НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ГЕРОНТОЛОГІЇ ІМЕНІ Д.Ф. ЧЕБОТАРЬОВА
НАМН УКРАЇНИ»

МЕЛЬНИК АНДРІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК: 546.221.1: 577.112.386:612.6:616.1

СТАТЕВІ ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ СІРКОВМІСНИХ АМІНОКИСЛОТ І ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ТА ЇХ ЗВ'ЯЗОК ЗІ СТАНОМ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ СИСТЕМИ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

03.00.04. – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора медичних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис
Робота виконана в Вінницькому національному медичному університеті ім. М.І. Пирогова МОЗ України

Науковий консультант: доктор медичних наук, професор
Заічко Наталія Валентинівна,
Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України, м. Вінниця, завідувач кафедри біологічної та загальної хімії

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, старший науковий співробітник
Новікова Світлана Миколаївна,
Державна установа «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», м. Київ, заступник директора з наукової роботи

доктор медичних наук, професор
Ніженковська Ірина Володимирівна,
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, завідувач кафедри фармацевтичної, біологічної та токсикологічної хімії

доктор медичних наук, професор
Наконечна Оксана Анатоліївна,
Харківський національний медичний університет МОЗ України, м. Харків, завідувач кафедри біологічної хімії

Захист відбудеться 28 грудня 2017 р. о 13^{00} годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.551.01 в Державній установі «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України» (04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67)

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Державної установи «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України» (04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67)

Автореферат розіслано «27» листопада 2017 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Р.І. Потапенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. В Україні та світі серцево-судинні захворювання (ССЗ) залишаються найбільш поширеною патологією і є основною причиною захворюваності, смертності, втрати працездатності, не дивлячись навіть на значні досягнення у вирішені питань етіології, патогенезу, лікування та профілактики [Сіренко Ю.М., 2011; Коваленко В.Н. и др., 2014; Lurbe E. et al., 2016; George A. et al., 2017]. Понад 53% усього населення (25,8 млн. осіб) мають ССЗ, із них 19% (9,3 млн. осіб) припадає на людей працездатного віку. За останні 10 років поширеність ССЗ в Україні зросла на 80%, захворюваність - на 55,3%, а смертність - на 45% [Коваленко В.М., 2011; Коваленко В.Н. и др., 2014; Зозуля А.І., Зозуля І.С., 2014].

Ризик розвитку ССЗ в популяції обумовлений рядом факторів, частина з яких є повністю чи частково модифікованою, а частина не підлягає корекції [Кульчицкий О.К., 2005; Ferns G. A., 2008; Корчинський В.С., 2015]. Модифіковані фактори ризику включають в себе чинники, які контролюються способом життя та / або підлягають фармакологічній корекції (паління, ожиріння, гіподинамія, порушення ліпідного балансу, гіпертензія, цукровий діабет та інсулінорезистентність). Не підлягають корекції такі фактори як генетична / сімейна схильність, вік та стать.

Численні клінічні, експериментальні та епідеміологічні дані засвідчують, що стать відіграє вагому роль у розвитку ССЗ [Tostes RC et al., 2008; Regitz-Zagrosek V. et al., 2010; Зозуля А.І., Зозуля І.С., 2014]. Традиційно частота інфаркту міокарду та артеріальної гіпретензії вважалась вищою серед чоловіків [Canto J.G. et al., 2012; Lurbe E. et al., 2016]. Однак, виявилось, що поширеність артеріальної гіпертензії переважає в чоловічій популяції до 55 років, а після 55 років - в жіночій [Regitz-Zagrosek V et al., 2010; Сіренко Ю.М., 2011]. За останніми даними, найбільш вразливими щодо ССЗ є жінки старшого і похилого віку, а між тим за прогнозами ВООЗ в найближчому майбутньому кожна друга жінка світу буде старше 45 років. Таким чином, проблеми гендерної кардіології привертають все більше уваги, адже відмінності у факторах ризику, клінічних проявах, діагностичних і лікувальних підходах для чоловіків та жінок є найбільш значимими саме при ССЗ [Барна О.М., 2007; Ковальова О.М., Амбросова Т.М., 2012; Зозуля А.І., Зозуля І.С., 2014].

Молекулярні механізми статевого диморфізму кардіоваскулярної патології переважно пов’язують з різними біологічними ефектами статевих гормонів: естрадіол посилює утворення вазодилятаторів, зменшує активність процесів вільнорадикального окиснення, володіє антиапоптичними та протизапальними ефектами, тоді як тестостерон індукує вазоконстрикцію, активує процеси пероксидації ліпідів та протеїнів, має проапоптичу дію [Kienitz T., Quinkler M., 2008; Coylewright M. et al., 2008; Bhupathy P. et al., 2010; Tarhouni K. et al., 2013; Smith P.M., Ferguson A.V., 2016].

За останнє десятиріччя були ідентифіковані нові незалежні фактори ризику ССЗ такі як гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) та гіперцистеїнемія [Vitvitsky V. et al., 2007; Moat S. J., 2008; Naess I. A. et al., 2008, Андрушко І.І., 2012; Zhang S. et al., 2014;

Peters B.A. et al., 2015]. Проте, гендерні особливості метаболізму сірковмісних амінокислот та його регуляції залишаються невизначеними. В окремих роботах засвідчені лише вікові та статеві відмінності щодо концентрації сірковмісних амінокислот в крові. Наприклад, у здорових дорослих жінок вміст гомоцистеїну та цистеїну в сироватці крові вірогідно менший, ніж у чоловіків того ж віку [Андрушко І.І., 2008]. В процесі старіння відмічається зростання рівня гомоцистеїну у осіб обох статей, але вектор гендерних відмінностей поступово змінює свою направленість: у жінок в період менопаузи рівень гомоцистеїну стає достовірно вищим, ніж у чоловіків того ж віку [Vitvitsky V. et al., 2007]. Також відсутні данні щодо впливу статевих чинників на активність основних шляхів синтезу та катаболізму гомоцистеїну та цистеїну в печінці, де найбільш активно відбувається обмін цих амінокислот. Невідомо, чи існують гендерні відмінності впливу високих рівнів сірковмісних амінокислот на функціональний стан серцево-судинної системи.

Метаболізм гомоцистеїну та цистеїну пов'язаний з продукцією біологічно-активної молекули - гідроген сульфіду (H_2S), що регулює тонус судин, скоротливість міокарду, агрегацію тромбоцитів, виявляє протиішемічні, антиоксидантні, протизапальні та антиапоптичні властивості [Заічко Н.В., 2011; Сагач В.Ф. та ін., 2013; Bełtowski J., Jamroz-Wiśniewska A. 2014; Nagpure B.V., Bian J.S., 2016; Donnarumma E. et al., 2017]. На сьогодні інформація щодо особливостей обміну H_2S у осіб різної статі та за різної насиченості організму статевими гормонами практично відсутня. Не встановлено, як змінюється активність, кінетичні параметри та експресія H_2S-продукуючих ензимів в міокарді та судинах в залежності від статі та різного рівня статевих гормонів. Не визначений вплив модуляторів обміну сірковмісних амінокислот та H_2S на стан серця та судин у осіб різної статі та за різного рівня насиченості організму статевими гормонами. Між тим, порушення обміну H_2S можуть виявитись одним із модифікованих чинників, що залучені у формування гендерних відмінностей ССЗ.

Ми вважаємо, що з'ясування статевих особливостей обміну сірковмісних амінокислот та H_2S, дослідження їх зв'язку зі станом серцево-судинної системи в нормі та при патології дозволить поглибити розуміння молекулярних механізмів, які інтегровані у формування гендерного диморфізму кардіоваскулярних захворювань, а також окреслить нові мішені та напрямки фармакологічної корекції захворювань серцево-судинної системи у осіб різної статі.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках планової НДР кафедри біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова "Вплив екзогенних та ендогенних чинників на обмін гідрогенсульфіду та асоційованих з ним метаболічних процесів в нормі та при патології" (№ держреєстрації - 0113U006461) (автор - відповідальний виконавець).

Мета дослідження. З'ясувати статеві особливості метаболізму сірковмісних амінокислот та гідроген сульфіду у щурів, оцінити їх зв'язок зі станом серцево-судинної системи в нормі та за гіпергомоцистеїнемії, і на цій основі

експериментально обґрунтувати нові підходи до корекції кардіоваскулярної патології.

Завдання дослідження:

1. Дослідити вміст гомоцистеїну, цистеїну, гідроген сульфіду в крові та особливості процесів метилування (за активністю ензимів бетаїнгомоцистеїн-метилтрансферази, метіонінаденозилтрансферази, S-аденозилгомоцистеїнгідролази), транссульфування (за активністю ензимів цистатіонін-γ-ліази та цистатіонін-β-синтази), синтезу H_2S (за десульфуразною активністю цистатіонін-γ-ліази, цистатіонін-β-синтази, цистеїнамінотрансферази, тіосульфатдитіолсульфідтрансферази), метаболізму цистеїну (за активністю цистеїндиоксигенази, γ-глутамілцистеїн-лігази) в печінці у щурів залежно від статі та рівня статевих гормонів.
2. Вивчити активність, кінетичні параметри та рівень експресії H_2S-синтезуючих ензимів (цистатіонін-γ-ліази, цистеїнамінотрансферази, тіосульфатдитіолсульфід-трансферази) в міокарді та аорті, оцінити їх зв'язок з рівнем гомоцистеїну, цистеїну й H_2S в сироватці крові у щурів залежно від статі та рівня статевих гормонів.
3. Оцінити зв'язки між вмістом H_2S та станом про- та антиоксидантної системи, показниками ендотеліальної функції (sVCAM-1), клітинного циклу, фрагментації ДНК в міокарді й аорті, параметрами мікроциркуляції, кардіогемодинаміки у щурів залежно від статі й рівня статевих гормонів.
4. Дослідити в модельних системах in vitro вплив статі та різного рівня статевих гормонів на ініційовану сірковмісними сполуками (гомоцистеїном, цистеїном та H_2S) скоротливість кільцевих фрагментів аорти щурів і на цій основі ідентифікувати нові молекулярні мішені реалізації судинних ефектів естрадіолу та тестостерону.
5. Дослідити статеві особливості впливу модуляторів стану системи H_2S (NaHS, інгібітору цистатіонін-γ-ліази пропаргілгліцину) на біохімічні та функціональні параметри стану серця й аорти щурів.
6. Оцінити статеві особливості параметрів мікроциркуляції та кардіогемодинаміки за різного рівня насиченості організму H_2S на моделі ішемії / реперфузії у щурів.
7. Вивчити вплив тіолактонової гіпергомоцистеїнемії на метаболізм сірковмісних амінокислот та H_2S в печінці, міокарді та аорті, показники стану серцево-судинної системи у щурів різної статі та визначити нові біохімічні фактори ризику формування стать-специфічних кардіоваскулярних порушень.
8. Дослідити вплив поліфенольних сполук з естрогеноподібним ефектом (геністеїн) та без нього (кверцетин) на метаболізм гомоцистеїну, цистеїну та H_2S в тканинах, біохімічні та функціональні параметри стану міокарду та аорти за умов тіолактонової гіпергомоцистеїнемії у щурів різної статі і на цій основі експериментально обґрунтувати нові підходи до корекції стать-специфічної патології серцево-судинної системи, асоційованої з порушеннями обміну сірковмісних амінокислот.

Об'єкт дослідження: статеві відмінності метаболізму сірковмісних сполук та їх зв'язок зі станом серцево-судинної системи у нормі й при гіпергомоцистеїнемії.

Предмет дослідження: активність, кінетичні параметри, експресія ензимів метаболізму сірковмісних амінокислот та гідроген сульфіду в міокарді, аорті,

печінці, вплив модуляторів обміну гідроген сульфіду на стан серця і судин у щурів різної статі та з різним рівнем статевих гормонів, гіпогомоцистеїнемічна дія біофлавоноїдів з естрогеноподібним ефектом та без нього.

Методи дослідження: біохімічні, імуноферментні, молекулярно-генетичні, електрофізіологічні, функціональні, метод проточної цитометрії, патофізіологічні, фармакологічні, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Проведені дослідження дозволили виявити статеві особливості метаболізму гомоцистеїну, цистеїну і гідроген сульфіду в печінці, міокарді та аорті, оцінити їх внесок у формування стать-асоційованої патології серцево-судинної системи, і на цій основі обґрунтувати нові підходи до корекції захворювань серця та судин у особин різної статі.

Встановлено, що у самців щурів вміст гомоцистеїну та цистеїну в сироватці крові вірогідно більший (в 1,2-1,3 раза), а рівень H_2S - менший (в 1,2 раза), що асоціюється з достовірно нижчою (на 14,4-22,6%) активністю ферментів циклу метилування (бетаїнгомоцистеїнметилтрансферази, метіонінаденозилтрансферази, S-аденозилгомоцистеїнгідролази), транссульфування гомоцистеїну (цистатіонін-γ-ліази та цистатіонін-β-синтази), окисного (цистеїндиоксигенази), кон'югаційного (γ-глутамілцистеїнлігази) та десульфуразного (цистатіонін-γ-ліази, цистатіонін-β-синтази та цистеїнамінотрансферази) шляхів деградації цистеїну в печінці, порівняно з самками. Кастрація самців супроводжується зменшенням вмісту гомоцистеїну, цистеїну та збільшенням рівня H_2S в сироватці крові (в 1,1-1,3 раза), зростанням активності ферментів катаболізму гомоцистеїну та цистеїну в печінці, тоді як гонадектомія самок викликає протилежні зміни. Встановлено, що найбільшу залежність від рівня статевих гормонів виявляють процеси десульфурування цистеїну ($|r|$=0,54-0,61), а найменшу - процеси реметилування та трансметилування гомоцистеїну ($|r|$=0,37-0,39).

Вперше виявлено, що рівень статевих гормонів, концентрація гомоцистеїну, цистеїну й H_2S в крові є чинниками, які впливають на характер метаболізму H_2S в серцево-судинній системі самців та самок щурів. У самок в міокарді та аорті відмічається вища (на 24,1-34,8%) активність H_2S-продукуючих ензимів (цистатіонін-γ-ліази, цистеїнамінотрансферази та тіосульфатдитіолсульфід-трансферази), нижча швидкість утилізації H_2S, вищий рівень експресії гену *CSE,* відмінності каталітичних параметрів цистатіонін-γ-ліази (вища Vmax на 13,3-16% та менша Km цистеїну на 19,5-20,3%), що асоціюється з більшим вмістом H_2S в тканинах, порівняно з самцями щурів. Кастрація самок викликає зменшення ензиматичної продукції H_2S, збільшення швидкості утилізації H_2S, зменшення експресії гену *CSE* (на 28,3%), рівня H_2S в міокарді та аорті, тоді як гонадектомія самців має протилежний вплив на вказані показники.

З'ясовані статеві особливості біохімічних та функціональних параметрів стану міокарда та аорти щурів, які детермінуються не лише типом та рівнем статевих гормонів, але й відмінностями метаболізму H_2S в серцево-судинній системі. У самців щурів в міокарді та аорті відмічається вірогідно менша (на 18,6-21,1%) активність супероксиддисмутази, тіоредоксинредуктази, менший вміст відновленого

глутатіону, вища активність (на 28,5-55,7%) НАДФН-оксидази, що асоціюється з вищою активністю процесів пероксидації ліпідів та протеїнів, вищим (на 17,7-30,3%) рівнем апоптозу, поліплоїдизації кардіоміоцитів та проліферації міофібробластів, ніж у самок. За цих умов у самців відмічається менший коефіцієнт мікроциркуляції лівого шлуночка, менша чутливість аорти до вазодилятуючої дії H_2S, цистеїну та більша чутливість до констрикторної дії гомоцистеїну, ніж у самок. Дефіцит тестостерону (кастрація самців) спричиняє збільшення активності супероксиддисмутази, тіоредоксинредуктази, вмісту відновленого глутатіону, зменшенням активності НАДФН-оксидази, зниження інтенсивності процесів пероксидації ліпідів та протеїнів в міокарді та аорті щурів, зменшення рівня апоптозу, поліплоїдизації кардіоміоцитів та проліферації міофібробластів, зростання коефіцієнту мікроциркуляції, чутливості аорти до вазодилятуючої дії H_2S, цистеїну та зниження чутливості аорти до констрикторної дії гомоцистеїну, в той час як дефіцит естрадіолу (кастрація самок) викликає протилежно спрямовані зміни вказаних показників. Різноспрямована дія статевих гормонів на біохімічні та функціональні параметри стану серцево-судинної системи щурів реалізується через систему H_2S / цистатіонін-γ-ліаза ($|r|$=0,55-0,76).

Вперше показаний стать-специфічний вплив модуляторів обміну H_2S на біохімічні та функціональні параметри міокарду та аорти. Введення пропаргілгліцину викликає вірогідне зменшення в міокарді та аорті активності цистатіонін-γ-ліази, вмісту H_2S, активності супероксиддисмутази, тіоредоксинредуктази, відновленого глутатіону, зростання активності НАДФН-оксидази, що індукує процеси вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів, цитоліз кардіоміоцитів, ендотеліальну дисфункцію, збільшення вазоконстрикторного ефекту гомоцистеїну, зменшення вазодилятуючого ефекту H_2S та цистеїну, натомість введення NaHS викликало протилежні зміни. Вказані біохімічні та функціональні зміни параметрів серцево-судинної системи у самців були достовірно вищими (в 1,1-1,2 раза), ніж у самок.

Встановлено, що у самців ішемія міокарду на тлі оклюзії лівої коронарної артерії супроводжується більш значущим зменшенням рівня H_2S в сироватці крові (на 13,4%, $p<0,05$), пригніченням мікроциркуляції та кисневого забезпечення кардіоміоцитів, зниженням скоротливої здатності та порушеннями внутрішньошлуночкової гемодинаміки, ніж у самок. Збільшення насиченості організму щурів H_2S (превентивне введення NaHS в дозі 3 мг/кг) ефективно перешкоджало розвитку ішемії міокарду та сприяло більш повноцінній реканалізації вінцевих артерій як у самців, так і у самок.

Вперше виявлені статеві відмінності впливу тривалого введення тіолактону гомоцистеїну на процеси метаболізму сірковмісних амінокислот та H_2S, біохімічні та функціональні параметри серця та аорти щурів. У самців з тіолактоновою ГГЦ реєструвались вищі рівні гомоцистеїнемії та цистеїнемії (на 21-30%), більший дефіцит ендогенного H_2S (на 12,0%), більш масштабні зміни у шляхах метаболізму сірковмісних амінокислот, що поєднувались з більш значним кардіо- та ендотеліотоксичним ефектом, ніж у самок.

Встановлено, що за експериментальної ГГЦ введення поліфенольних речовин зменшувало порушення в обміні сірковмісних амінокислот та H_2S в органах щурів, що супроводжувалось кардіо- та вазопротективним ефектами. За умов ГГЦ більш виразний метаботропний, ендотеліотропний та кардіопротективний ефекти були виявлені у геністеїну, порівняно з кверцетином, як у самців, так і у самок щурів.

Фармакотерапевтична дія геністеїну асоціювалась з його здатністю попереджувати порушення процесів транссульфування, деградації цистеїну та утворення H_2S в тканинах; стримувати формування гіпергомоцистеїнемії, гіперцистеїнемії та дефіциту H_2S в тканинах *in vivo*; зменшувати вазоконстрикторний ефект гомоцистеїну та потенціювати вазорелаксуючий ефект H_2S та цистеїну *in vitro* у самців та самок щурів.

Практичне значення отриманих результатів. Проведені дослідження поглиблюють існуючі уявлення щодо ролі статі та статевих гормонів в регуляції метаболізму сірковмісних амінокислот, H_2S в нормі та при патології, а також розкривають нові аспекти молекулярних механізмів формування секс-специфічної патології серця та судин.

Ідентифіковані метаболічні чинники гендерасоційованої патології серцево-судинної системи, до яких можна віднести гіпергомоцистеїнемію, гіперцистеїнемію, дефіцит гідроген сульфіду і, особливо, їх поєднання.

Експериментально обґрунтовано, що за умов гіпергомоцистеїнемії з метою корекції стать-специфічних змін метаболічного та функціонального стану серцево-судинної системи доцільно використовувати геністеїн - поліфенольну сполуку групи ізофлавоноїдів з естрогеноподібними властивостями.

Практичне значення результатів даного дослідження підтверджується 2 Патентами України на корисні моделі (№75683; 87884). Результати дослідження впроваджено в роботу клініко-діагностичної лабораторії НДІ реабілітації інвалідів Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, використовуються в науковій роботі та навчальному процесі кафедр біологічної та загальної хімії, патологічної фізіології, фармакології ВНМУ; кафедр медичної біохімії, фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського; кафедри медичної, біоорганічної та біологічної хімії ДВНЗ «Українська медична стоматологічна академія»; кафедри біологічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького, кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету МОЗ України.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом особисто обґрунтовано концепцію роботи, розроблено методологію досліджень, зроблено пошук та аналіз даних літератури, сформульовано основні положення та висновки. Всі результати отримані здобувачем особисто або за безпосередньої участі. Автором самостійно проведено моделювання порушень метаболізму сірковмісних амінокислот та H_2S, біохімічні, імуноферментні та електрофізіологічні дослідження. Аналіз та інтерпретація одержаних результатів, формулювання висновків дисертаційної роботи обговорювались з науковим консультантом д.мед.н., проф. Заічко Н.В.

Молекулярно-генетичні дослідження виконані на базі НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» за безпосередньої участі к.мед.н., старшого наукового співробітника О.А. Шликової. Дослідження вмісту ДНК в ядрах клітин міокарда методом проточної ДНК-цитометрії виконані на базі НДЛ функціональної морфології та генетики розвитку ВНМУ ім. М.І. Пирогова за безпосередньої участі к.мед.н., старшого наукового співробітника І.Л. Черешнюка. Моделювання ішемії/ реперфузії та оцінка показників кардіогемодинаміки виконані на базі Науково-дослідної лабораторії з доклінічної оцінки нових лікарських засобів та біологічноактивних сполук «Фармадар» при ВНМУ ім. М.І. Пирогова за безпосередньої участі д.мед.н., професора Ходаківського О.А. Моделювання змін гормонального статусу проведено в науково-дослідній лабораторії доклінічного вивчення фармакологічних речовин за безпосередньої участі к.мед.н., асистента кафедри фармакології ВНМУ ім. М.І. Пирогова Тарана І.В. Автор висловлює глибоку вдячність колегам за допомогу в проведенні досліджень, співучасть яких у виконанні роботи відмічена у спільних публікаціях. Автор не запозичував ідеї та розробки співавторів публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались на: всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю "Біохімічні основи патогенезу ураження внутрішніх органів різної етіології та способи їх фармакологічної корекції" (Тернопіль, 2011); Першому Українсько-Йорданському медичному конгресі та днях йорданської культури (Вінниця, 2011), IV Національному з'їзді фармакологів України (Київ, 2011); III міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених (Вінниця, 2012); II міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 2013); 7-th Lviv-Lublin conference of Experemental and Clinical Biochemistry (Lviv, 2013); Conference "Actual opinions in biology, ecology, medicine and pharmacology" (Kharkiv, 2013), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014), науково-практичній конференції «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб» (Вінниця, 2014); The Third International Conference on H_2S Biology and Medicine (Kyoto, Japan, 2014), науково-практичній конференції «Актуальні питання експериментальної і клінічної біохімії та фармакології» (Тернопіль, 2014), XIV Міжнародній науковій конференції «Перший крок в науку-2017» (Вінниця, 2017), LX науково-практичній конференції "Здобутки клінічної та експериментальної медицини" (Тернопіль, 2017).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 46 наукових праць, в тому числі 4 статті у міжнародних виданнях, 24 статті у фахових виданнях, рекомендованих ДАК України (9 одноосібних; 17 включено до міжнародних наукометричних баз, серед яких 2 - до бази «Scopus»), 16 - в збірках, матеріалах з'їздів та конференцій, 2 патенти України на корисні моделі.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 376 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, 5 розділів власних досліджень, розділу,

присвяченого аналізу і узагальненню отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних літературних джерел та двох додатків. Основний текст дисертації викладений на 294 сторінках. Робота ілюстрована 96 рисунками і 78 таблицями. Список використаних літературних джерел включає 414 найменувань, з них 95 кирилицею, 319 - латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В цьому розділі наведені системні та сучасні уявлення про гендерні аспекти епідеміології, факторів ризику та патогенетичних чинників ССЗ. Вивчено метаболізм сірковмісних амінокислот й гідроген сульфіду в серцево-судинній системі та роль статевих чинників в його регуляції. Розглянуті патогенетичні механізми кардіо- та вазотоксичної дії порушень обміну гомоцистеїну, цистеїну й H_2S, а також висвітлені основні принципи їх лікування.

Матеріали та методи дослідження. Досліди проведені на 400 білих нелінійних щурах обох статей (*Rattus norvegicus*) двох вікових груп: статевозрілі (6-8 міс., маса тіла 220-280 г, самців – 180, самок - 180) та старі (24-26 міс., маса тіла 330-380 г, самці - 20, самки - 20), отриманих з науково-експериментальної клініки Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. Всі етапи досліджень виконані згідно «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та затверджені комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (протокол № 6 від 15 червня 2017 року).

На щурах моделювали зміни гормонального статусу, відтворено моделі ішемії / реперфузії серця, дефіциту й надлишку H_2S та ГГЦ. Дози, шляхи та тривалість введення речовин запозичені з літератури і не викликали загибелі тварин.

Моделювання змін гормонального статусу у щурів. Дефіцит статевих гормонів в організмі щурів створювали шляхом кастрації тварин (оваріектомія та тестектомія відповідно самкам та самцям щурів) під каліпсоловим наркозом (10 мг/кг) хірургічним методом через серединний розтин передньої черевної стінки згідно загальноприйнятих методик. Дослідження проводились через 21 день після кастрації [Aloisi A.M. et al., 2003; Joshi S.A. et al., 2003]. Контрольним тваринам виконували розтин передньої черевної стінки з наступним пошаровим зашиванням рани («хибнооперовані»). Замісну гормонотерапію (ЗГТ) у самців і самок кастрованих щурів відтворювали введенням тестостерону пропіонату (ВАТ «Фармадон», РФ), 1 мг/кг підшкірно 1 раз на день; а також естрадіолу гемігідрату («Естримакс», АО Гедеон Рихтер), 150 мг/кг внутрішньошлунково (в/шл) протягом 14 днів [Ali B.H. et al., 2001; Yuzurihara M. et al., 2003]. Контрольні тварини отримували еквівалентні кількості розчинників. Ефект замісної терапії у тварин обох статей оцінювали за рівнем статевих гормонів в сироватці крові, а у самок ще й за допомогою вагінальних мазків.

Моделі надлишку та дефіциту H_2S у щурів [Lee A.T. et al., 2008; Liu H. et al., 2009]. Дефіцит H_2S у щурів створювали шляхом внутрішньоочеревинного (в/оч) введення D, L-пропаргілгліцину в дозі 50 мг/кг маси тіла, у вигляді свіжовиготовленого 5% водного розчину з розрахунку 0,1 мл на 100 г маси щура 1 раз на добу протягом 14 діб. Надлишок H_2S у щурів створювали шляхом в/оч введення його донору - натрій гідрогенсульфіду (NaHS) в дозі 3 мг/кг маси тіла, у вигляді свіжовиготовленого 0,3% водного розчину з розрахунку 0,1 мл на 100 г маси щура 1 раз на добу протягом 14 діб. Щурам контрольної групи в/оч вводили еквівалентний об'єм 0,15 М розчину NaCl.

Модель ішемії / реперфузії серця. Гостру постреперфузійну міокардіальну ішемію у щурів моделювали за рахунок 30 хв. оборотної оклюзії лівої коронарної артерії на рівні нижнього краю auricula sinistra [Галенко-Ярошевский П.А., Гацура В.В., 2005]. Ішемію-реперфузію (IP) здійснювали за умов торакотомії шляхом затягування шовкової лігатури, підведеної на атравматичній голці під ліву коронарну артерію. Оперативне втручання проводили в асептичних умовах на тлі внутрішньовенного (в/в) комбінованого багатокомпонентного наркозу (кетамін 2 мг/кг («Кетамін» Фармак, Україна), пропофол 60 мг/кг («Пропофол», Fresenius Kabi, Австрія), тіопентал 30 мг/кг («Тіопентал-КМП» Артеріум, Україна), із залученням штучної вентиляції легень через інтубаційну трубку (катетер для в/в інфузій («Унофлон», Україна). На цій моделі оцінювали вплив NaHS в дозі 3 мг/кг на показники кардіогемодинаміки у самців та самок щурів на тлі IP. Терапію NaHS розпочинали за 15 хв. до ішемії, і вона тривала упродовж 1 год після реперфузії, коли в останнє реєстрували необхідні гемодинамічні параметри. Тварини групи контрольної патології отримували фізіологічний розчин NaCl об'ємом 2 мл/кг. Досліджувані речовини (NaHS та NaCl) вводили інфузійно в/в, у попередньо катетеризовану стегнову вену на боці вимірювання тиску лівого шлуночка за допомогою інфузоматної системи B. Braun McGaw (Німеччина).

Модель тіолактонової гіпергомоцистеїнемії [Stangl G.I. et al., 2007]. Модель тіолактонової ГГЦ полягає у введенні в організм тварин надлишку екзогенного гомоцистеїну у вигляді його тіолактону. Тіолактон гомоцистеїну вводили в дозі 100 мг/кг маси тіла в/шл на 1% розчині крохмалю (2% завис - 0,5 мл / 100 г маси щура) 1 раз на добу протягом 28 діб. Частині тварин з метою попередження розвитку ГГЦ-індукованих метаболічних порушень паралельно з 28-денним веденням тіолактону гомоцистеїну застосовували поліфенольні сполуки. В якості біофлавоноїдів використовували геністеїн (Sigma, США) та кверцетин (Sigma, США) в дозах відповідно 2,5 та 25 мг/кг маси тіла в/шл на 1% розчині крохмалю 1 раз на добу [M. Li, 2013; Tian H., 2015]. Контрольним групам тварин вводили в/шл еквівалентний об'єм крохмального гелю.

Біохімічні дослідження проведені в сироватці крові, ЕДТА-плазмі, супернатанті пост'ядерного гомогенату печінки та міокарда, ТХО-екстракті міокарда. В сироватці крові визначали вміст загального гомоцистеїну імуноферментним методом за набором «Homocysteine EIA» (Axis-Shield, Англія) на імуноферментному аналізаторі STAT FAX 303/PLUS, вміст адгезивної молекули

судинних клітин-1 (sVCAM-1) - імуноферментним методом за набором “sVCAM-1 ELISA KIT” (Diaclone, Франція), рівень загального цистеїну - за реакцією з нінгідриновим реактивом у кислому середовищі після відновлення цистину в цистеїн під впливом дитіотреітолу [Gaitonde M. K., 1967], вміст H_2S - за реакцією утворення тіоніну з використанням n-фенілендиаміну [Заічко Н.В. та ін., 2009], активність аспартатамінотрасферази та креатинфосфокінази - за наборами ТОВ Філісіт-Діагностика, СпайнЛаб (Україна).

В ЕДТА-плазмі оцінювали вміст естрадіолу та тестостерону імуноферментним методом стандартними наборами DRG Estradiol ELISA фірми DRG (USA) та DSLACTIVE Testosterone фірми DSL (USA) згідно інструкцій фірм-виробників.

В супернатанті пост’ядерного гомогенату печінки визначали активність H_2S-синтезуючих ензимів - цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1), цистатіонін-β-синтази (ЦБС, КФ 4.2.1.22), цистеїнамінотрансферази (ЦАТ, КФ 2.6.1.3) в адаптованих інкубаційних середовищах за приростом сульфід аніону [Мельник А.В., Пентюк О.О., 2009]. Цистатіоназну активність цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1) визначали за утворенням цистеїну в реакції розщеплення цистатіоніну [Heinonen K., 1973], цистатіонінсинтазну активність цистатіонін-β-синтази (ЦБС, КФ 4.2.1.22) - за утворенням цистатіоніну в реакції конденсації гомоцистеїну з серином [Goldstein J.L. et al., 1972]. S-аденозилгомоцистеїнгідролазну активність (S-АГГ, КФ 3.3.1.1) визначали в реакції синтезу S-аденозилгомоцистеїну з гомоцистеїну та аденозину за зменшенням рівня сульфгідрильних груп [Isa Y. et al., 2006]. Активність метіонінаденозилтрансферази (МАТ, КФ 2.5.1.6) визначали за приростом неорганічного фосфату в реакції між метіоніном та АТФ [Chiang P.K., Cantoni G.L., 1977], бетаїнгомоцистеїнметилтрансферази (БГМТ, КФ 2.1.1.5) - за падінням сульфгідрильних груп в реакції між гомоцистеїном та бетаїном [Ericson L.E., 1960], цистеїндиоксигенази (ЦДО, КФ 1.13.11.20) - за зменшенням вмісту цистеїну в процесі його окиснення [Gaitonde M.K., 1967], γ-глутамілцистеїнлігази (γ-ГЦЛ, КФ 6.3.2.2) - за кількістю неорганічного фосфату, що утворювався при гідролізі АТФ в реакції між глутаматом та цистеїном [Orlowski M., Mrister A., 1971].

В супернатанті пост’ядерного гомогенату міокарда та аорти визначали вміст H_2S спектрофотометричним методом за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном в присутності $FeCl_3$ [Wiliński B. et al., 2011], активність H_2S-синтезуючих ензимів - цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1), цистеїнамінотрансферази (ЦАТ, КФ 2.6.1.3), тіосульфатдитіолсульфідтрансферази (ТСТ, КФ 2.8.1.5) - в адаптованих інкубаційних середовищах за приростом сульфід-аніону [пат. №75683]. Активність НАДФН-оксидази (КФ 1.6.3.1) визначали за поглинанням НАДФН при 340 нм [Fukui T. et al., 1997], супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) - за здатністю гальмувати окиснення кверцетину [Костюк В.А. та ін, 1990], рівень малонового діальдегіду (МДА) - за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [Владимиров Ю.А., Арчаков А.И., 1972], вміст карбонільних груп протеїнів (КГП) - за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином [Заічко Н. В., 2003]. Здатність міокарду до утилізації екзогенного H_2S визначали за швидкістю зниження концентрації сульфід-аніону в інкубаційному середовищі [пат. №87884]. Активність сульфітоксидази (КФ

1.8.3.1) в міокраді визначали за швидкістю окиснення сульфіт-аніону в присутності гексоціаноферрату калію [Cohen H.J. et al., 1971], тіоредоксиндисульфідредуктази (тіоредоксинредуктази, КФ 1.8.1.9) - за швидкістю НАДФН-залежного відновлення 5,5′-дітіобіс(2-нітробензоату) [Jung H.I. et al., 2004]. В ТХО-екстракті міокарда визначали вміст відновленого (GSH) та окисненого (GSSG) глутатіону за реакцією з 5,5′-дітіобіс(2-нітробензоатом) і розраховували індекс GSH/GSSG [Verbunt R.J. et al., 1995]. Вміст протеїну в сироватці крові, печінці, міокарді та аорті оцінювали мікробіуретовим методом [Кочетов Г.А., 1980].

Молекулярно-генетичні дослідження. Рівень експресії гену *CSE* визначали методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі "реального часу" (Real-time PCR). Загальну РНК виділяли з тканини серця за допомогою комплекту реагентів «РИБО-золь-В» (AmpliSens, Росія). Для отримання кДНК використовували набір реагентів для проведення реакції оберненої транскрипції (СИНТОЛ, Росія), що складався з 2,5 х реакційної суміші, 15 ОЕ/мл праймера оліго$(dT)_{15}$, 50 од/мкл оберненої транскриптази MMLV-RT, 5 од/мкл інгібітора РНКаз та деіонізуючої води, вільної від РНКаз. До суміші додавали 1-2 мкг тотальної РНК. Визначення експресії гену ЦГЛ проводили в присутності барвника SYBR Green I, з використанням детектувального ампліфікатора ДТ-Лайт («ДНК-Технология», Росія) в реакційній суміші: 10 х буфер для ампліфікації з барвником SYBR Green I; 25 мМ хлорид магнію; 2,5 мМ дезоксинуклеотидтрифосфатів; специфічні праймери ЦГЛ 5'-GCTGAGAGCCTGGGAGGATA-3'; 5'-TCACTGATCCCGAGGGTAGCT-3' та 5 Е/мкл SynTag ДНК-полімерази. До суміші додавали 5 мкл зразку ДНК. В якості референтного гену використовували ген β-актину: 5'-ACCCGCGAGTACAACCTTCTT-3'; 5'-TATCGTCATCCATGGCGAACT-3'. Для аналізу даних застосовували Ct метод.

Дослідження вмісту ДНК в ядрах клітин міокарда методом проточної ДНК-цитометрії. Вміст ДНК в ядрах клітин міокарда визначали методом проточної ДНК-цитометрії. Суспензії ядер з клітин міокарда щурів отримували за допомогою розчину для дослідження ядерної ДНК (CyStain DNA Step 1 фірми Partec, Німеччина) відповідно до протоколу-інструкції виробника. Проточний аналіз виконувався на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі "Partec PAS" фірми Partec (Німеччина). Циклічний аналіз клітин виконувався засобами програмного забезпечення FloMax (Partec, Німеччина) у повній цифровій відповідності згідно математичної моделі, де визначались: G0G1 (G1%) - відсоткове співвідношення клітин фази G0G1 до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК = 2с); S (S%) - відсоткове співвідношення клітин у фазі синтезу ДНК до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК > 2с та < 4с); G2 + M (G2M%) - відсоткове співвідношення клітин у фазі G2 + M до всіх клітин клітинного циклу (ДНК = 4с), або клітини з вмістом ДНК=4с (поліплоїдія). Визначення фрагментації ДНК (апоптоз) виконано шляхом виділення SUB-G0G1 ділянки на ДНК-гістограмах - RN2 перед піком G0G1, яка вказує на ядра клітин з вмістом ДНК < 2с.

Дослідження показників кардіогемодинаміки. В якості функціональних маркерів мікроциркуляторного статусу міокарда лівого шлуночка щурів оцінювали

коефіцієнт мікроциркуляції (КМ, у.о.) та ступінь насичення крові киснем (SaO_2, %), які реєстрували на 3 мм дистальніше від місця оклюзії-реперфузії за допомогою лазердоплерографічного та пульсоксиметричного модулів BIOPAC (США). Критеріями внутрішньосерцевої гемодинаміки стали зміни тиску у лівому (ТЛШ, мм.рт.ст.) та правому шлуночках (ТПШ, мм.водн.ст.), які оцінювали за допомогою датчика Pressure Transducer гемодинамічного модуля BIOPAC (США) [Ходаківський О.А., 2011].

Електрофізіологічні дослідження. Реєстрацію скоротливої активності ізольованих препаратів аорти під впливом гомоцистеїну, цистеїну та H_2S проводили в режимі, що наближався до ізометричного за допомогою тензометричної установки, створеної в ДУ «Інститут фізіології АМН України ім. О.О. Богомольця», за загальноприйнятою методикою [Гурковская А.В. и др., 1998; Ткаченко М.М. та ін., 2005].

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за допомогою стандартних методів із застосуванням пакету прикладних програм «MS Excel XP» та «Statistica SPSS 10.0 for Windows» (ліцензійний № 305147890). Результати представляли у вигляді середньої арифметичної та середньої помилки середньої (M±m). Достовірність різниці між показниками оцінювали за параметричним t-критерієм Стьюдента (при нормальному розподілі) та непараметричним U-критерієм Манна-Уітні (при невідповідності нормальному розподілу). Для оцінки біохімічних показників у самців та самок з різним рівнем статевих гормонів застосовували метод персентилів (визначали P_5, P_{10}, P_{25}, P_{50}, P_{75}, P_{90}, P_{95}). Для оцінки зв'язків між показниками проводили кореляційний аналіз за Пірсоном. Вірогідними вважали дані при $p<0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

Дослідження метаболізму сірковмісних амінокислот, H_2S в печінці, вмісту гомоцистеїну, цистеїну та H_2S в сироватці крові самців й самок щурів залежно від рівня насиченості організму статевими гормонами. Встановлено (табл. 1), що у самців щурів у сироватці крові рівень гомоцистеїну та цистеїну є достовірно вищим на 22,0-22,7%, а вміст H_2S вірогідно нижчим на 17,0%, порівняно з показниками у самок. Кастрація самців спричиняє достовірне зменшення в крові рівня гомоцистеїну (на 13,9%), цистеїну (на 15,6%) та збільшення вмісту H_2S (на 33,8%). Натомість кастрація самок щурів має протилежний вплив: вміст гомоцистеїну та цистеїну достовірно зростає (на 16,9-22,7%), а рівень H_2S знижується на 23,4%. За умов замісної гормонотерапії вміст гомоцистеїну, цистеїну та H_2S наближається до рівня контрольних тварин. Кореляційний аналіз засвідчив, що рівень статевих гормонів є важливим чинником, який детермінує вміст сірковмісних амінокислот та H_2S в крові. Так, з високим рівнем естрадіолу асоціюється низький вміст в крові гомоцистеїну ($r=-0,47$, $p<0,05$), цистеїну ($r=-0,52$, $p<0,05$) та високий рівень H_2S ($r=0,61$, $p<0,05$). Натомість, високий рівень тестостерону супряжений з високим рівнем гомоцистеїну та цистеїну ($r=0,41$-$0,44$, $p<0,05$), а також низьким вмістом H_2S ($r=-0,52$, $p<0,05$).

Таблиця 1

Вплив кастрації та замісної гормонотерапії на вміст гомоцистеїну, цистеїну та H_2S в крові (M±m; n=10)

Групи тварин	Вміст метаболітів в крові, мкмоль/л		
	Гомоцистеїн	Цистеїн	H_2S
Самці щурів			
Контроль	7,67±0,13	141±3,05	78,5±2,62
Кастрація	6,60±0,11*	119±3,18*	105±3,18*
Кастрація+ЗГТ	7,59±0,14$^{\#}$	137±3,22$^{\#}$	80,2±2,52$^{\#}$
Самки щурів			
Контроль	6,25±0,12$^{\$}$	110±2,70$^{\$}$	94,6±2,96$^{\$}$
Кастрація	7,31±0,15*$^{\$}$	135±3,30*$^{\$}$	72,5±2,31*$^{\$}$
Кастрація+ЗГТ	6,32±0,10$^{\#\$}$	113±3,12$^{\#\$}$	90,5±2,73$^{\#\$}$

Примітки: 1. * - $p<0,05$ відносно контролю; 2. $^{\#}$ - $p<0,05$ відносно групи кастрованих тварин; 3. $^{\$}$ - $p<0,05$ між самцями та самками.

Виникає питання щодо чинників, які інтегровані у розвиток статевих особливостей вмісту гомоцистеїну, цистеїну та H_2S в сироватці крові. Враховуючи те, що центральним органом обміну сірковмісних амінокислот є печінка, а активність процесів синтезу та катаболізму визначають їх вміст в крові, в подальшому ми оцінили вплив статі та рівня статевих гормонів на активність основних ферментів метаболізму гомоцистеїну, цистеїну та H_2S в печінці (табл. 2). Встановлено, що у самців в печінці відмічається вірогідно менша активність ферментів метилування (БГМТ, МАТ, S-АГГ) на 14,4-18,7%, транссульфування (ЦГЛ та ЦБС) на 17,1-21,5%, обміну цистеїну (ЦДО, γ-ГЦЛ, ЦГЛ, ЦБС, ЦАТ) на 19,8-22,6%, ніж у самок, що до певної міри визначає стать-специфічні співвідношення рівнів гомоцистеїну, цистеїну та H_2S в крові. Кастрація тварин змінює вектор статевих відмінностей: у самців вірогідно зростає активність ферментів утилізації гомоцистеїну, цистеїну та утворення H_2S в печінці, порівняно з самками. За умов замісної гормонотерапії статеві відмінності активності ферментів метаболізму сірковмісних амінокислот і H_2S в печінці набувають тієї ж направленості, що й в контрольній групі тварин.

Кореляційний аналіз надав підтвердження того, що метаболізм сірковмісних амінокислот і H_2S в печінці до певної міри регулюється статевими гормонами. Виявилось, що високий рівень тестостерону супроводжується низькою активністю ферментів утилізації сірковмісних амінокислот і ферментів синтезу H_2S в печінці ($r=-(0,38-0,54)$, $p<0,05$), що є важливим чинником більш високого рівня в сироватці крові гомоцистеїну, цистеїну та низького - H_2S у самців. Натомість, за високого рівня естрадіолу, активність ферментів деградації сірковмісних амінокислот та ферментів синтезу H_2S в печінці висока ($r=0,37-0,58$, $p<0,05$), що є причиною більш низького рівня в сироватці крові гомоцистеїну, цистеїну та високого вмісту H_2S у самок щурів.

Таблиця 2

Вплив кастрації на активність ферментів метаболізму сірковмісних амінокислот в печінці (M±m; n=10)

Активність ферментів, нмоль/хв·мг протеїну	Самці		Самки	
	Контроль	Кастрація	Контроль	Кастрація
БГМТ	3,56±0,06	4,20±0,10*	4,39±0,09$	3,68±0,07*$
МАТ	2,70±0,10	3,21±0,11*	3,28±0,13$	2,80±0,14*$
S-АГГ	3,52±0,12	4,11±0,11*	4,15±0,14$	3,60±0,13*$
ЦБС (синтез цистатіоніну)	14,8±0,76	17,8±0,67*	18,5±0,81$	15,4±0,78*$
ЦГЛ (розпад цистатіоніну)	15,7±0,31	19,3±0,30*	20,1±0,24$	16,4±0,38*$
ЦДОº	2,25±0,09	2,87±0,15*	2,95±0,13$	2,40±0,14*$
γ-ГЦЛ	3,60±0,17	4,50±0,22*	4,45±0,20$	3,45±0,19*$
ЦБС (синтез H_2S)	3,12±0,19	3,95±0,25*	3,89±0,23$	3,05±0,16*$
ЦГЛ (синтез H_2S)	2,82±0,25	3,67±0,23*	3,56±0,28$	2,70±0,20*$
ЦАТ (синтез H_2S)	2,55±0,15	3,14±0,13*	3,21±0,18$	2,60±0,20*$

Примітки: 1. * - $p<0,05$ відносно контролю; 2. $ - $p<0,05$ між самцями та самками; 3. º - активність цього ферменту виражається в мкмоль/хв·мг протеїну.

Дослідження активності, кінетичних параметрів, експресії H_2S-синтезуючих ензимів, утилізації H_2S в міокарді та аорті самців й самок щурів залежно від рівня насиченості організму статевими гормонами. Показано (табл. 3), що у самок активність в міокарді та аорті ЦГЛ, ЦАТ та ТСТ на 24,1-34,8% ($p<0,05$) більша, ніж у самців. Кастрація самців викликає вірогідне збільшення активності ЦГЛ, ЦАТ та ТСТ в міокарді та аорті на 26,6-31,1% ($p<0,05$), відносно контролю. Натомість оваріектомія самок викликала зменшення активності вказаних ензимів в міокарді та аорті на 20,0-35,3% ($p<0,05$), відносно контролю. Проведення замісної гормонотерапії кастрованих тварин повертає показники активності H_2S-синтезуючих ферментів в міокарді та аорті до рівня контрольної групи тварин. Зауважимо, що фізіологічне зменшення вмісту статевих гормонів в процесі старіння супроводжується вірогідним зниженням активності ЦГЛ, ЦАТ та ТСТ у самців (на 20,0-26,7%, $p<0,05$) і самок щурів (10,1-20,8%, $p<0,05$), відносно таких показників у статевозрілих тварин. Низьку активність H_2S-синтезуючих ферментів у самців, порівняно з самками, можна пояснити більш високими концентраціями гомоцистеїну та цистеїну у особин чоловічої статі, які є субстратними інгібіторами ЦГЛ, ЦАТ та ТСТ [Мельник А.В., Пентюк О.О., 2009]. Правомірність цього твердження доводять результати кореляційного аналізу: між рівнем гомоцистеїну, цистеїну в сироватці крові та активність H_2S-синтезуючих ензимів існують вірогідні обернені зв'язки ($r=-(0,44-0,69)$; $p<0,05$).

Таблиця 3

Вплив кастрації на активність H_2S-синтезуючих ферментів в міокарді та аорті щурів (M±m; n=10)

Активність ферментів, нмоль H_2S /хв·мг протеїну	Самці		Самки	
	Контроль	Кастрація	Контроль	Кастрація
Міокард				
ЦГЛ	0,28±0,01	0,35±0,02*	0,38±0,01$^{\$}$	0,30±0,03*$^{\$}$
ЦАТ	0,73±0,05	0,96±0,04*	0,90±0,06$^{\$}$	0,70±0,05*$^{\$}$
ТСТ	1,27±0,04	1,54±0,05*	1,60±0,07$^{\$}$	1,28±0,06*$^{\$}$
Аорта				
ЦГЛ	0,78±0,03	1,00±0,04*	1,01±0,03$^{\$}$	0,79±0,02*$^{\$}$
ЦАТ	0,57±0,04	0,80±0,05*	0,74±0,06$^{\$}$	0,48±0,07*$^{\$}$
ТСТ	1,91±0,08	2,45±0,06*	2,42±0,07$^{\$}$	1,86±0,05*$^{\$}$

Примітки: 1. * - p<0,05 відносно контролю; 2. $^{\$}$ - p<0,05 між самцями та самками.

Не виключено, що статеві відмінності продукції H_2S в серцево-судинній системі є наслідком різноспрямованого впливу статевих гормонів на їх експресію та кінетичні параметри. Тому, далі ми оцінили вплив статі та рівня статевих гормонів на експресію гену *CSE* в міокарді щурів (рис. 1). Виявилось, що у самців середній рівень цього показника менший на 46,9% (p<0,05), ніж у самок. Орхідектомія самців викликає вірогідне зростання відносного рівня експресії гену *CSE* в міокарді на 49,4% (p<0,05), тоді як оваріектомія самок приводить до його зменшення на 28,3% (p<0,05), відносно контрольної групи тварин. Зауважимо, що у самок експресія гену *CSE* в міокарді у контрольній групі була більшою на 87,5% (p<0,05), а в групі кастрованих тварин - меншою на 10,0% (p<0,05), порівняно з самцями. Тобто, кастрація змінює вектор статевих відмінностей експресії гену *CSE* в міокарді щурів.

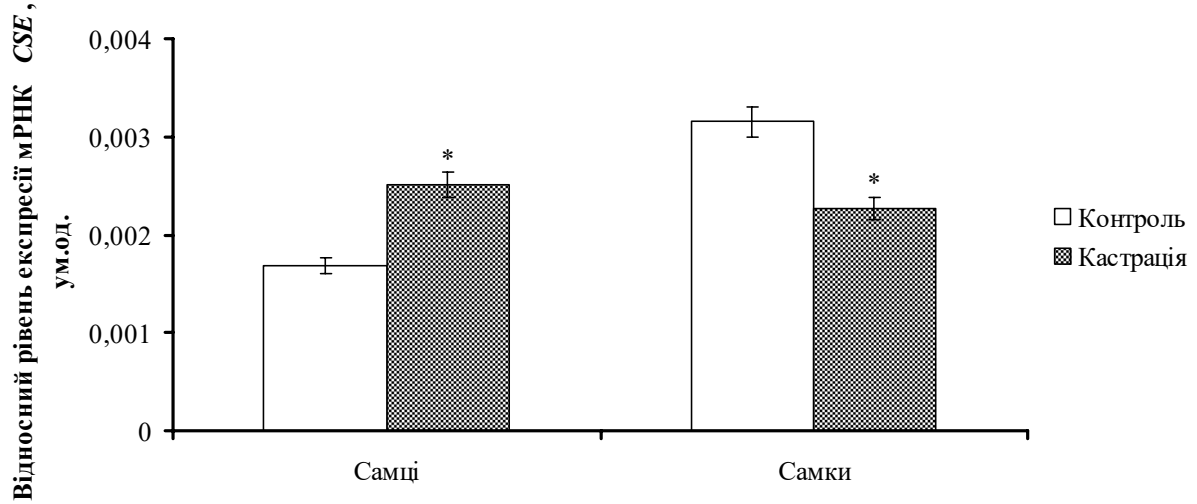

Рис. 1. Вплив кастрації на рівень експресії гену *CSE* у міокарді самців і самок щурів.
Примітки: 1. * - p<0,05 відносно контролю; 2. $^{\$}$ - p<0,05 між самцями та самками.

Кореляційний аналіз показав, що рівень експресії гену *CSE* в міокарді тварин обох статей залежить від рівня гомоцистеїну (r=-(0,49-0,50); p<0,05), цистеїну(r=-(0,44-0,48); p<0,05) та H_2S (r=0,42-0,45; p<0,05) в сироватці крові.

Далі ми оцінили кінетику реакції утворення H_2S за участі ЦГЛ в міокарді та аорті у тварин різної статі та з різним рівнем насиченості організму статевими гормонами (рис. 2). Встановлено, що у діапазоні низьких концентрацій цистеїну (0,12-0,48 мМ) у самок щурів швидкість реакції за участі ЦГЛ в міокарді була вищою на 31,4-38,8% (p<0,05), порівняно з самцями. Подібні закономірності відмічались і в аорті: за концентрації цистеїну 0,12-0,95 мМ у самок швидкість реакції була вищою на 30,7-87,5% (p<0,05), ніж у самців. Аналіз кінетичних параметрів показав, що в міокарді та аорті у самок Vmax реакції на 13,3-16,0% (p<0,05) більша, а Km по цистеїну - на 19,5-20,3% (p<0,05) менша, ніж у самців. Отримані дані свідчать про те, що в аорті та міокарді самок спорідненість ЦГЛ до цистеїну вірогідно більша, ніж у самців.

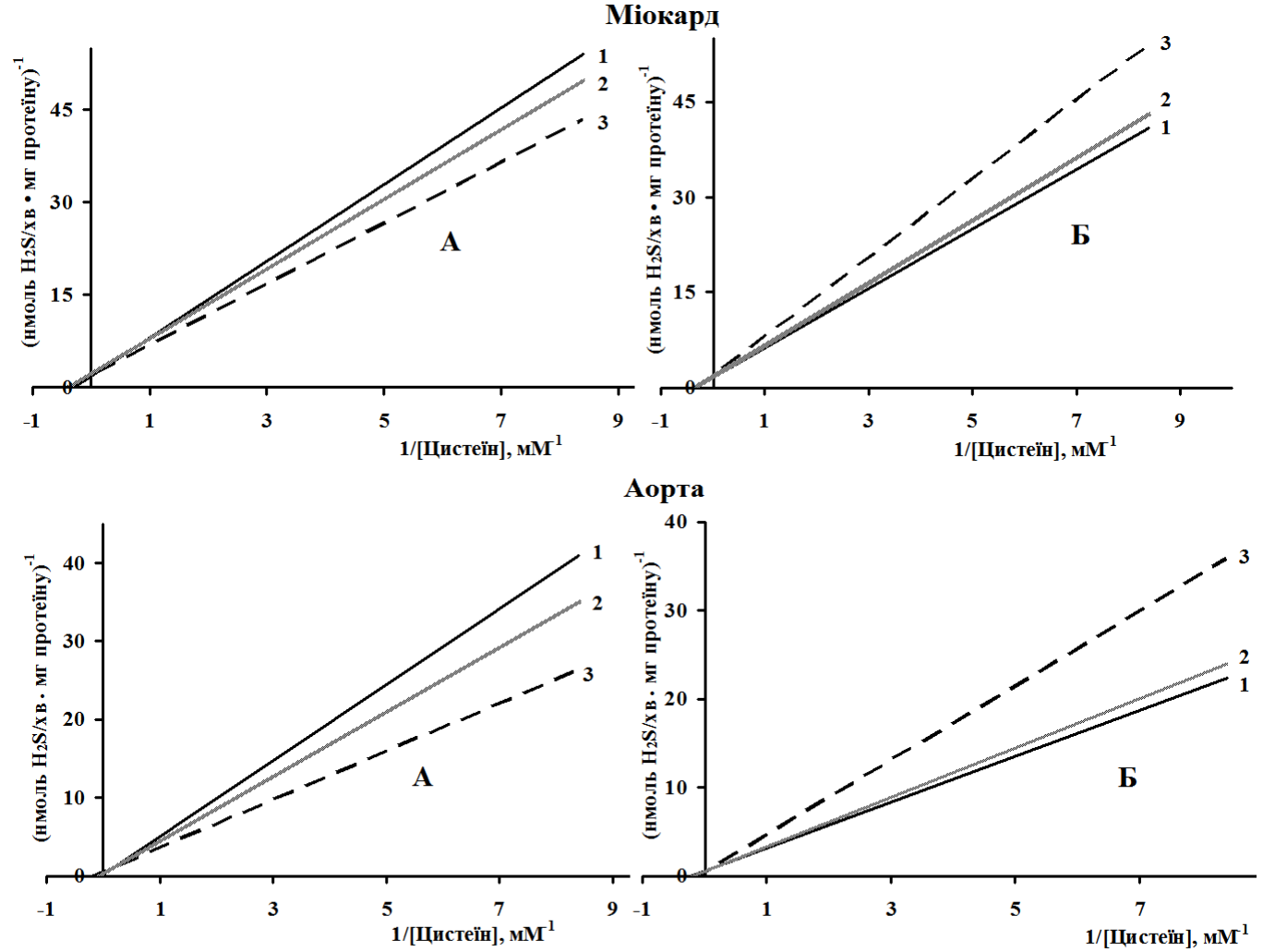

Рис. 2. Вплив кастрації та ЗГТ на кінетику утворення H_2S із L-цистеїну за участю ЦГЛ в міокарді та аорті самців (А) й самок (Б) щурів в обернених координатах Лайнуівера-Берка. Примітки: 1 - контроль; 2 - кастровані тварини; 3 - кастрація + ЗГТ.

Кастрація тварин мала різноспрямований вплив на кінетичні показники ЦГЛ в аорті та міокарді: оваріектомія самок супроводжувалась збільшенням Km по цистеїну на 13,3-23,8% ($p<0,05$) та зменшенням Vmax реакції на 16,4-16,7% ($p<0,05$), тоді як орхідектомія самців спричиняла зниження Km по цистеїну на 16,6-18,8% ($p<0,05$) та зростання Vmax реакції на 11,4-13,0% ($p<0,05$).

Виявилось, що статеві відмінності існують не лише в продукції H_2S, але й в його деградації в міокарді. У самців швидкість утилізації H_2S була вищою на 31,5% ($p<0,05$), ніж у самок щурів. Кастрація тварин чинить різноспрямований вплив на споживання H_2S міокардом: у самців відмічається зниження цього показника на 40,9% ($p<0,05$), тоді як у самок - збільшення на 41,7% ($p<0,05$), відносно контрольної групи тварин. Замісна гормонотерапія тестостероном викликала збільшення швидкості утилізації екзогенного H_2S у самців на 61,9% ($p<0,05$), тоді як терапія естрадіолом – зменшувала на 24,8% у самок ($p<0,05$), відносно кастрованих тварин, які не отримували замісної терапії.

Далі ми оцінили вміст H_2S у самців та самок щурів залежно від рівня насиченості статевими гормонами (рис. 3). Результати засвідчили, що у самок щурів рівень H_2S в міокарді був вищим на 19,1% ($p<0,05$), ніж у самців. Подібні закономірності відмічались і в аорті: у самок щурів рівень H_2S в міокарді був вищим на 20,9% ($p<0,05$), ніж у самців. Кастрація самців викликає вірогідне збільшення вмісту H_2S в міокарді та аорті відповідно на 22,2 та 24,8% ($p<0,05$), відносно контролю. В той же час, оваріектомія самок супроводжувалась вірогідним зменшенням рівня H_2S в серці та аорті відповідно на 16,3 та 18,8% ($p<0,05$), порівняно з контролем. Кастрація тварин змінювала направленість статевих відмінностей вмісту H_2S в серцево-судинній системі: у самок в контрольній групі його рівень був вищим на 19,1-20,9%, тоді як в групі кастрованих тварин - меншим на 18,4-21,4%, порівняно з самцями. Замісна гормонотерапія кастрованим тваринам повертала направленість статевих відмінностей рівня H_2S до такої у контрольній групі тварин.

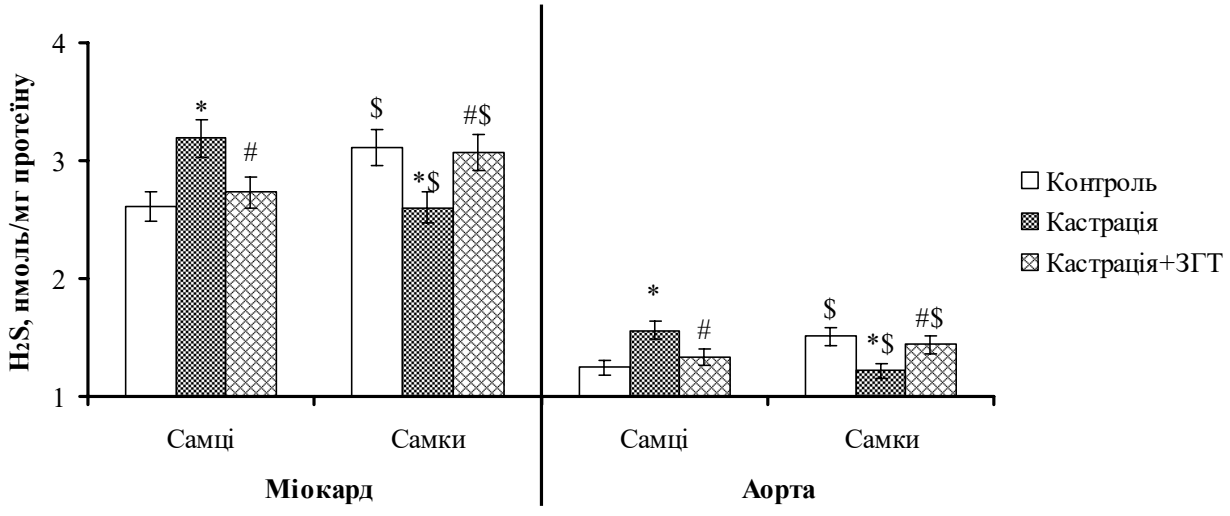

Рис. 3. Вплив кастрації та ЗГТ на вміст H_2S в міокарді та аорті самців та самок щурів. Примітки: 1. * - $p<0,05$ відносно контролю; 2. $^{\#}$ - $p<0,05$ відносно групи кастрованих тварин; 3. $^{\$}$ - $p<0,05$ між самцями та самками.

Отже, статеві особливості вмісту H_2S в міокарді та аорті є наслідком різноспрямованого впливу статевих гормонів на активність, експресію, кінетичні параметри H_2S-синтезуючих ферментів та процеси утилізації H_2S в серцево-судинній системі. Крім того відмінності рівня H_2S в міокарді та аорті до певної міри визначаються різним вмістом гомоцистеїну, цистеїну та H_2S в сироватці крові. Статеві особливості вмісту H_2S в міокарді та аорті є одним із чинників різної резистентності серцево-судинної системи самців та самок до пошкодження.

Дослідження стану міокарду та аорти у самців й самок щурів залежно від рівня статевих гормонів та вмісту H_2S в серцево-судинній системі. Спершу оцінено показники про- і антиоксидантної системи в серці та аорті щурів (табл. 4). З'ясувалось, що у самців в міокарді та аорті активність НАДФН-оксидази достовірно більша 31,7-55,7% ($p<0,05$), тоді як активність супероксиддисмутази та тіоредоксинредуктази менша на 18,6-21,1% ($p<0,05$), ніж у самок. Поряд з цим тварини різної статі відрізняються за фракційним розподілом глутатіону в міокарді. Так, у самців відмічається вірогідно більший рівень дисульфіду глутатіону (GSSG) на 42,6% ($p<0,05$) та достовірно менший вміст відновленого глутатіону (GSH) й співвідношення GSH/GSSG відповідно на 15,5 та 40,1% ($p<0,05$), відносно самок. На тлі статевих особливостей в системі про- і антиоксидантів у самців та самок щурів реєструється різна активність вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів. Встановлено, що в міокарді та аорті рівень МДА та КГП у самців вірогідно більший на 28,5-44,9% ($p<0,05$), порівняно з самками. Кастрація тварин змінює направленість статевих відмінностей стану про- і антиоксидантної системи у щурів різної статі. Так, кастрація самців супроводжується зменшенням активності НАДФН-оксидази в міокарді та аорті на 30,1-51,2% ($p<0,05$), і зростанням активності супероксиддисмутази та тіоредоксинредуктази на 25,0-32,8% ($p<0,05$). Також у кастрованих самців відмічалось зменшення рівня GSSG на 38,1% ($p<0,05$) та зростання рівня GSH і співвідношення GSH/GSSG відповідно на 19,7 та 94,5% ($p<0,05$), відносно контролю. Поряд з цим кастрація самців викликає достовірне зменшення вмісту МДА та КГП в міокарді та аорті на 22,2-43,7% ($p<0,05$). Гонадектомія самок супроводжується протилежними змінами в міокарді та аорті: активність НАДФН-оксидази зростає на 30,1-60,8% ($p<0,05$), активність супероксиддисмутази та тіоредоксинредуктази зменшується на 22,1-23,4% ($p<0,05$), збільшується рівень GSSG на 48,5% ($p<0,05$) та зменшується вміст GSH і співвідношення GSH/GSSG відповідно на 19,3 та 45,7% ($p<0,05$), зростає вміст МДА та КГП в міокарді та аорті на 27,7-61,2% ($p<0,05$), відносно контролю. Замісна гормонотерапія повертає вказані показники до рівня контрольної групи тварин. Статеві відмінності активності про-антиоксидантних ензимів, стану системи глутатіону та активності вільнорадикального окиснення ліпідів і протеїнів обумовлені різноспрямованим впливом статевих гормонів на вказані процеси: вміст естрадіолу в крові виявляє прямий зв'язок з активністю супероксиддисмутази, тіоредоксинредуктази, вмістом відновленого глутатіону ($r=0,54-0,65$, $p<0,05$) та обернений з активністю НАДФН-оксидази, вмістом окисненого глутатіону, МДА та КГП в міокарді та аорті ($r=-(0,50-0,76)$, $p<0,05$). Натомість зв'язки з рівнем

тестостерону в крові мали протилежну направленість. Ще однією із можливих причин гендерних відмінностей стану про-антиоксидантних систем є особливості вмісту H_2S в міокарді самців та самок щурів. Підтвердженням цього є результати кореляційного аналізу: вміст H_2S в серцево-судинній системі щурів обох статей виявляє прямі асоціативні зв'язки з активністю супероксиддисмутази, тіоредоксинредуктази, вмістом відновленого глутатіону (r=0,65-0,76, p<0,05), тоді як з активністю НАДФН-оксидази, рівнем окисненого глутатіону та вмістом МДА і КГП в міокарді та аорті виникали обернені кореляції (r=-(0,61-0,75), p<0,05).

Таблиця 4

Вплив кастрації на активність H_2S-синтезуючих ферментів в міокарді та аорті щурів (M±m; n=10)

Показники	Самці		Самки	
	Контроль	Кастрація	Контроль	Кастрація
Міокард				
Супероксиддисмутаза, ум.од./мг протеїну	3,60±0,13	4,78±0,19*	4,56±0,16$^{\$}$	3,52±0,14*$^{\$}$
НАДФН-оксидаза нмоль/хв·мг протеїну	1,23±0,08	0,60±0,07*	0,79±0,04$^{\$}$	1,27±0,07*$^{\$}$
Тіоредоксинредуктза, нмоль/хв·мг протеїну	4,28±0,25	5,35±0,17*	5,26±0,21$^{\$}$	4,10±0,19*$^{\$}$
GSH, нмоль/мг протеїну	2,94±0,08	3,52±0,14*	3,48±0,12$^{\$}$	2,81±0,14*$^{\$}$
GSSG, нмоль/мг протеїну	0,097±0,003	0,060±0,004*	0,068±0,002$^{\$}$	0,101±0,005*$^{\$}$
GSH/GSSG	30,8±1,23	59,9±2,89*	51,4±1,76$^{\$}$	27,9±0,99*$^{\$}$
МДА, мкмоль/г тканини	10,0±0,33	6,74±0,13*	7,29±0,27$^{\$}$	10,3±018*$^{\$}$
КГП, нмоль/мг протеїну	0,97±0,04	0,55±0,05*	0,69±0,03$^{\$}$	1,07±0,07*$^{\$}$
Аорта				
Супероксиддисмутаза, ум.од./мг протеїну	2,23±0,09	2,90±0,10*	2,74±0,13$^{\$}$	2,10±0,08*$^{\$}$
НАДФН-оксидаза нмоль/хв·мг протеїну	0,83±0,03	0,58±0,05*	0,63±0,04$^{\$}$	0,90±0,02*$^{\$}$
МДА, мкмоль/г тканини	6,36±0,17	4,95±0,10*	5,01±0,09$^{\$}$	6,40±0,14*$^{\$}$
КГП, нмоль/мг протеїну	0,71±0,02	0,40±0,04*	0,49±0,03$^{\$}$	0,79±0,05*$^{\$}$

Примітки: 1. * - p<0,05 відносно контролю; 2. $^{\$}$ - p<0,05 між самцями та самками.

В подальшому ми оцінили вплив статі та рівня статевих гормонів на показники клітинного циклу кардіоміоцитів та їх зв'язок з рівнем H_2S в міокарді (табл. 5). Виявилось, що у самців відмічається вірогідно більша кількість клітин у

фазі синтезу ДНК та фазі G2+M (з вмістом ДНК=4с) відповідно на 30,3 та 25,4% ($p<0,05$), а також клітин з фрагментованою ДНК (SUB-G0G1) на 17,2% ($p<0,05$), порівняно з самками. Отримані дані свідчать про наступні особливості показників клітинного циклу в міокарді самців: 1) вища інтенсивність апоптозу (відсоток клітин в інтервалі SUB-G0G1) є доказом більш швидкої елімінації кардіоміоцитів; 2) більш активна поліплоїдизація (число клітин з кількістю ДНК=4с) може бути одним із чинників більшої схильності міокарду до розвитку гіпертрофії; 3) більший відсоток клітин в фазі синтезу ДНК може свідчити про інтенсивну проліферацію міофібробластів, що є предиктором високої чутливості серця до фіброгенезу. Кастрація тварин має різноспрямований вплив на показники клітинного циклу в міокарді самців та самок тварин. Зокрема, гонадектомія самців супроводжується зменшенням відносної кількості клітин у фазах S, G2+M та інтервалі SUB-G0G1 відповідно на 28,7; 23,3 та 12,7% ($p<0,05$), відносно контролю. Натомість, оваріектомія самок викликає протилежні зміни: число клітин у фазах S, G2+M та інтервалі SUB-G0G1 збільшується відповідно на 80,8; 18,3 та 27,3% ($p<0,05$), відносно контролю. На тлі кастрації тварин виявляється зміна вектора статевих відмінностей показників клітинного циклу в міокарді: в групі кастрованих тварин у самців кількість клітин у фазах S, G2+M та інтервалі SUB-G0G1 відповідно на 48,6; 18,7 та 19,6% ($p<0,05$) менша, ніж у самок. Отже, у кастрованих самок зростає інтенсивність апоптозу, поліплоїдизації та проліферації. Натомість, орхідектомія самців супроводжується протилежними змінами.

Виникає питання щодо молекулярних механізмів, які інтегровані до формування статевих особливостей перебігу клітинного циклу в міокарді тварин. Ймовірно, важливу роль в цьому відіграють статеві гормони та рівень H_2S в серці, доказом чого є результати кореляційного аналізу: між рівнем тестостерону в плазмі крові та відносною кількістю клітин у фазах S, G2+M та інтервалі SUB-G0G1 виникають вірогідні прямі зв'язки ($r=0,51$-$0,56$, $p<0,05$), тоді як з рівнем естрадіолу - обернені кореляції ($r=-(0,54$-$0,58)$, $p<0,05$). Також виникали обернені зв'язки між рівнем H_2S в міокарді та кількістю клітин у фазах S, G2+M та інтервалі SUB-G0G1 у самців та самок (у самців $r=-(0,59$-$0,66)$, а у самок $r=-(0,57$-$0,63)$, $p<0,05$).

Таблиця 5

Вплив кастрації та замісної гормонотерапії статевими гормонами на показники клітинного циклу в міокарді самців і самок щурів (M±m, n=10)

Показники клітинного циклу, %	Самці		Самки	
	Контроль	Кастрація	Контроль	Кастрація
G0G1	94,4±0,33	94,9±0,59	95,0±0,30	94,6±0,49
S	1,29±0,07	0,92±0,08*	0,99±0,04$^{\$}$	1,79±0,33$^{\$}$*
G2M	4,59±0,18	3,52±0,30*	3,66±0,09$^{\$}$	4,33±0,13$^{\$}$*
SUB-G0G1	15,0±0,58	13,1±0,60*	12,8±0,21$^{\$}$	16,3±0,65$^{\$}$*

Примітки: 1. * - $p<0,05$ відносно контролю; 2. $^{\$}$ - $p<0,05$ між самцями та самками.

Дослідження показників кардіогемодинаміки показало, що в контрольній групі існують статеві відмінності лише коефіцієнта мікроциркуляції лівого шлуночка (КМ), його рівень у самців вірогідно менший на 8,82% ($p<0,05$), ніж у самок. Кастрація тварин викликала різноспрямований вплив лише на КМ: у самців рівень цього показника збільшувався на 12,5% ($p<0,05$), а у самок – зменшувався на 11,2% ($p<0,05$), відносно контролю. За цих умов змінюється вектор статевих відмінностей КМ: у самців його рівень вірогідно більший на 14,1%, ніж у самок. Замісна гормонотерапія естрадіолом та тестостероном повертає показник КМ до рівня контрольної групи. Однією із причин статевих відмінностей мікроциркуляції є рівень статевих гормонів в крові та H_2S в міокарді. Так, між рівнем тестостерону в плазмі крові та КМ виникає вірогідний обернений зв'язок ($r=-0,50$, $p<0,05$), тоді як з рівнем естрадіолу - пряма кореляція ($r=-0,54$, $p<0,05$). Вміст H_2S в міокарді виявляв пряму кореляцію з КМ (у самців $r=0,55$, а у самок $r=0,60$, $p<0,05$).

Далі проведені стендові дослідження скоротливості фрагментів аорти під впливом H_2S, цистеїну та гомоцистеїну у тварин різної статі та з різним рівнем статевих гормонів (рис. 4). У самок чутливість кільцевих фрагментів аорти до вазодилятуючої дії H_2S та цистеїну вірогідно більша (EC_{50} H_2S та цистеїну відповідно на 22,8 та 26,3% менша, $p<0,05$), тоді як чутливість до вазоконстрикторної дії гомоцистеїну менша (EC_{50} гомоцистеїну на 27,9% більша, $p<0,05$), ніж у самців.

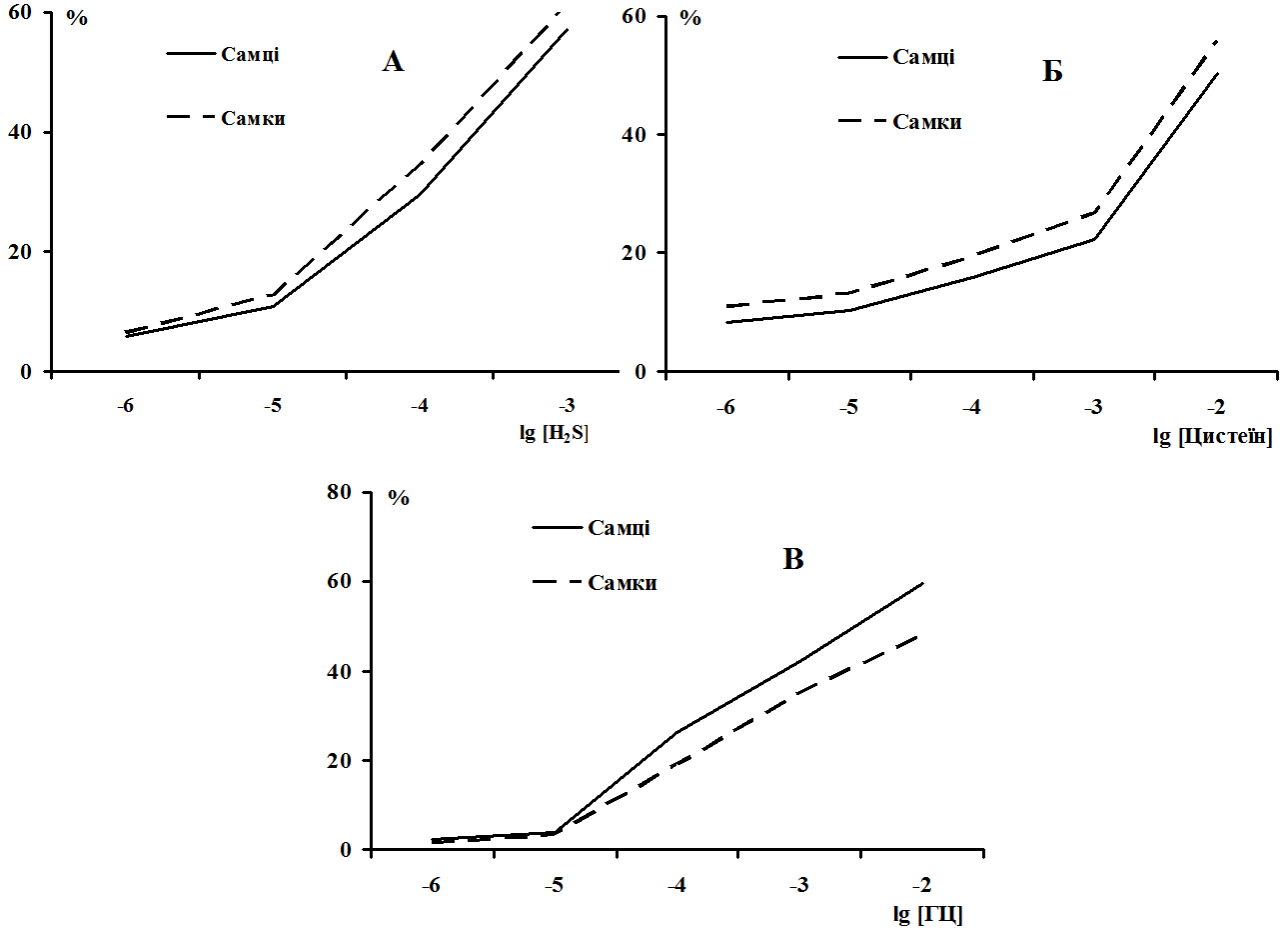

Рис. 4. Статеві особливості скоротливості кільцевих фрагментів аорти під впливом H_2S (А), цистеїну (Б) та гомоцистеїну (В).

Кастрація самок супроводжується зменшенням чутливості аорти до вазодилятуючої дії H_2S та цистеїну (EC_{50} H_2S та цистеїну збільшується відповідно на 33,0 та 42,3%, $p<0,05$) та збільшенням чутливості до вазоконстрикторної дії гомоцистеїну (EC_{50} гомоцистеїну зменшується на 24,9%, $p<0,05$). Гонадектомія самців викликає зростання H_2S- та цистеїн-індукованої вазодилятації (EC_{50} H_2S та цистеїну зменшується відповідно на 23,4 та 24,1%, $p<0,05$) та зменшення гомоцистеїн-ініційованої вазоконстрикції, відносно контролю (EC_{50} гомоцистеїну зростає на 33,3%, $p<0,05$). Замісна гормонотерапія повертала показники до рівня контролю. Кореляційний аналіз надав докази того, що статеві гормони залучені до регуляції скоротливості аорти під впливом сірковмісних сполук: рівень естрадіолу виявляє прямі кореляції з EC_{50} гомоцистеїну ($r=0,50$, $p<0,05$) та обернені кореляції з EC_{50} H_2S ($r=-0,56$, $p<0,05$) і EC_{50} цистеїну ($r=-0,53$, $p<0,05$). Натомість, рівень тестостерону проявляє прямі асоціативні зв'язки з EC_{50} H_2S ($r=0,51$, $p<0,05$) і EC_{50} цистеїну ($r=0,49$, $p<0,05$) та обернені - з EC_{50} гомоцистеїну ($r=-0,57$, $p<0,05$).

Дослідження впливу 14-добового введення NaHS (донор H_2S) та D,L-пропаргілгліцину (інгібітор ЦГЛ) на біохімічні та функціональні показники стану міокарду та аорти самців та самок щурів. Пропаргілгліцин викликає депримуючий вплив на продукцію H_2S за участі ЦГЛ в міокарді та аорті, причому більш виразні зміни відмічались у самців (табл. 6). За цих умов реєструється зменшення активності ЦГЛ (у самців на 42,9-58,6%, а у самок на 26,9-39,5%, $p<0,05$) та вмісту H_2S (у самців на 30,2-46,2%, а у самок на 20,0-23,0%, $p<0,05$) в міокарді та аорті, відносно контролю. Натомість, NaHS не впливав на активність H_2S-синтезуючих ензимів, однак збільшував рівень H_2S в міокарді та аорті у самців на 20,5-22,3% ($p<0,05$), а у самок – на 11,1-12,7% ($p<0,05$). За цих умов зменшувались статеві відмінності вмісту H_2S в міокарді та аорті.

Введення пропаргілгліцину порушувало про- і антиоксидантну рівновагу в міокарді та аорті, причому у самців ефект був більш виразним. За цих умов відмічалось зменшення активності супероксиддисмутази (у самців на 29,2-29,9%, а у самок на 16,4-21,7%, $p<0,05$), тіоредоксинредуктази (у самців на 31,7%, а у самок на 22,7%, $p<0,05$), запасів відновленого глутатіону (у самців на 40,4%, а у самок на 29,9%, $p<0,05$), зростання активності НАДФН-оксидази (у самців на 29,7-38,8%, а у самок на 17,2-22,0%, $p<0,05$), вмісту МДА та КГП (у самців на 62,5-85,9%, а у самок на 51,8-64,7%, $p<0,05$). У тварин, які отримували пропаргілгліцин, відмічалось суттєве поглиблення статевих відмінностей досліджуваних показників, порівняно з контролем. При введенні NaHS зміни про- та антиоксидантної рівноваги були протилежними.

Застосування пропаргілгліцину викликало розвиток цитолізу кардіоміоцитів та ендотеліальної дисфункції (табл. 6), про що доказово свідчить зростання в крові активності АСТ, КФК та вмісту sVCAM-1 у самців відповідно на 32,5-44,4% ($p<0,05$), а у самок - на 22,8-30,4% ($p<0,05$), відносно контролю. Введення NaHS не впливало на активність вказаних ферментів в сироватці крові, проте викликало статистично вірогідне зменшення рівня sVCAM-1 в крові у самців на 17,1% ($p<0,05$), а у самок – на 10,5% ($p<0,05$), відносно контролю.

Таблиця 6

Вплив модуляторів обміну H_2S на вміст H_2S, стан міокарду та аорти у самців та самок щурів (M±m, n=10)

Групи тварин		Міокард	Аорта	Сироватка крові		
		H_2S		АСТ	КФК	s-VCAM-1
		нмоль/ мг протеїну		мкмоль/хв·л	Од./л	нг/мл
Самці						
1	Контроль	2,61±0,11	1,29±0,05	36,5±1,06	76,2±4,64	513±14,6
2	ППГ	1,58±0,08*	0,90±0,06*	49,8±0,84*	101±3,91*	740±14,4*
3	NaHS	3,14±0,13*	1,58±0,07*	35,7±0,62	74,4±4,10	425±13,2*
Самки						
1	Контроль	3,17±0,12	1,65±0,07	35,8±0,81	72,4±3,63	445±17,4
2	ППГ	2,44±0,13*	1,32±0,08*	43,9±0,72*	89,2±3,59*	580±22,2*
3	NaHS	3,52±0,08*	1,86±0,08*	34,9±0,63*	71,1±3,81	398±18,2*

Примітка. * - $p<0,05$ відносно контролю.

Використання модуляторів обміну H_2S має різнонаправлений вплив на чутливість стінки аорти до дії H_2S, цистеїну та гомоцистеїну. Встановлено, що застосування пропаргілгліцину зменшує H_2S- та цистеїн-індуковану вазодилятацію та збільшує гомоцистеїн-ініційовану вазоконстрикцію. Вказані зміни були більш виразними у самців, ніж у самок. За цих умов EC_{50} H_2S та цистеїну в аорті збільшувалась у самців на 35,8-36,6% ($p<0,05$), а у самок – на 23,2-25,1% ($p<0,05$), порівняно з контролем. Поряд з цим EC_{50} гомоцистеїну зменшувався у самців на 31,9% ($p<0,05$), а у самок – на 21,9% ($p<0,05$), відносно контрольної групи тварин. Введення NaHS справляло протилежний вплив на ці показники: EC_{50} H_2S та цистеїну в аорті зменшувалась (у самців на 21,3-24,1%, а у самок – на 14,1-14,5%, $p< 0,05$), а EC_{50} гомоцистеїну збільшувалась (у самців на 26,9%, а у самок – на 14,8%, $p<0,05$), відносно контрольної групи тварин. Отримані дані є важливим свідченням того, що на тлі застосування пропаргілгліцину у самців розвиваються більш масштабні порушення ендотеліальної функції, ніж у самок. В той же час, NaHS покращує функцію ендотелію, в більшій мірі у самців.

Дослідження впливу донору H_2S на показники кардіогемодинаміки у щурів обох статей за умов ішемії / реперфузії. За умов ішемії серця відмічається зниження функціональних показників у тварин обох статей, причому у самців вказані зміни були більш виразними (табл. 7). Лігування лівої коронарної артерії у самців викликає зменшення КМ, SaO_2, ТЛШ та ТПШ відповідно на 92,0; 38,8; 61,5 та 48,3% ($p<0,05$), тоді як у самок падіння цих показників є меншим і становить відповідно 85,7; 29,0; 52,5 та 34,3% ($p<0,05$), відносно фонового рівня. Застосування донору H_2S стримує падіння показників кардіогемодинаміки на тлі ішемії: зменшення КМ, SaO_2, ТЛШ та ТПШ у самців становить відповідно на 52,8; 19,7; 29,0 та 14,7% ($p<0,05$), а у самок - 43,9; 18,4; 17,4 та 8,38% ($p<0,05$), відносно фонового рівня. Через 1 годину на тлі реперфузії реєструється зростання функціональних параметрів

кардіогемодинаміки, однак вони не досягають фонового рівня: КМ, SaO_2, ТЛШ та ТПШ у самців збільшується в 5,0; 1,25; 1,34 та 1,29 рази ($p<0,05$), а у самок - в 3,90; 1,19; 1,19 та 1,13 рази ($p<0,05$), відносно показників на тлі ішемії. Використання NaHS супроводжується більш виразним покращенням показників мікроциркуляції та тиску в порожнинах серця на тлі реперфузії: рівні КМ, SaO_2, ТЛШ та ТПШ у самців більші в 2,27; 1,21; 1,57 та 1,43 рази ($p<0,05$), а у самок – в 1,66; 1,17; 1,58 та 1,33 рази ($p<0,05$), відносно показників контролю.

Таблиця 7

Вплив NaHS на параметри мікроциркуляції у міокарді лівого шлуночка та тиску в порожнинах серця у самців і самок щурів за умов ішемії / реперфузії (M±m, n=10)

Групи тварин		Самці			Самки		
		Фон	Ішемія	Репер-фузія	Фон	Ішемія	Репер-фузія
КМ, у.о.							
1	ІР (Контрольна патологія)	3977± 25,1	313± 22,3#	1577± 54,1#°	4362± 35,0$	625± 16,5#$	2405± 54,4#°$
2	ІР + NaHS	3975± 21,6	1877± 24,7#	3583± 64,3#°	4457± 44,3$	2496± 52,9#$	3994± 42,9#°$
SaO_2, %							
1	ІР (Контрольна патологія)	98,7± 0,13	60,4± 1,54#	75,2± 0,94#°	98,2± 0,28	69,7± 0,98#$	82,7± 0,80#°$
2	ІР + NaHS	98,1± 0,23	78,8± 1,30*#	91,1± 0,51*#°	98,2± 0,17	80,1± 1,47*#$	97,0± 0,36*#°$
ТЛШ, мм.рт.ст							
1	ІР (Контрольна патологія)	145± 1,56	55,9± 4,82#	74,7± 1,56#°	146± 1,90	69,4± 1,46#$	82,5± 1,27#°$
2	ІР + NaHS	145± 1,69	103± 1,50*#	117± 1,04*#°	144± 1,34	119± 1,26*#$	130± 1,33*#°$
ТПШ, мм.водн.ст.							
1	ІР (Контрольна патологія)	79,8± 0,27	41,3± 0,56#	53,2± 0,52#°	81,7± 0,98	53,7± 0,81#$	60,9± 0,90#°$
2	ІР + NaHS	82,6± 0,64	70,5± 0,66*#	76,3± 0,55*#°	83,5± 0,49	76,5± 0,63*#$	81,1± 0,58*#°$

Примітки: 1. * - $p<0,05$ відносно контрольної патології; 2. # - $p<0,05$ відносно фонового рівня в межах групи; 3. ° - $p<0,05$ відносно рівня на тлі ішемії в межах групи; 4. $^{\$}$ - $p<0,05$ відмінність між самцями та самками.

Дослідження динаміки вмісту H_2S в сироватці крові показало, що на тлі ішемії міокарда реєструється зменшення рівня H_2S в сироватці крові у самців на 64,5% ($p<0,05$), а у самок - на 51,1% ($p<0,05$). За цих умов реєструється поглиблення статевих відмінностей рівня H_2S порівняно з фоновим рівнем: у самців його вміст на 40,3% менший ($p<0,05$), ніж у самок. За умов профілактично-лікувального

застосування NaHS на тлі ішемії відмічається менш виразне падіння рівня H_2S в сироватці крові: у самців зменшення його вмісту становить 47,7% ($p<0,05$), а у самок 43,7% ($p<0,05$), відносно фонового рівня. Станом на 1 годину після початку реперфузії виявляється зростання рівня H_2S в сироватці крові у самців на 31,6% ($p<0,05$), а у самок - на 39,4% ($p<0,05$), відносно показника на тлі ішемії. В той же час, використання NaHS за умов реперфузії супроводжується більш істотним збільшенням H_2S в сироватці крові у самців - на 40,6% ($p<0,05$), а у самок - на 49,5% ($p<0,05$), відносно такого на тлі ішемії.

Таким чином, оклюзія лівої коронарної артерії у самців має більш важкий перебіг, а реканалізація інфаркт-залежної судини відбувається менш повноцінно, ніж у самок. Не виключено, що однією із причин статевих відмінностей резистентності міокарду до пошкодження на тлі ішемії / реперфузії є особливості системи H_2S у самців та самок. Так, більш високий фоновий рівень H_2S в крові самок щурів та менше його падіння на тлі лігування лівої коронарної артерії є важливим чинником більшої опірності міокарда тварин цієї статі до пошкодження, порівняно з самцями. Превентивне в/в інфузійне введення водного розчину NaHS не тільки перешкоджало розвитку ішемії серцевого м'язу, а й сприяло більш повноцінній реканалізації.

Дослідження впливу 28-добового введення тіолактону гомоцистеїну на метаболізм сірковмісних амінокислот в печінці, показники обміну H_2S, про- та антиоксидантної системи, тіол-дисульфідного обміну в міокарді та аорті, скоротливість судин у самців та самок щурів. Корекція поліфенольними сполуками (геністеїном та кверцетином). Застосування тіолактону гомоцистеїну викликає зростання в сироватці крові вмісту гомоцистеїну (у самців в 2,1 рази, $p<0,05$, а у самок - в 1,8 рази, $p<0,05$), цистеїну (у самців на 59,2%, $p<0,05$), а у самок на 38,0%, $p<0,05$) та зменшення рівня H_2S (у самців на 59,4% ($p<0,05$), у самок - на 47,5%, $p<0,05$), причому вказані зміни були більш виразними у самців (табл. 8).

ГГЦ супроводжується зменшенням швидкості утилізації гомоцистеїну в реакціях реметилування та транссульфування, а також деградації цистеїну в окисному, кон'югаційному та десульфуразному шляхах. Більш істотний вплив ГГЦ відмічався у самців. За цих умов реєструється зниження активності ферментів метилування: МАТ (у самців на 20,5%, $p<0,05$, а у самок - на 13,4%, $p<0,05$), БГМТ (у самців на 19,4%, $p<0,05$, а у самок - на 11,2%, $p<0,05$) та S-АГГ (у самців та самок щурів відповідно на 20,9 та 14,2%, $p<0,05$), порівняно з відповідним контролем. Зменшується швидкість деградації гомоцистеїну в реакціях транссульфування: активність ЦБС у самців на 24,8% ($p<0,05$), а у самок щурів - на 15,4% ($p<0,05$), порівняно з відповідним контролем. Поряд з цим знижується швидкість катаболізму цистеїну: зменшується активність ЦДО (у самців та самок відповідно на 21,1 та 13,4%, $p<0,05$) та γ-ГЦЛ (у самців та самок відповідно на 22,0 та 15,9%, $p<0,05$), порівняно з контролем. Також реєструється падіння активності печінкових H_2S-продукуючих ензимів ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ, причому у самців в більшій мірі (на 20,6-25,9%, $p<0,05$), ніж у самок (на 13,5-17,5%, $p<0,05$, відносно контролю).

З'ясувалось, що введення тіолактону гомоцистеїну упродовж 28 діб викликало зменшення вмісту H_2S в міокарді та аорті у самців на 31,4-43,3% ($p<0,05$), а у самок - на 20,0-25,1% ($p<0,05$), порівняно з відповідним контролем (табл. 8). Поряд з цим відмічалось зменшення активності H_2S-синтезуючих ензимів ЦГЛ, ЦАТ та ТСТ в серцево-судинній системі, більш істотне у самців (на 28,3-49,8%, $p<0,05$,), ніж у самок (на 17,1-36,8%, $p<0,05$, порівняно з контролем). Також реєструвалось збільшення загальної швидкості утилізації екзогенного H_2S в міокарді самців (на 36,5%, $p<0,05$) та самок (на 22,5%, $p<0,05$) щурів. На тлі ГГЦ поглиблюються відмінності метаболізму H_2S в серцево-судинній системі між самцями та самками.

Таблиця 8

Вплив ГГЦ на вміст сірковмісних амінокислот та H_2S в сироватці крові, міокарді та аорти у самців та самок щурів (M±m, n=10)

Групи тварин		Міокард	Аорта	Сироватка крові		
		H_2S		Гомоцистеїн	Цистеїн	H_2S
		нмоль/ мг протеїну		мкмоль/л		
Самці						
1	Контроль	2,60±0,11	1,27±0,05	7,68±0,13	143±2,95	77,6±2,76
2	ГГЦ	1,47±0,07*	0,87±0,04*	16,2±0,52*	228±4,12*	31,5±1,10*
Самки						
1	Контроль	3,14±0,10	1,61±0,06	6,23±0,12	110±2,46	95,6±2,15
2	ГГЦ	2,35±0,09*	1,29±0,07*	11,4±0,34*	152±2,87*	50,2±1,51*

Примітка. * - $p<0,05$ відносно контролю.

ГГЦ ініціює розвиток дисбалансу про- та антиоксидантних ензимів в міокарді та аорті щурів обох статей, який є істотно більшим у самців. Станом на 28 добу введення тіолактону гомоцистеїну в міокарді та аорті реєструється зменшення активності супероксиддисмутази (у самців на 33,2-34,1%, а у самок відповідно на 20,7-23,7%, $p<0,05$), тіоредоксинредуктази (у самців та самок відповідно на 33,0 та 24,8%, $p<0,05$), вмісту відновленого глутатіону (у самців та самок відповідно на 39,7 та 25,6%, $p<0,05$) та зростання активності НАДФН-оксидази (у самців на 46,2-52,7%, а у самок відповідно на 31,6-33,3%, $p<0,05$), рівня окисненого глутатіону (у самців та самок відповідно на 32,1 та 20,0%, $p<0,05$), МДА та КГП (у самців на 83,1-102%, у самок відповідно на 68,3-66,7%, $p<0,05$), відносно контролю. ГГЦ поглиблювала базальні відмінності стану про-антиоксидантних систем у самців та самок щурів.

Введення тіолактону гомоцистеїну викликає цитоліз кардіоміоцитів та ендотеліальну дисфункцію, причому у самців вказані зміни були більш масштабними. У тварин з ГГЦ відмічається зростання в крові активності АСТ, КФК та вмісту sVCAM-1 (на 39,2-50,3% у самців проти 24,9-35,6% у самок, $p<0,05$), порівняно з контролем. За цих умов відмічається зменшення H_2S- та цистеїн-стимульованого розслаблення та збільшення гомоцистеїн-індукованої вазоконстрикції кілець аорти: EC_{50} H_2S та цистеїну в аорті зростала у самців та самок відповідно на 32,8-40% та 21,1-26,8% ($p<0,05$), а EC_{50} гомоцистеїну

зменшувалась у самців на 40,0% ($p<0,05$), а у самок на 34,9% ($p<0,05$), відносно контролю.

З метою корекції стать-специфічних розладів, індукованих ГГЦ обрані поліфенольні сполуки кверцетин та геністеїн, які володіють політропними фармакологічними властивостями. Введення геністеїну попереджує індуковані ГГЦ порушення метаболізму сірковмісних амінокислот, збільшення рівня гомоцистеїну, цистеїну та зменшення вмісту H_2S в сироватці крові у тварин обох статей (рис. 5). За цих умов використання кверцетину не впливає на активність ферментів метаболізму сірковмісних амінокислот в печінці, вміст гомоцистеїну та цистеїну в сироватці крові, однак протидіє формуванню дефіциту H_2S.

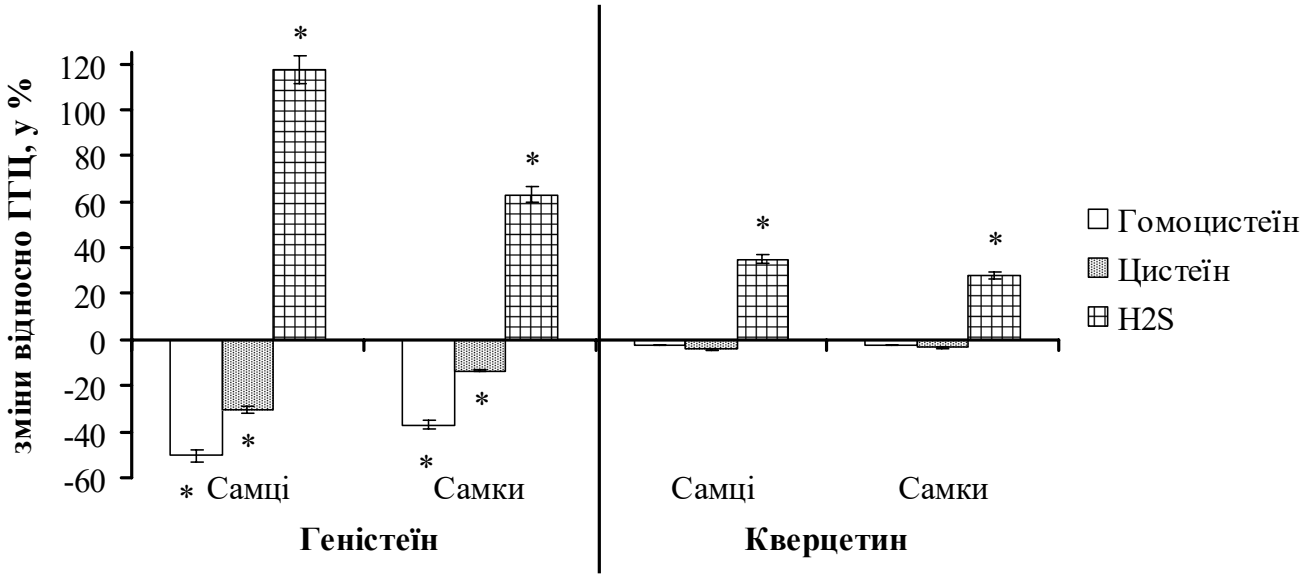

Рис. 5. Вплив геністеїну та кверцетину на вміст сірковмісних амінокислот та H_2S в сироватці крові за умов ГГЦ. Примітка. * - $p<0,05$ відносно ГГЦ.

Застосована фармакотерапія з різною ефективністю впливала на обмін H_2S в міокарді та аорті самців й самок щурів за умов ГГЦ (рис. 5). Введення геністеїну стримує формування дефіциту H_2S, протидіє посиленій деградації H_2S в серці та попереджує зниження активності H_2S-синтезуючих ферментів в серцево-судинній системі самців та самок щурів за умов ГГЦ. В групі «ГГЦ+геністеїн» рівень H_2S та активність ЦГЛ, ЦАТ та ТСТ в міокарді та аорті були вищими (у самців на 29,1-64,3%, $p<0,05$, а у самок на 13,7-45,7%, $p<0,05$), а швидкість утилізації екзогенного H_2S виявилась меншою (у самців та самок відповідно на 24,2 та 16,9%, $p<0,05$), відносно групи нелікованих тварин. Натомість, введення кверцетину не впливало на активність H_2S-синтезуючих ферментів в міокарді та аорті щурів, а за впливом на інші показники обміну H_2S значно поступалось геністеїну.

Фармакотерапія попереджувала ГГЦ-індукований дисбаланс в системі про-антиоксидантів, зменшувала ознаки оксидативного стресу в міокарді та аорті, однак істотно відрізнялась за ефективністю залежно від обраного препарату. Наприклад, в міокарді тварин, лікованих геністеїном, активність НАДФН-оксидази, вміст МДА, КГП в міокарді вірогідно менша (у самців на 31,9-45,8%, у самок - 22,7-35,8%,

p<0,05), тоді як активність супероксиддисмутази та вміст відновленого глутатіону більша (у самців на 43,8-57,1%, у самок на 27,9-30,5%, p<0,05), порівняно з тваринами групи «ГГЦ». Введення кверцетину поступається геністеїну за антиоксидантною активністю на тлі ГГЦ.

Застосування геністеїну та кверцетину в різній мірі виявляли кардіопротективну та ендотеліотропну дію на тлі ГГЦ. Встановлено, що у самців, лікованих геністеїном, активність АСТ, КФК та вміст sVCAM-1 в крові були меншими у самців на 23,3-32,2% (p<0,05), а у самок - на 14,5-23% (p<0,05), порівняно з тваринами групи «ГГЦ». Також геністеїн стримував падіння релаксуючої дії H_2S й цистеїну та наростання констрикторної дії гомоцистеїну на кільцеві фрагменти аорти за умов ГГЦ. Застосування кверцетину не впливає на чутливість аорти до дії сірковмісних сполук та в меншій мірі стримує ГГЦ-ініційований цитоліз кардіоміоцитів та наростання в крові sVCAM-1.

На основі результатів власних досліджень та даних літератури була створена схема молекулярних механізмів формування стать-асоційованої патології серця та судин за умов ГГЦ та точки прикладання геністеїну (рис. 6).

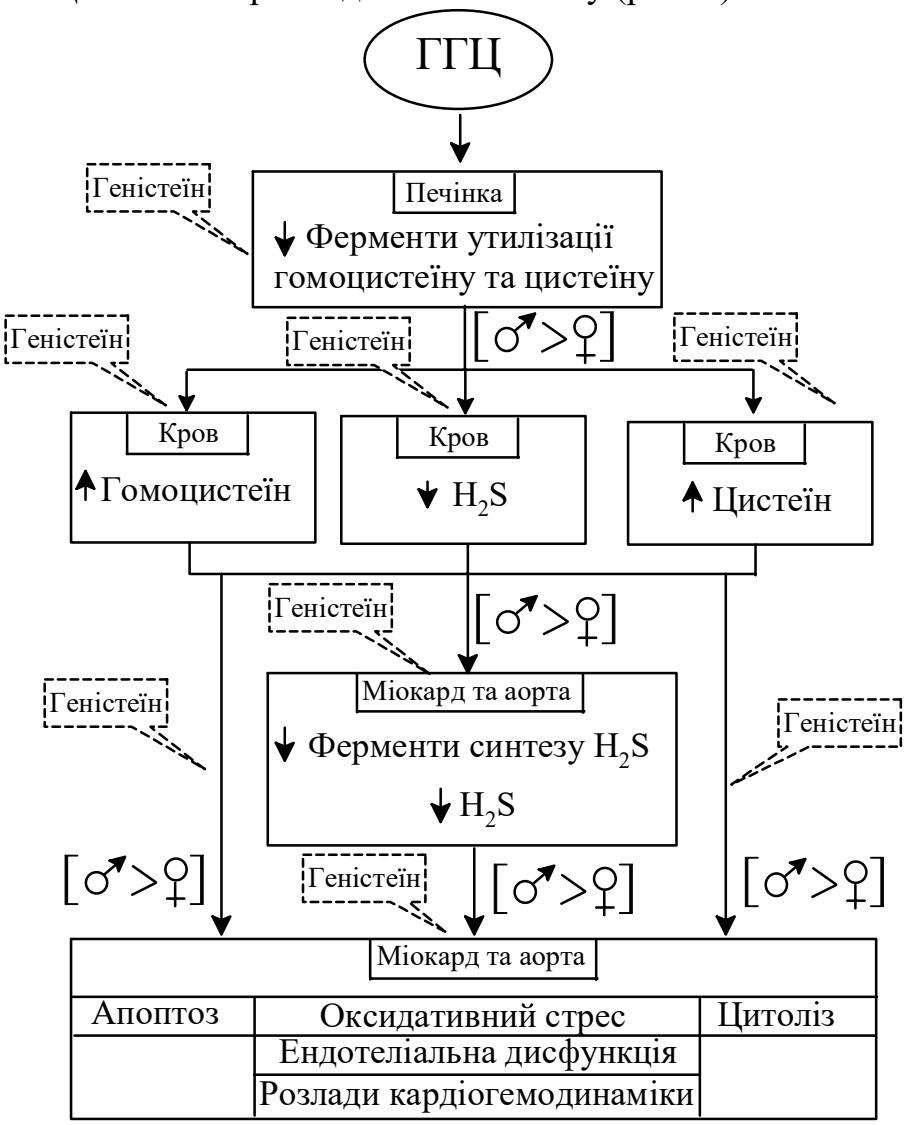

Рис. 6. Молекулярні механізми формування стать-асоційованої патології серця та судин за умов ГГЦ та точки прикладання геністеїну.

ВИСНОВКИ

У дисертації теоретично узагальнено та встановлено нові біохімічні механізми формування гендерасоційованої патології серцево-судинної системи: з'ясовано статеві особливості процесів метилування, транссульфування, обміну цистеїну та гідроген сульфіду (H_2S) в печінці, міокарді й аорті в нормі та при гіпергомоцистеїнемії. На цій основі розроблено підходи до корекції вказаної патології у самців та самок щурів з використанням поліфенольних сполук та запропоновано метаболічні критерії ризику кардіоваскулярної патології у особин різної статі.

1. У тварин різної статі та з різним рівнем статевих гормонів метаболізм сірковмісних амінокислот та H_2S в печінці має ряд особливостей. У самців відмічається вірогідно менша активність (на 14,4-22,6%, $p<0,05$) ферментів транссульфування (активність ензимів цистатіонін-γ-ліази та цистатіонін-β-синтази), метилування (бетаїнгомоцистеїнметилтрансфераза, метіонінаденозилтрансфераза, S-аденозилгомоцистеїнметилтрансфераза), синтезу H_2S (десульфуразна активність цистатіонін-γ-ліази, цистатіонін-β-синтази, цистеїнамінотрансферази, тіосульфатдитіолсульфідтрансферази), метаболізму цистеїну (активність цистеїндиоксигенази, γ-глутамілцистеїнлігази), порівняно з самками. Кастрація тварин змінює вектор статевих відмінностей - у самців вірогідно зростає (на 16,8-27,6%, $p<0,05$) активність ферментів транссульфування, метилування, синтезу H_2S та метаболізму цистеїну, тоді як у самок виникають протилежні зміни. Проведення замісної гормонотерапії повертає вектор статевих відмінностей до такого у контрольної групи тварин. Високий рівень тестостерону виявляє обернені кореляції з активністю ферментів обміну сірковмісних амінокислот та синтезу H_2S в печінці ($r=-(0,38-0,54)$, $p<0,05$), тоді як асоціативні зв'язки з рівнем естрадіолу є прямими ($r=0,37-0,58$, $p<0,05$).

2. В сироватці крові тварин існують статеві відмінності концентрації сірковмісних амінокислот та H_2S. У самців щурів вміст гомоцистеїну та цистеїну є достовірно вищим на 22,0-22,7%, а вміст H_2S вірогідно нижчим на 17,0%, порівняно з такими показниками у самок. Кастрація самців спричиняє достовірне зменшення в крові рівня гомоцистеїну (на 13,9%), цистеїну (на 15,6%) та збільшення вмісту H_2S (на 33,8%), тоді як оваріектомія самок викликає протилежні зміни. Важливими детермінантами рівня сірковмісних амінокислот та H_2S в сироватці крові є вміст статевих гормонів в крові: високий рівень естрадіолу асоціюється з низьким вмістом гомоцистеїну ($r=-0,47$, $p<0,05$), цистеїну ($r=-0,52$, $p<0,05$) та високим рівнем H_2S ($r=0,61$, $p<0,05$), в той час як високий рівень тестостерону супряжений з високим рівнем гомоцистеїну, цистеїну ($r=0,41-0,44$, $p<0,05$) та низьким вмістом H_2S ($r=-0,52$, $p<0,05$).

3. Метаболізм H_2S в міокарді та аорті має особливості у тварин різної статі та різним рівнем статевих гормонів. У самок відмічається більша (на 24,1-34,8%, $p<0,05$) активність H_2S-синтезуючих ферментів в міокарді та аорті (цистатіонін-γ-ліази, цистеїнамінотрансферази, тіосульфатдитіолсульфідтрансферази), вищий (на 87,5%, $p<0,05$) рівень експресії гену *CSE* в міокарді, більша її спорідненість до

цистеїну (Km по цистеїну менша на 19,5-20,3% ($p<0,05$) та максимальна каталітична активність (Vmax реакції більша на 13,3-16,0%, $p<0,05$) в міокарді й аорті, менша (на 24,5%, $p<0,05$) загальна швидкість утилізації H_2S в міокарді, ніж у самців. Кастрація самців викликала збільшення (на 21,6-41,4%, $p<0,05$) активності H_2S-синтезуючих ферментів, зростання (на 22,2%, $p<0,05$) експресії *CSE* в міокарді, збільшення її максимальної каталітичної активності (на 11,4-13,0%, $p<0,05$) та спорідненості до цистеїну (на 16,6-18,8%, $p<0,05$), зменшення (на 40,9%, $p<0,05$) швидкості утилізації H_2S в міокарді та аорті, тоді як оваріектомія самок мала протилежний вплив на вказані показники.

4. Вміст H_2S в міокарді та аорті відрізняється у щурів різної статі та з різним рівнем статевих гормонів. У самок щурів вміст H_2S вищий на 19,1-20,9% ($p<0,05$), ніж у самців. Кастрація самців викликає збільшення вмісту H_2S на 22,2-24,8% ($p<0,05$), тоді як оваріектомія самок - зменшення на 16,3-18,8% ($p<0,05$), порівняно з контролем. Кастрація тварин змінювала направленість статевих відмінностей вмісту H_2S в серцево-судинній системі: у самок в контрольній групі його рівень був вищим на 19,1-20,9%, тоді як в групі кастрованих тварин - меншим на 18,4-21,4%, порівняно з самцями. Замісна гормонотерапія у кастрованих тварин наближала вміст H_2S до рівня контрольної групи. Важливими детермінантами рівня H_2S в міокарді й аорті є вміст статевих гормонів, гомоцистеїну, цистеїну та H_2S в крові: рівень H_2S в міокарді й аорті виявляє прямі асоціативні зв'язки з рівнем естрадіолу та H_2S в крові ($r=0,45-0,77$, $p<0,05$), а обернені - з рівнем тестостерону, гомоцистеїну та цистеїну в крові ($r=-(0,40-0,69)$, $p<0,05$).

5. Біохімічні та функціональні параметри міокарду та аорти відрізняються у тварин різної статі та з різним рівнем статевих гормонів. У самців в міокарді та аорті виявляється менша (на 18,6-21,1%, $p<0,05$) активність супероксиддисмутази та тіоредоксинредуктази, менший (на 15,5%, $p<0,05$) рівень відновленого глутатіону, більша (на 28,5-55,7%, $p<0,05$) активність НАДФН-оксидази та процесів вільнорадикального окиснення ліпідів й протеїнів, порівняно з самками. Поряд з цим у самців більший (на 17,7-30,3%, $p<0,05$) рівень апоптозу (кількість клітин в ділянці SUB-G0G1), проліферації (кількість клітин в фазі S) та поліплоїдизації (число клітин з кількістю ДНК=4c) в серці, порівняно з самками. Також у самців відмічається менший коефіцієнт мікроциркуляції (на 8,82%, $p<0,05$) лівого шлуночка та більший (на 15,3%, $p<0,05$) вміст молекули адгезії sVCAM в сироватці крові, порівняно з самками. Кастрація тварин змінює вектор статевих відмінностей досліджуваних показників, тоді як замісна гормонотерапія статевими гормонами відновлює направленість статевих відмінностей до такого у контрольній групи тварин.

6. У тварин різної статі існують відмінності регуляторного впливу сірковмісних амінокислот та H_2S на тонус аорти. У самок чутливість кільцевих фрагментів аорти до вазодилятуючої дії H_2S та цистеїну вірогідно більша (EC_{50} H_2S та цистеїну відповідно на 22,8 та 26,3% менша, $p<0,05$), тоді як чутливість до вазоконстрикторної дії гомоцистеїну менша (EC_{50} гомоцистеїну на 27,9% більша, $p<0,05$), ніж у самців. Кастрація самок супроводжується зменшенням чутливості

аорти до вазодилятуючої дії H_2S та цистеїну (EC_{50} H_2S та цистеїну збільшується відповідно на 33,0 та 42,3%, $p<0,05$) та збільшенням чутливості до вазоконстрикторної дії гомоцистеїну (EC_{50} гомоцистеїну зменшується на 24,9%, $p<0,05$), тоді як гонадектомія самців викликає протилежні зміни. Рівень естрадіолу виявляє прямі кореляції з EC_{50} гомоцистеїну ($r=0,50$, $p<0,05$) та обернені кореляції з EC_{50} H_2S ($r=-0,56$, $p<0,05$) і EC_{50} цистеїну ($r=-0,53$, $p<0,05$), натомість направленість зв'язків з рівнем тестостерону є протилежною. Також виникали обернені асоціативні зв'язки між рівнем H_2S в аорті та EC_{50} H_2S і цистеїну ($r=-0,54$-$0,62$, $p<0,05$), а також прямі кореляції з EC_{50} гомоцистеїну ($r=0,58$-$0,66$; $p<0,05$) у самців й самок щурів.

7. Модулятори обміну H_2S мають стать-специфічний вплив на біохімічні та функціональні параметри міокарду та аорти. Введення пропаргілгліцину у самців викликає більш значиме зменшення активності цистатіонін-γ-ліази (на 42,9-58,6% проти 26,9-39,5% у самок, $p<0,05$), вмісту H_2S (на 30,2-46,2% проти 20,0-23,0% у самок, $p<0,05$) в міокарді та аорті, що супроводжується більш виразним оксидативним стресом (вміст малонового діальдегіду та карбонільних груп протеїнів в крові зростає на 62,5-85,9% проти 51,8-64,7% у самок, $p<0,05$), цитолізом кардіоміоцитів (активність аспартатамінотрансферази та креатинфосфокінази в крові зростає на 32,5-36,5% проти 22,8-23,3% у самок $p<0,05$), ендотеліальної дисфункції (вміст sVCAM-1 в крові зростає на 44,4%, проти 30,4% у самок, $p<0,05$), зменшенням вазодилятуючої дії H_2S та цистеїну, збільшенням вазоконстрикторної дії гомоцистеїну. Застосування NaHS у самців викликає більш істотне збільшення рівня H_2S (на 20,5-22,3% проти 11,1-12,7% у самок, $p<0,05$), виявляє більш виразну антиоксидантну дію в міокарді й аорті (зменшення вмісту малонового діальдегіду та карбонільних груп протеїнів становило 21,1-31,3% проти 13,1-16,9% у самок, $p<0,05$) та ендотеліопротекторний ефект (вміст sVCAM-1 в крові зменшується на 44,4% проти 30,4% у самок, $p<0,05$).

8. На тлі оклюзії лівої коронарної артерії у самців відмічається більш істотне зменшення вмісту H_2S в сироватці крові (на 64,5% проти 51,1% у самок, $p<0,05$), що асоціюється з більш значимим зниженням показників мікроциркуляції лівого шлуночка та кардіогемодинаміки (38,8-92,0% проти 29,0-85,7% у самок, $p<0,05$). Реперфузія вінцевої артерії не нормалізує вміст H_2S в сироватці крові та повністю не відновлює показники кардіогемодинаміки, тоді як превентивне введення NaHS стримує мікроциркуляторні та гемодинамічні зрушення у шлуночках як у самців, так і у самок.

9. Введення тіолактону гомоцистеїну (100 мг/кг, 28 діб) у самців викликає більш значиме зростання в сироватці крові вмісту гомоцистеїну (на 110% проти 80% у самок, $p<0,05$), цистеїну (на 59,2% проти 38,0% у самок, $p<0,05$), зменшення рівня H_2S (на 59,4% проти 47,5% у самок, $p<0,05$) та більш істотні порушення обміну сірковмісних амінокислот та H_2S в тканинах, що асоціюється з вищим кардіо- та вазотоксичним ефектами, порівняно з самками.

10. Використання геністеїну (2,5 мг/кг, 28 діб) за гіпергомоцистеїнемії зменшує рівень гомоцистеїну, цистеїну та підвищує вміст H_2S в сироватці крові, протидіє порушенню обміну сірковмісних амінокислот та H_2S в органах щурів,

виявляє антиоксидантний, кардіопротекторний та ендотеліотропний ефекти як у самців, так і у самок. За умов гіпергомоцистеїнемії введення кверцетину не виявляє гіпогомоцистеїнемічного та гіпоцистеїнемічного ефекту, не впливає на метаболізм сірковмісних амінокислот в печінці та за іншими ефектами значно поступається геністеїну.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Під час скринінгу речовин на наявність кардіопротекторних та ендотеліотропних властивостей до переліку досліджень доцільно включити визначення їх впливу на вміст гомоцистеїну, цистеїну та H_2S в сироватці крові.

2. Поліфенольна сполука геністеїн, що володіє естрогеноподібними властивостями, нормалізує вміст гомоцистеїну, цистеїну й H_2S в крові і є перспективною речовиною для доклінічних та клінічних досліджень з метою розробки метаболічних коректорів стану серцево-судинної системи.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Мельник А.В.**, Ольховський О.С., Заічко Н.В., Колошко О.М. Роль статевих чинників у продукції гідроген сульфіду в серцево-судинній системі щурів // Медична хімія. 2011. № 13(4). С. 64-68. *(Здобувачем особисто проведений опис літературних даних, виконані всі експериментальні дослідження, проведено статистичну обробку, аналіз та узагальнення результатів, написання статті, оформлення матеріалів до друку).*
2. Ольховський О.С., **Мельник А.В.**, Заічко Н.В. Вікові відмінності продукції гідроген сульфіду в серці та аорті щурів // Актуальні проблеми сучасної медицини. 2011. № 11(4). С. 133-137. *(Здобувачем виконано частину експериментальних досліджень, проведено статистичну обробку, аналіз та узагальнення результатів).*
3. **Мельник А.В.**, Заічко Н.В., Волощук Н.І. Статеві відмінності метаболізму гомоцистеїну в печінці щурів // Медична хімія. 2013. № 15(1). С. 20-24. *(Здобувачем виконані всі експериментальні дослідження, проведено статистичну обробку, аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*
4. **Мельник А.В.** Вплив тестостерону на продукцію гідроген сульфіду в міокарді щурів // Медична хімія. 2014. № 16(4). С. 22-25.
5. **Мельник А.В.** Утворення гідроген сульфіду в аорті щурів: зв'язок із рівнем статевих гормонів // Вісник морфології. 2014. № 20(1). С. 158-162.
6. **Мельник А.В.**, Заічко Н.В., Паламарчук І.В. Вплив модуляторів обміну гідроген сульфіду на біохімічні показники та тонус аорти щурів різних вікових груп // Вісник Вінницького національного медичного університету. 2014. № 18(2). С. 397-400. *(Здобувачем особисто проведений аналіз та узагальнення літературних даних, результатів власних досліджень, написана стаття).*
7. Zaichko N.V., **Melnik A.V.**, Yoltukhivskyy M.M., Olhovskiy A.S., Palamarchuk I.V. Hydrogen sulfide: modern aspects of metabolism, biological and medical role // Ukr. Biochem. J. 2014. № 86(5). P. 5-25. *(Здобувач приймав участь в аналізі та узагальненні літературних даних, написав частину статті).*

8. Юрченко П.О., **Мельник А.В.**, Заічко Н.В., Йолтухівський М.М. Особливості обміну гомоцистеїну та гідроген сульфіду в центральній нервовій системі // Медична хімія. 2014. № 16(3). С. 90-96. *(Здобувачем проведений аналіз та узагальнення літературних даних, написана стаття).*
9. Нечипорук В.М., Заічко Н.В., **Мельник А.В.**, Корда М.М. Роль тиреоїдних гормонів в обміні гомоцистеїну // Медична хімія. 2014. № 16(1). С. 81-88. *(Здобувач приймав участь в аналізі та узагальненні літературних даних).*
10. Заічко Н.В., Ольховський О.С., **Мельник А.В.**, Юрченко П.О., Григор'єва Г.С., Конахович Н.Ф. Вплив полімікроелементного препарату «Есмін» на вміст гідрогенсульфіду та показники про- та антиоксидантної системи в міокарді щурів різного віку // Український біохімічний журнал. 2014. № 86(3). С. 69-76. *(Здобувач приймав участь в аналізі та узагальненні результатів досліджень, допомагав в підготовці статті до друку).*
11. Заічко Н.В., Юрченко П.О., **Мельник А.В.**, Штатько О.І. Біохімічні аспекти нейротоксичної дії гіпергомоцистеїнемії // Вісник морфології. 2014. № 20(2). С. 520-524. *(Здобувач приймав участь в аналізі, узагальненні літературних даних та написанні частини статті).*
12. **Мельник А.В.** Вплив різної насиченості організму самок щурів естрадіолом на утворення гідроген сульфіду в міокарді // Медичні перспективи. 2015. № 20(1). С. 21-26.
13. Voloshchuk N.I., Taran I.V., **Mel'nik A.V.** Influence of diclofenac sodium on biochemical indicators of stomach mucosa conditions against the background of excess and deficiency of hydrogen sulfide in rats // The Science Advanced. 2015. № 1. P. 36-40. *(Здобувач провів частину експериментальних досліджень, приймав участь в аналізі та узагальненні результатів дослідження).*
14. Voloshchuk N.I., Taran I.V., **Mel'nik A.V.** Vascular mechanism in the diclophenac induced gastrotoxicity: the association with the level of hydrogen sulfide // Curierul medical. 2015. № 58(1). P. 7-11. *(Здобувач провів частину експериментальних досліджень, приймав участь в аналізі та узагальненні результатів дослідження).*
15. **Мельник А.В.** Статевий диморфізм регуляції судинного тонусу у щурів // Biomedical and biosocial anthropology. 2016. № 27. С. 95-97.
16. **Мельник А.В.**, Заічко Н.В. Вплив поліфенольних сполук на метаболізм сірковмісних амінокислот та гідроген сульфіду в печінці у самців та самок щурів за умов гіпергомоцистеїнемії // Актуальні проблеми сучасної медицини. 2017. № 2(58). С. 36-40. *(Здобувачем сплановано та проведено експеримент, виконані усі біохімічні дослідження, виконана статистична обробка результатів та написана стаття).*
17. **Мельник А.В.**, Заічко Н.В., Качула С.О., Струтинська О.Б. Аналіз впливу статевих гормонів на біохімічні показники стану серця щурів: зв'язок з рівнем гідроген сульфіду в міокарді // ScienceRise. Medical Science. 2017. № 3(11). С. 35-39. *(Здобувачем особисто проведено опис літературних даних, сплановано експеримент, проведені усі біохімічні дослідження, статистична обробка матеріалу, аналіз та узагальнення результатів дослідження, написана стаття).*

18. **Мельник А.В.**, Заічко Н.В. Статеві відмінності H_2S-ініційованої вазодилятації аорти за умов гіпергомоцистеїнемії // Вісник проблем біології та медицини. 2017. № 1(135). С. 148-152. *(Здобувачем проведені усі біохімічні та електрофізіологічні дослідження, статистична обробка матеріалу, аналіз та узагальнення результатів дослідження, написана стаття).*
19. **Мельник А.В.**, Волощук Н.І. Вплив біофлавоноїдів на індуковані гіпергомоцистеїнемією зміни метаболізму гідроген сульфіду в міокарді та аорті самців та самок щурів // Світ медицини та біології. 2017. № 1(59). С. 129-133. *(Здобувачем особисто сплановано експеримент, проведені усі біохімічні дослідження, аналіз та узагальнення результатів, написана стаття).*
20. **Мельник А.В.**, Заічко Н.В. Статеві відмінності впливу гіпергомоцистеїнемії на метаболізм гідроген сульфіду в серцево-судинній системі // Вісник наукових досліджень. 2017. № 1(86). С. 125-128. *(Здобувачем особисто проведений опис літературних даних, виконані всі експериментальні дослідження, проведено статистичну обробку, аналіз та узагальнення результатів, написання статті, оформлення матеріалів до друку).*
21. **Мельник А.В.**, Заічко Н.В. Гендерні особливості впливу гіпергомоцистеїнемії на метаболізм сірковмісних амінокислот та гідроген сульфіду в печінці // Медична та клінічна хімія. 2017. № 1(19). С. 95-101. *(Здобувач особисто спланував та виконав усі експериментальні дослідження, провів аналіз та узагальнення результатів, написав та підготував статтю до друку).*
22. **Мельник А.В.** Статеві відмінності показників про-антиоксидантної системи в міокарді щурів за умов гіпергомоцистеїнемії // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2017. № 1(29). С. 47-52.
23. **Melnik A.V.**, Zaichko N.V. Influence of polyphenolic compounds on H_2S-induced vasodilation of aorta in male and female rats under hyperhomocysteinemia // European Journal of Biomedical and Life Sciences, «East West» Association for Advanced Studies and Higher Education GmbH. Vienna. 2017. № 2. P. 29-32. *(Здобувачем особисто проведений опис літературних даних, сплановано та проведено експеримент, виконані усі біохімічні та експериментальні дослідження, виконана статистична обробка результатів та написана стаття).*
24. **Melnik A.V.** Effect of polyphenol compounds on the aorta state in male and female rats under conditions of hyperhomocysteinemia // Deutscher Wissenschaftsherold. German Science Herald. 2017. № 3. P. 35-38.
25. **Мельник А.В.** Вплив біофлавоноїдів на біохімічні показники стану серця у самців та самок щурів за умов гіпергомоцистеїнемії // Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень. 2017. № 5(2). С. 856-862.
26. **Мельник А.В.** Статеві особливості рівня гідроген сульфіду в сироватці крові щурів // Вісник морфології. 2017. № 1(23). С. 7-9.
27. **Мельник А.В.** Зв'язок рівня статевих гормонів з вмістом сірковмісних амінокислот та гідроген сульфіду в крові // Вісник Вінницького національного медичного університету. 2017. № 1(21). С. 6-8.
28. **Мельник А.В.** Гендерний диморфізм рівня сірковмісних амінокислот в сироватці крові щурів // Biomedical and biosocial anthropology. 2017. № 28. С. 13-17.

29. Заічко Н.В., **Мельник А.В.**, Ольховський О.С., Заічко К.О. Спосіб визначення H_2S-продукуючої активності міокарда тварин: пат. 75683 Україна. № u2012 06388; заявл. 28.05.2012; опубл. 10.12.2012; Бюл. № 23. 3с.
30. Заічко Н.В., Ольховський О.С., Юрченко П.О., **Мельник А.В.**, Штатько О.І. Спосіб визначення утилізації H_2S в органах тварин: пат. 87884 Україна. № u2013 10024; заявл. 12.08.2013; опубл. 25.02.2014; Бюл. № 4. 2с.
31. **Мельник А.В.**, Заічко Н.В., Тертишна О.В. Продукція гідроген сульфіду та нітроген монооксиду в нирках за умов хронічної гіперцистеїнемії та її зв'язок з функціональним станом нирок // Матеріали Першого Українсько-Йорданського медичного конгресу та днів йорданської культури у Вінниці, 12-14 вересня 2011 р., Вінниця. 2011. С. 70-71.
32. Ольховський О.С., **Мельник А.В.**, Заічко Н.В. Вікові зміни продукції гідроген сульфіду в органах щурів // Матеріали Першого Українсько-Йорданського медичного конгресу та днів йорданської культури у Вінниці, 12-14 вересня 2011 р., Вінниця. 2011. С. 71-72.
33. Заічко Н.В., Луцюк М.Б., Григор'єва Г.С., Конахович Н.Ф., **Мельник А.В.**, Артемчук М.А. Сучасні підходи до корекції гіпергомоцистеїнемії та гіперцистеїнемії: лікувально-профілактична ефективність нового вітамінно-мікроелементного комплексу тези // Матеріали IV Національного з'їзду фармакологів України, 10-12 жовтня 2011 р., Київ. 2011. С. 119-120.
34. Йолтухівський М.М., Луцюк М.Б., Заічко Н.В., **Мельник А.В.** Продукція гідроген сульфіду в нирках щурів за умов цисплатинової нефропатії та її корекції вітамінами В6, В9, В12 // Матеріали IV Національного з'їзду фармакологів України, 10-12 жовтня 2011 р., Київ. 2011. С. 142-143.
35. Волощук Н.І., **Мельник А.В.**, Таран І.В., Ольховський О.С. Вікові зміни продукції гідроген сульфіду слизовою оболонкою шлунка в реалізації гастротоксичності НПЗЗ у щурів // Матеріали IV Національного з'їзду фармакологів України, 10-12 жовтня 2011 р., Київ. 2011. С. 59-60.
36. Pentiuk N.O., **Melnik A.V.**, Pentiuk L.O. Hepatic steatosis in rats is associated with alteration in metabolism of hydrogen sulfide and homocysteine in the liver // 7th Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinic Biochemistry, May 23-24, 2013. Lviv. 2013. P. 147
37. Zaichko N.V., Luciuk M.B., Yoltukhivskyy M.M., **Melnik A.V.**, Olhovskiy A.S., Shtatko O.I. The violation of hydrogen sulphide synthesis is a new link in the pathogenesis of of several pathological conditions // Abstract book of conference "Actual opinions in biology, ecology, medicine and pharmacology", September 26-27, 2013. Kharkiv, 2013. P. 47-48.
38. Заічко Н.В., Штатько О.І., Юрченко П.О., Колошко О.М., **Мельник А.В.** Продукція гідрогенсульфіду в мозку щурів за умов хронічної гіпергомоцистеїнемії та її корекції вітамінними та мікроелементними комплексами // Матеріали II міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології», 24-25 вересня, 2013 р., Дніпропетровськ. 2013. С. 28.
39. **Мельник А.В.**, Ольховський О.С., Заічко Н.В. Статеві та вікові відмінності в регуляції судинного тонусу гідроген сульфідом за умов гіпергомоцистеїнемії //

Матеріали науково-практичної конференції «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб», Вінниця 17-18 квітня 2014 р. Вінниця: ВНМУ, 2014. С. 96-97.

40. **Мельник А.В.**, Заічко Н.В., Колошко О.М. Роль статевих чинників у регуляції утворення гідроген сульфіду в серцево-судинній системі щурів // Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, Київ 6-10 жовтня 2014 р. Ukr. Biochem. J. 2014. № 86(5). С. 22.
41. Zaichko N., **Mel'nik A.**, Olhovskiy A., Palamarchyk I. Disturbances in hydrogen sulfide synthesis and degradation in rats' myocardium in aging // The Third International Conference on H_2S Biology and Medicine, June 4-6, 2014, Kyoto, Japan. Nitric Oxide. 2014. № 39(1). P. 18.
42. **Mel'nik A.**, Zaichko N., Palamarchyk I. Gender dimorphism of hydrogen sulfide production and physiological effects in cardiovascular system // The Third International Conference on H_2S Biology and Medicine, June 4-6, 2014, Kyoto, Japan. Nitric Oxide. 2014. № 39(1). P. 16.
43. Волощук Н.І., Таран І.В., **Мельник А.В.**, Заічко Н.В. Вплив гідрогенсульфіду на індуковані диклофенаком зміни слизової оболонки шлунка у щурів з автоімунним запальним процесом // Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, Київ 6-10 жовтня 2014 р. Ukr. Biochem. J. 2014. № 86(5). P. 8-9.
44. **Мельник А.В.** Гендерні відмінності регуляції тонусу аорти у щурів // Матеріали XIV Міжнародної наукової конференції «Перший крок в науку-2017», Вінниця 26-28 квітня 2017 р. - Вінниця: ВНМУ, 2017. С. 217.
45. **Мельник А.В.**, Тубулкан К.М., Личик Г.З. Статеві особливості впливу модуляторів обміну гідроген сульфіду на показники про-антиоксидантної системи в міокарді та нирках щурів // Матеріали LX науково-практичної конференції "Здобутки клінічної та експериментальної медицини", Тернопіль 14 червня 2017 р. Здобутки клінічної та експериментальної медицини. 2017. № 3. С. 326-328.
46. **Мельник А.В.** Гендерні особливості біохімічних показників стану аорти щурів за умов гіпергомоцистеїнемії // Медичний форум. 2017. № 10(10). С. 84-87.

АНОТАЦІЯ

Мельник А.В. Статеві особливості метаболізму сірковмісних амінокислот і гідроген сульфіду та їх зв'язок зі станом серцево-судинної системи (експериментальне дослідження). - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія. - Державна установа «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України», Київ, 2017.

Дисертація присвячена вивченню статевих особливостей обміну сірковмісних амінокислот і H_2S в нормі та при гіпергомоцистеїнемії, їх зв'язку зі станом серцево-судинної системи та експериментальному обґрунтуванню нових підходів щодо корекції стать-асоційованої патології серця та судин.

Встановлено, що статеві чинники відіграють важливу роль в регуляції метаболізму сірковмісних амінокислот і H_2S в тканинах щурів. У самців активність

ферментів деградації гомоцистеїну, цистеїну та утворення H_2S в печінці вірогідно менша, що асоціюється з більшим вмістом гомоцистеїну, цистеїну та нижчим рівнем H_2S в крові, порівняно з самками. Поряд з цим у самців в міокарді та аорті реєструється менша активність H_2S-синтезуючих ферментів, більша швидкість деградації H_2S та менший рівень H_2S, ніж у самок. Статеві особливості метаболізму сірковмісних амінокислот і H_2S асоціюються з різною резистентністю серцево-судинної системи самців та самок щурів до пошкоджень.

Введення тіолактону гомоцистеїну у самців викликає більш істотне зростання в сироватці крові вмісту гомоцистеїну, цистеїну, зменшення рівня H_2S та більш виразні порушення обміну сірковмісних амінокислот і H_2S в тканинах, що асоціюється з вищим кардіо- та вазотоксичним ефектами, порівняно з самками. Застосування геністеїну за цих умов зменшує рівень гомоцистеїну, цистеїну та підвищує вміст H_2S в сироватці крові, протидіє порушенню обміну сірковмісних амінокислот та H_2S в органах щурів, виявляє антиоксидантний, кардіопротекторний та ендотеліотропний ефекти як у самців, так і у самок. В той же час, введення кверцетину не виявляє гіпогомоцистеїнемічного та гіпоцистеїнемічного ефекту, не впливає на метаболізм сірковмісних амінокислот в печінці, а за іншими ефектами значно поступається геністеїну.

Ключові слова: стать, гомоцистеїн, цистеїн, гідроген сульфід, метаболізм, міокард, аорта, гіпергомоцистеїнемія, геністеїн, кверцетин.

АННОТАЦИЯ

Мельник А.В. Половые особенности метаболизма серосодержащих аминокислот и гидроген сульфида и их связь с состоянием сердечно-сосудистой системы (экспериментальное исследование). - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.00.04 - биохимия. - Государственное учреждение «Институт геронтологии имени Д.Ф. Чеботарева НАМН Украины», Киев, 2017.

Диссертация посвящена изучению половых особенностей обмена серосодержащих аминокислот и H_2S в норме и при гипергомоцистеинемии, их связи с состоянием сердечно-сосудистой системы и экспериментальному обоснованию новых подходов к коррекции пол-асоциированной патологии сердца и сосудов.

Установлено, что половые факторы играют важную роль в регуляции метаболизма серосодержащих аминокислот и H_2S в тканях крыс. У самцов активность ферментов деградации гомоцистеина, цистеина и образования H_2S в печени достоверно меньше, что ассоциируется с более высоким содержанием гомоцистеина, цистеина и низким уровнем H_2S в крови по сравнению с самками. Наряду с этим, у самцов в миокарде и аорте регистрируется меньшая активность H_2S-синтезирующих ферментов, более высокая скорость деградации H_2S и меньший уровень H_2S, чем у самок. Половые особенности метаболизма серосодержащих аминокислот и H_2S ассоциируются с разной резистентностью сердечно-сосудистой системы самцов и самок крыс к повреждениям.

Введение тиолактона гомоцистеина у самцов вызывает более существенное повышение в сыворотке крови содержания гомоцистеина, цистеина, снижение уровня H_2S и более выраженные нарушения обмена серосодержащих аминокислот и H_2S в тканях, что ассоциируется с более высоким кардио- и вазотоксическим эффектами по сравнению с самками. Применение генистеина в этих условиях уменьшает уровень гомоцистеина, цистеина и повышает содержание H_2S в сыворотке крови, противодействует нарушению обмена серосодержащих аминокислот и H_2S в органах крыс, оказывает антиоксидантный, кардиопротекторный и ендотелиотропный эффекты как у самцов, так и у самок. В то же время, введение кверцетина не проявляет гипогомоцистеинемического и гипоцистеинемичного эффекта, не влияет на метаболизм серосодержащих аминокислот в печени, а по другим эффектам значительно уступает генистеину.

Ключевые слова: пол, гомоцистеин, цистеин, гидроген сульфид, метаболизм, миокард, аорта, гипергомоцистеинемия, генистеин, кверцетин.

SUMMARY

Melnyk A.V. Sex Characteristics of Metabolism of Sulfur-Containing Amino Acids and Hydrogen Sulfide and Their Relations with the State of Cardiovascular System (experimental study). - Manuscript.

Dissertation submitted for the Doctor of Medical Sciences Degree in Speciality 03.00.04 - Biochemistry. - State Institution «D.F. Chebotarev Institute of Gerontology NAMS Ukraine», Kyiv, 2017.

It has been established that sex factors play an important role in regulating metabolism of sulfur-containing amino acids and H_2S in the liver. In males the activity of homocysteine degradation enzymes (betain homocysteine methyltransferase, methionine adenosyltransferase, S-adenosylhomocysteine hydrolase, cystathionine-β-synthase, cystathionine-γ-lyase), cysteine catabolism (cysteine dioxygenase, γ-glutamylcysteine ligase) and H_2S formation (cystathionine-β-synthase, cystathionine-γ-lyase and thiosulfate dithiol sulfurtransferase) in liver is significantly lower, which is associated with higher content of homocysteine, cysteine and lower level of H_2S in blood, compared with females. Castration of males is accompanied by significantly increase in activity of degradation enzymes of homocysteine, cysteine and H_2S formation in liver, H_2S content in serum and decrease of homocysteine and cysteine level in blood, whereas females ovariectomy causes opposite changes. Substitution hormone therapy of castrated animals brings these parameters closer to the control group.

It has been proved that sex hormones are involved in regulating metabolism of H_2S in cardiovascular system. In males in myocardium and aorta, a lower activity of H_2S-synthesizing enzymes (cystathionine-γ-lyase, cysteine aminotransferase, thiosulfate dithiol sulfurtransferase), higher rate of H_2S degradation and lower H_2S level is recorded than in females. Along with this, in males, lower level *CSE* gene expression in myocardium, lower affinity of this enzyme for cysteine and maximum catalytic activity is recorded. Castration of the animals changes the vector of sex differences in H_2S metabolism, and substitution hormone therapy restores its orientation.

Sex characteristics of metabolism of sulfur-containing amino acids and H_2S are one of the causes of varying resistance of cardiovascular system of rat males and females to injuries. In males, activity of superoxide dismutase and thioredoxin reductase, left ventricle microcirculation index is lower, and level of reduced glutathione, activity of NADPH oxidase, processes of free radical oxidation of lipids and proteins in myocardium and aorta, level of apoptosis, proliferation and polyploidization in heart, content of sVCAM adhesion molecule in serum is higher, which is associated with lower level of H_2S in cardiovascular system and higher level of homocysteine and cysteine in serum comparing to females.

Modulators of H_2S exchange exhibit a sex-specific effect on biochemical and functional parameters of myocardium and aorta. Administration of propargylglycine leads to a significant reduction in activity of cystathionine-γ-lyase, H_2S content, superoxide dismutase activity, thioredoxin reductase, reduced glutathione, increased activity of NADPH-oxidase in myocardium and aorta, which induces processes of free radical oxidation of lipids and proteins, cardiomyocyte cytolysis, endothelial dysfunction, increase of homocysteine vasoconstricting effect, decrease in vasodilating effect of H_2S and cysteine, while administration of NaHS caused opposite alterations. The indicated biochemical and functional changes in cardiovascular parameters in males were significantly higher than in females.

It has been established that in males, myocardial ischemia with left coronary artery occlusion background is accompanied by more significant decrease in serum H_2S level, inhibition of microcirculation and oxygen supply of cardiomyocytes, decrease in contractility and intraventricular hemodynamics, than in females. Increasing of H_2S saturation in rats decreased the symptoms of myocardial ischemia with left coronary artery occlusion background and contributed to more complete recanalization of coronary arteries against reperfusion background in both males and females.

Administration of thiolactone homocysteine in males causes more significant increase in serum levels of homocysteine, cysteine, decrease in H_2S levels, and more pronounced disturbances in exchange of sulfur-containing amino acids and H_2S in tissues, which is associated with higher cardiovascular and vasotoxic effects compared to females. Introduction of thiolactone homocysteine also results in the development of cardiomyocytes cytolysis in animals of both sexes, but the severity of these changes is greater in males, as evidenced by increase of aspartate and creatine phosphokinase activity in blood compared with the corresponding control. Along with this, in males, hyperhomocysteinemia reveals more distinct endothelial toxicity: sVCAM-1 content in blood increases in males and in females, but the severity of these changes is greater in males. Under these conditions, males noted more significant decrease in H_2S- and cysteine-stimulated relaxation and increase in homocysteine-induced vasoconstriction in aortic rings.

Applying of genistein in hyperhomocysteinemia reduces level of homocysteine, cysteine and increases H_2S serum content, counteracts disturbances in exchange of sulfur-containing amino acids and H_2S in rat organs, has antioxidant, cardioprotective and endothelitotropic effects in both males and females. At the same time, administration of quercetin does not exhibit hypohomocysteinemic and hypocysteinemic effects, does not

affect metabolism of sulfur-containing amino acids in liver, and in other effects is significantly inferior to genistein.

Key words: sex, homocysteine, cysteine, hydrogen sulfide, metabolism, myocardium, aorta, hyperhomocysteinemia, genistein, quercetin.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АСТ	- аспартатамінотрансфераза
S-АГГ	- S-аденозилгомоцистеїнгідролаза
БГМТ	- бетаїнгомоцистеїнметилтрансфераза
ГГЦ	- гіпергомоцистеїнемія
γ-ГЦЛ	- γ-глутамілцистеінлігаза
ЗГТ	- замісна гормонотерапія
ІР	- ішемія / реперфузія
КГП	- карбонільні групи протеїнів
КМ	- коефіцієнт мікроциркуляції
КФК	- креатинфосфокіназа
МДА	- малоновий діальдегід
ППГ	- пропаргілгліцин
НАДФН	- нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
ССЗ	- серцево-судинні захворювання
ТЛШ	- тиск у лівому шлуночку
ТПШ	- тиск у правому шлуночку
ТСТ	- тіосульфатдитіолсульфідтрансфераза
ЦАТ	- цистеїнамінотрансфераза
ЦБС	- цистатіонін-β-синтаза
ЦГЛ	- цистатіон-γ-ліаза
ЦДО	- цистеїндиоксигеназа
CSE	- ген, який кодує синтез цистатіон-γ-ліази
GSH	- відновлений глутатіон
GSSG	- глутатіондисульфід (окиснений глутатіон)
H_2S	- гідроген сульфід
EC_{50}	- середньоефективна концентрація
NaHS	- натрій гідрогенсульфід
SaO_2	- ступінь насичення крові киснем
sVCAM-1	- розчинна молекула адгезії судинних клітин-1
♀	- самки
♂	- самці

Підписано до друку 27.11.2017 р. Замовл. № 668.
Формат 60х90 1/16 ум. друк. арк. 1,2 друк офсетний.
Наклад 100 примірників.

Вінниця. Друкарня ВНМУ імені М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56.