.N.; Ciriolo, M.R.; Ciccarone, F. Hypoxia-Induced Reactive Oxygen Species: Their Role In Cancer Resistance And Emerging Therapies To Overcome It. *Antioxidants.* **2025**, 14, 94. doi: 10.3390/Antiox14010094.

414. Giussani, D.A. The Fetal Brain Sparing Response To Hypoxia: Physiological Mechanisms. *J Physiol.* **2016**, 594(5):1215-30. doi: 10.1113/Jp271099.
415. Guo, J.; Yu, X.; Liu, Y.; Lu, L.; Zhu, D.; Zhang, Y.; Li, L.; Zhang, P.; Gao, Q.; Lu, X.; Sun, M. Prenatal Hypothyroidism Diminished Exogenous NO-Mediated Diastolic Effects In Fetal Rat Thoracic Aorta Smooth Muscle Via Increased Oxidative Stress. *Reprod Toxicol.* **2022**, 113:52-61. doi: 10.1016/J.Reprotox.2022.08.009.
416. Korge, P.; Ping, P.; Weiss, J.N. Reactive Oxygen Species Production In Energized Cardiac Mitochondria During Hypoxia/Reoxygenation: Modulation By Nitric Oxide. *Circ Res.* **2008**, 103(8):873-80. doi: 10.1161/Circresaha.108.180869.
417. Spiess, B.D. Perfluorocarbon Emulsions, Platelet Counts, And Inflammation. *Shock.* **2019**, 52(1S Suppl 1):13-18. Doi: 10.1097/Shk.0000000000001154.
418. Gale, S.C.; Gorman, G.D.; Copeland, J.G.; McDonagh, P.F. Perflubron Emulsion Prevents PMN Activation And Improves Myocardial Functional Recovery After Cold Ischemia And Reperfusion. *J Surg Res.* **2007**, 138(1):135-40. doi: 10.1016/J.Jss.2006.08.029;
419. Krafft, M.P.; Riess, J.G. Corrigendum To "Therapeutic Oxygen Delivery By Perfluorocarbon-Based Colloids" [Advances In Colloid And Interface Science 294 (2021) 102407]. *Adv Colloid Interface Sci.* **2021**, 295:102505. doi: 10.1016/J.Cis.2021.102505.
420. Janjua, M.B.; Makepeace, C.M.; Anastacio, M.M.; Schuessler, R.B.; Nichols, C.G.; Lawton, J.S. Cardioprotective Benefits Of Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channel Opener Diazoxide Are Lost With Administration After The Onset Of Stress In Mouse And Human Myocytes. *J Am Coll Surg.* **2014**, 219(4):803-13. doi: 10.1016/J.Jamcollsurg.2014.05.010.
421. Ahmad, T.; Wang, J.; Velez, A.K.; Suarez-Pierre, A.; Clement, K.C.; Dong, J.; Sebestyen, K.; Canner, J.K.; Murphy, M.P.; Lawton, J.S. Cardioprotective Mechanisms Of Mitochondria-Targeted S-Nitrosating Agent And Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channel Opener Are Mutually Exclusive. *JTCVS Open.* **2021**, 8:338-354. Doi: 10.1016/J.Xjon.2021.07.036.

422. Larrieu, A.J.; Yazdanfar, S.; Redovan, E.; Eftychiadis, A.; Kao, R.; Silver, J.; Ghosh, S.C. Beneficial Effects Of Cocarboxylase In The Treatment Of Experimental Myocardial Infarction In Dogs. *Am Surg.* **1987**, 53(12):721-5. PMID: 3425997.
423. Бондаренко, І.П. Вплив рибоксину на гемодинаміку та мікроциркуляцію у хворих на хронічну ішемічну хворобу серця. *Лікарська справа* **1983**, 1: 15–18. PMID: 6868490.
424. Дунаєв, В.В.; Тішкін, В.С.; Євдокимов, Є.І.; Бєлий І.М. Механізм дії рибоксину. *Фармакологія і токсикологія.* **1989**, 52 (6): 56–58. PMID: 2483141.
425. Мазур, І.А.; Чекман, І.С., Беленічев, І.Ф. Метаболітотропні препарати. *Запоріжжя*, **2007**. 309 с. ISBN 5-225-04144-2.
426. Novikov, V.E.; Levchenkova, O.S.; Ivantsova, E.N.; Vorobieva, V.V. Mitochondrial Dysfunctions And Antihypoxants. *Rev Clin Pharmacol Drug Ther.* **2019**, 17(4):31-42. doi: 10.17816/Rcf17431-42.
427. Pospelova, M.L.; Barnaulov, O.D. The Antihypoxant And Antioxidant Effects Of Medicinal Plants As The Basis For Their Use In Destructive Diseases Of The Brain. *Hum Physiol.* **2000**, 26:86–91. doi: 10.1007/Bf02760723.
428. Vorrink, S.U.; Domann, F.E. Regulatory Crosstalk And Interference Between The Xenobiotic And Hypoxia Sensing Pathways At The AhR-ARNT-HIF1 α Signaling Node. *Chem Biol Interact.* **2014**, 218:82-88. doi: 10.1016/J.Cbi.2014.05.001.
429. Dow, L.F.; Case, A.M.; Paustian, M.P.; Pinkerton, B.R.; Simeon, P.; Trippier, P.C. The Evolution Of Small Molecule Enzyme Activators. *RSC Med Chem.* **2023**, 14(11):2206-2230. Doi: 10.1039/D3md00399j.
430. Weinberg, J.; Liu, K.H.; Lee, C.M.; Crandall, W.J.; Cuevas, A.R.; Druzak, S.A.; Morgan, E.T.; Jarrell, Z.R.; Ortlund, E.A.; Martin, G.S.; Singer, G.; Strobel, F.H.; Go, Y.M.; Jones, D.P. Mammalian Hydroxylation Of Microbiome-Derived Obesogen, Delta-Valerobetaine, To Homocarnitine, A 5-Carbon Carnitine Analog. *J Biol Chem.* **2025**, 301(1):108074. doi: 10.1016/J.Jbc.2024.108074.
431. Stoyanova, S.; Bogdanov, M.G. Rational Design, Synthesis, And In Vitro Activity Of Heterocyclic Gamma-Butyrobetaines As Potential Carnitine Acetyltransferase Inhibitors. *Molecules.* **2025**, 30, 735. doi: 10.3390/Molecules30030735.

432. Gerashchenko, A.D.; Pozdnyakov, D.I.; Voronkov, A.V. Study Of Dose-Dependent Actoprotective Effect Of ATACL On Physical Performance And Psychoemotional Status Of Animals Under Exhausting Exercise. *Res Results Pharmacol.* **2022**, 8(1):13–22. doi: 10.3897/Rrpharmacology.8.75981.
433. Liepinsh, E.; Vilskersts, R.; Skapare, E.; Svalbe, B.; Kuka, J.; Cirule, H.; Pugovics, O.; Kalvinsh, I.; Dambrova, M. Mildronate Decreases Carnitine Availability And Up-Regulates Glucose Uptake And Related Gene Expression In The Mouse Heart. *Life Sci.* **2008**, 83(17-18):613-19. doi: 10.1016/J.Lfs.2008.08.008.
434. Sjakste, N.; Gutcaits, A.; Kalvinsh, I. Mildronate: An Antiischemic Drug For Neurological Indications. *CNS Drug Rev.* **2005**, 11(2):151-68. Doi: 10.1111/J.1527-3458.2005.Tb00267.X.
435. Bellman, V. Unlocking The Potential Of Meldonium: From Performance Enhancement To Therapeutic Insights. *Psychoactives.* **2024**, 3:235-247. doi: 10.3390/Psychoactives3020015.
436. Vilskersts, R.; Kigitovica, D.; Korzh, S.; Videja, M.; Vilks, K.; Cirule, H.; Skride, A.; Makrecka-Kuka, M.; Liepinsh, E.; Dambrova, M. Protective Effects Of Meldonium In Experimental Models Of Cardiovascular Complications With A Potential Application In COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 45. doi: 10.3390/Ijms23010045.
437. Dambrova, M.; Makrecka-Kuka, M.; Vilskersts, R.; Makarova, E.; Kuka, J.; Liepinsh, E. Pharmacological Effects Of Meldonium: Biochemical Mechanisms And Biomarkers Of Cardiometabolic Activity. *Pharmacol Res.* **2016**, 113(Pt B):771-780. doi: 10.1016/J.Phrs.2016.01.01.
438. Zarubina, I.V.; Lukk, M.V.; Shabanov, P.D. Antihypoxic And Antioxidant Effects Of Exogenous Succinic Acid And Aminothiol Succinate-Containing Antihypoxants. *Bull Exp Biol Med.* **2012**, 153(3):336-39. doi: 10.1007/S10517-012-1709-5;
439. Zhao, F.; Li, R.; Liu, Y.; Chen, H. Perspectives On Lecithin From Egg Yolk: Extraction, Physicochemical Properties, Modification, And Applications. *Front Nutr.* **2023**, 9:1082671. doi: 10.3389/Fnut.2022.1082671.
440. Tanaka-Kanegae, R.; Kimura, H.; Hamada, K. Oral Administration Of Egg-And Soy-Derived Lysophosphatidylcholine Mitigated Acetylcholine Depletion In The

Brain Of Scopolamine-Treated Rats. *Nutrients*. **2023**, 15(16):3618. doi: 10.3390/Nu15163618.

441. Onaolapo, M.C.; Alabi, O.D.; Akano, O.P.; Olateju, B.S.; Okeleji, L.O.; Adeyemi, W.J.; Ajayi, A.F. Lecithin And Cardiovascular Health: A Comprehensive Review. *Egypt Heart J.* **2024**, 76(1):92. doi: 10.1186/S43044-024-00523-0.

442. Tuteja, N.; Chandra, M.; Tuteja, R.; Misra, M.K. Nitric Oxide As A Unique Bioactive Signaling Messenger In Physiology And Pathophysiology. *J Biomed Biotechnol.* 2004; 2004(4):227-237. doi: 10.1155/S1110724304402034.

443. Cannavo, A.; Koch, W.J. GRK2 As Negative Modulator Of NO Bioavailability: Implications For Cardiovascular Disease. *Cell Signal.* **2018**, 41:33-40. Doi: 10.1016/J.Cellsig.2017.01.014.

444. Zhao, Y.; Jiang, Q.; Zhang, X.; Zhu, X.; Dong, X.; Shen, L.; Zhang, S.; Niu, L.; Chen, L.; Zhang, M.; Jiang, J.; Chen, D.; Zhu, L. L-Arginine Alleviates LPS-Induced Oxidative Stress And Apoptosis Via Activating SIRT1-AKT-Nrf2 And SIRT1-FOXO3a Signaling Pathways In C2C12 Myotube Cells. *Antioxidants (Basel)*. **2021**, 10(12):1957. doi: 10.3390/Antiox10121957.

445. Bielenichev, I.F.; Vizir, V.A.; Mamchur, V.Y.; Kuriata, O.V. Place Of Tiotriazoline In The Gallery Of Modern Metabolitotropic Medicines. *Zaporozhye Med J.* **2019**, 21(1). doi: 10.14739/2310-1210.2019.1.155856.

446. Gureev, A.P.; Nesterova, V.V.; Babenkova, P.I.; Ivanov, M.E.; Plotnikov, E.Y.; Silachev, D.N. L-Carnitine And Mildronate Demonstrate Divergent Protective Effects On Mitochondrial DNA Quality Control And Inflammation Following Traumatic Brain Injury. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, 26, 2902. doi: 10.3390/Ijms26072902.

447. Беленічев І.Ф.; Мазур І.А.; Чекман І.С.; та ін. Звіт про доклінічне вивчення специфічної біологічної активності (антиішемічної, ендотеліопротекторної) препарату «Лізиній» при парентеральному введенні. *Запоріжжя*, **2011**, 87 с.

448. Беленічев І.Ф.; Мазур І.А.; Чекман І.С.; та ін. Звіт про доклінічне вивчення специфічної фармакологічної активності (кардіопротекторної, нейропротекторної, ендотеліопротекторної) таблеток «Ангіолін». *Запоріжжя*, **2015**, 167 с.

449. Абрамов А.В.; та ін. Звіт про сліпе дослідження кардіопротекторної та ендотеліопротекторної дії нового ін'єкційного розчину «Ангіолін», 25 мг/мл (ВАТ «НВО «Фарматрон», Україна) у порівнянні з ін'єкційним розчином «Тіотриазолін», 25 мг/мл (ПрАТ «Галичфарм» за участю ВАТ «НВО «Фарматрон», Україна) та ін'єкційним розчином «Мілдронат», 100 мг/мл (AS «Grindex», Латвія) при внутрішньочеревному введенні на моделі інфаркту міокарда, індукованого пітуїтрином-ізадрином у лабораторних щурів. *Запоріжжя*, **2013**, 25 с.

450. Мамчур В.І.; Беленічев І.Ф.; Мазур І.А. Звіт про фармакологічну експертизу (гостра і хронічна токсичність) (S)-2,6-діаміно-гексанової кислоти 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетату («Лізиній») та його 2,5% розчину для парентерального застосування. *Дніпропетровськ*, **2011**, 139 с.

451. Kurutas, E.B. The Importance Of Antioxidants Which Play The Role In Cellular Response Against Oxidative/Nitrosative Stress: Current State. *Nutr J.* **2015**, 15, 71. doi: 10.1186/S12937-016-0186-5.

452. Rodriguez-Miguel, P.; Lima-Cabello, E.; Martínez-Flórez, S.; Almar, M.; Cuevas, M.J.; González-Gallego, J. Hypoxia-Inducible Factor-1 Modulates The Expression Of Vascular Endothelial Growth Factor And Endothelial Nitric Oxide Synthase Induced By Eccentric Exercise. *J Appl Physiol (1985)*. **2015**, Apr 15; 118(8):1075-83. Doi: 10.1152/Jappphysiol.00780.2014;

453. Belenichev, I.F.; Mazur, I.A.; Abramov, A.V.; Et Al. The Endothelium-Protective Effect Of 3-Methyl-1,2,4-Triazolyl-5-Thioacetate (S)-2,6-Diaminohexanic Acid (Lysinium): Effects On The Expression Of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) And The Characteristics Of The Endotheliocytes Of The Cerebral Vessels Of Animals With Cerebral Ischemia. *Neurochem. J.* 2013, 7, 296–302. doi: 10.1134/S181971241304003X.

454. Hood, J.D.; Meininger, C.J.; Ziche, M.; Granger, H.J. VEGF Upregulates EcNOS Message, Protein, And NO Production In Human Endothelial Cells. *Am J Physiol.* **1998**, Mar; 274(3):H1054-58. Doi: 10.1152/Ajppheart.1998.274.3.H1054.

455. Tishkin, V.S.; Belenichev, I.F.; Serikov, V.I. Report on Study of General Toxic Effects of "Thiotriazoline Injection Solution 2.5% for Intravenous Administration". *Zaporizhzhya*, **1990**, 41 p.

456. Решетілов, В.І.; Карзов, М.В.; Книш, Є.Г. Звіт про вивчення ембріотоксичних властивостей нового препарату «Тіотриазолін» та його лікарських форм. *Запоріжжя*, **1994**, 66 с.

457. Мазур, І.А.; Волошин, Н.А.; Книш, Є.Г.; та ін. Звіт про вивчення мутагенних властивостей нового препарату «Тіотриазолін» та його лікарських форм. *Запоріжжя*, **1994**, 123 с.

458. Mazur, I.; Belenichev, I.; Kucherenko, L.; Siusiuka, V.; Reznichenko, N.; Kyryliuk, A.; Ryzhenko, V.; Shevchenko, A.; Khromylova, O. Thiotriazoline and Its Today. *Monograph. Dnipro: Jurfond*, **2025**, 384 p. ISBN 978-966-934-648-3.

459. Беленічев, І.Ф., та ін. Тіол-дисульфідна система: роль в ендогенній цитопротекції та органопротекції, шляхи фармакологічної модуляції. *Монографія. Київ: ТОВ «Поліграф Плюс»*, **2020**. 232 с. ISBN 978-617-7854-05-9.

460. Zvyagintseva, T.V.; Myronchenko, S.I.; Kytsyuk, N.I.; Naumova, O.V. The Effect Of Ointments With Antioxidant Activity On The Morphological Structures Of Skin Of Guinea Pigs Exposed To Local Ultraviolet Irradiation. *Precarpathian Bull Shevchenko Sci Soc Pulse*. **2019**, 6(58):64–72. doi: 10.21802/2304-7437-2019-6(58)-64-72.

461. Manischenkova, Y.; Shkala, L.; Dudich, T.; Litvinova, M.; Ivanova, M. Oxidative Stress In Patients With Diabetes Mellitus Type 2 Associated With Exacerbation Of Chronic Pyelonephritis. *Int J Endocrinol (Ukraine)*. **2022**, 3(51):19–22. doi: 10.22141/2224-0721.3.51.2013.84311.

462. Mukhina, I.V. Report on Independent Preclinical Assessment of Specific Activity of Thiotriazoline Pharmaceutical Forms (2.5% Injection Solution and Tablets). *Nizhny Novgorod*, **2009**, 57 p.

463. Kucherenko, L.I.; Hromyleva, O.V.; Mazur, I.A.; Shishkina, S.V. Theoretical Study About L-Arginine Complexes Formation With Thiotriazoline. *Zaporozhye Med J*. **2017**, 19(1):108–112. doi: 10.14739/2310-1210.2017.1.91736.

464. Kastanayan, A.A.; Kartashova, E.A.; Zheleznyak, E.I. The Effect Of Thiotriazoline On Energy Production In Conditions Of Chronic Myocardial Ischemia. *South Russia J Ther Pract*. **2020**, 1(1):84-90. doi: 10.21886/2712-8156-2020-1-1-84-90.

465. Дзяк, Г.В. Звіт про клінічне дослідження: «Подвійне сліпе,

багатофункціональне, рандомізоване дослідження в паралельних групах для оцінки ефективності та переносимості тіотриазоліну». Київ, 2010.

466. Кадін Д.В., Чумак Б.А., Філіппов О.Є., Шустов С.Б. Тіотриазолін у лікуванні стабільної стенокардії II–III функціонального класу. *Кардіологія*. 2015, 55, (8): 26–29. doi: 10.18565/Cardio.2015.8.26-29.

467. Kuka, J.; Vilskersts, R.; Cirule, H.; Makrecka, M.; Pugovics, O.; Kalvinsh, I.; Dambrova, M.; Liepinsh, E. The Cardioprotective Effect Of Mildronate Is Diminished After Co-Treatment With L-Carnitine. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2012, 17(2):215-22. doi: 10.1177/1074248411419502.

468. Liepinsh, E.; Vilskersts, R.; Loca, D.; Kirjanova, O.; Pugovichs, O.; Kalvinsh, I.; Dambrova, M. Mildronate, An Inhibitor Of Carnitine Biosynthesis, Induces An Increase In Gamma-Butyrobetaine Contents And Cardioprotection In Isolated Rat Heart Infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006, 48(6):314-19. doi: 10.1097/01.Fjc.0000250077.07702.23.

469. Berlato, D.G.; Bairros, A.V. Meldonium: Pharmacological, Toxicological, And Analytical Aspects. *Toxicol Res Appl*. 2020, 4. doi:10.1177/2397847320915143.

470. Gureev, A.P.; Sadovnikova, I.S.; Shaforostova, E.A.; Starkov, A.A.; Popov, V.N. Mildronate Protects Heart MtDNA From Oxidative Stress Toxicity Induced By Exhaustive Physical Exercise. *Arch Biochem Biophys*. 2021, 705:108892. doi: 10.1016/J.Abb.2021.

471. Bielenichev, I.F.; Gorchakova, N.A.; Doroshenko, E.Yu.; Samura, I.B.; Ryzhenko, V.P.; Bukhtiiarova, N.V. Use Of Metabolites, Metabolithotropic Agents And Nutritional Supplements In Sports And Sports Medicine: A Modern View On The Problem. *Mod Med Technol*. 2023, (4):76-88. doi: 10.34287/Mmt.4(59).2023.10.

472. Abel, T.; Knechtle, B.; Perret, C.; Eser, P.; Von Arx, P.; Knecht, H. Influence Of Chronic Supplementation Of Arginine Aspartate In Endurance Athletes On Performance And Substrate Metabolism – A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Int J Sports Med*. 2005, 26(5):344-49. doi: 10.1055/S-2004-821111.

473. Castell, L.M.; Stear, S.J.; Burke, L.M., Eds. Nutritional Supplements In Sport, Exercise And Health: An A-Z Guide. London: Routledge; 2015. doi: 10.4324/9781315772509.

474. Hsu, C.N.; Tain, Y.L. Impact Of Arginine Nutrition And Metabolism During Pregnancy On Offspring Outcomes. *Nutrients*. **2019**, Jun 27; 11(7):1452. Doi: 10.3390/Nu11071452.

475. Bednov, A.; Espinoza, J.; Betancourt, A.; Vedernikov, Y.; Belfort, M.; Yallampalli, C. L-Arginine Prevents Hypoxia-Induced Vasoconstriction In Dual-Perfused Human Placental Cotyledons. *Placenta*. **2015**, 36(11):1254-59. doi: 10.1016/J.Placenta.2015.08.012.

476. Suvorava, T.; Nagy, N.; Pick, S.; Lieven, O.; Rüther, U.; Dao, V.T.; Fischer, J.W.; Weber, M.; Kojda, G. Impact Of eNOS-Dependent Oxidative Stress On Endothelial Function And Neointima Formation. *Antioxid Redox Signal*. **2015**, Sep 20; 23(9):711-23. Doi: 10.1089/Ars.2014.6059;

477. Parkhomenko, D.; Belenichev, I.; Bukhtiyarova, N.; Kuchkovskyi, O.; Gorchakova, N.; Diachenko, V.; Et Al. Pharmacocorrection Of Disturbances In The NO System In Experimental Chronic Generalized Periodontitis. *Open Access Maced J Med Sci*. **2023**, 11(A):47-52. doi: 10.3889/Oamjms.2023.10717.

478. Maslennikov, S.O.; Golovakha, M.L.; Belenichev, I.F.; Makyeyeva, L.V. Regenerative Properties Of Polypropylene Mesh Coated With Thiotriazoline And L-Arginine. *Biomed Pharmacol J*. **2022**, 15(4). Doi: 10.13005/Bpj/2537.

479. Задніпрятий, І.В.; Трет'якова, О.С.; Сатаєва, Т.П. Морфологічні зміни міокарда щурів при гемічній гіпоксії та лікуванні Цитофлавіном. *Експ Клін Фармакол*. **2016**, 79(5):20-25.

480. Zadnipryanyy, I.V.; Tretiakova, O.S.; Sataieva, T.P. Cardio and cytoprotective effect of cytoflavin in terms of experimental perinatal hemic hypoxia. *Patol Fiziol Eksp Ter*. **2016**, 60(4):64-71.

481. Черкасова, Д.У.; Магомедгаджієва, Д.Н.; Рабаданова, А.І. Функціональні зміни у системі мати-плід при експериментальній хронічній нітритній гіпоксії. *ЦНЦ Російської академії наук*. **2009**, 11(5):934-937.

482. Мухіна, І.В. Звіт про незалежну преклінічну оцінку специфічної активності лікарських форм Тіотриазоліну (2,5% розчин для ін'єкцій та таблетки). *Нижній Новгород, Росія*, **2009**, с. 112.

483. Колесник, Ю.М. Звіт про преклінічне вивчення специфічної біологічної активності (антіішемічної, ендотеліопротекторної) препарату Лізиній (Ангіолін) при парентеральному введенні. *Запоріжжя*. **2018**, 11, 2584.
484. Ghotbeddin, Z.; Basir, Z.; Jamshidian, J.; Delfi, F. Modulation of behavioral responses and CA1 neuronal death by nitric oxide in the neonatal rat's hypoxia model. *Brain Behav*. **2020**, 10, e01841.
485. Henry, J.B. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods; W.B Saunders Company: Philadelphia, PA, USA, **1979**, p. 1233, 1.
486. Kumar, P.; Srivastava, P.; Gupta, A.; Bajpai, M. Noninvasive recording of electrocardiogram in conscious rat: A new device. *Indian J Pharmacol*. 2017, 49(1):116–118. DOI: 10.4103/0253-7613.201031.
487. Pereira-Junior, P.P.; Marocolo, M.; Rodrigues, F.P.; Medei, E.; Nascimento, J.H. Noninvasive method for electrocardiogram recording in conscious rats: Feasibility for heart rate variability analysis. *An Acad Bras Cienc*. 2010, 82(2):431–437. DOI: 10.1590/s0001-37652010000200019.
488. Richardson, B.S.; Bocking, A.D. Metabolic and circulatory adaptations to chronic hypoxia in the fetus. *Comp Biochem Physiol A Mol Integ Physiol*. **1998**, 119(3):717–23. DOI: 10.1016/S1095-6433(98)01010-1.
489. Li G, Bae S, Zhang L. Effect of prenatal hypoxia on heat stress-mediated cardioprotection in adult rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2004**, 286(5):H1712–9. DOI: 10.1152/ajpheart.00898.2003.
490. Tomat, A.L.; Juriol, L.V.; Gobetto MN, Veiras LC, Mendes Garrido Abregú F, Zilberman J, et al. Morphological and functional effects on cardiac tissue induced by moderate zinc deficiency during prenatal and postnatal life in male and female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2013**, 305(11):H1574–83. DOI: 10.1152/ajpheart.00578.2013.
491. Sesti, C.; Simkhovich, B.Z.; Kalvinsh, I.; Kloner, R.A. Mildronate, a novel fatty acid oxidation inhibitor and antianginal agent, reduces myocardial infarct size without affecting hemodynamics. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. **2006**, Mar; 47(3):493–9. DOI: 10.1097/01.fjc.0000211732.76668.d2.

492. Izhar, U.; Schwalb, H.; Borman, J.B.; Merin, G. Cardioprotective effect of L-arginine in myocardial ischemia and reperfusion in an isolated working rat heart model. *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)* **1998**, 39(3):321–9.
493. Dakshinamurti, S.; Abman, S.H.; Cheung, P.Y.; Lakshminrusimha, S.; McNamara, P.; Milsom, W.K. Hypoxic Respiratory Failure in the Newborn: From Origins to Clinical Management. *1st ed.*; CRC Press: **2021**. DOI: 10.1201/9780367494018.
494. Palmer, R.M.; Ashton, D.S.; Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. **1988**, Jun; 333(6174):664–6. DOI: 10.1038/333664a0.
495. Sjakstea, N.; Kalvinshb, I. Meldonium: An antiischemic drug with multiple indications. *Pharmacologyonline*. **2006**, 1:1-18
496. Pyatyshkina, N.A.; Yushkov, B.G.; Brykina, I.A.; Sheshenina, A.V.; Volodarskaya, A.V. Changes in macrometric indices of rat placentas under hypobaric hypoxia and posthemorrhagic anemia in different embryonic periods. *Bull. Sib. Med.* **2005**, T4, 14.
497. Іваніцька, Н.Ф. Методи отримання різних стадій гемічної гіпоксії у щурів шляхом введення нітриту натрію. *Патол. фізіол. експерим. терапія*, **1976**, 3: 69–71.
498. Evidence on Developmental and Reproductive Toxicity of Sodium Nitrite. Reproductive and Cancer Hazard Assessment Section (RCHAS) Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHHA) California Environmental Protection Agency (CAL/EPA) DRAFT. USA. 3 March 2000. Available online: <https://oehha.ca.gov/proposition-65/cmr/draft-hid-available-sodium-nitrite> (accessed on 27 October 2023).
499. Kotsiou, O.S.; Gourgoulisanis, K.I.; Zarogiannis, S.G. IL-33/ST2 Axis in Organ Fibrosis. *Front. Immunol.* **2018**, 9, 2432. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02432
500. Fike, C.D.; Dikalova, A.; Slaughter, J.C.; Kaplowitz, M.R.; Zhang, Y.; Aschner, J.L. Reactive oxygen species-reducing strategies improve pulmonary arterial responses to nitric oxide in piglets with chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, 18, 1727–1738.doi: 10.1089/ars.2012.4823
501. Le Brocq, M.; Leslie, S.J.; Milliken, P.; Megson, I.L. Endothelial Dysfunction: From Molecular Mechanisms to Measurement, Clinical Implications, and

Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10*, 1631–1674. doi: 10.1089/ars.2007.201.

502. Marchiq, I.; Pouysségur, J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H⁺ symporters. *J. Mol. Med.* **2016**, *94*, 155–171. doi: 10.1007/s00109-015-1307-x.

503. Brüne, B.; Zhou, J. The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 845–855. doi: 10.2174/0929867033457746.

504. Дунаєв В.В., Крайдаченко О.В., Березін О.Є. Застосування нового кардіопротекторного засобу тіотриазоліну в терапії ішемічної хвороби серця у літніх пацієнтів. *Експериментальна і клінічна фармакологія.* **1996**, *59*: 21–23.

505. Gambardella, J.; Khondkar, W.; Morelli, M.B.; Wang, X.; Santulli, G.; Trimarco, V. Arginine and Endothelial Function. *Biomedicines* **2020**, *8*, 277. doi: 10.3892/etm.2015.2280.

506. Kappou, D.; Sifakis, S.; Konstantinidou, A.; Papantoniou, N.; Spandidos, D.A. Role of the angiopoietin/Tie system in pregnancy (Review). *Exp. Ther. Med.* **2015**, *9*, 1091–1096. Doi: 10.3892/etm.2015.2280.

507. Hellgren, K.T. *Long-Term Effects of Prenatal Hypoxia on Cardiomyocyte Function*; School of Medical Sciences, Division of Cardiovascular Sciences: Manchester, UK, 2020.

508. Todorovic', Z.; Đurašević', S.; Stojkovic', M.; Grigorov, I.; Pavlovic', S.; Jasnic', N.; Tosti, T.; Macut, J.B. Lipidomics Provides New Insight into Pathogenesis and Therapeutic Targets of the Ischemia-Reperfusion Injury. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2798. doi: 10.3390/ijms22062798.

509. Saposnik, B.; Peynaud-Debayle, E.; Stepanian, A.; Baron, G.; Simansour, M.; Mandelbrot, L.; de Prost, D.; Gandrille, S. Elevated soluble endothelial cell protein C receptor (sEPCR) levels in women with preeclampsia: A marker of endothelial activation/damage? *Thromb. Res.* **2012**, *129*, 152–157. doi: 10.1016/j.thromres.2011.07.023.

510. Schmaier, A.A.; Hurtado, G.M.; Manickas-Hill, Z.J.; Sack, K.D.; Chen, S.M.; Bhambhani, V.; Quadir, J.; Nath, A.K.; Ai-ris, Y.C.; Ngo, D.; et al. Tie2

activation protects against prothrombotic endothelial dysfunction in COVID-19. *JCI Insight* **2021**, 6, e151527. Doi: 10.1172/jci.insight.151527.

511. Jongman, R.M.; Zwiers, P.J.; van de Sluis, B.; van der Laan, M.; Moser, J.; Zijlstra, J.G.; Dekker, D.; Huijkman, N.; Moorlag, H.E.; Popa, E.R.; et al. Partial Deletion of Tie2 Affects Microvascular Endothelial Responses to Critical Illness in a Vascular Bed and Organ-Specific Way. *Shock* **2019**, 51, 757–769. Doi: 10.1097/SHK.0000000000001226.

512. Li, X.; Lee, C.; Tang, Z.; Zhang, F.; Arjunan, P.; Li, Y.; Hou, X.; Kumar, A.; Dong, L. VEGF-B: A survival, or an angiogenic factor? *Cell Adh. Migr.* **2009**, 3, 322–327. Doi: 10.4161/cam.3.4.9459.

513. Mallick, R.; Ylä-Herttuala, S. Therapeutic Potential. of VEGF-B in Coronary Heart Disease and Heart Failure: Dream or Vision? *Cells* **2022**, 11, 4134. Doi: 10.3390/cells11244134.

514. Kivelä, R.; Bry, M.; Robciuc, M.R.; Räsänen, M.; Taavitsainen, M.; Silvola, J.M.; Saraste, A.; Hulmi, J.J.; Anisimov, A.; Mäyränpää, M.I.; et al. VEGF-B-induced vas-cular growth leads to metabolic reprogramming and ischemia resistance in the heart. *EMBO Mol. Med.* **2014**, 6, 307–321. Doi: 10.1002/emmm.201303147.

515. Bian, Z.M.; Elner, S.G.; Elner, V.M. Regulation of VEGF mRNA expression and protein secre-tion by TGF-beta2 in human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* **2007**, 84, 812–822. Doi: 10.1016/j.exer.2006.12.016.

516. Sultan, I.; Ramste, M.; Peletier, P.; Hemanthakumar, K.A.; Ramanujam, D.; Tirronen, A.; von Wright, Y.; Antila, S.; Saharinen, P.; Eklund, L.; et al. Contribution of VEGF-B-Induced Endocardial Endothelial Cell Lineage in Physiological Versus Pathological Cardiac Hypertrophy. *Circ. Res.* **2024**, 134, 1465–1482. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.324136.

517. Waller, J.P.; Howell, J.A.; Peterson, H.; George, E.M.; Bidwell, G.L., 3rd. Elastin-Like Polypeptide: VEGF-B Fusion Protein for Treatment of Preeclampsia. *Hypertension* **2021**, 78, 1888–1901. Doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17713.

518. Kuwabara, M.; Kakinuma, Y.; Ando, M.; Katare, R.G.; Yamasaki, F.; Doi, Y.; Sato, T. Nitric oxide stimulates vascular endothelial growth factor production in

cardiomyocytes involved in angiogenesis. *J. Physiol. Sci.* **2006**, *56*, 95–101. Doi: 10.2170/physiolsci.RP002305.

519. Boughaleb, H.; Lobysheva, I.; Dei Zotti, F.; Balligand, J.L.; Montiel, V. Biological Assessment of the NO-Dependent Endothelial Function. *Molecules* **2022**, *27*, 7921. Doi: 10.3390/molecules27227921.

520. Kucherenko, L.I.; Khromylova, O.V.; Mazur, I.A.; Moriak, Z.B. Optimization of L-arginine and thiotriazoline compound analysis by high-performance liquid chromatography method. *Zap. Med. J.* **2018**, *20*, 837–840. Doi: 10.14739/2310-1210.2018.6.146760.

ДОДАТОК А1



ЗАТВЕРЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
роботи та навчальної роботи та якості
освіти Запорізького державного медико-
фармацевтичного університету
Світлана Моргунцова
2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ результатів, отриманих у дисертаційній роботі, у наукову роботу та навчальний процес

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Кардіопротективні властивості модуляторів системи NO після пренатальної гіпоксії (Експериментальне дослідження).
2. **Установа, її адреса, виконавці:** ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України", м. Київ, 03057, вулиця Антона Цедіка, 14, аспірант Попазова Олена Олександрівна, д. біол. н. Ядловський Олег Євгенович, д. біол. н., професор Беленічев Ігор Федорович.
3. **Джерела інформації:**
 - Popazova O.O., Belenichev I.F., Abramov A.V., Bukhtiyarova N.V., Chereszniuk I.L., Skoryna D.Yu. Indicators of bioelectrical activity of the rat heart after prenatal hypoxia and pharmacological correction. Innov Biosyst Bioeng. 2023, 6 (3-4):148–160 doi: 10.20535/ibb.2022.6.3-4.268504.
 - Popazova O., Belenichev I., Bukhtiyarova N., Ryzhenko V., Oksenykh V., Kamyshnyi A. Cardioprotective Activity of Pharmacological Agents Affecting NO Production and Bioavailability in the Early Postnatal Period after Intrauterine Hypoxia in Rats. Друк. Biomedicines 2023, 11, 2854. doi: 10.3390/biomedicines11102854.
 - Popazova, O., Belenichev, I., Yadlovskyi, O., Oksenykh, V., Kamyshnyi, A. Altered blood molecular markers of cardiovascular function in rats after intrauterine hypoxia and drug therapy. Current Issues in Molecular Biology, 2023, 45(11), 8704–8715. doi: 10.3390/cimb45110547.
 - Belenichev, I., Popazova, O., Yadlovskyi, O., Bukhtiyarova, N., Ryzhenko, V., Pavlov, S., Oksenykh, V., Kamyshnyi, O. Possibility of using NO modulators for pharmacocorrection of endothelial dysfunction after prenatal hypoxia. Pharmaceuticals, 2025, 18(1), 106. doi: 10.3390/ph18010106.
4. **Де і коли впроваджено:** у освітньо-науковий процес кафедри фармакології та медичної рецептури з курсом нормальної фізіології Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, Обговорено та затверджено на засіданні кафедр (протокол № 7 від «26» червня 2025 року.
5. **Результат впровадження:** отримана інформація поглиблює знання про патофізіологію постгіпоксичних уражень серцево-судинної системи, зокрема роль NO-дисфункції, нітрозативного стресу та порушень ангиогенезу. Вивчення кардіопротекторної дії модуляторів NO дозволяє сформувати у здобувачів цілісне уявлення про сучасні підходи до фармакологічної корекції гіпоксичних станів.
6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Завідувач кафедри фармакології та медичної
рецептури з курсом нормальної фізіології Запорізького
державного медико-фармацевтичного університету,
професор

Відповідальний за впровадження

Ігор БЄЛЕНІЧЕВ
доц. Оксана МОРОЗОВА

ДОДАТОК А2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Дніпровського державного медичного
університету

Сергій ЗАХАРОВ

06 2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів, отриманих у дисертаційній роботі,
у наукову роботу та навчальний процес

1. Назва пропозицій для впровадження: Кардіопротективні властивості модуляторів системи NO після пренатальної гіпоксії (Експериментальне дослідження).
2. Установа, її адреса, виконавці: ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України", м. Київ, 03057, вулиця Антона Цедіка, 14, аспірант Попазова Олена Олександрівна, д. біол. н. Ядловський Олег Євгенович, д. біол. н., професор Беленічев Ігор Федорович.
3. Джерела інформації:
 - Popazova O.O., Belenichev I.F., Abramov A.V., Bukhtiyarova N.V., Cheresnhiuk I.L., Skoryna D.Yu. Indicators of bioelectrical activity of the rat heart after prenatal hypoxia and pharmacological correction. *Innov Biosyst Bioeng*, 2023, 6 (3-4):148–160 doi: 10.20535/ibb.2022.6.3-4.268504.
 - Popazova O., Belenichev I., Bukhtiyarova N., Ryzhenko V., Oksenysh V., Kamyshnyi A. Cardioprotective Activity of Pharmacological Agents Affecting NO Production and Bioavailability in the Early Postnatal Period after Intrauterine Hypoxia in Rats. *Друк. Biomedicines* 2023, 11, 2854. doi: 10.3390/biomedicines11102854.
 - Popazova, O., Belenichev, I., Yadlovskiy, O., Oksenysh, V., Kamyshnyi, A. Altered blood molecular markers of cardiovascular function in rats after intrauterine hypoxia and drug therapy. *Current Issues in Molecular Biology*, 2023, 45(11), 8704–8715. doi: 10.3390/cimb45110547.
 - Belenichev, I., Popazova, O., Yadlovskiy, O., Bukhtiyarova, N., Ryzhenko, V., Pavlov, S., Oksenysh, V., Kamyshnyi, O. Possibility of using NO modulators for pharmacocorrection of endothelial dysfunction after prenatal hypoxia. *Pharmaceuticals*, 2025, 18(1), 106. doi: 10.3390/ph18010106.
4. Форма впроваджено: у науково-педагогічну роботу та навчальний процес.
5. Термін впровадження: 2025.
6. Ефективність впровадження: Отримана інформація поглиблює знання про механізми постгіпоксичних уражень серцево-судинної системи, зокрема роль NO-дисфункції, нітрозативного стресу та порушень ангіогенезу в кардіопатології новонароджених. Аналіз дії модуляторів NO-системи сприяє формуванню у здобувачів цілісного уявлення про сучасні підходи до фармакологічної корекції гіпоксичних станів.
7. Зауваження та пропозиції: не вносилися.
8. Обговорено та затверджено на засіданні структурного підрозділу: протокол № 17 від «02» червня 2025 року.

Відповідальний за впровадження:

Професор кафедри фармакології,
загальної та клінічної фармації
Дніпровського державного медичного
університету, д.мед.н., професор

(Підпис)

Володимир ЖИЛЮК

ДОДАТОК АЗ



ЗАТВЕРЖУЮ

Проректор з науково-педагогічної та
лікувальної роботи Вінницького
національного медичного університету
ім. М.І. Пирогова

проф. Василь ПОГОРІЛИЙ
_____ 2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів, отриманих у дисертаційній роботі, у наукову роботу та навчальний
процес

1. Назва пропозицій для впровадження: Кардіопротективні властивості модуляторів системи NO після пренатальної гіпоксії (Експериментальне дослідження).

2. Установа, її адреса, виконавці: ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України", м. Київ, 03057, вулиця Антона Цедіка, 14, аспірант Попазова Олена Олександрівна, д. біол. н. Ядловський Олег Євгенович, д. біол. н., професор Бєленічев Ігор Федорович.

3. Джерела інформації:

– Popazova O.O., Belenichev I.F., Abramov A.V., Bukhtiyarova N.V., Cheresniiuk I.I., Skoryna D.Yu. Indicators of bioelectrical activity of the rat heart after prenatal hypoxia and pharmacological correction. Innov Biosyst Bioeng. 2023. 6 (3-4):148–160. doi: 10.20535/ibb.2022.6.3-4.268504.

– Popazova O., Belenichev I., Bukhtiyarova N., Ryzhenko V., Oksenykh V., Kamyshnyi A. Cardioprotective Activity of Pharmacological Agents Affecting NO Production and Bioavailability in the Early Postnatal Period after Intrauterine Hypoxia in Rats. Друк. Biomedicines 2023, 11, 2854. doi: 10.3390/biomedicines11102854.

– Popazova, O., Belenichev, I., Yadlovskiy, O., Oksenykh, V., Kamyshnyi, A. Altered blood molecular markers of cardiovascular function in rats after intrauterine hypoxia and drug therapy. Current Issues in Molecular Biology. 2023. 45(11), 8704–8715. doi: 10.3390/cimb45110547.

– Belenichev, I., Popazova, O., Yadlovskiy, O., Bukhtiyarova, N., Ryzhenko, V., Pavlov, S., Oksenykh, V., Kamyshnyi, O. Possibility of using NO modulators for pharmacocorrection of endothelial dysfunction after prenatal hypoxia. Pharmaceuticals. 2025, 18(1), 106. doi: 10.3390/ph18010106.

4. Форма впровадження: у науково-педагогічну роботу та навчальний процес.

5. Термін впровадження: 2025 р.

6. Ефективність впровадження: Отримана інформація поглибило знання про механізми постгіпоксичних уражень серцево-судинної системи, зокрема роль NO-дисфункції, нитрогативного стресу та порушень ангіогенезу в кардіонатології новонароджених. Аналіз дії модуляторів NO-системи сприяє формуванню у здобувачів цілісного уявлення про сучасні підходи до фармакологічної корекції гіпоксичних станів.

7. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

8. Обговорено та затверджено на засіданні структурного підрозділу: протокол № 13 від «23» червня 2025 року.

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри фармакології

Вінницького національного
медичного університету

ім. М.І. Пирогова, професор

Наталія ВОЛОЩУК

ДОДАТОК А4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з науково-педагогічної,
навчальної роботи та якості освіти
Запорізького державного медико-
фармацевтичного університету
Світлана МОРГУНЦОВА
» _____ 2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
результатів, отриманих у дисертаційній роботі, у наукову роботу
та навчальний процес

1. Назва пропозицій для впровадження: Кардіопротективні властивості модуляторів системи NO після пренатальної гіпоксії (Експериментальне дослідження).

2. Установа, її адреса, виконавці: ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України", м. Київ, 03057, вулиця Антона Цедіка, 14, аспірант Попазова Олена Олександрівна, д. біол. н. Ядловський Олег Євгенович, д. біол. н., професор Беленічев Ігор Федорович.

3. Джерела інформації:

– Popazova O.O., Belenichev I.F., Abramov A.V., Bukhtiyarova N.V., Chereszniuk I.L., Skoryna D.Yu. Indicators of bioelectrical activity of the rat heart after prenatal hypoxia and pharmacological correction. Innov Biosyst Bioeng, 2023, 6 (3-4):148–160 doi: 10.20535/ibb.2022.6.3-4.268504.

– Popazova O., Belenichev I., Bukhtiyarova N., Ryzhenko V., Oksenysh V., Kamyshnyi A. Cardioprotective Activity of Pharmacological Agents Affecting NO Production and Bioavailability in the Early Postnatal Period after Intrauterine Hypoxia in Rats. Друк. Biomedicines 2023, 11, 2854. doi: 10.3390/biomedicines11102854.

– Popazova, O., Belenichev, I., Yadlovskiy, O., Oksenysh, V., Kamyshnyi, A. Altered blood molecular markers of cardiovascular function in rats after intrauterine hypoxia and drug therapy. Current Issues in Molecular Biology, 2023, 45(11), 8704–8715. doi: 10.3390/cimb45110547.

– Belenichev, I., Popazova, O., Yadlovskiy, O., Bukhtiyarova, N., Ryzhenko, V., Pavlov, S., Oksenysh, V., Kamyshnyi, O. Possibility of using NO modulators for pharmacocorrection of endothelial dysfunction after prenatal hypoxia. Pharmaceuticals, 2025, 18(1), 106. doi: 10.3390/ph18010106.

4. Де і коли впроваджено: у освітньо-науковий процес кафедри акушерства і гінекології Запорізького державного медико-фармацевтичного університету з червня 2025 року.

5. Результат впровадження: отримана інформації сприяє поглибленню знань студентів, лікарів-інтернів та лікарів акушерів-гінекологів про патофізіологічні механізми постгіпоксичних уражень серцево-судинної системи, зокрема роль нітросидергічної дисфункції, нітрозативного стресу та порушень ангиогенезу в розвитку серцевої патології у новонароджених. Вивчення кардіопротекторної дії модуляторів NO-системи, таких як тіотриазолін, ангіолін, мілдронат і L-аргінін, дозволяє сформувати у здобувачів вищої освіти цілісне уявлення про сучасні підходи до фармакологічної корекції гіпоксичних уражень, що є важливим для підготовки майбутніх фахівців.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Завідувач кафедри акушерства і гінекології
Запорізького державного
медико-фармацевтичного університету,
д-р мед. наук, професор

Володимир СЮСЮКА

ДОДАТОК А5

ЗАТВЕРЖУЮ
Директор ДУ «Інституту фармакології та
токсикології НАМН України»
Олег Ядловський
2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів, отриманих у дисертаційній роботі, у наукову роботу та навчальний процес

1. Назва пропозицій для впровадження: Кардіопротективні властивості модуляторів системи NO після пренатальної гіпоксії (Експериментальне дослідження).

2. Установа, її адреса, виконавці: ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ, 03057, вулиця Антона Цедіка, 14, аспірант Попазова Олена Олександрівна, д. біол. н. Ядловський Олег Євгенович, д. біол. н., професор Беленічев Ігор Федорович.

3. Джерела інформації:

- Popazova O.O., Belenichev I.F., Abramov A.V., Bukhtiyarova N.V., Cheresnick I.L., Skoryna D.Yu. Indicators of bioelectrical activity of the rat heart after prenatal hypoxia and pharmacological correction. *Innov Biosyst Bioeng.* 2023, 6 (3-4):148–160 doi: 10.20535/ibb.2022.6.3-4.268504.
- Popazova O., Belenichev I., Bukhtiyarova N., Ryzhenko V., Oksenyeh V., Kamyshnyi A. Cardioprotective Activity of Pharmacological Agents Affecting NO Production and Bioavailability in the Early Postnatal Period after Intrauterine Hypoxia in Rats. *Друк. Biomedicines* 2023, 11, 2854. doi: 10.3390/biomedicines11102854.
- Popazova, O., Belenichev, I., Yadlovskiy, O., Oksenyeh, V., Kamyshnyi, A. Altered blood molecular markers of cardiovascular function in rats after intrauterine hypoxia and drug therapy. *Current Issues in Molecular Biology*, 2023, 45(11), 8704–8715. doi: 10.3390/cimb45110547.
- Belenichev, I., Popazova, O., Yadlovskiy, O., Bukhtiyarova, N., Ryzhenko, V., Pavlov, S., Oksenyeh, V., Kamyshnyi, O. Possibility of using NO modulators for pharmacocorrection of endothelial dysfunction after prenatal hypoxia. *Pharmaceuticals*, 2025, 18(1), 106. doi: 10.3390/ph18010106.

4. Базова установа, що проводила впровадження: ДУ «Інституту фармакології та токсикології НАМН України».

5. Форма впровадження: у наукову та навчальну діяльність.

6. Термін впровадження: 2025.

7. Ефективність впровадження: Отримана інформація поглиблює знання про механізми постгіпоксичних уражень серцево-судинної системи, зокрема роль NO-дисфункції, підрозативного стресу та порушень ангіогенезу в кардіонатології новонароджених. Аналіз дії модуляторів NO-системи сприяє формуванню у здобувачів цілісного уявлення про сучасні підходи до фармакологічної корекції гіпоксичних станів.

8. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

9. Обговорено та затверджено на засіданні структурного підрозділу: протокол № 2 від «09» червня 2025 року.

Відповідальний за впровадження:

ДУ «Інституту фармакології та токсикології НАМН України»
в.о. зав. відділу мед. хімії

Зінаїда СУВОРОВА

ДОДАТОК Б

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Попазова О. О. Особливості порушень у нітроксидергічній системі міокарду щурів після внутрішньоутробної гіпоксії. Збірник тез доповідей 82 науково-практичної конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2022» (Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, 17 травня 2022 р.). – Запоріжжя: ЗДМУ, 2022. – с. 77.

2. Popazova O.O., Belenichev I.F., Abramov A.V., Bukhtiyarova N.V., Chereshniuk I.L., Skoryna D.Yu. Indicators of bioelectrical activity of the rat heart after prenatal hypoxia and pharmacological correction. *Innov Biosyst Bioeng*, 2023, 6 (3-4):148–160 <http://dx.doi.org/10.20535/ibb.2022.6.3-4.268504>. Scopus Q3. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, експериментальні дослідження, обговорення результатів та підготовку тексту статті до друку).*

3. Popazova O. O. ECG changes in rats after prenatal hypoxia and course treatment with modulators of NO. Друк. Збірник тез доповідей 83 науково-практичної конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2023» (Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, 25-26 травня 2023 р.). – Запоріжжя: ЗДМУ, 2023.

4. Popazova O., Belenichev I., Bukhtiyarova N., Ryzhenko V., Oksenyich V., Kamyshnyi A. Cardioprotective Activity of Pharmacological Agents Affecting NO Production and Bioavailability in the Early Postnatal Period after Intrauterine Hypoxia in Rats. Друк. *Biomedicines* 2023, 11, 2854. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102854>. Scopus Q1. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, експериментальні дослідження, обговорення*

результатів та підготовку тексту статті до друку).

5. Belenichev I., Aliyeva O, Bukhtiyarova N., Popazova O., Ryzhenko O. Prognostic Significance of Neurodegradation/Neuroplasticity Markers and Endothelial Dysfunction Indicators in Assessing the Efficiency of Therapy for Children with CNS Disorders af5 ter Prenatal Hypoxia Proceedings of the 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 1–30 November 2023, MDPI: Basel, Switzerland, doi:10.3390/ECMC2023-15626.

6. Popazova, O., Belenichev, I., Yadlovskyi, O., Oksenych, V., Kamyshnyi, A. Altered blood molecular markers of cardiovascular function in rats after intrauterine hypoxia and drug therapy. Current Issues in Molecular Biology, 2023, 45(11), 8704–8715. <https://doi.org/10.3390/cimb45110547>. Scopus Q2. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, експериментальні дослідження, обговорення результатів та підготовку тексту статті до друку).*

7. Popazova O. O. Disruption of cardiac bioelectrical activity after intrauterine hypoxia and approaches to cardioprotection in the postnatal period. Збірник тез доповідей 84 науково-практичної конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2024» (Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, м. Запоріжжя, 23-24 травня 2024 р.). – Запоріжжя: ЗДМФУ, 2024, с.125. (диплом I ступеню)

8. Попазова О. О., Беленічев І.Ф., Ядловський О.Є. Вплив модуляторів системи оксиду азоту на порушення серцево-судинної системи у щурів після пренатальної гіпоксії. Актуальні питання фармакології та лікарської токсикології: матеріали науково-практичної конференції молодих вчених із міжнародною участю (№137), вересень 2024, м. Київ.

9. Popazova O. O. Development of approaches to pharmacological correction of endothelial dysfunction in newborns after prenatal hypoxia: Focus on NO system modulators. Збірник тез доповідей 85 науково-практичної конференції з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2025» (Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, м. Запоріжжя, 15-16 травня 2025 р.). – Запоріжжя: ЗДМФУ, 2025, с

231. (диплом I ступеню).

10. Belenichev, I., Popazova, O., Yadlovskiy, O., Bukhtiyarova, N., Ryzhenko, V., Pavlov, S., Oksenykh, V., Kamyshnyi, O. Possibility of using NO modulators for pharmacocorrection of endothelial dysfunction after prenatal hypoxia. *Pharmaceuticals*, 2025, 18(1), 106. <https://doi.org/10.3390/ph18010106>. Scopus Q1. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, експериментальні дослідження, обговорення результатів та підготовку тексту статті до друку).*

11. Popazova O., Belenichev I., Bukhtiyarova N., Ryzhenko V., Gorchakova N., Oksenykh V., Kamyshnyi O. Molecular and Biochemical Mechanisms of Cardiomyopathy Development Following Prenatal Hypoxia—Focus on the NO System. *Antioxidants*. 2025; 14(6):743. <https://doi.org/10.3390/antiox14060743>. Scopus Q1. *(Дисертанткою проведено аналіз літератури, обговорення результатів та підготовку тексту статті до друку).*

ДОДАТОК В

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. 82-а науково-практична конференція з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2022» (Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, 17 травня 2022 р.) — усна доповідь з публікацією тез.

2. 83-я науково-практична конференція з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2023» (Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, 25–26 травня 2023 р.) — усна доповідь з публікацією тез.

3. 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 1–30 November 2023, MDPI: Basel, Switzerland, doi:10.3390/ECMC2023-15626. — усна доповідь з публікацією тез.

4. 84-а науково-практична конференція з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2024» (Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, м. Запоріжжя, 23–24 травня 2024 р.) — усна доповідь (диплом I ступеня) з публікацією тез.

5. Науково-практична конференція молодих вчених із міжнародною участю «Актуальні питання фармакології та лікарської токсикології» (№137) (м. Київ, вересень 2024 р.) — публікація тез.

6. 85-а науково-практична конференція з міжнародною участю молодих вчених та студентів «Актуальні питання сучасної медицини і фармації – 2025» (Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, м. Запоріжжя, 15–16 травня 2025 р.) — усна доповідь (диплом I ступеня) з публікацією тез.

