Міністерство охорони здоров'я України
Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова
Національна академія медичних наук України
ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МЕЛЬНИК АНДРІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК: 546.221.1: 577.112.386:612.6:616.1

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

03.00.04 - біохімія
(222 - Медицина; 22 - Охорона здоров'я)

Подається на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук

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

_____ А.В. Мельник

Науковий консультант: Заічко Наталія Валентинівна, доктор медичних наук, професор

Вінниця – 2017

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» (22 - Охорона здоров'я). - 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 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).

Доведено, що статеві гормони залучені до регуляції метаболізму H_2S в серцево-судинній системі самців та самок щурів. У самок відмічається більша (на 24,1-34,8%, $p<0,05$) активність H_2S-синтезуючих ферментів в міокарді та аорті (цистатіонін-γ-ліази, цистеїнамінотранферази, 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, що асоціюється з більшим вмістом H_2S в тканинах (на 19,1-20,9%, $p<0,05$), 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, що супроводжувалось збільшенням вмісту H_2S на 22,2-24,8% ($p<0,05$), тоді як оваріектомія самок мала протилежний вплив на вказані показники. Замісна гормонотерапія у кастрованих тварин наближала показники обміну 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 ($r=-(0,40-0,69)$, $p<0,05$).

Статеві особливості метаболізму сірковмісних амінокислот і H_2S асоціюються з різною резистентністю серцево-судинної системи самців та самок щурів до пошкоджень. 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. Поряд з цим у самців відмічається вірогідно більша кількість клітин у фазі синтезу ДНК та фазі G2+M (з вмістом ДНК=4c) відповідно на 30,3 та 25,4% ($p<0,05$), а також клітин з фрагментованою ДНК (SUB-G0G1) на 17,2% ($p<0,05$), що свідчить про вищу активність апоптозу, поліплоїдизації кардіоміоцитів та проліферації міофібробластів, ніж у самок. Також 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, зменшення 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 ($|r|=0,55$-$0,76$).

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 і 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.

Модулятори обміну H_2S виявляють 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 $p<0,05$), ендотеліальною дисфункцією (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, $p<0,05$).

Встановлено, що у самців ішемія міокарду на тлі оклюзії лівої коронарної артерії супроводжується більш значущим зменшенням рівня H_2S

в сироватці крові, пригніченням мікроциркуляції та кисневого забезпечення кардіоміоцитів, зниженням скоротливої здатності та порушеннями внутрішньошлуночкової гемодинаміки, ніж у самок. Лігування лівої коронарної артерії у самців викликає зменшення коефіцієнту мікроциркуляції та сатурації киснем лівого шлуночка, тиску у лівому та правому шлуночках 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. За цих умов відмічається зменшення рівня H_2S в сироватці крові у самців на 64,5% ($p<0,05$), а у самок - на 51,1% ($p<0,05$). Через 1 годину на тлі реперфузії реєструється зростання функціональних параметрів кардіогемодинаміки (у самців в 1,29-1,5 рази; у самок в 1,13-3,9 рази) та вмісту рівня H_2S в сироватці крові (у самців на 31,6%, $p<0,05$, а у самок - на 39,4%, $p<0,05$), однак вони не досягають фонового рівня. 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 гіпергомоцистеїнемією 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. Введення тіолактону гомоцистеїну також спричиняє розвиток цитолізу кардіоміоцитів у тварин обох статей, але виразність вказаних змін більша у самців, про що доказово свідчить зростання в крові активності аспартатамінотрансферази (на 39,2% у самців проти 24,9% у самок, $p<0,05$) та креатинфосфокінази (на 42,5% у самців проти 31,3% у самок, $p<0,05$), порівняно з відповідним контролем. Поряд з цим у самців гіпергомоцистеїнемія виявляє більш виразну ендотеліотоксичність: вміст в

крові sVCAM-1 зростає у самців на 50,3% ($p<0,05$), а у самок - на 35,6% ($p<0,05$). За цих умов у самців відмічалось більш істотне 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% ($p<0,05$), EC_{50} гомоцистеїну зменшувалась у самців на 40,0% ($p<0,05$), а у самок на 34,9% ($p<0,05$), відносно контролю.

Встановлено, що за експериментальної гіпергомоцистеїнемії введення геністеїну (2,5 мг/кг, 28 діб) зменшує рівень гомоцистеїну, цистеїну та підвищує вміст H_2S в сироватці крові, протидіє порушенню обміну сірковмісних амінокислот. Поряд з цим геністеїн стримував розвиток дефіциту H_2S, зниження активності H_2S-синтезуючих ензимів, зростання швидкості утилізації екзогенного H_2S, попереджував розвиток дисбалансу в про- та антиоксидантних системах серця й аорти, зміну фракційного розподілу глутатіону та виникнення тіол-дисульфідних порушень, гіперактивацію вільнорадикального окиснення ліпідів і протеїнів в міокарді та аорті, а також запобігав розвитку цитолізу кардіоміоцитів й ендотеліальної дисфункції. В той же час, введення кверцетину не виявляє гіпогомоцистеїнемічного та гіпоцистеїнемічного ефекту, не впливає на метаболізм сірковмісних амінокислот в печінці та за іншими ефектами значно поступається геністеїну.

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. За результатами дослідження ідентифіковані метаболічні чинники гендерасоційованої патології серцево-судинної системи, до яких можна віднести гіпергомоцистеїнемію, гіперцистеїнемію, дефіцит гідроген сульфіду і, особливо, їх поєднання, а також запропоновані наступні 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.

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

Список публікацій здобувача

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.
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.
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.
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.
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.

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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.

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.
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.
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.
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.
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.
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.
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). С. 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.

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» (22 - Healthcare). - State Institution «D.F. Chebotarev Institute of Gerontology NAMS Ukraine», Kyiv, 2017.

The dissertation is devoted to the study of sex characteristics of the exchange of sulfur-containing amino acids and H_2S in norm and in hyperhomocysteinemia, their relations with the state of cardiovascular system and experimental substantiation of new approaches to the correction of gender-associated pathology of heart and blood vessels.

It was established that sex factors play an important role in the regulation of metabolism of sulfur-containing amino acids and H_2S in tissues of rats. In male rats the content of homocysteine and cysteine in serum is reliably higher (1,2-1,3 times), while H_2S level is lower (1,2 times), which is associated with significantly lower (14,4-22,6%) activity of enzymes of methylation cycle (betaine homocysteine methyltransferase, methionine adenosyltransferase, S-adenosylhomocysteine hydrolase), homocysteine transsulfuration (cystathionine-γ-lyase and cystathionine-β-synthase), oxide (cysteine dioxygenase), conjugation (γ-glutamylcysteine ligase) and desulfuration (cystathionine-γ-lyase, cystathionine-β-synthase and cysteine aminotransferase) ways of cysteine degradation in liver, compared with females. Castration of males is accompanied by a decrease in the content of homocysteine, cysteine and an increase in serum H_2S level (1,1-1,3 times), an increase in the activity of catabolism enzymes of homocysteine and cysteine in liver, while female gonadectomy causes opposite changes. It was found, that the processes of cysteine desulfuration reveal the greatest dependence on the of sex hormones level ($| r | = 0,54-0,61$), and the processes of remethylation and transmethylation of homocysteine – the least one ($| r | = 0,37-0,39$). It is proved that sex hormones are involved in the regulation of H_2S metabolism in the

cardiovascular system of males and females of rats. In females, there is a greater (by 24,1-34,8%, p<0,05) activity of H_2S-synthesizing enzymes in myocardium and aorta (cystathionine-γ-lyase, cysteine aminotransferase, thiosulfate dithiol sulfurtransferase), higher (by 87,5%, p<0,05) the level of expression of *CSE* gene in myocardium, its greater affinity for cysteine (Km by cysteine is less by 19,5-20,3% (p <0,05) and maximum catalytic activity (reaction Vmax is greater by 13,3-16,0%, p <0,05) in myocardium and aorta, less (by 24,5%, p<0,05) the overall rate of H_2S utilization in myocardium, which is associated with a larger H_2S content in tissues (by 19,1-20,9%, p<0,05) than in males. Castration of males caused increase (by 21,6-41,4%, p <0,05) in the activity of H_2S-synthesizing enzymes, increase (by 22,2%, p <0,05) in CSE expression in myocardium, increase in its maximum catalytic activity (by 11,4-13,0%, p <0,05) and affinity for cysteine (by 16,6-18,8%, p <0,05), decrease (by 40,9%, p < 0.05) the rate of H_2S utilization in myocardium and aorta, which was accompanied by increase in H_2S content by 22,2-24,8% (p <0,05), whereas female ovariectomy had an opposite effect on these parameters. Substitution hormone therapy in castrated animals has brought H_2S exchange rates closer to the control group. Important determinants of H_2S levels in myocardium and aorta are the content of sex hormones, homocysteine, cysteine and H_2S in blood: H_2S level in myocardium and aorta exhibits direct associative relationships with the level of estradiol and H_2S in blood (r = 0,45-0,77, P<0,05), and inverted - with the level of testosterone, homocysteine and cysteine in blood (r = - (0,40-0,69), p<0,05).

Sex characteristics of metabolism of sulfur-containing amino acids and H_2S are associated with different resistance of cardiovascular system of males and females to injuries. In male rats in myocardium and aorta, activity of superoxide dismutase, thioredoxine reductase is reliably lower (by18,6-21,1%), reduced content of restored glutathione, higher activity (by 28,5-55,7%) of NADPH-oxidase, which is associated with higher activity of peroxidation processes of lipids and proteins. Along with this, in males a significantly higher number of cells in DNA synthesis phase and G2+M phase (with DNA content = 4c), respectively, by

30,3 and 25,4% ($p < 0,05$), as well as cells with fragmented DNA (SUB-G0G1) by 17,2% ($p < 0,05$) is observed, indicating higher activity of apoptosis, cardiomyocytes polyploidisation and myofibroblasts proliferation than in females. Also, in males, less left ventricular microcirculation index, less aorta sensitivity to vasodilating action of H_2S, cysteine, and greater sensitivity to constrictive effect of homocysteine than in females are observed. Testosterone deficiency (castration of males) causes increases activity of superoxide dismutase, thioredoxin reductase, restored glutathione content, decrease of NADPH oxidase activity, reducing of intensity of lipid and protein peroxidation in myocardium and aorta of rats, reducing of apoptosis, cardiomyocytes polyploidization and myofibroblasts proliferation, increase of microcirculation factor, sensitivity of aorta to vasodilating effect of H_2S, cysteine and decrease of aortic sensitivity to homocysteine constrictive action, while estradiol deficit (castration of females) causes opposite directed changes of these parameters. The divergent action of sex hormones on biochemical and functional parameters of cardiovascular system state of rats is realized through the system of H_2S / cystathionine-γ-lyase ($| r | = 0,55$-$0,76$).

Animals of different sex have differences in the regulatory effect of sulfur-containing amino acids and H_2S on the aortic tone. In females, the sensitivity of aortic ring fragments to vasodilating effect of H_2S and cysteine is significantly higher (EC_{50} of H_2S and cysteine by 22,8 and 26,3% lower respectively, $p<0,05$), while sensitivity to vasoconstrictive action of homocysteine is lower (EC_{50} of homocysteine by 27,9% higher, $p<0,05$) than in males. Castration of females is accompanied by a decrease in aorta sensitivity of to the vasodilating effect of H_2S and cysteine (ES_{50} of H_2S and cysteine increases by 33,0 and 42,3% respectively, $p<0,05$) and increase of susceptibility to vasoconstrictive action of homocysteine (EC_{50} of homocysteine decreases by 24,9 %, $p<0,05$), whereas male gonadectomy causes opposite changes. The level of estradiol shows direct correlations with EC_{50} of homocysteine ($r = 0,50$, $p < 0.05$) and inverse correlation with EC_{50} of H_2S ($r = -0,56$, $p < 0,05$) and EC_{50} of cysteine ($r = -0,53$, $p < 0,05$), whereas connections direction with testosterone level is opposite. There also were inverse associative

connections between H_2S level in aorta and EC_{50} of H_2S and cysteine (r = -0,54-0,62, p <0,05), as well as direct correlations with EC_{50} of homocysteine (r = 0,58-0,66; p <0,05) in males and females of rats.

The modulators of H_2S exchange exhibit gender-specific effects on biochemical and functional parameters of myocardium and aorta. Introduction of propargylglycine in males causes more significant decrease in cystathionine-γ-lyase activity (42,9-58,6% versus 26,9-39,5% in females, p<0,05), H_2S content (by 30,2 -46,2% vs. 20,0-23,0% in females, p<0,05) in myocardium and aorta, which is accompanied by more pronounced oxidative stress (content of malondialdehyde and carbonyl groups of proteins in the blood increases by 62,5- 85,9% vs. 51,8-64,7% in females, p<0,05), cytolysis of cardiomyocytes (activity of aspartate aminotransferase and creatine phosphokinase in blood increases by 32,5-36,5% versus 22,8-23,3 % in females p<0.05), endothelial dysfunction (sVCAM-1 content in blood increases by 44,4%, against 30,4% in females, p<0,05), reduction of vasodilating effect of H_2S and cysteine, increase of vasoconstrictive action of homocysteine. Applying of NaHS in males causes a more significant increase in H_2S levels (20,5-22,3% versus 11,1-12,7% in females, p<0,05), exhibits a more pronounced antioxidant effect in myocardium and aorta (decrease of content of malondialdehyde and carbonyl groups of proteins was 21,1-31,3% versus 13,1-16,9% in females, p<0,05) and endothelial-protective effect (content of sVCAM-1 in blood decreases by 44,4% against 30,4% in females, p<0,05).

It was established that, in males, myocardial ischemia on the background of the left coronary artery occlusion is accompanied by a more significant decrease in the level of H_2S in serum, inhibition of microcirculation and oxygen supply of cardiomyocytes, decrease in contractility and intraventricular hemodynamic disorders than in females. Ligation of left coronary artery in males causes decrease in coefficient of microcirculation and oxygen saturation of left ventricle, pressure in left and right ventricles, respectively, by 92,0; 38,8; 61,5 and 48,3% (p <0,05), whereas in females the incidence of these indicators is lower and is respectively 85,7; 29,0; 52,5 and 34,3% (p <0,05), relatively to the background level. Under

these conditions, H_2S level in the blood serum in males decreases by 64,5% ($p < 0,05$), and in females - by 51,1% ($p < 0,05$). After 1 hour, against the background of reperfusion, there is increase of functional parameters of cardiac hemodynamics (in males 1,29-1,5 times, in females 1,13-3,9 times) and H_2S level in blood serum (in males by 31,6 %, $p < 0,05$, and in females - by 39,4%, $p < 0,05$), however, they do not reach the background level. Increasing of body saturation with H_2S (preventive introduction of NaHS in a dose of 3 mg / kg) effectively prevented the development of myocardial ischemia and contributed to more complete recanalization of coronary arteries in both males and females.

For the first time, gender differences in effects of long-term administration of thiolactone homocysteine on metabolic processes of sulfur-containing amino acids and H_2S, biochemical and functional parameters of heart and aorta of rats have been detected. In males with thiolactone hyperhomocysteinemia, higher levels of homocysteinemia and cysteinemia (21-30%), higher deficiency of endogenous H_2S (12,0%), and more extensive changes in metabolic pathways of sulfur-containing amino acids were recorded. 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 aminotransferase (39,2% in males versus 24,9% in females, $p < 0,05$) and creatine phosphokinase (42,5% in males versus 31,3% in females, $p < 0,05$) 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 by 50,3% ($p < 0,05$), and in females - by 35,6% ($p < 0,05$). Under these conditions, males noted more significant decrease in H_2S- and cysteine-stimulated relaxation and increase in homocysteine-induced vasoconstriction in aortic rings: EC_{50} of H_2S and cysteine in aorta increased in males and females, respectively, by 32,8-40% and 21,1-26,8% ($p < 0,05$), EC_{50} of homocysteine was reduced by 40,0% in males ($p < 0,05$), and in females by 34,9% ($p < 0,05$) relative to control.

It has been established that under conditions of experimental hyperhomocysteinemia, administration of genistein (2,5 mg/kg, for 28 days) reduces the level of homocysteine, cysteine and increases serum H_2S content, and counteracts the disturbance of sulfur-containing amino acids exchange. In addition, genistein inhibited the development of H_2S deficiency, the decrease of H_2S-synthesizing enzymes activity, the increase of exogenous H_2S utilization rate, prevented the development of imbalance in pro- and antioxidant systems of heart and aorta, the changes in glutathione fractional distribution and the occurrence of thiol-disulphide disorders, hyperactivation of free radical lipid oxidation and proteins in myocardium and aorta, and also prevented the development of cytolysis of cardiomyocytes and endothelial dysfunction. At the same time, administration of quercetin does not reveal hypohomocysteinemic and hypocysteinemic effect, does not affect the metabolism of sulfur-containing amino acids in liver, and in other effects is considerably inferior to genistein.

The studies have deepened existing perceptions of the role of sex and sex hormones in regulating metabolism of sulfur-containing amino acids, H_2S in norm and pathology, and also revealed new aspects of molecular mechanisms of sex-specific cardiovascular diseases formation. According to the results of the study, the metabolic factors of gene-dependent pathology of cardiovascular system, which include hyperhomocysteinemia, hypercysteinemia, hydrogen sulfide deficiency and, in particular, their combination, have been identified, as well as the following practical recommendations were suggested: 1) During screening of substances for the presence of cardioprotective and endothelitotropic properties, it is expedient to include in the list of studies the definition of their effect on the content of homocysteine, cysteine and H_2S in serum; 2) Polyphenolic compound of genistein possessing estrogen-like properties normalizes the content of homocysteine, cysteine and H_2S in blood and is a promising substance for preclinical and clinical studies with the aim of developing metabolic correctors of cardiovascular system state.

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

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ 24

ВСТУП 26

РОЗДІЛ 1 БІОХІМІЧНІ АСПЕКТИ ГЕНДЕРНОГО ДИМОРФІЗМУ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ ПАТОЛОГІЇ. РОЛЬ ПОРУШЕНЬ МЕТАБОЛІЗМУ СІРКОВМІСНИХ АМІНОКИСЛОТ ТА ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ) 38

1.1 Гендерні аспекти епідеміології та патогенезу серцево-судинних захворювань 39

1.2 Метаболізм сірковмісних амінокислот та гідроген сульфіду: основні шляхи, ферменти, коферменти. Роль статевих гормонів в регуляції 42

1.3 Обмін гідроген сульфіду, його регуляція та біологічне значення 50

1.4 Порушення обміну сірковмісних амінокислот і гідроген сульфіду як чинники кардіо-васкулярного ризику, підходи до корекції 62

1.5 Роль поліфенольних сполук в корекції серцево-судинної патології та їх вплив на обмін сірковмісних амінокислот і гідроген сульфіду 72

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ, МОДЕЛІ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 75

2.1 Характеристика експериментальних тварин та моделей 75

2.1.1 Моделювання змін гормонального статусу у щурів 77

2.1.2 Моделі надлишку та дефіциту H_2S у щурів 78

2.1.3 Модель ішемії / реперфузії серця у щурів 78

2.1.4 Модель тіолактонової гіпергомоцистеїнемії у щурів 80

2.1.5 Дослідження впливу поліфенольних сполук геністеїну та кверцетину на обмін сірковмісних сполук та стан серцево-судинної системи за умов гіпергомоцистеїнемії 80

2.2 Біохімічні методи дослідження 81
2.3 Молекулярно-генетичні дослідження (експресія гену *CSE*) 87
2.4 Дослідження вмісту ДНК в ядрах клітин міокарда методом проточної ДНК-цитометрії 88
2.5 Дослідження показників кардіогемодинаміки 89
2.6 Реєстрація скоротливості кільцевих фрагментів грудної аорти *in vitro* 90
2.7 Статистичні методи дослідження 93
РОЗДІЛ 3 РІВЕНЬ СІРКОВМІСНИХ МЕТАБОЛІТІВ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ТА АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ ОБМІНУ СІРКОВМІСНИХ АМІНОКИСЛОТ В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ОБОХ СТАТЕЙ: ЗВ'ЯЗОК З РІВНЕМ СТАТЕВИХ ГОРМОНІВ 94
3.1 Вміст гомоцистеїну, цистеїну та гідроген сульфіду в сироватці крові щурів обох статей залежно від рівня насиченості організму статевими гормонами 95
3.2 Дослідження активності ензимів метаболізму гомоцистеїну, цистеїну та гідроген сульфіду в печінці щурів обох статей 106
3.3 Вплив кастрації та замісної гормонотерапії на метаболізм гомоцистеїну, цистеїну та гідроген сульфіду в печінці щурів обох статей 111
3.4 Зв'язок між рівнем статевих гормонів, гомоцистеїну, цистеїну й гідроген сульфіду в крові та активністю ензимів метаболізму сірковмісних амінокислот в печінці щурів обох статей 117
РОЗДІЛ 4 МЕТАБОЛІЗМ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В СЕРЦІ ТА АОРТІ ЩУРІВ: ЗВ'ЯЗОК З РІВНЕМ СТАТЕВИХ ГОРМОНІВ ТА ВМІСТОМ СІРКОВМІСНИХ МЕТАБОЛІТІВ В КРОВІ 124
4.1 Дослідження маркерів метаболізму гідроген сульфіду в серці та аорті щурів обох статей 125
4.2 Вплив кастрації та замісної гормонотерапії на показники 142

обміну гідроген сульфіду в серці та аорті щурів обох статей

4.3 Зв’язок між вмістом статевих гормонів, рівнем сірковмісних метаболітів в крові та маркерами обміну H_2S в серці й аорті щурів обох статей 159

РОЗДІЛ 5 БІОХІМІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ СТАНУ СЕРЦЯ ТА АОРТИ В НОРМІ ТА ЗА УМОВ ІШЕМІЇ / РЕПЕРФУЗІЇ: ЗВ’ЯЗОК З РІВНЕМ СТАТЕВИХ ГОРМОНІВ Й ВМІСТОМ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В СЕРЦЕВО-СУДИННІЙ СИСТЕМІ ЩУРІВ 166

5.1 Біохімічні та функціональні показники стану серця й аорти щурів обох статей залежно від рівня статевих гормонів та їх зв’язок з рівнем гідроген сульфіду в міокарді та аорті 167

5.2 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфіду на показники стану міокарду й аорти щурів обох статей 193

5.3 Вплив донору гідроген сульфіду на функціональні показники стану міокарда щурів обох статей за умов ішемії / реперфузії: зв’язок з рівнем гідроген сульфіду в крові 215

РОЗДІЛ 6 ВПЛИВ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ НА МЕТАБОЛІЗМ СІРКОВМІСНИХ АМІНОКИСЛОТ ТА ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ У ЩУРІВ ОБОХ СТАТЕЙ: ЗВ’ЯЗОК ЗІ СТАНОМ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ СИСТЕМИ 220

6.1 Вплив гіпергомоцистеїнемії на маркери метаболізму сірковмісних амінокислот в печінці та вміст сірковмісних метаболітів в крові щурів обох статей 221

6.2 Вплив гіпергомоцистеїнемії на показники обміну гідроген сульфіду в серці та аорті щурів обох статей 228

6.3 Вплив гіпергомоцистеїнемії на показники стану серця та аорти щурів обох статей 233

РОЗДІЛ 7 ВПЛИВ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК ГЕНІСТЕЇНУ ТА КВЕРЦЕТИНУ НА ОБМІН СІРКОВМІСНИХ АМІНОКИСЛОТ 250

ТА ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ, СТАН СЕРЦЯ І АОРТИ У ЩУРІВ ОБОХ СТАТЕЙ ЗА УМОВ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ

7.1 Вплив геністеїну та кверцетину на показники метаболізму сірковмісних амінокислот в печінці та крові у щурів обох статей за умов гіпергомоцистеїнемії 251

7.2 Вплив геністеїну та кверцетину на утворення та утилізацію гідроген сульфіду в серці та аорті у щурів обох статей за умов гіпергомоцистеїнемії 258

7.3 Вплив геністеїну та кверцетину на стан серця й аорти у щурів обох статей за умов гіпергомоцистеїнемії 265

РОЗДІЛ 8 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ 284

ВИСНОВКИ 320

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ 325

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ 326

ДОДАТКИ 367

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

S-АГЦ	- S-аденозилгомоцистеїн
S-АГГ	- S-аденозилгомоцистеїнгідролаза
АДФ	- аденозиндифосфат
S-АМДК	- S-аденозилметіоніндекарбоксилаза
цАМФ	- циклічний аденозинмонофосфат
АСТ	- аспартатамінотрансфераза
АТФ	- аденозинтрифосфат
БГМТ	- бетаїнгомоцистеїнметилтрансфераза
ВМК	- вітамінно-мікроелементна композиція
в/в	- внутрішньовенно
в/шл	- внутрішньошлунково
в/оч	- внутрішньоочеревинно
ГГЦ	- гіпергомцистеїнемія
γ-ГЦЛ	- γ-глутамілцистеінлігаза
ГМК	- гладком’язеві клітини
ЗГТ	- замісна гормонотерапія
ЕДТА	- етилендіамінтетраацетат
ІР	- ішемія / реперфузія
КГП	- карбонільні групи протеїнів
КМ	- коефіцієнт мікроциркуляції
КФК	- креатинфосфокіназа
ЛПНЩ	- ліпопротеїди низької щільності
ЛПВЩ	- ліпопротеїди високої щільності
МДА	- малоновий діальдегід
3-МСТ	- 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза
МС	- метіонінсинтетаза
НАДФН	- нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
ППГ	- пропаргілгліцин
ССЗ	- серцево-судинні захворювання
ТЛШ	- тиск у лівому шлуночку

ТПШ	- тиск у правому шлуночку
ТСТ	- тіосульфатдитіолсульфідтрансфераза
ТХО	- трихлороцтова кислота
ФЗ	- фармакологічні засоби
ЦАТ	- цистеїнамінотрансфераза
ЦБС	- цистатіонін-β-синтаза
ЦГЛ	- цистатіон-γ-ліаза
ЦДО	- цистеїндиоксигеназа
ЦСАТ	- цистеїнсульфінатамінотрансфераза
CO	- карбон монооксид
CSE	- ген, який кодує синтез цистатіон-γ-ліази
DAAO	- оксидаза D-амінокислот
GSH	- відновлений глутатіон
GSSG	- глутатіондисульфід (окиснений глутатіон)
H_2S	- гідроген сульфід
EC_{50}	- середньоефективна концентрація
NaHS	- натрій гідрогенсульфід
NO	- нітроген монооксид (оксид азоту)
NOS	- синтаза оксиду азоту
SaO_2	- ступінь насичення крові киснем
sVCAM-1	- розчинна молекула адгезії судинних клітин-1
♀	- самки
♂	- самці

ВСТУП

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 [86, 91, 131, 175]. 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% [21, 33, 91].

Ризик розвитку ССЗ в популяції обумовлений рядом факторів, частина з яких є повністю чи частково модифікованою, а частина не підлягає корекції [39, 43, 177]. 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 ризику як генетична / сімейна схильність, вік та стать.

Численні клінічні, експериментальні та епідеміологічні дані засвідчують, що стать відіграє вагому роль у розвитку ССЗ [33, 161, 342]. Традиційно частота інфаркту міокарду та артеріальної гіпретензії вважалась вищою серед чоловіків. Однак, виявилось, що поширеність артеріальної гіпертензії переважає в чоловічій популяції до 55 років, а після 55 років - в жіночій [86, 342]. 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 [8, 33, 38].

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 [111, 127, 262, 350].

За останнє десятиріччя були ідентифіковані нові незалежні фактори ризику ССЗ такі як гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) та гіперцистеїнемія [4, 5, 104, 278, 295, 324, 390]. 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 [5]. 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 [390]. 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 антиоксидантні, протизапальні та антиапоптичні властивості [28, 74, 85, 140, 208, 209, 229, 300, 373]. 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

бетаїнгомоцистеїнметилтрансферази, 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-глутамілцистеїнлігази) 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, тіосульфатдитіолсульфідтрансферази) 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. Біохімічні методи використані для визначення в крові вмісту цистеїну, H_2S, активності аспартатамінотрансферази та креатинфосфокінази, дослідження в тканинах вмісту H_2S, малонового діальдегіду, карбонільних груп протеїнів, відновленого та окисненого глутатіону, протеїну, активності ферментів - бетаїнгомоцистеїнметилтрансферази, метіонінаденозилтрансферази, S-аденозилгомоцистеїнгідролази, цистатіонін-β-синтази (синтез цистатіоніну),

цистатіонін-γ-ліази (розпад цистатіоніну), цистеїндиоксигенази, γ-глутамілцистеїнлігази, десульфуразної активності цистатіонін-β-синтази та цистатіонін-γ-ліази, тіосульфатдитіолсульфідтрансферази, цистеїнаміно-трансферази, сульфітоксидази, НАДФН-оксидази, супероксиддисмутази, тіоредоксинредуктази, швидкості утилізації H_2S. Імуноферментними методами оцінювали вміст в крові гомоцистеїну, s-VCAM-1, естрадіолу та тестостерону. Молеклярно-генетичні дослідження дозволили оцінити відносний рівень експресії гену *CSE*. Електрофізіологічні методи використані для визначення впливу гомоцистеїну, цистеїну та H_2S на скоротливість кільцевих фрагментів грудної аорти. Функціональні методи використані для оцінки мікроциркуляції лівого шлуночка та внутрішньошлуночкової гемодинаміки. Метод проточної цитометрії дозволив визначити вміст ДНК в ядрах кардіоміоцитів в різні періоди клітинного циклу. Патофізіологічні методи використані для моделювання змін гормонального статусу, надлишку та дефіциту H_2S, ішемії / реперфузії серця та гіпергомоцистеїнемії. Фармакологічні методи використані для оцінки впливу фармакологічних засобів геністеїну та кверцетину на обмін сірковмісних сполук та стан серцево-судинної системи за умов гіпергомоцистеїнемії. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою стандартних методів із застосуванням пакету прикладних програм «MS Excel XP» та «Statistica SPSS 10.0 for Windows».

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, зменшення 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 обгрунтовано, 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 матеріалів 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).

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.

РОЗДІЛ 1
БІОХІМІЧНІ АСПЕКТИ ГЕНДЕРНОГО ДИМОРФІЗМУ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ ПАТОЛОГІЇ. РОЛЬ ПОРУШЕНЬ МЕТАБОЛІЗМУ СІРКОВМІСНИХ АМІНОКИСЛОТ ТА ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Серцево-судинні захворювання (ССЗ) є найбільш поширеною патологією в структурі захворюваності в Україні та світі. Понад 53% усього населення (25,8 мільйонів осіб) мають ССЗ, із них 19% (9,3 млн. осіб) припадає на людей працездатного віку [84, 91]. За останні 10 років поширеність ССЗ в Україні серед дорослого населення зросла в 1,8 рази, а захворюваність - на 55,3%. Серед ССЗ найбільш поширеними є гіпертонічна хвороба та ішемічна хвороба серця [81].

ССЗ займають чільне місце серед причин інвалідизації та смертності населення Україні та світу. За даними МОЗ України щороку 6 із 10 смертей спричинені ССЗ. Станом на 2009 рік смертність від ССЗ в Україні становила в середньому 65% [7]. Упродовж останніх 25 років смертність від ССЗ не має тенденції до зниження: відмічається її зростання в середньому на 45% [93, 131].

Важливим чинником, який визначає поширеність ССЗ, є стать [33, 44]. Так, відомо, що поширеність артеріальної гіпертензії серед чоловіків віком 18-24 років становить 10,5%, а віком 55-64 років - 63,7%, тоді як серед жінок віком 18-24 років - 3,4%, а віком 55-64 років - 70,7% [18].

Дотепер залишаються невивченими молекулярні механізми, які інтегровані у формування гендерного диморфізму ССЗ, що в свою чергу стримує розробку ефективних заходів профілактики та лікування патології серця та судин у осіб різної статі. Все вищенаведене обумовлює необхідність подальших досліджень у цьому напрямку.

1.1 Гендерні аспекти епідеміології та патогенезу серцево-судинних захворювань

Статеві чинники є важливою детермінантою, яка визначає поширеність різних ССЗ. Виявилось, що гендерні відмінності характерні для розвитку інфаркту міокарда. Так, у дорослих здорових жінок до моменту настання менопаузи частота розвитку інфаркту міокарда менша, ніж у чоловіків того ж віку, однак важкість його перебігу та смертність від цієї патології є значно вищою. У жінок пременопаузального віку інфаркт міокарду частіше супроводжується атиповою симптоматикою (безбольова, гастралгічна форми). В останні роки встановлено, що патофізіологічні механізми розвитку ішемії міокарду відрізняються у осіб різної статі. У чоловіків коронарні артерії мають високу схильність до розвитку анатомічної обструкції і основною причиною гострого коронарного синдрому є розрив атеросклеротичної бляшки. І, навпаки, для жінок менш характерним є атеросклеротичне ураження коронарних артерій, а гострий коронарний синдром часто асоціюється з поверхневими ерозіями бляшок, спонтанною дисекцією, вазоспазмом і тромбозом [105, 346, 388, 394].

Серцева недостатність також має свої особливості у осіб різної статі. Частота розвитку серцевої недостатності та смертність від цього патологічного стану більша у чоловіків, ніж у жінок. Діастолічна серцева недостатність частіше зустрічається у жінок, тоді як систолічна - у чоловіків [334, 384].

Найбільш важлива роль статевих чинників у виникненні, поширеності та прогресуванні артеріальної гіпертензії, гіпертрофії серця та ураження міокарду за умов ішемії/реперфузії. Встановлено, що у дорослих чоловіків частота розвитку артеріальної гіпертензії та важкість її перебігу є вірогідно більшою, ніж у жінок. Поряд з цим у чоловіків, порівняно з жінками, частіше виникає гіпертрофія лівого шлуночка, значно швидше розвивається порушення його скоротливої функції. Ураження серця на тлі

ішемії/реперфузії викликає більш важкі пошкодження міокарду у чоловіків, ніж у жінок [186, 261, 298, 346, 382].

Традиційні серцево-судинні фактори ризику мають свої особливості впливу на розвиток ССЗ у чоловіків та жінок. Так, вік, артеріальна гіпертензія, ожиріння, рівень загального холестеролу, ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) в крові відіграють вагому роль в розвитку ССЗ у чоловіків. Натомість важливими чинниками ризику кардіо-васкулярної патології у жінок є менопауза, цукровий діабет ІІ типу, підвищений вміст тригліцеридів, низький рівень ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) в крові та паління [186, 261].

У чоловіків серцево-судинний ризик лінійно зростає з віком, що асоціюється з розвитком атеросклеротичного процесу. Навпаки, у жінок судинна стінка захищена від атеросклеротичного ураження протягом дітородного віку, що супряжено з геномними та негеномними ефектами естрогенів. Після настання менопаузи дефіцит естрогенів призводить до експоненціального зростання серцево-судинного ризику [186].

Значну роль в кардіоваскулярному ризику належить артеріальній гіпертензії, що є причиною 54 % усіх інсультів, 47 % усіх випадків ішемічної хвороби серця та 25 % інших серцево-судинних захворювань [86]. За результатами проспективних досліджень артеріальна гіпертензія підвищує ризик серцево-судинної смертності у чоловіків в 4,5, а у жінок - в 2,0 рази [175].

Дисліпідемія є незаперечним чинником розвитку ССЗ. Встановлено, що у жінок пременопаузального віку рівень загального холестеролу, ЛПНЩ в крові є меншим, а вміст ЛПВЩ - більшим, порівняно з чоловіками того ж віку. Вказані особливості ліпідного профілю сироватки крові у жінок зменшують кардіоваскулярний ризик порівняно з таким у чоловіків [261].

Цукровий діабет ІІ типу є одним із важливих чинників різної поширеності ССЗ у осіб чоловічої та жіночої статі. Встановлено, що дана патологія збільшує серцево-судинний ризик у чоловіків приблизно в 2-3 рази,

а у жінок - в 3-7 разів. Натомість, високий рівень тригліцеридів підвищує ризик розвитку ССЗ у жінок [246, 261].

Наявність ожиріння та метаболічного синдрому є незалежним фактором кардіоваскулярної патології. Зауважимо, що саме чоловіки з надлишковою масою тіла є групою високого кардіоваскулярного ризику: артеріальна гіпертензія у чоловіків з індексом маси тіла > 30 кг/м^2 виявляється у 75%, а у жінок аналогічної групи лише у 46% випадків [343].

Ще одним важливим фактором ризику ССЗ є тютюнопаління. Виявлено, що частота інфаркту міокарду у курців чоловічої статі майже в 4 рази вища, ніж у однолітків, які не курять. Куріння супроводжується передчасним (на 2 роки) настанням менопаузи. Поряд з цим тютюнопаління збільшує серцево-судинний ризик у чоловіків в 2,4, а у жінок - в 3,6 разів [215].

Одним із чинників статьасоційованої патології серця та судин є оксидативний стрес, активність якого в організмі чоловіків більша, ніж у жінок. Нещодавні дослідження показали, що продукція реактивних кисневих інтермедіатів судинною системою у осіб чоловічої статі вірогідно більша, ніж у жінок [150, 344]. У жінок в постменопаузальному віці відмічається зростання продукції активних форм кисню, що пов’язують з розвитком дефіциту естрогенів [344]. Відмінності рівня реакційноздатних кисневих дериватів у чоловіків та жінок є наслідком різної активності про- та антиоксидантних ензимів в серцево-судинній системі. Виявилось, що у особин чоловічої статі активність прооксидантного ензиму НАДФН-оксидази є вірогідно більшою, а активність антиоксидантної супероксиддисмутази достовірно меншою, ніж у осіб протилежної статі [151, 170, 189].

Одним із факторів гендерних відмінностей ССЗ є особливості розвитку ендотеліальної дисфункції у чоловіків та жінок. Показано, що у осіб жіночої статі вміст нітроген монооксиду більший, що асоціюється з вищою активністю та експресією ендотеліальної ізоформи NO-синтази, порівняно з чоловіками [334, 341].

Останнім часом виявлено, що незалежними чинниками виникнення та прогресування ССЗ є зростання в крові сірковмісних амінокислот гомоцистеїну (гіпергомоцистеїнемія, ГГЦ) та цистеїну (гіперцистеїнемія) [16, 126, 371]. У здорових дорослих чоловіків вміст гомоцистеїну та цистеїну в крові достовірно перевищує такіж показники у жінок [5, 104, 278]. В процесі старіння рівень гомоцистеїну зростає у осіб обох статей, однак вектор гендерних відмінностей поступово змінює свою направленість: у жінок в період менопаузи рівень гомоцистеїну стає достовірно вищим, ніж у чоловіків того ж віку [390]. На сьогодні відсутні дані щодо зміни рівня цистеїну в процесі старіння чоловіків та жінок. Залишається невивченою також роль статевих відмінностей вмісту сірковмісних амінокислот у формуванні гендерного диморфізму ССЗ.

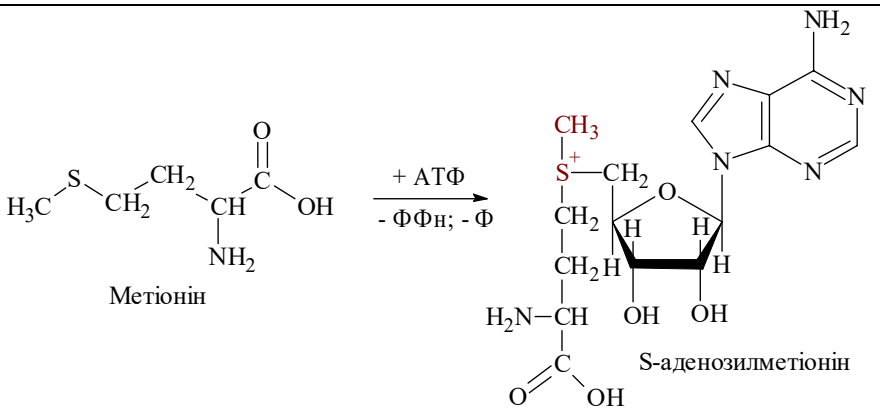
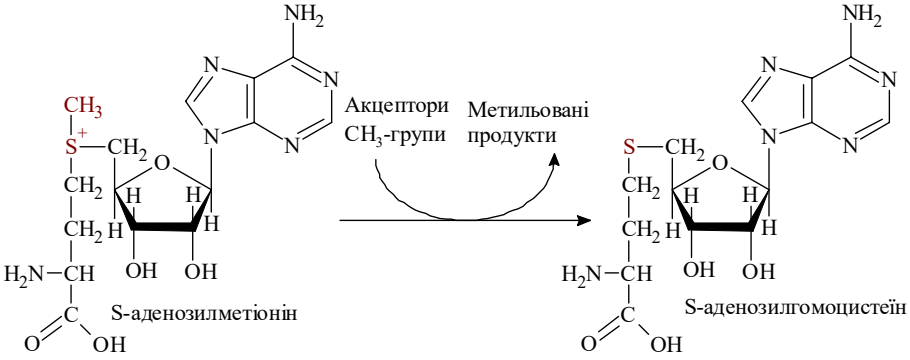
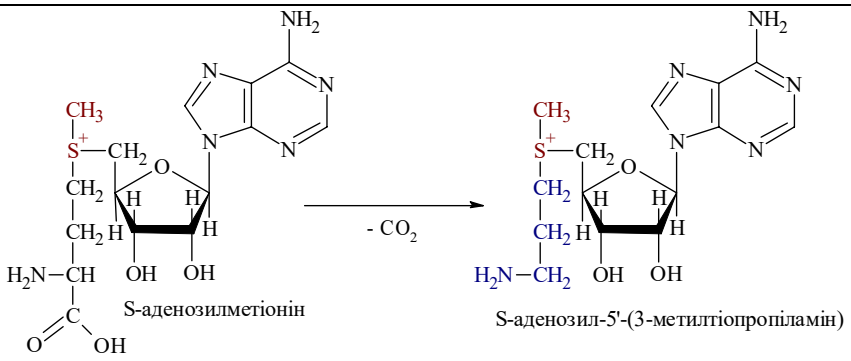
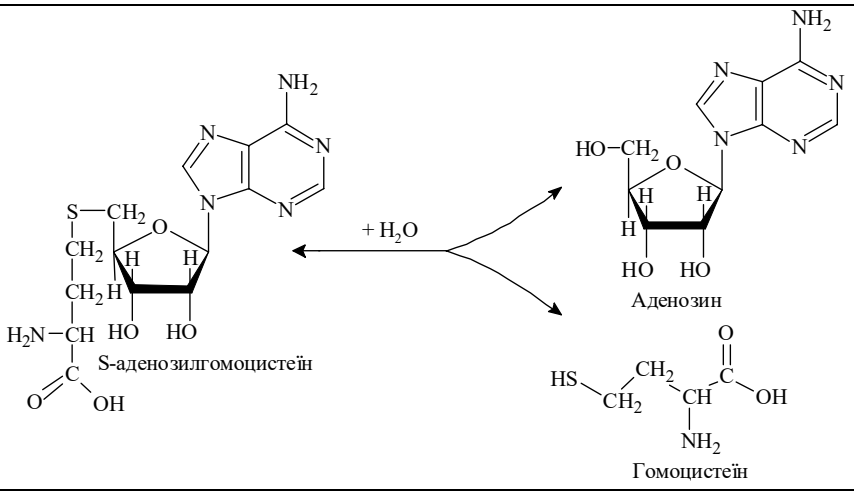
Гендерні відмінності поширеності ССЗ до певної міри пов'язують з різними біологічними ефектами статевих гормонів: естрадіол посилює утворення вазодилятаторів, зменшує активність процесів вільнорадикального окиснення, володіє антиапоптичними та протизапальними ефектами, тоді як тестостерон індукує вазоконстрикцію, активує процеси пероксидації ліпідів та протеїнів, має проапоптичу дію [109, 111]. Однак, молекулярні механізми, через які реалізуються біологічні ефекти статевих гормонів на стан серцево-судинної системи, залишаються до кінця невивченими, що потребує подальших досліджень в цьому напрямку.

1.2 Метаболізм сірковмісних амінокислот та гідроген сульфіду: основні шляхи, ферменти, коферменти. Роль статевих гормонів в регуляції

Метіонін - сірковмісна, гідрофобна, незамінна, протеїногенна амінокислота. Реакції катаболізму метіоніну наведені в табл. 1.1 [73, 188, 294, 329, 380, 405].

Таблиця 1.1

Реакції трансметилування та декарбоксилування метіоніну

Ензим	Схема реакції
Метіонінаденозилтрансфераза, **КФ 2.5.1.6**	
Метилтрансферази	
S-аденозилметіонінде-карбоксилаза, **КФ 4.1.1.50**	
S-аденозилгомоцистеїн-гідролаза, **КФ 3.3.1.1**	

Спершу метіонін конденсується з АТФ за участі метіонінаденозилтрансферази (МАТ, КФ 2.5.1.6) з утворенням S-аденозилметіоніну. Останній є універсальним донором метильних груп, які використовуються для синтезу біологічно активних речовин (адреналіну, карнітину, карнозину, креатину, холіну, фосфоліпідів), інактивації гормонів, нейромедіаторів, ксенобіотиків, а також виконують роль регуляторів експресії генів, посттранскрипційної модифікації мРНК та посттрансляційної модифікації пептидів й білків [73, 188]. Також S-аденозилметіонін декарбоксилується за участі S-аденозилметіоніндекарбоксилази (S-АМДК, КФ 4.1.1.50), з утворенням S-аденозил-5'-(3-метилтіопропіламіну). Останній переносить амінопропановий фрагмент на путресцин з утворенням спермідину, який після приєднання ще однієї амінопропанової групи перетворюється на спермін. Поліаміни, маючи позитивний заряд, легко зв'язуються з нуклеїновими кислотами, приймають участь в реплікації ДНК, транскрипції та трансляції [107]. Після втрати метильної групи S-аденозилметіонін трансформується в S-аденозилгомоцистеїн, який гідролізується до гомоцистеїну та аденозину за участі S-аденозилгомоцистеїнгідролази (S-АГГ, КФ 3.3.1.1). Ця реакція гідролізу є оборотною і гомоцистеїн може ефективно трансформуватись знову в S-аденозилгомоцистеїн, причому швидкість реакції синтезу на порядок перевищує швидкість реакції гідролізу [254]. Зауважимо, що в умовах нормоксії реакція гідролізу S-аденозилгомоцистеїну є основним джерелом аденозину в клітинах, який бере участь в регуляції тонусу судин і є потужним інгібітором агрегації тромбоцитів [275].

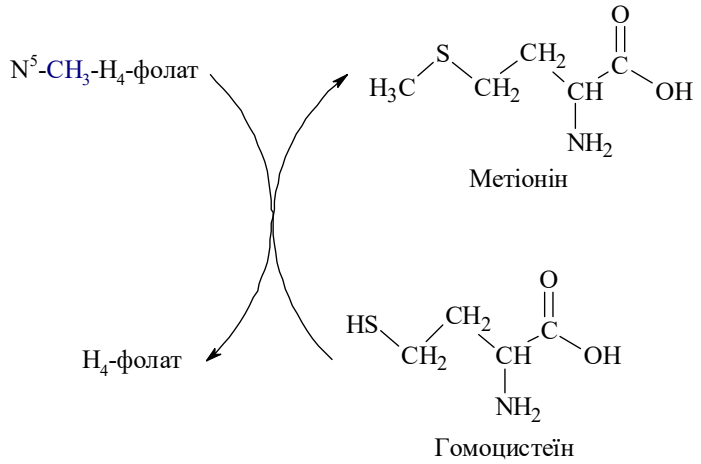
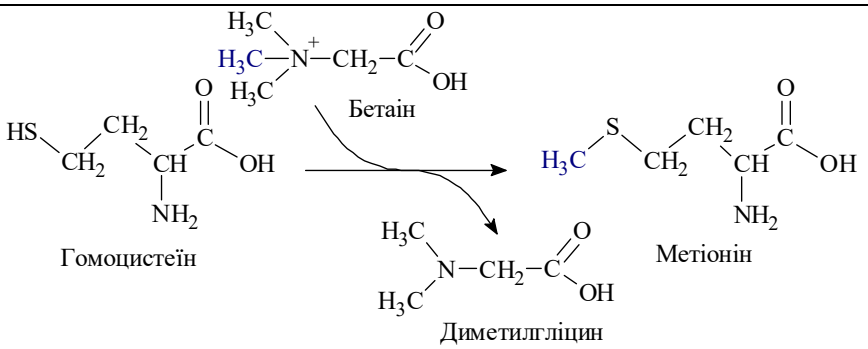
Таким чином, основним шляхом утилізації метіоніну є його перетворення у гомоцистеїн, однак за високих концентрацій метіоніну активується ще один шлях його елімінації - непряме дезамінування за схемою: метіонін → α-кето-γ-метилтіомасляна кислота → α-кето-γ-гідроксимасляна кислота → гомосерин → α-кетомасляна кислота → пропіонова кислота → сукциніл-КоА (окиснюється в циклі трикарбонових

кислот Кребса) [299]. Показано, що у пацієнтів з гомоцистинурією внаслідок дефіциту ЦБС відмічається посилення трансамінування за концентрації метіоніну в крові вище 350 мкмоль/л [292].

Гомоцистеїн - сірковмісна, непротеїногенна амінокислота, яка в організмі утворюється з метіоніну. У плазмі крові найбільше гомоцистеїну (70-80%) знаходиться у білковозв'язаній формі, дещо менша кількість (20-30%) циркулює у вигляді гомоцистину та дисульфіду гомоцистеїн-цистеїну, близько 1% знаходиться у вільній формі, а найменше (0,3%) - у формі тіолактону гомоцистеїну [123]. Утилізація гомоцистеїну відбувається в реакціях реметилування та транссульфування [73, 112, 380, 405]. В шляху реметилування відбувається перетворення гомоцистеїну (приблизно 2% від його загальної кількості) до метіоніну (табл. 1.2).

Таблиця 1.2

Реакції реметилування гомоцистеїну до метіоніну

Ензим	Схема реакції
Метіонінсинтетаза, **КФ 2.1.1.13**	
Бетаїнгомоцистеїн-метилтрансфераза, **КФ 2.1.1.5**	

Синтез метіоніну відбувається переважно в реакції, що каталізується метіонінсинтетазою (МС, КФ 2.1.1.13). Джерелом метильної групи є 5-

метилентетрагідрофолат, який переносить її на кобаламінову простетичну групу метіоніносинтетази з утворенням метилкобаламіну. Останній передає метильну групу на метіонін і утворюється гомоцистеїн. Утворення метіоніну може проходити також в альтернативній реакції між гомоцистеїном та бетаїном за участі бетаїнгомоцистеїнметилтрансферази (БГМТ, КФ 2.1.1.5), але ця реакція відбувається лише в печінці та нирках.

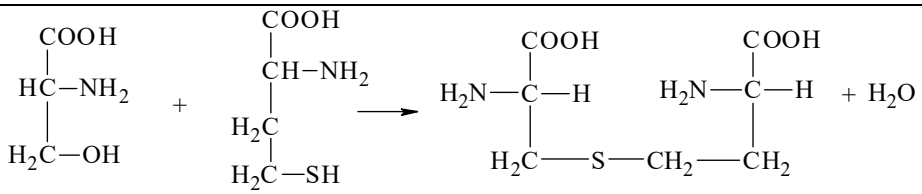
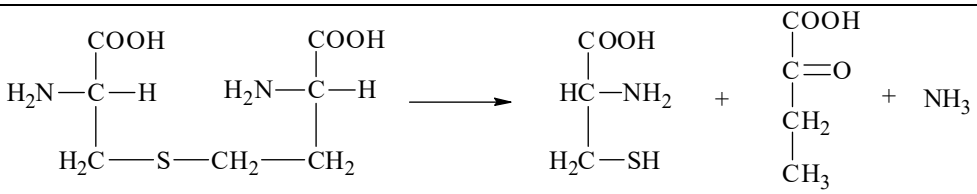
Гомоцистеїн може помилково взаємодіяти з тРНК^{мет} (або тРНК^{лей}, тРНК^{іле}) і утворювати комплекс гомоцистеїн-тРНК. Специфічна тРНК-синтетаза (наприклад, метіонін-тРНК-синтетаза) виправляє пошкодження: забезпечує конверсію гомоцистеїну до тіолактону, який далі може зв'язуватись з молекулами білків, гідролізуватись мітохондріальною тіолактоназою або сироватковою параоксаназою [199, 258, 308]. Основна частина гомоцистеїну (близько 80%) утилізується в шляху транссульфування, який забезпечує утворення цистеїну (табл. 1.3.). Транссульфування гомоцистеїну каталізуєтьсмя двома піридоксальфосфатзалежними ензимами - цистатіонін-β-синтазою (ЦБС, КФ 4.2.1.22) та цистатіонін-γ-ліазою (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1) [73, 260]. Спершу гомоцистеїн конденсується з серином за участі ЦБС, що супроводжується утворенням цистатіоніну. Останній в реакції, каталізованій ЦГЛ, перетворюється в цистеїн, α-кетобутират із вивільненям амоніаку.

Цистеїн - сірковмісна, гідрофільна, замінна та протеїногенна амінокислота. В організмі людини відіграє важливу біологічну роль: бере участь у формуванні просторових структур білків, фолдінгу протеїнів, посттрансляційних перетвореннях, які слугують молекулярними ключами в регуляції функціонального стану багатьох ензимів та рецепторних протеїнів [271, 321]. В металопротеїнах залишки цистеїну беруть участь в координації іонів металів - заліза, міді, цинку [321]. Цистеїн є складовою глутатіону (GSH) та коензиму А. Відношення цистеїн/цистин та GSH/GSSG визначають редокс-потенціал в клітинах і позаклітинному просторі, забезпечують

редокс-сигналінг [321, 355]. Також цистеїн задіяний в реакціях кон'югації ксенобіотиків та використовується для синтезу таурину.

Таблиця 1.3

Реакції транссульфування гомоцистеїну до цистеїну

Ензим	Схема реакції
Цистатіонін-β-синтаза, **КФ 4.2.1.22**	 Серин Гомоцистеїн Цистатіонін
Цистатіонін-γ-ліаза, **КФ 4.4.1.1**	 Цистатіонін Цистеїн α-кетобутират

Основним шляхом утилізації цистеїну є окиснення його тіольних груп за участі цистеїндіоксигенази (ЦДО, КФ 1.13.11.20) з утворенням цистеїнсульфінату [260, 358]. Останній цистеїнсульфінатдекарбоксилазою (ЦСД, КФ 4.1.1.29) перетворюється до гіпотаурину, який окиснюється до таурину. Частина цистеїнсульфінату в реакції трансамінування за участі цистеїнсульфінатамінотрансферази (ЦСАТ, КФ 2.6.1.75) перетворюється на β-сульфінілпіруват, який розщеплюється до пірувату та сульфіту, який окинюється до сульфату сульфітоксидазою (КФ 1.8.3.1). Незначна кількість цистеїнсульфінату спонтанно окиснюється до цистеїнсульфонату. Цей шлях є джерелом сульфітів та сульфатів, необхідних для синтезу глікозаміногліканів, діоксиду сірки (бере участь в регуляції тонусу судин), детоксикації ксенобіотиків [273, 352, 358, 414]. Також в цьому шляху утворюється біологічно-активна речовина таурин, яка виконує роль нейротрансміттера, антиоксиданта, цитопротектора, зменшує

інсулінорезистентність та рівень лептину. В печінці таурин кон'югується з жовчними кислотами, стимулює виділення жовчі і екскрецію холестеролу, відіграє важливу роль у знешкодженні токсичних речовин [120, 156, 368, 369].

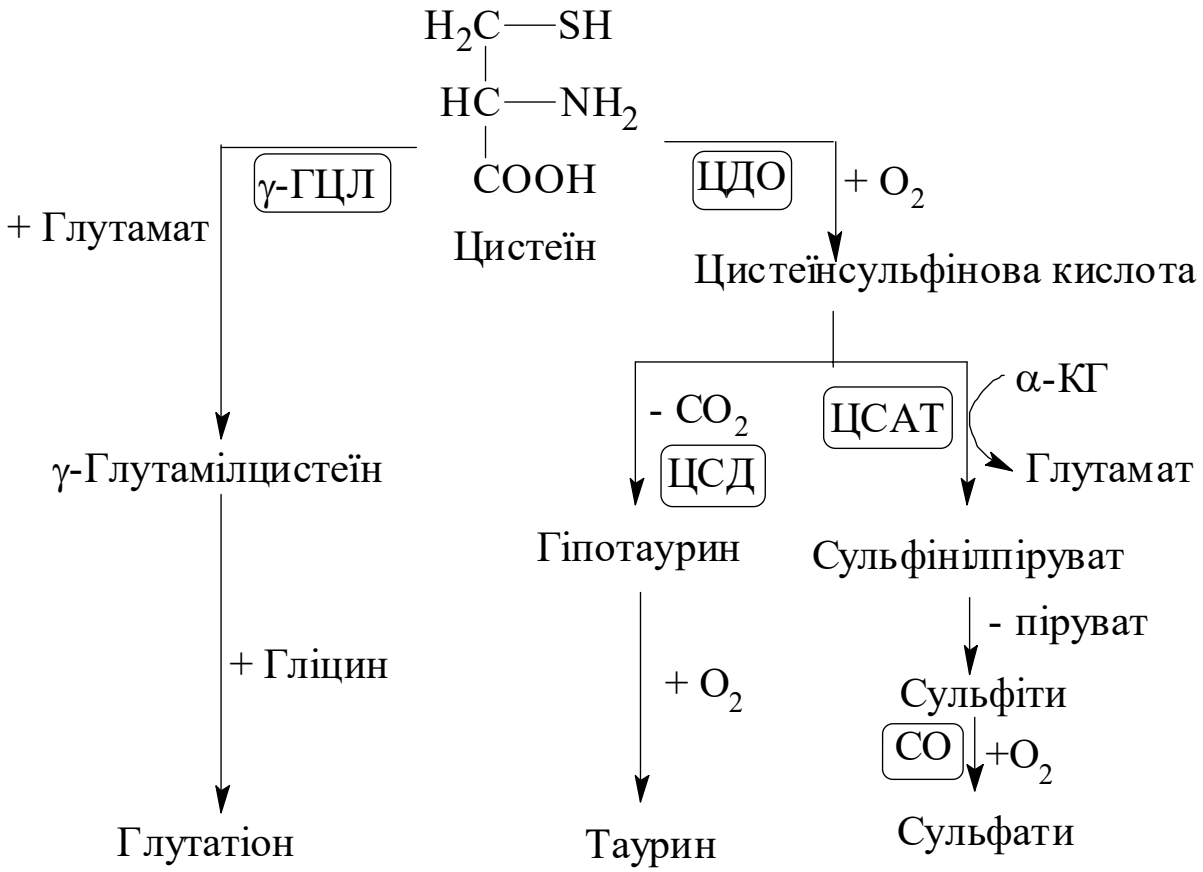


Рис. 1.1. Схема катаболізму цистеїну. ЦДО - цистеїндиоксигеназа; ЦСД - цистеїнсульфінатдекарбоксилаза; СО - сульфітоксидаза; ЦСАТ - цистеїнсульфінатамінотрансфераза; γ-ГЦЛ - γ-глутамілцистеїнлігаза.

Важливим шляхом утилізації цистеїну є його використання на синтез глутатіону (рис. 1.1). Цей шлях започатковує γ-глутамілцистеїнлігаза (γ-ГЦЛ, КФ 6.3.2.2), яка каталізує реакцію синтезу γ-глутамілцистеїну. До останнього приєднується гліцин з утворенням трипептиду глутатіону [282, 358]. Глутатіон присутній у всіх клітинах тварин та людини. Він є потужним антиоксидантом, цитопротектором, нейромодулятором, забезпечує підтримання відновленого стану заліза (Fe^{2+}) у гемоглобіні, бере участь у

процесах детоксикації ксенобіотиків і відновленні органічних пероксидів та пероксиду водню [89, 164, 243].

Регуляція метаболізму сірковмісних амінокислот здійснюється трьома основними шляхами.

Метаболітна регуляція. Обмін гомоцистеїну регулює S-аденозилметіонін - інгібітор метилентетрагідрофолатредуктази і метіонінсинтетази та активатор цистатіонін-β-синтази [167, 266, 304], а також S-аденозилгомоцистеїн - конкурентний інгібітор метилтрансферазних реакцій [304]. Метаболізм цистеїну регулюється рівнем цистеїну, гомоцистеїну та глутатіону. За низьких концентрацій цистеїну в клітинах ЦДО швидко піддається убіквітинуванню та деградації системою протеосом [129, 282]. Високі концентрації гомоцистеїну є конкурентими інгібіторами ЦДО [360]. Активність γ-ГЦЛ гальмується високими концентраціями глутатіону алостеричним шляхом [280].

Нутрієнтна регуляція. Важливе значення в обміні сірковмісних амінокислот має вміст у дієті донорів метильних груп - бетаїну та метіоніну, а також вітамінів B_9, B_{12}. Високі дози вітамінів B_9 та B_{12}, а також бетаїну зменшують вміст гомоцистеїну в крові за експериментальної ГГЦ, тоді як їх нестача, а також надлишок метіоніну сприяють збільшенню вмісту гомоцистеїну [112, 304]. Підвищення метіоніну в дієті також супроводжується збільшенням активності ЦДО, в той час як активність ЦСД та γ-ГЦЛ, навпаки, зменшується [129, 282].

Гормональна регуляція. Важливу роль в регуляції обміну гомоцистеїну та цистеїну мають тиреоїдині гормони. Показано, що на тлі експериментального гіпотиреозу відмічається зростання рівня гомоцистеїну та цистеїну в крові, що асоціюється зі зменшенням активності ферментів реметилування та транссульфування, тоді як гіпертиреоз супроводжується протилежними змінами [77, 78]. Обмін сірковмісних амінокислот регулюється також інсуліном. Встановлено, що на тлі стрептозотоцинового діабету (дефіцит інсуліну) відмічається зниження рівня гомоцистеїну в

сироватці крові та активності цистатіонін-β-синтази в органах, в той час як введення інсуліну нормалізувало ці показники [205, 207]. У людей з цукровим діабетом I та II типів концентрація гомоцистеїну в крові менша, ніж у здорових осіб, і лише за умов приєднання нефропатії чи кардіоваскулярних ускладнень його рівень в сироватці крові зростає [155, 158, 272]. Певну роль в регуляції метаболізму гомоцистеїну та цистеїну відіграють глюкокортикоїдні гормони. Встановлено, що експериментальний гіперкортицизм супроводжується зростанням рівня гомоцистеїну та цистеїну, зменшенням активності ферментів транссульфування гомоцистеїну, зниженням активності цистеїндиоксигеназного та кон'югаційного шляхів метаболізму цистеїну [75, 76]. Існують дані щодо причетності статевих гормонів до метаболізму сірковмісних амінокислот: оваріектомія самок щурів супроводжується зростанням рівня гомоцистеїну в сироватці крові, тоді як замісна гормонотерапія нормалізує його вміст [239]. Статеві гормони регулюють активність транссульфування гомоцистеїну: у самок активність та експресія ЦБС у печінці вірогідно більша, ніж у самців, кастрація самців супроводжується збільшенням активності та експресії цього ферменту [390]. Залишається невивченим вплив статевих гормонів на рівень цистеїну в сироватці крові, активність ферментів циклу метилування та ферментів метаболізму цистеїну.

1.3 Обмін гідроген сульфіду, його регуляція та біологічне значення

H_2S є короткоживучою молекулою з періодом напівжиття у кілька хвилин [402]. У водних розчинах при pH 7,4 20-30% H_2S існує в недисоційованій формі та 70-80% - у вигляді гідрогенсульфід-аніону ($H_2S \leftrightarrow H^+ + HS^-$; pK_a =6,89), який частково перетворюється в сульфід-аніон (S^{2-}) [279, 351]. H_2S характеризується високим коефіцієнтом мембранної проникності і тому легко долає плазматичні мембрани шляхом простої дифузії [351]. Отже, H_2S діє як паракринна сигнальна молекула, але не

виключається і дистантний ефект, оскільки цей метаболіт міститься в плазмі крові і може транспортуватись еритроцитами. Встановлено, що транспорт H_2S еритроцитами людини здійснюється в 4 етапи: 1) дифузія H_2S крізь клітинні мембрани або газові канали; 2) екстрацелюлярне депротонування H_2S у HS^-; 3) надходження HS^- в еритроцит через аніонний транспортер - протеїн AE1 в обмін на Cl^-; 4) інтрацелюлярне протонування HS^- до H_2S [259]. Можливим є і мембранний транспорт H_2S через аквапорини - водні канали [302].

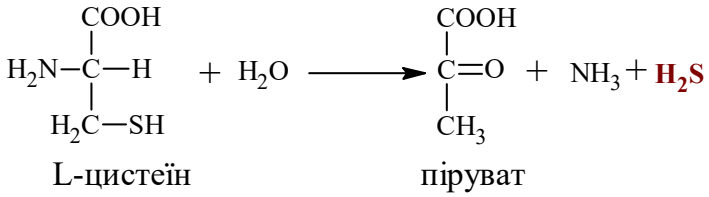
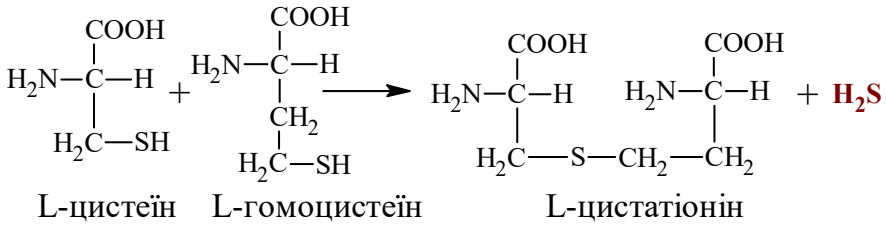
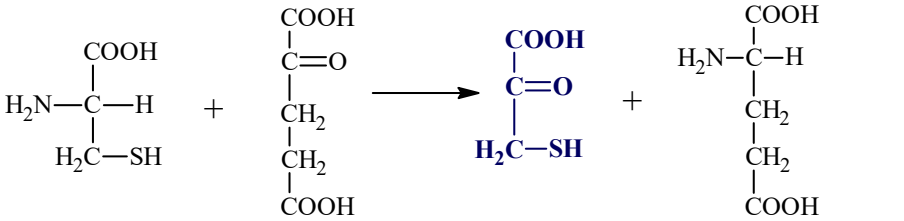
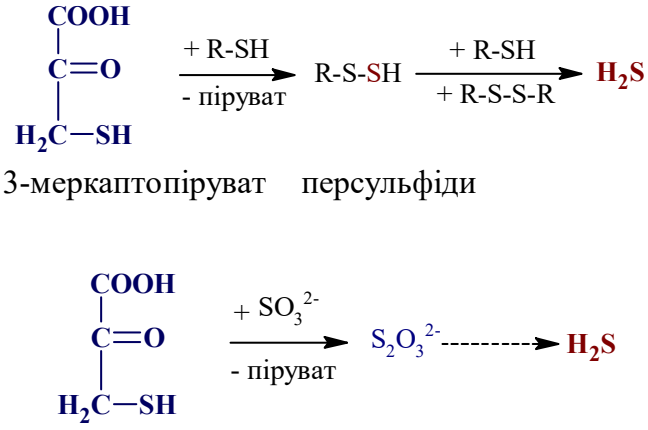
Основними джерелами ендогенного H_2S в тканинах є L-цистеїн та L-гомоцистеїн. Утвореюється H_2S в реакціях транссульфурування та трансамінування за участі піридоксальфосфатзалежних ензимів цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1), цистатіонін-β-синтази (ЦБС, КФ 4.2.1.22) та цистеїнамінотрансферази (ЦАТ, КФ 2.6.1.3) (табл. 1.4). Серед ключових реакцій утворення H_2S в тканинах виділяють наступні: 1) десульфурування L-цистеїну до пірувату за участі ЦГЛ; 2) конденсаціїя L-гомоцистеїну з L-цистеїном та десульфурування L-цистеїну до L-серину за участі ЦБС; 3) трансамінування L-цистеїну з α-кетоглутаратом за участі ЦАТ з утворенням 3-меркаптопірувату, з якого далі 3-меркаптопіруватсульфуртрансферазою (3-МСТ, КФ 2.8.1.2) вивільняється H_2S. Кофакторами 3-МСТ в цій реакції можуть виступати глутатіон, тіоредоксин та дигідроліпоєва кислота [118, 211, 267, 330, 347, 397]. Ще одним шляхом утворення H_2S є відновлення тіосульфату за участі піридоксальфосфатнезалежного ензиму тіосульфатдитіолсульфідтрансферази (ТСТ, КФ 2.8.1.5).

Нещодавно були відкриті інші реакції синтезу H_2S (табл. 1.5), фізіологічне значення яких ще остаточно не з'ясоване [330, 211, 347, 267, 386]. До таких альтернативних реакцій відносяться: 1) десульфурування L-цистину з утворенням L-тіоцистеїну, з якого H_2S вивільнює ЦГЛ; 2) десульфурування L-цистеїну до L-серину за участі ЦБС; 3) конденсації двох молекул L-гомоцистеїну з утворенням L-гомолантіоніну за участі ЦГЛ; 4) десульфурування L-гомоцистеїну до гомосерину ферментом ЦГЛ; 5)

конденсації двох молекул L-цистеїну з утворенням L-лантіоніну за участі ЦГЛ або ЦБС; 6) окиснення D-цистеїну оксидазою D-амінокислот (DAAO, КФ 1.4.3.3) до 3-меркаптопірувату.

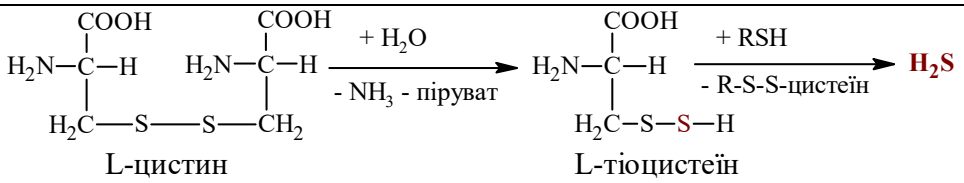
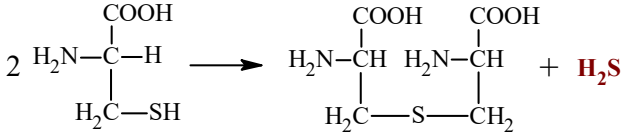
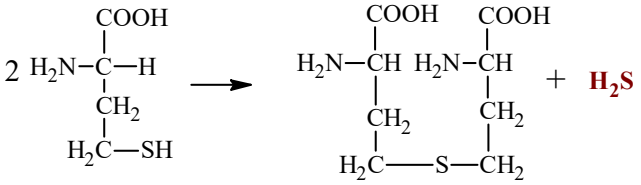
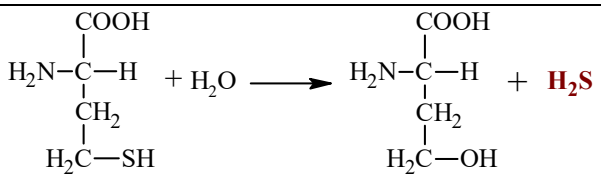
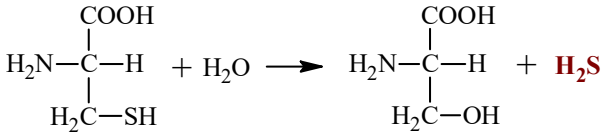
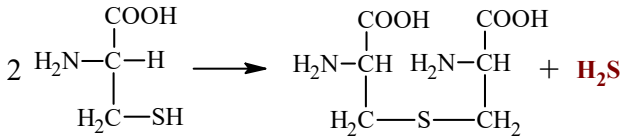
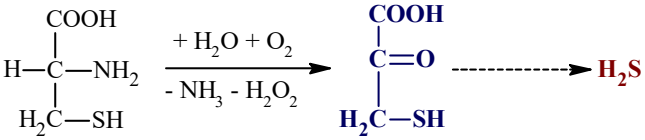
Таблиця 1.4

Ключові ензиматичні реакції утворення H_2S в тканинах тварин та людини

Ензим	Схема реакції
Цистатіонін-γ-ліаза **КФ 4.4.1.1**	
Цистатіонін-β-синтаза **КФ 4.2.1.22**	
Цистеїнаміно-трансфераза **КФ 2.6.1.3**	
3-Меркапто-піруватсульфур-трансфераза **КФ 2.8.1.2**	

Таблиця 1.5

Альтернативні реакції утворення H_2S в тканинах тварин та людини

Ензим	Схема реакції
Цистатіонін-γ-ліаза **КФ 4.4.1.1**	 L-цистин L-тіоцистеїн
	 L-цистеїн L-лантіонін
	 L-гомоцистеїн L-гомолантіонін
	 L-гомоцистеїн L-гомосерин
Цистатіонін-β-синтаза **КФ 4.2.1.22**	 L-цистеїн L-серин  L-цистеїн L-лантіонін
Оксидаза D-амінокислот **КФ 1.4.3.3**	 D-цистеїн 3-меркаптопіруват
Тіосульфатди-тіолсульфід-трансфераза **КФ 2.8.1.5**	$S_2O_3^{2-} + 2R\text{-}SH \rightarrow SO_3^{2-} + R\text{-}S\text{-}S\text{-}R + H_2S$

В організмі тварин та людини найбільш інтенсивний синтез H_2S відбувається в печінці, де експресується більшість H_2S-синтезуючих ензимів - ЦБС, ЦГЛ, ЦАТ, 3МСТ [184, 214, 241, 357]. В нирках утворення H_2S забезпечують ЦГЛ та ЦБС (експресуються в корковому та мозковому шарі, проксимальних канальцях, інтерстиціальній тканині), а також 3-МСТ (експресується в гломерулах) [138, 154]. В центральній нервовій системі головним продуцентом H_2S вважається ЦБС, який експресується у гіппокампі, мозочку, корі, стовбурі мозку [143, 172, 184, 267]. Поряд з цим утворення H_2S відбувається також в реакції за участі 3-МСТ [113]. В судинах H_2S синтезується за участі ЦГЛ (експресується в ГМК), та ЦАТ/3-МСТ (експресуються в ендотеліоцитах аорти, легеневої артерії, мезентеріальних та ниркових артеріях) [184, 225, 265, 359, 366, 392, 397]. В міокарді утворення H_2S відбувається переважно за участі ЦАТ/3-МСТ та ЦГЛ [120, 352], а в скелетних м'язах – ЦАТ/3-МСТ, ЦГЛ та ЦБС [163]. Достатньо висока здатність до утворення H_2S виявлена в міометрії та плаценті щурів і людини, в яких експресуються ЦБС та ЦГЛ [174, 303, 375]. Експресія ЦГЛ та ЦБС виявлена в кишечнику, шлунку, β-клітинах підшлункової залози [235, 305, 365, 376], адипоцитах [223], легенях [160, 216].

Катаболізм H_2S відбувається практично у всіх тканинах переважно шляхом окиснення, хоча незначна його частина в цитоплазмі метилується з утворенням метантіолу та диметилсульфіду [279, 403] (табл. 1.6). Переважна більшість H_2S перетворюється поетапно в тіосульфат, сульфіт та сульфат в реакціях мітохондріального окиснення [160, 358]. В матриксі мітохондрій окиснення H_2S відбувається послідовно за участі сульфід хінон оксидоредуктази (КФ.1.8.5.4), S-діоксигенази (КФ.1.13.11.18), S-трансферази (роданези) (КФ. 2.8.1.1) (табл. 2). Ці ферменти забезпечують послідовне окиснення H_2S в сульфіт і тіосульфат з вивільненням електронів, які транспортуються в дихальний ланцюг на убіхінон [183, 184, 256]. Далі сульфіт під впливом сульфітоксидази в матриксі перетворюється в сульфат. Кінцеві продукти окиснення H_2S протягом доби виводяться нирками та через

шлунково-кишковий тракт [183]. Також H_2S може безпосередньо реагувати з мітохондріальними гемпротеїнами – цитохромоксидазою та цитохромом *c* з утворенням сульфану (S^0) та реакційноздатного тіїльного радикалу ($HS^{\bullet}$) [356]. H_2S може окислюватись до сульфіту в міжклітинному просторі або крові (в нейтрофілах) НАДФН-оксидазою, а також різними окисниками: пероксинітритом, гіпохлоритом, супероксидним аніон-радикалом, гідроген пероксидом. В еритроцитах утилізація H_2S відбувається неензиматичним шляхом - утворенням сульфгемоглобіну [279, 356, 402].

Таблиця 1.6

Шляхи утилізації та депонування H_2S в тканинах

Ензим	Схема реакції
Сульфідхінон-оксидоредуктаза **КФ 1.8.5.4**	H_2S +R-SH + хінон → R-S-**S***-H + гідрохінон
Сульфурдіоксиге-наза **КФ 1.13.11.18**	R-S-**S***-H + O_2 + H_2O → R-SH + **SO_3^{2-}** + $2H^+$
Тіосульфатціанід-сульфур-трансфераза **КФ 2.8.1.1**	**$2HS^-$** + $2O_2$ → **$S_2O_3^{2-}$** + H_2O $S_2O_3^{2-}$ + CN^- → SCN^- + **SO_3^{2-}**
Сульфітоксидаза **КФ 1.8.3.1**	**SO_3^{2-}** + Fe^{3+}(цитохром с) → **SO_4^{2-}** + Fe^{2+}(цитохром с)
Тіол-S-метил-трансфераза **КФ 2.1.1.9**	**H_2S** → CH_3-SH→ CH_3-S-CH_3
Неензиматичний шлях	**H_2S** + метгемоглобін → сульфгемоглобін **HS^-** + Fe^{3+}(цитохром с) → Fe^{2+}(цитохром с) + **$HS^{\bullet}$**
Неензиматичний шлях	**$HS^{\bullet}$** + $NO^{\bullet}$ → HSNO HSNO + RSH ↔ RSNO + **H_2S**

Тканини з високими потребами кисню - серце та мозок досить чутливі до порушень катаболізму H_2S. За умов гіпоксії в цих тканинах пригнічується окиснення H_2S та активуються процеси його зв'язування з білками, особливо цитохромом с. Високі концентрації H_2S, які створюються за цих умов, викликають відновлення дисульфідних містків цитохромоксидази, що супроводжується її інактивацією та пригніченням тканинного дихання [120].

Регуляція ензиматичного утворення H_2S залишається до кінця нез'ясованою. Відомо, що алостеричним активатором ЦБС є S-аденозилметіонін [184]. Її активність інгібують CO, який має високу спорідненість до цього ензиму, і NO - лише у високих (надфізіологічних) концентраціях [367]. Нещодавно встановлений ще один механізм впливу на активність ЦБС, який свідчить про можливу участь ензиму в епігенетичній регуляції та експресії генів. С-кінцевий фрагмент ЦБС містить тандем із двох доменів, які піддаються SUMO-модифікації (small ubiquitin-like modifier) по залишкам лізину в 211 положенні, що викликає зниження каталітичної активності ензиму. Інгібітором сумолювання ЦБС виступає цистатіонін [98]. Біологічне значення SUMO-модифікації ЦБС поки що залишається не визначеним. Гіпотетично, в такій формі може відбуватись транслокація ЦБС в ядро з подальшим десумолюванням і відновленням H_2S-продукуючої активності [98]. Утворення H_2S за участі ЦГЛ активується кальмодуліном в присутності 1-2 мМ Ca^{2+} [210]. Однак, базальна концентрація Ca^{2+} в клітинах становить біля 100 нМ, тому роль Ca^{2+}/кальмодуліну в регуляції ЦГЛ-залежної продукції H_2S потребує подальшого вивчення [264]. На відміну від ЦГЛ, утворення H_2S за участі ЦАТ/ 3-МСТ дозозалежно інгібується Ca^{2+} (з повним блокуванням в присутності 2,9 мкМ Ca^{2+}) і не залежить від кальмодуліну [265]. Активність ЦАТ знижується при збільшенні концентрації L-аспартату в середовищі [99]. 3-МСТ-залежна продукція H_2S зростає при підвищенні вмісту тіоредоксину та дигідроліпоєвої кислоти в клітинах [265]. Останім часом показано, що метаболізм H_2S регулюється і

гормонами. Показано, що за умов експериментального гіперкортицизму відмічається зменшення активності ЦГЛ та ЦБС в печінці й нирках [76]. Зменшення активності цих ферментів реєструється також за умов гіпотиреозу у щурів, тоді як гіпертиреоз супроводжується протилежними змінами [78]. Встановлено, що статеві гормони також причетні до метаболізму H_2S в міокарді та судинах. Так, оваріектомія самок супроводжується зменшенням активності та експресії ЦГЛ, а замісна гормонотерапія відновлює продукцію H_2S [168].

Вміст H_2S в плазмі крові тварин (щурів) та людини становить біля 50-80 мкмоль/л [9, 279, 402]. В тканинах H_2S міститься в більш значних кількостях, зокрема в мозку тварин його вміст коливається в межах 50-160 мкмоль/л [265, 402]. Більша частина H_2S в тканинах перебуває у зв'язаній формі, і вивільнення H_2S відбувається лише при певних умовах. На сьогодні існує дві основні форми, з яких можливе вивільнення зв'язаного H_2S. Перша форма – кислото-лабільна зв'язана сірка - представлена в мітохондріях залізосірчаними кластерами (Fe/S) [183]. Вивільнення H_2S з цієї форми відбувається лише при pH 5,4, тому за фізіологічних умов цей шлях не має важливого значення [183]. Друга форма - сульфан сульфур - представлена полісульфідами, персульфідами, елементарною сіркою. Із цієї форми H_2S вивільняється за низьких значень редокс-потенціалу та при pH 8,4, що свідчить про досить важливу роль цього шляху в поповненні пулу H_2S в тканинах [183, 263].

В організмі H_2S виконує роль сигнальної молекули, газотрансміттера, специфічних рецепторів для якого не знайдено. Вплив H_2S на активність білків реалізується різними шляхами. H_2S може виступати відновлюючим агентом і перетворювати дисульфідні групи білків у сульфгідрильні, однак роль цього шляху значно зростає за високих концентрацій H_2S в тканинах [213, 265]. Також H_2S може модифікувати вільні сульфгідрильні групи білків та тіолів [265]. В роботі A.K. Mustafa показано, що H_2S здатен S-сульфгідрувати білки, подібно того, як NO забезпечує S-нітрозилування

білків [213, 356]. В процесі S-сульфгідрування HS-групи залишків цистеїну перетворюються в персульфідну форму (HSS-групи), що супроводжується зміною активності білків. Слід зауважити, що процес S-нітрозилування найчастіше супроводжується зменшенням реакційної здатності цистеїну, тоді як S-сульфгідрування – підвищенням [265, 356].

Механізм S-сульфгідрування вивчений значно менше ніж S-нітрозилування. Відомо, що в процесі S-нітрозилування безпосередню участь приймає NOS, яка приєднується до білка-мішені [213], однак роль ЦГЛ в процесі S-сульфгідрування до кінця не встановлена. На сьогодні показано, що в тканинах сульфгідрованих білків значно більше, ніж S-нітрозильованих, що до певної міри пояснюється більшою стабільністю продуктів сульфгідрувння, а також достатньою тканинною концентрацією H_2S для цього процесу [213]. В печінці S-сульфгідрування гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази підвищує її активність, тоді як S-сульфгідрування β-тубуліну та актину викликає їх полімеризації [213]. S-сульфгідрування підвищує нейропротекторну активність убіквітин Е3 лігази [267]. Шляхом S-сульфгідрування/десульфгідрування, реалізується вплив H_2S і на інші молекулярні мішені – кальцієві канали різних типів, TRP (transient receptor potential) канали ($TRPV_{1,}$ $TRPA_1$), протеїнкінази, фактори транскрипції, про що свідчать результати чисельних досліджень з використанням донорів H_2S (NaHS) та інгібіторів H_2S-синтезуючих ензимів у тварин.

Дія H_2S реалізується і через взаємодію з простетичними групами металопротеїнів, активними формами кисню, низькомолекулярними електрофільними дериватами. У високих концентраціях H_2S блокує активність цитохромоксидази, відновлюючи електронами гем *aa3, CuB* і цитохром *c* [356]. H_2S може відновлювати Fe^{3+} у складі метгемоглобіну з конвертацією його у форму, здатну зв'язувати та транспортувати кисень [356]. При взаємодії H_2S з активними формами кисню відбувається генерація тіїльного радикалу та тіосульфат-аніону, який перетворюється в інші оксигенвмісні деривати сірки (сульфіти, сульфати). Не виключено, що

цей шлях також опосередковує H_2S-сигналінг, адже SO_2 бере участь в регуляції судинного тонусу та скоротливості міокарду [354, 372]. Доведено, що $Na_2SO_3/NaHSO_3$ викликає дозозалежну релаксацію ізольованих кілець аорти щурів *in vitro* [163]. Як нуклеофіл H_2S легко взаємодіє з електрофільними ліпідними дериватами, в тому числі з 4-гідроксиноненалем - потужним модулятором оксидативного стресу, клітинної проліферації, апоптозу [236].

Антиоксидантні властивості H_2S. В багатьох клінічних дослідженнях доведена антиоксидантна здатність H_2S [201, 365]. H_2S є сильним відновником і тому володіє прямою антиоксидантною дією. За фізіологічних умов в клітині близько 80% H_2S знаходиться в дисоційованому стані HS^-, який є більш сильним відновником ніж H_2S [141]. На сьогодні вважають, що в умовах організму антиоксидантна дія H_2S та HS^- в основному є непрямою, адже в тканинах їх концентрація досить невелика [141, 267]. Антиоксидантні властивості H_2S, очевидно, пов'язані з його здатністю регулювати активність транскрипційних факторів, таких як Nrf2, який активує близько 200 генів білків, залучених до антиоксидантного захисту. Метаболізм H_2S тісно пов'язаний з тіолдисульфідним обміном та синтезом глутатіону [364], що дає певний внесок в антиоксидантну дію H_2S. Поряд з цим H_2S може безпосередньо взаємодіяти з NO і утворювати нітрозотіол - тіонітрозильну кислоту [119, 318]. Також H_2S може пригнічувати процес ланцюгового утворення активних форм кисню в мітохондріях [218, 221]

Вплив H_2S на мітохондрії. У високих концентраціях донори H_2S на моделі ішемії/реперфузії міокарду викликали пригнічення активності цитохромоксидази та тканинного дихання в мітохондріях, що супроводжувалось зменшенням активності оксидативного стресу в серці [120]. Натомість, у фізіологічних кількостях H_2S виступає донором електронів для дихального ланцюга мітохондрій, посилює процеси тканинного дихання та окисного фосфорилування [218, 249].

В мітохондріях H_2S може виконувати роль редокс-сенсора. За умов гіпоксії пригнічується окиснення H_2S в мітохондріях, і його рівень зростає, тоді як при відновленні нормального кровопостачання посилюється утилізація H_2S, і його вміст в мітохондріях зменшується [355, 356].

Роль H_2S в апоптозі. На сьогодні показно, що H_2S пригнічує процеси апоптозу клітин через різноманітні механізми. За даними деяких досліджень, H_2S здатний інгібувати експресію проапоптичних факторів - каспази-3, Fas, FasL та TNFα [102, 212]. Донори H_2S можуть активувати казеїнкіназу 2, яка активує репресор апоптозу (ARC) шляхом його фосфорилування. Показано, що H_2S може пригнічувати активність кальциурину, який пошкоджує мітохондрій та дефорилює ARC.

Вплив H_2S на апоптоз реалізується також на рівні мітохондрій. H_2S пригнічує утворення активних форм кисню в мітохондріях, стабілізує мітохондріальну мембрану і тому попереджує розвиток апоптозу клітин [218, 263]. Останнім часом розкриті деякі механізми впливу H_2S на мітохондріальну мембрану. Співробітниками відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАНУ (Київ) під керівництвом чл.-кор. НАНУ д.мед.н. В.Ф. Сагача, було встановлено, що H_2S через вплив на K^+-АТФ-канали залучений до регуляції відкриття мітохондріальної пори (*mitochondrial permeability transition pore*), яка відіграє ключову роль в регуляції апоптозу та некрозу клітин [87, 128, 152].

Вплив H_2S на іонні канали. Спрямованість впливу H_2S на іонні канали залежить від його вмісту в тканинах, а також від впливу процесів S-сульфгідрування на просторову будову іонного каналу [364]. Показано, що H_2S викликає інгібування Ca^{2+}-каналів L-типу в кардіоміоцитах (супроводжується зниженням рівня Ca^{2+} та негативним інотропним ефектом) та їх активацію в нейронах (супроводжується підвищенням рівня Ca^{2+}); інгібування великих $K^+(Ca^{2+})$-каналів у каротидних синусах та їх активацію в пітуїтарних клітинах [218, 266, 338, 364]. H_2S є основним фактором гіперполяризації та релаксації судин, що зумовлено його здатністю

активувати АТФ чутливі K^+-канали ендотелію та ГМК за рахунок їх S-сульфгідрування [210, 397]. Через взаємодію з АТФ чутливими K^+-каналами реалізується вплив H_2S на секрецію інсуліну [409]. Також H_2S активує Ca^{2+}-канали Т-типу, що асоціюється з H_2S-індукованою гіпералгезією та проноцицептивним ефектом [219].

Зв'язок H_2S та NO. Останім часом показано, що між обміном H_2S та NO існує певний взаємозв'язок, однак дані щодо цього питання досить суперечливі [134, 273]. Так, NO стимулює продукцію H_2S та експресію ЦГЛ у культурі ГМК [300]. Вплив H_2S на утворення NO неоднозначний: низькі концентраціїї H_2S активують синтез NO, тоді як високі справляють протилежний ефект [134, 273]. За даними деяких досліджень, показано, що кардіопротекторний ефект H_2S до певної міри пов'язаний з активацією конститутивної NOS [159, 212].

H_2S та NO мають різноспрямований вплив на міокард [159]. Так, донори H_2S не впливають на скоротливість міокарду, донори NO чинять негативну інотропну дію, тоді як комбінація H_2S та NO виявляє виражений позитивний інотропний ефект. Встановлено, що в міокарді може проходити реакція між H_2S та NO з утворенням нітроксилу (HNO), який підвищує концентрацію кальцію в міокарді через стимуляцію ріанодинових рецепторів та активацію Ca^{2+}-АТФ-ази саркоплазматичного ретикулюму [233].

Вплив H_2S на запалення. На сьогодні існують досить суперечливі дані щодо впливу H_2S на запалення. За даними більшості досліджень, H_2S виявляє протизапальні властивості, що пояснюється наявністю у нього наступних ефектів: інгібує NF-κB (нуклеарний фактор каппа-В) та посилює експресію гемоксигенази-1 [212, 234], блокує утворення прозапальних цитокінів TNF-a, IL-1b, IL-6, та IL-8, пригнічує хемотаксис нейтрофілів та адгезію лейкоцитів до ендотелію. В той же час існують дані про те, що високі концентрації H_2S виявляють прозапальну активність [222].

Вплив H_2S на сигнальні шляхи. H_2S модулює активність аденілатциклазної системи. Показано, що він викликає інгібування

аденілатциклази та зниження вмісту цАМР в нейронах морфін-залежних мишей [217]; зниження активності аденілатциклази та вмісту цАМФ, збільшення активності фосфодіестерази в юкстагломерулярних клітинах нирок щурів з реноваскулярною гіпертензією [232]; підвищення вмісту цАМФ та активності протеїнкінази А, зниження активності цАМФ-залежної фосфодіестерази в ізольованих мітохондріях гепатоцитів щурів [227]; підвищення синтезу цАМФ в культурі нейрональних та гліальних клітин [363]. H_2S є інгібітором фосфодіестерази-4 в ендотелії та ГМК судин [225] і тому попереджує розвиток судинних порушень. Пригнічення проліферації ГМК під впливом H_2S є наслідком зменшення активності МАПКК [173]. Також H_2S зменшує експресію NF-kB та індукує синтез активатору транскрипції 3 (STAT-3), з чим пов'язаний стимулюючий вплив H_2S на процеси проліферації клітин та ангіогенез [273]. Донори H_2S активують транскрипційний фактор Nrf2, який індукує синтез ферментів НАДФН-хінон оксидоредуктази, гемоксигенази, глутаматцистеїнлігази. [108]. Поряд з цим H_2S має депримуючим вплив на активність ренін-ангіотензин-альдостеронової системи [232].

Дотепер залишається невивченим питання щодо статевих особливостей метаболізму H_2S, а також ролі системи H_2S у механізмах формування стать-специфічної патології серцево-судинної системи.

1.4 Порушення обміну сірковмісних амінокислот і гідроген сульфіду як чинники кардіо-васкулярного ризику, підходи до корекції

Серед порушень обміну сірковмісних амінокислот досить часто зустрічаються гіпергомоцистеїнемія та гіперцистеїнемія. **Гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ)** - це патологічний стан, який характеризується підвищенням вмісту гомоцистеїну в сироватці крові. За рекомендаціями Jacobsen D.W. [255], вміст гомоцистеїну менше 10 мкмоль/л є оптимальним, 10-15 мкмоль/л - субнормальним, вище 15 мкмоль/л - ГГЦ. Важкість ГГЦ

класифікують за наступними критеріями: легка ГГЦ – рівень гомоцистеїну у сироватці крові 15-30 мкмоль/л, середньо важка – 31-100 мкмоль/л, важка – вище 100 мкмоль/л [73, 270, 285].

Рівень гомоцистеїну в плазмі крові визначається такими чинниками як вік, стать та етнічна приналежність. Показано, що вміст гомоцистеїну зростає від 10,8 мкмоль/л у віці 40-42 роки до 12,4 мкмоль/л у віці 65-67 років; у осіб білої раси рівні гомоцистеїну є вищими, ніж у осіб негроїдної раси [315]. В багатьох дослідженнях продемонстровано, що чоловіки мають вищий вміст гомоцистеїну в крові, ніж жінки відповідного віку [1, 315, 385].

Серед причин ГГЦ розглядають наступні: а) генетичний поліморфізм гомоцистеїн-метаболізуючих ензимів - метилентетрагідрофолатредуктази, цистатіонін-β-синтази, метіонінсинтетази [73, 293, 297, 317]; б) дефіцит вітамінів B_6, B_9 та B_{12}, коферментні форми яких входять до складу ензимів метаболізму гомоцистеїну [73, 284, 293, 335, 398]; в) фактори, які негативно впливають на метаболізм вказаних вітамінів - зловживання алкоголем, кавою, паління [147, 198, 278, 284, 379]; г) прийом лікарських засобів - антагоністів вітаміну B_6 (ізоніазид, гідралазин) та B_9 (метотрексат, сульфасалазін), метформіну, оральних контрацептивів, антиепілептичних препаратів, імунодепресантів, а також препаратів, які в ході метаболізму метилуються (L-ДОФА) [73, 146, 198, 268, 293]; д) надлишок метіоніну в дієті, що супроводжується блокуванням реакцій реметилування гомоцистеїну [73, 284]; е) ниркова недостатність [178, 331].

У великому проспективному дослідженні Hordaland Homocysteine Study показано, що у осіб з рівнем гомоцистеїну ≥20 мкмоль/л загальна серцево-судинна смертність протягом 4 років спостереження складає 21%, тоді як у осіб з рівнем гомоцистеїну <9 мкмоль/л - лише 2,9% [378]. У осіб з ГГЦ ризик ішемічних серцевих нападів зростає у 2-3 рази, а підвищення рівня гомоцистеїну на 5 мкмоль /л підвищує ризик венозних тромбозів на 27%.

В Україні поширеність ГГЦ сягає 10% серед здорових дорослих людей, 2% серед юнаків та підлітків, 13-43% у пацієнтів з серцево-судинною патологією [5]. Досить поширеним в популяції мешканців України є поліморфізм С677Т гену метилентатрагідрофолатредуктази - 40,7% [19].

Негативний вплив ГГЦ на серцево-судинну систему реалізується через різноманітні молекулярні механізми: гіпометилування; хімічна модифікація (гомоцистеїнування) білків; оксидативний стрес; стрес ендоплазматичного ретикулуму, індукція апоптозу та запалення, порушення продукції вазодилятаторів [73, 109, 187, 196, 250, 257, 286, 335, 393].

Вважають, що найбільш потужним патохімічним чинником ГГЦ є *порушення процесів метилування*. Однією з причин гіпометилування є накопичення S-аденозилгомоцистеїну - інгібітора метилтрансфераз [1, 73, 277]. Неефективне метилування викликає зміни мембранного спектру фосфоліпідів, текучості мембран, структури білків та нуклеїнових кислот, експресії генів, а також порушення диференціювання та репарації клітин [314]. Показано, що зниження активності процесів метилування причетне до розвитку ендотеліальної дисфункції, зниження чутливості судин до дії вазорелаксантів, патологічного ремоделювання серця і судин [171, 329, 339].

Ще одним із патогенетичних механізмів кардіо- та вазотоксичної дії ГГЦ є *гомоцистеїнування білків* [257, 269, 311, 380]. Відомо, що гомоцистеїн та тіолактон гомоцистеїну можуть включатись в структуру білків як під час трансляції, так і на посттрансляційному рівні. Доведено, що трансляційне включення гомоцистеїну до складу білків є однією із можливих причин розвитку атеросклерозу за умов ГГЦ. На постттрансляційному рівні тіолактон гомоцистеїну може включатись в боковий ланцюг білкової молекули шляхом взаємодії з аміногрупою лізину - N-гомоцистеїнування. Посттрансляційне включення гомоцистеїну до складу фібриногену, цитохрому С, ліпопротеїнів високої щільності, лізиноксидази веде до втрати їх функціональної активності.

Важливим механізмом патогенетичної дії ГГЦ на серцево-судинну систему є *індукція оксидативного стресу*, що веде до порушення структури і функції мембран, білків, нуклеїнових кислот, активує запалення та загибель клітин [269, 335, 380]. Гомоцистеїн має високореакційну сульфгідрильну групу, яка легко окиснюється з утворенням дисульфіду, що супроводжується генерацією супероксидного-аніон радикалу. Поряд з цим гомоцистеїн активує PAR4- рецептори, що збільшує експресію НАДФН-оксидази та веде до надмірного синтезу супероксиду. Також за умов ГГЦ відмічається зменшення активності антиоксидантних ензимів супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази.

ГГЦ викликає розвиток *стресу ендоплазматичного ретикулуму*, що супроводжується порушенням гомеостазу кальцію, синтезу стероїдів та фолдінгу протеїнів [130, 269, 401]. Високі концентрації гомоцистеїну порушують утворення дисульфідних зв'язків у протеїнах, викликають їх незавершений фолдінг, що супроводжується активацією ферментої системи PERK-IRE-1-ATF-6, яка відновлює нормальну структуру пошкоджених протеїнів. Якщо рефолдінг виявився неефективним, активується шаперон GRP78/94, який запускає протеосомну деградацію пошкодженого протеїну.

Високі концентрації гомоцистеїну можуть індукувати *апоптоз клітин* [269, 307, 401]. Відомо, що ГГЦ супроводжується активацією двох апоптичних генів CHOP/GADD153 та TDAG51, які зупиняють клітинний цикл та активують загибель клітин шляхом апоптозу. Також відомо, що тривала гіперактивація системи PERK-IRE-1-ATF-6 на тлі ГГЦ може також стимулювати апоптоз.

Токсична дія ГГЦ реалізується також і через розвиток *системного запалення*. Встановлено, що гомоцистеїн стимулює експресію ядерного фактора транскрипції NF-kB, прозапальних цитокінів, хемокінів, лейкоцитарних молекул адгезії, а також окремих ростових факторів, індуцибельної ізоформи NO-синтази [201, 269].

Ще одним механізмом реалізації патогенного впливу ГГЦ є порушення утворення вазодилятаторів. За умов ГГЦ порушується ендотеліальна продукція та біологічна доступність оксиду азоту, а також транспорт попередника оксиду азоту аргініну [200, 202, 269, 361]. Порушення продукції оксиду азоту при ГГЦ зумовлене також накопиченням асиметричного диметиларгініну - конкурентного інгібітора синтази оксиду азоту, що пов'язують з інгібуючим впливом високих концентрацій гомоцистеїну на активність ензиму диметиларгінін диметиламіногідролази. Поряд з цим на тлі ГГЦ порушується утворення ще одного потужного вазодилятатора та регулятора скорочення серця - H_2S. Показано, що високі концентрації гомоцистеїну викликають субстратне інгібування H_2S-синтезуючих ензимів [45]. Поряд з цим оксидативний стрес, що виникає на тлі ГГЦ, може викликати ковалентну модифікацію ензимів синтезу H_2S [332].

Корекція ГГЦ. Виділяють два основних шляхи корекції патології, асоційованої з ГГЦ: нормалізація рівня гомоцистеїну та лікування ускладнень. Немедикаментозне зниження рівня гомоцистеїну базується на корекції способу життя - раціональне харчування, яке забезпечує надходження до організму всіх необхідних макро- та мікронутрієнтів, позбавлення шкідливих звичок (алкоголь, паління, кава, гіподинамія), виключення чи обмежене вживання лікарських препаратів, які індукують ГГЦ [91]. Медикаментозна корекція передбачає застосування фармакологічних засобів (ФЗ), що проявляють гіпогомоцистеїнемічну дію [181, 374]. Критерієм ефективності таких ФЗ вважають їх спроможність нормалізувати або достовірно зменшувати рівень загального гомоцистеїну в плазмі крові, а також зменшувати прояви ГГЦ-індукованих порушень, в першу чергу з боку серцево-судинної системи та системи гемостазу [41]. Проведені дослідження дозволяють виділити наступні групи фармакологічних засобів з гіпогомоцистеінемічною дією [6, 91, 203]: 1) ФЗ з прямою гіпогомоцистеїнемічною дією. До таких засобів відносяться вітаміни B_9, B_{12}, B_2, бетаїн, поліаміни, механізм дії яких пов'заний з посиленням

реметилування гомоцистеїну, активацією метіонінсинтетази, БГМТ. Вітамін B_6 та піридоксальфосфат, гем, S-аденозилметіонін, нітропрусид натрію, які посилюють елімінацію гомоцистеїну шляхом транссульфування, є активаторами ЦБС, ЦГЛ. 2) ФЗ з опосередкованою гіпогомоцистеїнемічною дією. Вони зменшують потребу в реакціях метилування та метильованих продуктах (креатин, холін) або сприяють нормалізації експресії генів, проявляють неспецифічну гіпогомоцистеїнемічну дію (вітамін А, естрогени). 3) ФЗ засоби, дія яких спрямована на корекцію ускладнень, викликаних ГГЦ. Вони активують процеси метилування, блокують оксидативний стрес, гальмують хімічну модифікацію протеїнів, мають антитромботичну дію. Таку дію проявляють антиоксиданти, антикоагулянти, антиагреганти, донори NO (аргінін) та інші вазопротектори. 4) Комбіновані ФЗ. Передбачають поєднання речовин з різними механізмами дії в одній лікарські формі, наприклад, вітамінно-мікроелементні композиції (ВМК).

Доцільність зниження рівня гомоцистеїну в плазмі крові з метою профілактики судинних катастроф та тромбозів підтверджена в численних клінічних дослідженнях. Показано, що прийом 5 мг фолієвої кислоти, 0,4 мг вітаміну B_{12}, 50 мг вітаміну B_6 практично здоровими особами з помірною ГГЦ (> 16 мкмоль/л) викликає зниження рівня гомоцистеїну на 27,7% [153]. У пацієнтів з кардіоваскулярною патологією прийом вітамінного комплексу Sclerovit (0,8 мг фолієвої кислоти, 20 мкг вітаміну B_{12}, 5 мг вітаміну B_6, 100 мг вітаміну Е) достовірно зменшував рівень гомоцистеїну, фібриногену, С-реактивного протеїну та викликав регрес ендотеліальної дисфункції [157, 245].

Досить важливим порушенням обміну сірковмісних амінокислот є **гіперцистеїнемія -** патологічний стан, який супроводжується зростанням вмісту цистеїну в сироватці крові. Показано, що рівень цистеїну до 300 мкмоль/л можна розглядати як нормальний, 300-350 мкмоль/л - пограничо високий, більше 350 мкмоль/л - гіперцистеїнемія. Рівень цистеїну в крові зростає з віком, причому у чоловіків його рівень вищий, ніж у жінок [5].

Показано, що гіперцистеїнемія є ще одним з метаболічних чинників розвитку кардіо-васкулярної патології [3, 26, 28, 162, 182, 313, 312, 316]. Причини розвитку гіперцистеїнемії дотепер залишаються невивченими. Враховуючи той факт, що гіперцистеїнемія та ГГЦ досить часто поєднуються, а шляхи обміну гомоцистеїну та цистеїну мають багато спільного, можна вважати, що і причини розвитку цих патологічних станів також по більшій мірі є спільними. Існуюча інформація стосовно можливих механізмів патогенетичної дії гіперцистеїнемії також є обмеженою. Доведено, що високі рівні цистеїну можуть створювати умови для посиленої продукції активних форм кисню, пероксидації ліпідів і пошкодження судин [2, 4]. Цистеїн взаємодіє з NO з утворенням нітрозоцистеїну і зменшує біодоступність цього вазодилятатора [316]. Гіперцистеїнемія також супроводжується розвитком гіпометилування, зменшенням синтезу вазодилятаторів H_2S і NO та зниженням їх рівня в сироватці крові [17]. Поряд з цим високі концентрації цистеїну індукують дисбаланс в системі гемостазу: активується система зсідання крові, знижується активність інгібіторів зсідання крові (протеїну С, антитромбіну ІІІ), зменшується фібринолітичний потенціал (підвищується вміст ПАІ-1), розвивається гіперреактивність тромбоцитів [17, 23, 24, 25, 27].

Питання *корекції гіперцистеїнемії* також залишається достатньо невивченим. Існують поодинокі дані про те, що використання вітамінно-мікроелементного комплексу (вітаміни B_6, B_9, B_{12}, мікроелементи цинк, хром, ванадій) у щурів з гіперцистеїнемією відновлює баланс в шляхах метаболізму сірковмісних амінокислот, H_2S, сприяє нормалізації рівня цистеїну в плазмі крові, зменшує прояви гіперреактивності тромбоцитів, гіперкоагуляції та дефіциту інгібіторів зсідання крові, знижує рівень ПАІ-1 [25].

Порушення обміну сірковмісних амінокислот часто супроводжуються **розладами метаболізму гідроген сульфіду**. З порушеннями вмісту та продукції H_2S в тканинах асоціюються різні патологічні стани. Підвищення рівня H_2S виявляється при синдромі Дауна, декомпенсованому цирозі печінки, сепсисі, ішемічному інсульті, хронічних

обструктивних захворюваннях легень [9, 279]. Зниження базального вмісту H_2S в плазмі крові відмічається у хворих з артеріальною гіпертензією, ішемічною хворобою серця, тромбозами глибоких вен нижніх кінцівок, хворобою Альцгеймера, гіпергомоцистеїнемією, нирковою недостатністю, а також за умов цисплатинової нефропатії, ішемії / реперфузії нирок [24, 37, 254, 279].

Корекція рівня H_2S в сироватці крові. В умовах організму дія H_2S переважно реалізується у формі HS^-, тому в якості його донорів використовують NaHS або Na_2S. Інформація стосовно доз, шляхів та тривалості введення тваринам неорганічних донорів H_2S є дуже різноманітною [301]. В більшості досліджень NaHS / Na_2S вводять парентерально (в/в) в дозах від 100 мкг/кг до 3 мг/кг маси тварини, а тривалість досліду може коливатись від кількох годин до 2-3 тижнів [301]. LD_{50} NaHS при парентеральному введенні становить 14,6±1,0 мг/кг [97], за іншими даними – 60,2 мг/кг, а умовно терапевтичні дози NaHS наближаються до 1/20 LD_{50} [14]. В такому діапазоні концентрацій NaHS / Na_2S зменшують ішемічно-реперфузійні пошкодження при інфаркті міокарду, ішемії нирок, інтестинальній ішемії, виявляють антиоксидантні, церебропротекторні, кардіопротекторні та протизапальні властивості [114, 115, 195, 209, 220, 231, 265, 301, 338, 363]. Донори H_2S проявляють антиагрегантний та антикоагулянтний ефект: NaHS пригнічував агрегацію тромбоцитів, індуковану АДФ та колагеном in vitro [16, 243]; введення щурам $Na_2S \cdot 9H_2O$ 3,36 мг/кг 1 раз на добу протягом 7 діб викликало збільшення протромбінового часу, АЧТЧ та активності фактору Ха [16]. Неорганічні донори H_2S швидко підвищують його вміст в плазмі крові та тканинах, але й швидко елімінуються із організму у вигляді сульфідів, тіосульфатів, сульфітів, сульфатів. Більш повільне підвищення вмісту H_2S в тканинах забезпечують субстрати H_2S-синтезуючих ензимів - L-цистеїн, D-цистеїн; деривати цистеїну - N-ацетилцистеїн, S-пропаргілцистеїн, S-пропілцистеїн, S-алілцистеїн; полісульфіди (діалілдисульфід,

діалілтрисульфід) та штучний органічний донор H_2S - реактив Lawesson [363, 194]. Неорганічним субстратом для синтезу ендогенного H_2S також може виступати тіосульфат натрію.

Введення L-цистеїну (15 та 100 мг/кг) сприяло загоєнню гострих виразок шлунку у щурів [222]. D-цистеїн захищав нейрони мозочка від оксидативного стресу і зменшував ступінь ураження нирок при ішемії-реперфузії [347]. S-пропілцистеїн, S-алілцистеїн та S-пропаргілцистеїн проявляли кардіопротекторну дію при гострому інфаркті міокарду у щурів, підвищували вміст H_2S та збільшували активність супероксиддисмутази в кардіоміоцитах [209].

З метою зменшення ендогенної продукції H_2S в умовах експерименту використовують інгібітори H_2S-синтезуючих ензимів: DL-пропаргілгліцин, β-ціаноаланін – інгібітори ЦГЛ; гідроксиламін, амінооксиацетат – інгібітори ЦБС. Як правило, інгібітори H_2S-синтезуючих ензимів проявляють вазоконстрикторну, цитотоксичну, прооксидантну та прозапальну дію [209, 265, 267, 301, 338, 363]. Наприклад, введення DL-пропаргілгліцину викликало зниження активності I комплексу дихального ланцюга, зниження вмісту глутатіону та розвиток оксидативного стресу в мозку мишей [139]; посилювало ішемічно-реперфузійні пошкодження та збільшувало розмір інфаркту міокарда, погіршувало функціональний стан нирок та підвищувало сироватковий вміст креатиніну у щурів [301]. При певних станах, що асоціюються з надмірною генерацією H_2S в тканинах, інгібітори H_2S-синтезуючих ензимів можуть проявляти цитопротекторну дію. Введення пропаргілгліцину (8-10 мг/кг в/оч) зменшувало ознаки гострого тубулярного некрозу, запобігало зростанню сироваткового креатиніну та знижувало утворення H_2S в нирках щурів при введенні гентаміцину [149].

Дотепер ефекти донорів H_2S залишаються невивченими. В роботах Струтинської Н.А., Семенихіної О.М. та ін. (2011, 2013) показано, що у фізіологічних концентраціях NaHS та L-цистеїн покращують функціональний стан мітохондрій в серці, попереджують Ca^{2+}-індуковане

відкривання мітохондріальної пори та набухання мітохондрій, в той час як інгібітор ЦГЛ пропаргілгліцин підвищує чутливість мітохондріальної пори до дії індуктора Ca^{2+} та викликає набухання мітохондрій [87, 152, 128]. У безкальцієвому середовищі в присутності NaHS 10^{-12} - 10^{-8} М відбувається помірне набухання мітохондрій серця щурів [87]. NaHS в діапазоні концентрацій 10^{-9} - 10^{-6} М викликає дозозалежне зниження поглинання кисню в присутності сукцинату та АДФ ізольованими мітохондріями серця дорослих щурів і при концентраціх 10^{-9} та 10^{-8} М підвищує супряженя окиснення та фосфорилування [152].

З огляду на фізіологічні ефекти H_2S були зроблені спроби модифікувати ефективність та токсичність лікарських засобів шляхом створення H_2S-дериватів. Так з'явились S-диклофенак, S-напроксен, S-аспірин, які в експерименті проявляли більшу протизапальну дію та меншу гастротоксичність, ніж їх прототипи [222, 283].

В останні роки з'явились дані про вплив фармакологічних засобів на вміст H_2S в органах тварин, які часто мають суперечливий характер. Наприклад, диклофенак викликає зменшення продукції H_2S в слизовій оболонці шлунка [10]. Амлодипін викликав зниження рівня H_2S в головному мозку і печінці мишей у дозі 3 та 10 мг/кг, у серці та нирках - підвищення рівня H_2S в дозі 3 мг/кг та його зниження у дозі 10 мг/кг [101]. Також показано, що аспірин знижував рівень H_2S в головному мозку, але збільшував - у печінці мишей [145]. Підвищення вмісту H_2S в серці, нирках, печінці, мозку мишей викликали карведілол (в дозі 10 мг/кг) [117], дігоксин [137], аторвастатин [106], раміприл [327], метформін [291].

Не виключено, що неорганічні та органічні донори H_2S можуть суттєвим чином впливати на біотрансформацію лікарських засобів. Пероральне введення NaHS (5 мг/кг) викликало зниження активності CYP2C9, підвищення активності CYP3A4 і не впливало на активність CYP2B6, CYP2D6 та CYP2C19 у щурів [377].

Пошук безпечних та ефективних модуляторів обміну H_2S продовжується. Перспективними є засоби, що містять активатори та кофактори H_2S-синтезуючих ензимів - комплекси вітамінів та мікроелементів. В ряді досліджень показано, що за умов тривалої гіпергомоцистеїнемії у щурів зменшується вміст H_2S в плазмі крові та знижується активність H_2S-синтезуючих ензимів (ЦГЛ, ЦБС, ЦАТ, ТСТ) в печінці, нирках, мозку, аорті. Введення вітаміно-мікроелементної композиції, яка містить вітаміни B_6, B_9, B_{12} та координаційні сполуки цинку (Zn^{2+}) та хрому (Cr^{3+}) з N-2,3-диметилфенілантраніловою кислотою і амоній ванадат ефективно підвищувало ендогенну продукцію H_2S з цистеїну, гомоцистеїну, тіосульфату в органах щурів з ГГЦ та її поєднанні з введенням інгібітору NO-синтази - L-NAME [46]. Комплекс есенціальних мікроелементів (заліза, міді, цинку, кобальту, марганецю, хрому) та оксигенвмісних солей ультрамікроелементів (ванадію, молібдену та селену) - есмін (Есмін, АТ «Київський вітамінний завод») в дозі 35 мг/кг зменшував вік-асоційоване зниження вмісту та продукції H_2S в міокарді, аорті та нирках щурів [410]. Зазначені мікроелементи необхідні для широкого кола біохімічних процесів, зокрема, є компонентами антиоксидантних ензимів та кофакторів обміну сірковмісних амінокислот, залучені до регуляції кардіоваскулярного гомеостазу та тканинного дихання.

.

1.5 Роль поліфенольних сполук в корекції серцево-судинної патології та їх вплив на обмін сірковмісних амінокислот і гідроген сульфіду

Поліфеноли – це група рослинних сполук, які можуть мати флавоноїдну та нефлавоноїдну структуру. До нефлавоноїдів відносяться похідні фенолової кислоти (галова та кафеінова кислоти) та стільбени (ресвератрол). Типова молекула флавоноїду містить 2 бензольних та 1 гетероциклічне піранове кільце. Серед флавоноїдів виділяють наступні класи: антоціани (мальвідин), флавони (апігенін), ізофлавони (геністеїн,

дайдзеін), флавоноли (кверцетин), флавонони (нарінгенін), флаван-3-оли (катехін, проантоціанідини). Показано, що застосування поліфенольних сполук має виразну кардіо- та ендотеліотропну дії, виявляє антигіпертензивний та антиагрегантний ефект, зменшує ризик смертності від кардіоваскулярної патології [179, 274, 328, 396, 406]. Вплив поліфенольних сполук на стан серцево-судинної системи реалізується через різноманітні механізми. Поліфеноли володіють виразною антиоксидантною дією, яка обумовлена їх здатністю інактивувати реактивні кисневі деривати (за рахунок наявності в структурі полі фенолів фенольних гідроксилів), а також відновлювати баланс в системі про- та антиоксидантів (зменшують активність НАДФН-оксидази та збільшують активність супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази) [121, 193, 281, 328]. Поряд з цим поліфенольні сполуки виявляють потужні протизапальні властивості. Їх депримуючий вплив на запалення реалізується через різні шляхи: 1) пригнічують транскрипцію ядерного фактора NFkB; 2) зменшують активність циклооксигенази та ліпооксигенази [103, 121, 381]. Також у поліфенолів реєструються антиапоптичні ефекти, які асоціюються з їх здатністю стабілізувати мітохондріальну пору, зменшувати експресію проапоптичних генів [407]. Показано, що флавоноїди здатні коригувати дисліпідемію при атеросклерозі – збільшують вміст ліпопротеїнів високої щільності та зменшують рівень ліпопротеїнів низької щільності, тригліцеридів та загального холестеролу [328, 407, 408]. Флавоноїди також мають ендотеліопротекторні властивості, які асоціюються з їх стимулюючим впливом на активність ендотеліальної ізоформи NO-синтази та продукцію нітроген монооксиду [193, 328, 396]. Поліфенольні сполуки класу ізофлавонів, особливо геністеїн та дайдзеін, виявляють естрогенні ефекти [133, 340]. Ці фітоестрогени мають структуру, подібну до естрадіолу, що є важливою передумовою їх афінності до естрогенових рецепторів. Афінність геністеіна до альфа-рецепторів естрогенів становить лише 5% від афінності естрадіолу, тоді як зв'язування геністеіна з бета-рецепторами естрогенів

становить 36% і наближується до такого у естрону. В той же час, на відміну від естрону, ізофлавони не здатні перетворюватися в естрадіол або 16-альфа-гідроксиестрон, що є причиною їх низького проліферативного потенціалу. Це робить застосування фітоестрогенів безпечними з точки зору гіперплазії гормонозалежних тканин і не вимагає прогестагенного прикриття. Естрогенна подібність зумовлює реалізацію таких ендогенних ефектів естрогенів, як запобігання остеопорозу, припинення проявів клімактеричного синдрому, зниження ризику серцево-судинних порушень у жінок в постменопаузі.

Існують поодинокі дані щодо впливу флавоноїдів на метаболізм гомоцистеїну та H_2S. Показано, що геністеїн володіє гіпогомоцистеїнемічним ефектом у жінок в постменопаузі з метаболічним синдромом [190]. В експерименті встановлено, що геністеїн також активує ЦГЛ та збільшує продукцію H_2S в слизовій оболонці шлунка у тварин з диклофенак-індукованою гастротоксичністю [12]. Інформація щодо здатності інших флавоноїдів нормалізувати метаболізм гомоцистеїну та H_2S в серцево-судинній системі відсутня.

На завершення слід сказати, що в останні роки був зроблений значний прогрес у вивченні обміну сірковмісних амінокислот, H_2S та встановленні механізмів патогенетичної дії його порушень. Проте залишається невивченим вплив статі та статевих гормонів на регуляцію обміну сірковмісних амінокислот та H_2S в печінці та серцево-судинній системі в нормі та при ГГЦ. Невідомо існування статевих особливостей кардіо-та вазотоксичної дії ГГЦ. Не визначені підходи щодо корекції серцево-судинної патології, порушень метаболізму сірковмісних амінокислот та H_2S в печінці, міокарді та аорті у особин різної статі за умов ГГЦ. Вивченню цих проблемних питань присвячена дисертаційна робота.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях [15, 29, 32, 34-36, 48, 77, 95, 310, 399, 400, 411, 413].

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ, МОДЕЛІ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика експериментальних тварин та моделей

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. В експериментальних дослідженнях самок щурів використовували в фазі проеструсу, коли рівень естрогенів найвищий. Дослідження проведені згідно загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), правил гуманного відношення до експериментальних тварин, затверджених комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова (протокол №6, від 15 червня 2017 року), інших міжнародних угод та національного законодавства в цій галузі.

Всі тварини перебували в стандартних умовах віварію з 12-годинним режимом день/ніч. Воду і збалансований гранульований корм отримували *ad libitum* у відповідності до нормативів [20]. Через визначені умовами експерименту проміжки часу тварин знеживлювали методом цервікальної дислокації. Всі маніпуляції проводили в стандартних умовах з 9^{00} до 10^{00}. При дослідженні впливу модуляторів біохімічних процесів тварин виводили з експерименту через 24 години після останнього введення обраних речовин. Під час експериментів щоденно контролювали загальний стан тварин, вживання їжі та води, кожні 4 доби визначали масу тіла (вірогідно не відрізнялась між усіма дослідними та контрольними групами).

Всі тварини згідно мети та задач дослідження були розподілені на 7 серій експериментів (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Розподіл щурів за серіями експериментів

№№ серій	Напрямки дослідження по серіям	Кількість тварин
1	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	60
2	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	80
3	Дослідження стану міокарду та аорти у самців й самок щурів залежно від рівня статевих гормонів	80
4	Дослідження впливу 14-добового введення NaHS (донор H_2S) та D,L-пропаргілгліцину (інгібітор цистатіонін-γ-ліази) на біохімічні та функціональні показники стану міокарду та аорти самців та самок щурів	60
6	Дослідження впливу донору H_2S на показники кардіогемодинаміки у щурів обох статей за умов ішемії/ реперфузії	40
7	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)	80
	Всього тварин	400

2.1.1 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 [100, 319]. Контрольним тваринам розтинали передню черевну стінку з наступним пошаровим зашиванням рани («хибнооперовані»). Замісну гормонотерапію у самців і самок кастрованих щурів проводили 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 [136, 252]. 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 (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Вміст статевих гормонів в плазмі крові самців та самок щурів (M±m)

Групи тварин		Самці	Самки
		Тестостерон, нг/дл	Естрадіол, нг/дл
1	Інтактні (n=10)	120±7,45	5,85±0,19
2	Гонадектомія (n=10)	6,50±0,62 $p_{1,2}<0,05$	0,72±0,02 $p_{1,2}<0,05$
3	Гонадектомія + тестостерон/тестрадіол (n=10)	90,5±4,52 $p_{2,3}<0,05$ $p_{1,3}<0,05$	5,22±0,11 $p_{2,3}<0,05$ $p_{1,3}<0,05$

Виявилось, що кастрація самців супроводжується вірогідним зниженням вмісту тестостерону на 94,5% (6,50±0,62 нг/дл проти 120±7,45

нг/дл в контролі), а гонадектомія самок - зменшенням рівня естрадіолу на 87,7% (0,72±0,02 нг/дл проти 5,85±0,19 нг/дл в контролі). Проведення замісної гормонотерапії кастрованим тваринам викликала збільшення рівня тестостерону в 14 разів, а естрадіолу – в 7,25 разів, відносно нелікованих тварин. За цих умов показники рівня гормонів наближались до таких в контрольній групі.

2.1.2 Моделі надлишку та дефіциту H_2S у щурів

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. Дози, шляхи та тривалість введення вказаних речовин були запозичені з літератури при проведенні подібних досліджень і не викликали загибелі тварин [96, 228]. На цих моделях ми оцінили вплив надлишку та дефіциту гідроген сульфіду на метаболізм H_2S, біохімічні та функціональні показники стану серця та аорти у самців та самок щурів.

2.1.3 Модель ішемії / реперфузії серця у щурів

Гостру постреперфузійну міокардіальну ішемію у щурів моделювали за рахунок 30 хв. оборотної оклюзії лівої коронарної артерії на рівні нижнього краю auricula sinistra [82]. Даний стан екстраполює клінічну картину після реканалізації інфаркт-залежної судини (тромболізис, стентування, балонна ангіопластика). Ішемію-реперфузію (ІР) здійснювали за

умов торакотомії затягуванням шовкової лігатури, підведеної на атравматичній голці під ліву коронарну артерію за контролем капіляроскопу марки «М-70А» (СРСР). 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 (ШВЛ)) через інтубаційну трубку (катетер для в/в інфузій («Унофлон», Україна), розміром 22 G, довжиною 25 мм, який забезпечує безперервну швидкість подачі повітря або кисню в межах 35 мл/хв). Інтубація здійснювалась неонатологічним ларингоскопом із прямим клинком, модифікованим для пащі щурів. ШВЛ забезпечувалась за допомогою неонатологічного мішка Амбу (Flexicare, Великобританія), сумішшю чистого кисню з повітрям (фракція кисню в суміші, FiO_2=0,9), яка подавалась до інтубаційної трубки через систему редукторів із балону портативного апарату для ШВЛ КОКЧЕТАВ-І У2, серійний №0688 (Казахстан) [83]**.** За таких умов можна швидко перейти із ручної вентиляції мішком Амбу на автоматичну апаратну. Контроль адекватності ШВЛ моніторували на сублінгвальній ділянці за показником сатурації крові киснем (SaO_2), який упродовж операції підтримувався на рівні не нижчому за 95% (модуль пульсоксиметрії BIOPAC, США).

На цій моделі оцінювали вплив NaHS в дозі 3 мг/кг на показники кардіогемодинаміки у самців та самок щурів на тлі ІР. Терапію NaHS розпочинали за 15 хв. до ішемії, яка 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 (катетер внутрішньовенній «УНОФЛОН» 22 G, Індія) стегнову вену на боці вимірювання тиску лівого шлуночка за допомогою інфузоматної системи B. Braun McGaw (Німеччина). Під час

терапії тварина поміщалась у термостабільну камеру BIOPAC (США) із постійною тепловою конвекцією (t=34 ºС), де проводилась ШВЛ, що необхідно для підтримання гомеостазу в умовах наркозу [92]. Після завершення досліджень евтаназію тварин здійснювали шляхом передозування розчину тіопенталу натрію (200 мг/кг в/в струминно).

2.1.4 Модель тіолактонової гіпергомоцистеїнемії у щурів

Модель тіолактонової ГГЦ створюється введенням в організм тварин надлишку екзогенного гомоцистеїну у вигляді 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. Доза, шляхи та тривалість введення тіолактону гомоцистеїну запозичена з літератури при проведенні подібних досліджень і не викликала загибелі тварин [204]. Контрольним групам тварин вводили в/шл еквівалентний об’єм крохмального гелю. На цій моделі ми оцінювали статеві особливості впливу надлишку тіолактону гомоцистеїну на метаболізм сірковмісних амінокислот в печінці, рівень гомоцистеїну, цистеїну, H_2S в сироватці крові, обмін H_2S в міокарді та аорті, біохімічні та функціональні параметри серця та аорти щурів.

2.1.5 Дослідження впливу поліфенольних сполук геністеїну та кверцетину на обмін сірковмісних сполук та стан серцево-судинної системи за умов гіпергомоцистеїнемії

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. Поліфенольні сполуки застосовували паралельно з веденням тіолактону гомоцистеїну (у вищенаведених дозах) протягом 28 діб. Доза, шляхи та тривалість введення біофлавоноїдів

запозичена з літератури при проведенні подібних досліджень і не викликала загибелі тварин [325, 391]. На цій моделі досліджено здатність біофлавоноїдів з різним механізмом дії коригувати індуковані ГГЦ зміни метаболізму сірковмісних амінокислот в печінці, рівня гомоцистеїну, цистеїну, H_2S в сироватці крові, обміну H_2S в міокарді та аорті, а також порушення біохімічних та функціональних параметрів серця і аорти самців й самок щурів.

2.2 Біохімічні методи дослідження

Дослідження виконані в науково-дослідній клініко-діагностичній лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідоцтво про переатестацію №049/15 від 02 березня 2015 р.), за безпосередньої участі автора. Визначення вмісту метаболітів та активності ферментів проводили в сироватці крові, ЕДТА-плазмі, супернатанті пост'ядерного гомогенату печінки та міокарда, ТХО-екстракті міокарда.

Сироватку крові та ЕДТА-плазму отримували центрифугуванням крові при 1500 об/хв. протягом 20 хв. Аліквоти сироватки та плазми крові відбирали в мікропробірки Eppendorf і до проведення аналізу зберігали при -20^{o}C [71, 72].

Печінку перфузували холодним 1,15% розчином калію хлориду, подрібнювали ножицями, гомогенізували в середовищі 1,15% калію хлориду у співвідношенні 1:3 (маса/ об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло). Пост'ядерну фракцію отримували центрифугуванням гомогенатів упродовж 30 хв при 1500 g та +4^{o}C. Супернатант відбирали в мікропробірки Eppendorf і до проведення аналізу зберігали при -20^{o}C.

Для визначення вмісту H_2S міокард та аорту промивали холодним 1,15% розчином KCl, подрібнювали ножицями, гомогенізували в середовищі 0,01 М NaOH у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло). До 1 мл гомогенату додавали 250 мкл 50% ТХО, центрифугували при

1200 g 15 хв. і отримували супернатант, який зразу ж використовували для досліджень.

Для визначення вмісту фракцій глутатіону використовували безбілковий ТХО-екстракт міокарду. Для цього міокард промивали холодним 1,15% розчином KCl, подрібнювали ножицями, гомогенізували в 10% розчині трихлороцтової кислоти у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло). Супернатант відбирали в мікропробірки Eppendorf і до проведення аналізу зберігали при -20^{o}C [191].

Для інших досліджень міокард та аорту гомогенізували в середовищі 0,25 М сахарози, 0,01 М Трис (pH 7,4) у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло), центрифугували 30 хв при 600 g при температурі 4-6^{o}C, відбирали аліквоти постядерного супернатанту в мікропробірки Eppendorf і до проведення досліджень зберігали при -20^{o}C.

Біохімічні дослідження в сироватці крові. Загальний рівень гомоцистеїну визначали імуноферментним методом за набором «Homocysteine EIA» (Axis-Shield, Англія) на імуноферментному аналізаторі STAT FAX 303/PLUS. Гомоцистеїн, зв'язаний з білком, спочатку відновлювали до вільного гомоцистеїну, який ферментативно перетворювали до S-аденозилгомоцистеїну (S-АГЦ). Твердофазний імуноферментний аналіз базується на конкуренції між S-АГЦ в зразку та імобілізованим на стінках планшетки S-АГЦ за місця зв'язування на моноклональних анти-S-АГЦ антитілах. Після стадії відмивання незв'язані антитіла видаляли і додавали вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хріну. Активність пероксидази вимірювали після додавання субстрату. Величина екстинкції є обернено пропорційною до концентрації гомоцистеїну в зразку.

Рівень загального цистеїну визначали за реакцією з нінгідриновим реактивом у кислому середовищі після відновлення цистину в цистеїн [185]. за допомогою 1,4-дитіотреітолу при pH=8, при індикаторі фенолфталеїн. Реакційну суміш, що містила біологічний зразок (цистеїн), оцтову кислоту і кислий нінгідриновий реактив (нінгідрин + оцтова кислота + концентрована

соляна кислота) кип'ятили протягом 10 хв, швидко охолоджували і розводили етанолом. Утворювався рожевий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі при λ=560 нм проти контролю. Вміст цистеїну розраховували, виходячи з коефіцієнту молярної екстинкції, який дорівнює 26,0 х $10^3 М^{-1} см^{-1}$.

Вміст H_2S в сироватці визначали за реакцією утворення тіоніну з використанням n-фенілендиаміну [9]. В пробірку з 0,5 мл 1% розчину цинк ацетату додавали 0,1 мл сироватки крові, 2,5 мл дистильованої води та перемішували. Потім додавали 0,5 мл 50 мМ водного розчину n-фенілендиаміну гідрохлориду, 0,4 мл 30 мМ розчину $FeCl_3$ в 1,2М HCl. Інкубували 5 хвилин при кімнатній температурі, потім додавали 1 мл 20% ТХО для осадження протеїнів. Центрифугували 10 хвилин при 3000 об/хв. Вимірювали оптичну щільність надосадової рідини на фотоколориметрі при довжині хвилі 590 нм в кюветі на 1,0 см проти контролю на реактиви (замість сироватки крові брали 0,1 мл розчину альбуміну з концентрацією 75 г/л). В якості стандартів використовували водні розчини натрію сульфіду ($Na_2S \cdot 9H_2O$) з концентрацією 7,5-750 мкг/мл (31,2-3120 мкмоль/л), які обробляли як дослідні проби. Вміст H_2S розраховували за відношенням оптичної щільності дослідної проби до оптичної щільності стандартної проби за формулою: $С_д = (Е_д / Е_{ст}) х С_{ст}$ мкг/мл (мкмоль/л), де $С_д$ – концентрація гідроген сульфіду в сироватці крові, $Е_д$. – оптична щільність дослідної проби, $Е_{ст}$. – оптична щільність стандартної проби, $С_{ст}$ – концентрація стандартної проби з вмістом натрію сульфіду 312 мкмоль/л.

Активність аспартатамінотрасферази та креатинфосфокінази визначали за наборами ТОВ Філісіт-Діагностика, СпайнЛаб (Україна). Вміст адгезивної молекули судинних клітин-1 (sVCAM-1) в сироватці крові визначали імуноферментним методом за набором "sVCAM-1 ELISA KIT" (Diaclone, Франція) у відповідності до інструкції фірми-виробника.

Біохімічні дослідження в ЕДТА-плазмі. Вміст естрадіолу та тестостерону визначали імуноферментним методом стандартними наборами

DRG Estradiol ELISA фірми DRG (USA) та DSLACTIVE Testosterone фірми DSL (USA) згідно інструкцій фірм-виробників.

Біохімічні дослідження в супернатанті пост'ядерного гомогенату печінки. 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) оцінювали в адаптованих інкубаційних середовищах за приростом сульфід аніону [45, 90]. Цистатіоназну активність цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1) визначали за утворенням цистеїну в реакції розщеплення цистатіоніну [197], а цистатіонінсинтазну активність цистатіонін-β-синтази (ЦБС, КФ 4.2.1.22) - за утворенням цистатіоніну в реакції конденсації гомоцистеїну з серином [192]. 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 [254]. Активність метіонінаденозилтрансферази (МАТ, КФ 2.5.1.6) визначали за приростом неорганічного фосфату в реакції між метіоніном та АТФ [122], а бетаїнгомоцистеїнметилтрансферази (БГМТ, КФ 2.1.1.5) - за падінням сульфгідрильних груп в реакції між гомоцистеїном та бетаїном [166]. Активність цистеїндиоксигенази – ЦДО (КФ 1.13.11.20) визначали за зменшенням вмісту цистеїну адаптованим нами методом: до 1 мл інкубаційного середовища, що містило в кінцевих концентраціях L-цистеїн 0,5 мМ, дітіотреітол 40 мкМ, Тріс-HCI буфер 0,47 мМ (pH 7,4), додавали 0,1 мл пост'ядерного супернатанту гомогенату печінки, інкубували 30 хв при 37ºС, реакцію зупиняли додаванням 10% ТХО, проби центрифугували 20 хв при 1500 g, в надосаді визначали вміст цистеїну [185]. Активність γ-глутамілцистеїнлігази - γ-ГЦЛ (КФ 6.3.2.2) оцінювали за кількістю неорганічного фосфату, що утворювався при гідролізі АТФ в реакції між глутаматом та цистеїном [306].

Біохімічні дослідження в супернатанті пост'ядерного гомогенату міокарда, аорти та ТХО-екстракті міокарда. Вміст H_2S в міокарді та аорті

визначали спектрофотометричним методом за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном в присутності $FeCl_3$ [117]. 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 міокарді та аорті оцінювали в адаптованих нами інкубаційних середовищах за приростом сульфід-аніону [30]. Концентрації субстратів та кофакторів, значення pH та тривалість інкубації, які забезпечували оптимальні умови визначення активності ензимів, були підібрані априорі (табл. 2.3). До 0,5 мл інкубаційного середовища додавали 0,2 мл (2 мг протеїну) пост'ядерного супернатанту міокарду. Проби інкубували при 37ºС 60 хв у стерильних герметизованих пластикових пробірках типу Eppendorf (для попередження втрат H_2S). Реакцію зупиняли охолодженням пробірок на льоду, додавали 1% розчин цинк ацетату для зв'язування утвореного H_2S. Контрольні проби обробляли як і дослідні за винятком того, що досліджуваний матеріал вносили в середовище після інкубації та охолодження. Вміст H_2S в середовищі визначали за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном в присутності $FeCl_3$ [141].

Таблиця 2.3

Склад інкубаційних середовищ для визначення активності H_2S-синтезуючих ензимів в міокарді щурів

№	Назва ензиму	Склад інкубаційного середовища (кінцеві концентрації)
1	Цистатіонін-γ-ліаза (ЦГЛ)	L-цистеїн 6,0 мМ, піридоксальфосфат 1,34 мМ, Трис-HCl буфер 0,08 М (pH 8,5)
2	Цистеїнамінотрансфераза (ЦАТ)	L-цистеїн 6,0 мМ, α-кетоглутарат 1,6 мМ, піридоксальфосфат 1,34 мМ, Трис-HCl буфер 0,08 М (pH 8,5)
3	Тіосульфатдитіолсульфід-трансфераза (ТСТ)	Тіосульфат натрію 0,2 мМ, дитіотреітол 2,3 мМ, Трис-HCl буфер 0,09 М (pH 8,5)

Активність НАДФН-оксидази (КФ 1.6.3.1) в міокарді та аорті визначали за поглинанням НАДФН при 340 нм [320], супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) - за здатністю гальмувати окиснення кверцетину [40], вміст малонового діальдегіду (МДА) - за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [11], карбонільних груп протеїнів (КГП) - за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином [22].

Здатність міокарду до утилізації екзогенного H_2S визначали за швидкістю зниження концентрації сульфід-аніону в інкубаційному середовищі [31]. До 1,0 мл інкубаційного середовища, що містило 312 мкМ Na_2S, 0,47 мМ Трис-HCI буферу (pH 7,4) в кінцевих концентраціях додавали 0,1 мл пост'ядерного супернатанту гомогенату міокарду (кількість білка – 1-2 мг), інкубували 30 хв. при 37^oC в стерильних герметизованих пластикових пробірках типу Eppendorf. Контрольні проби інкубували без гомогенату, який додавали лише після зупинки реакції. Реакцію зупиняли охолодженням пробірок на льоду, після чого додавали 0,5 мл 1% розчину цинк ацетату для зв'язування сульфід-аніону і визначали його кількість за реакцією утворення метиленового синього відомими методом [141]. Пробірки витримували 20 хв. при 18-25^oC, додавали 1 мл 20% трихлороцтової кислоти, центрифугували 10 хв. при 1500 g. Вимірювали абсорбцію надосадової рідини на фотометричному обладнанні при довжині хвилі 670 нм. Стандартом слугували водні розчини $Na_2S \cdot 9H_2O$ з концентраціями 31,2-3120 мкМ, які обробляли як дослідні проби. Активність сульфітоксидази (КФ 1.8.3.1) в міокраді визначали за швидкістю окиснення сульфіт-аніону в присутності гексоціаноферату калію [124], тіоредоксиндисульфідредуктази (тіоредоксинредуктази, КФ 1.8.1.9) - за швидкістю НАДФН-залежного відновлення 5,5′-дітіобіс(2-нітробензоату) - DTNB [Jung H. I. et al., 2004],

Вміст відновленого (GSH) та окисненого (GSSG) глутатіону в міокарді визначали за реакцією з 5,5′-дітіобіс(2-нітробензоатом) і розраховували індекс GSH/GSSG [191]. Вміст протеїну в сироватці крові, печінці, міокарді та аорті визначали мікробіуретовим методом [42].

2.3 Молекулярно-генетичні дослідження (експресія гену *CSE*)

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, за що автор висловлює їй глибоку вдячність.

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 *CSE* 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 дезоксинуклеозидтрифосфатів; 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: відносний рівень мРНК *CSE* / β-актину (у.о.) оцінювали за формулою $2^{-\Delta Ct}$, $\Delta Ct = Ct_{ЦГЛ} - Ct_{β\text{-актин}}$, де $Ct_{ЦГЛ}$ - величина порогового циклу ампліфікації кДНК цільового гену ЦГЛ; $Ct_{β\text{-актин}}$ - величина порогового циклу ампліфікації кДНК референтного гену β-актину.

2.4 Дослідження вмісту ДНК в ядрах клітин міокарда методом проточної ДНК-цитометрії

Дослідження 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, за що автор висловлює йому глибоку вдячність.

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. Даний розчин дозволяє екстрагувати ядра та маркувати ядерну ДНК діамідинофеніліндолом (DAPI). При виготовленні нуклеарних суспензій використовувались одноразові фільтри CellTrics 50 мкм (Partec, Німеччина).

Проточний аналіз виконувався на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі "Partec PAS" фірми Partec (Німеччина). Для збудження флуоресценції DAPI застосовувалось УФ-випромінювання. З кожного зразка нуклеарної суспензії аналізу підлягало 10 тис. подій. 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 = 2c); S (S%) - відсоткове співвідношення клітин у фазі синтезу ДНК до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК > 2c та < 4c); G2 + M (G2M%) - відсоткове співвідношення клітин у фазі G2 + M до всіх клітин клітинного циклу (ДНК = 4c), або клітини з вмістом ДНК=4c (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 < 2c.

2.5 Дослідження показників кардіогемодинаміки

Дослідження виконані на базі Науково-дослідної лабораторії з доклінічної оцінки нових лікарських засобів та біологічно-активних сполук «Фармадар» при ВНМУ ім. М.І. Пирогова за безпосередньої участі д.мед.н., професора Ходаківського О.А., за що автор висловлює глибоку вдячність.

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 (внутрішньошлуночкової) гемодинаміки стали зміни тиску у лівому (ТЛШ, мм.рт.ст.) та правому шлуночках (ТПШ, мм.водн.ст.). ТЛШ та ТПШ оцінювали безпосередньо у лівому та правому шлуночках, за допомогою датчика Pressure Transducer гемодинамічного модуля BIOPAC (США), який послідовно під'єднувався до портів канюлей катетерів довжиною 50 мм та розміром 22 G, встановлених контрлатерально через стегнову артерію та вену у відповідний шлуночок за методикою Сельдінгера. Знаходження катетерів у порожнинах шлуночків верифікували електрокардіографічно у трьох стандартних відведеннях за зміною елевації сегменту ST над ізолінією під час контакту кінця катетера з ендокардом шлуночка при його потраплянні через бі-та трикуспідальні клапани [92]. За умов ІР досліджувані параметри реєстрували тричі у кожній дослідній групі: фоновий рівень (вихідні дані) після їх стабілізації, після лігування судини (ішемія) та через 1 год на тлі реперфузії**.** За 15 хв. до первинної реєстрації показників внутрішньошлуночкової гемодинаміки проводили помірну в/в гепаринізацію з розрахунку 0,1 мл антикоагулянта на 1 кг маси тіла щура.

2.6 Реєстрація скоротливості кільцевих фрагментів грудної аорти *in vitro*

Дослідження виконані в науково-дослідній клініко-діагностичній лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідоцтво про переатестацію №049/15 від 02 березня 2015 р.), за безпосередньої участі автора.

Реєстрація скоротливості кільцевих фрагментів грудної аорти проводилась в модельній системі *in vitro*. Після виділення грудну аорту щурів одразу поміщали у стандартний буферний розчин Кребса (склад в кінцевих концентраціях, мМ: 132 натрію хлориду, 4,7 калію хлориду, 1,4 натрію дигідрофосфату, 1,0 кальцію хлориду, 12,5 натрію гідрокарбонату та 5,6 глюкози), pH 7,4, при температурі 18-20^{o}C. pH розчину Кребса доводили до 7,4 шляхом продування сумішю газів - 95% кисню та 5% карбону диоксиду. За допомогою препарувальних голок аорту фіксували на парафіновому дні препарувальної чашки, заповненої розчином Кребса. Під бінокуляром аорту звільняли від сполучної тканини та згустків крові. Відпрепаровані ділянки аорти розрізали на кільцеві сегменти завширшки 2-3 мм під кутом близько 45^{o}. Отримані ізольовані кільцеві сегменти судин залишали у розчині Кребса при температурі 18-20^{o}C на 45 хв. Потім гладком’язові препарати аорти поміщали у робочу перфузійну камеру (об’єм - 0,5 мл) між гачком і датчиком напруження та розтягували під постійним навантаженням 0,015-0,02 Н, що дозволяє отримати оптимальну силу скорочення ізольованих кільцевих сегментів.

Реєстрацію скоротливої активності ізольованих препаратів аорти 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 [88, 94]. Блок-схема тензометричної установки для реєстрації скоротливої активності ізольованих

судинних препаратів наведена нижче (рис. 2.1). Сегменти аорти в камері суперфузували буферним розчином Кребса із сталою швидкістю 1,5 мл/хв за допомогою перистальтичного насосу. Суперфузійний буферний розчин Кребса термостатували із постійною температурою 37^{o}C за допомогою системи підігріву. До початку експерименту сегменти аорти витримували у перфузійній камері протягом 40-60 хвилин. Потім починали періодичну стимуляцію гладком'язевих клітин за допомогою гіперкалієвого буферного розчину із вмістом іонів K^{+} 80 мМ до отримання стабільних скоротливих відповідей з метою досягнення оптимального режиму роботи гладеньких м'язів судин. Після цього м'язові смужки промивались стандартним розчином Кребса 3 рази по 30 хв. Цілісність ендотелію контролювали за ступенем ізометричного розслаблення досліджуваних фрагментів судин під впливом ацетилхоліну (10^{-6}М), попередньо скорочених розчином α_1-агоніста адренорецепторів фенілефрином (10^{-6}М).

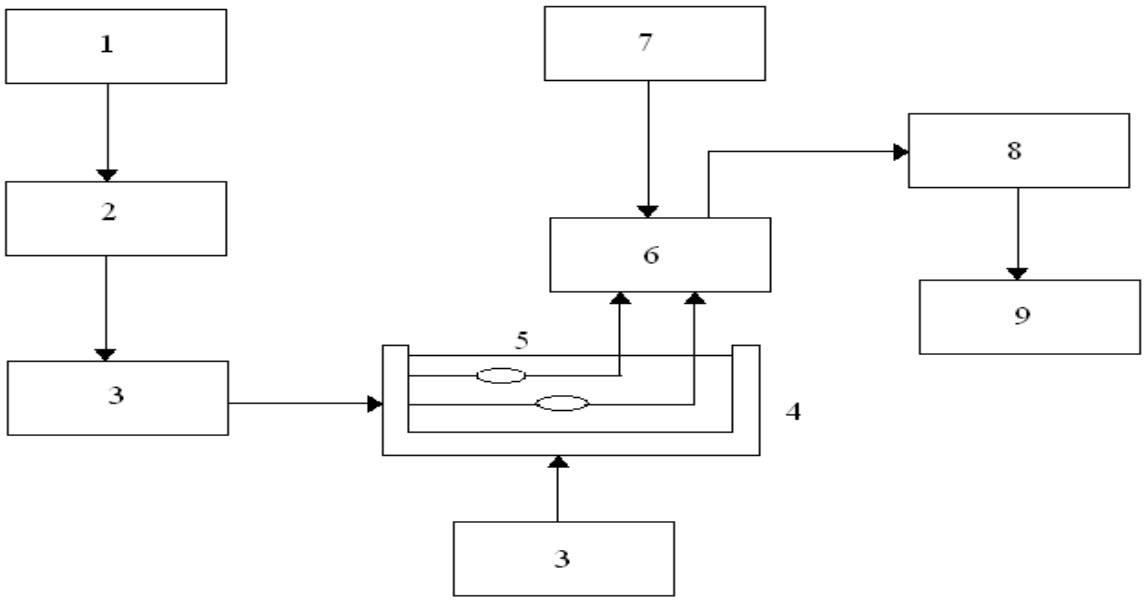


Рис. 2.1 Блок-схема установки для реєстрації скоротливої активності ізольваних препаратів аорти. 1 - ємність із перфузійним розчином; 2 - перистальтичний насос; 3 - нагрівач із термодатчиком; 4 - робоча камера; 5 – кільцеві фрагменти аорти; 6 - тензодатчики, поєднані з мікроманіпулятором та підсилювачем; 7 - блок живлення; 8 - аналоговий цифровий перетворювач; 9 - комп'ютер.

Оцінка H_2S- або цистеїн-стимульованого розслаблення. Спершу оцінювали ізометричне напруження фрагментів аорти, передскорочених фенілефрином (10^{-6}М), і брали його за 100%. Далі ізольовані фрагменти аорти, передскороченої фенілефрином (10^{-6}М), перфузували розчинами, що містили фенілефрин (10^{-6}М) та донор H_2S ($Na_2S \cdot 9H_2O$) або цистеїн в різних концентраціях (10^{-2}-10^{-6}М), протягом 15 хв кожний з наступною реєстрацією змін ізометричного напруження. Рівень H_2S- або цистеїн-стимульованого розслаблення представляли у відсотках, які розраховували відносно показника ізометричного напруження фрагменту аорти, досягнутого при дії фенілефрину.

Оцінка непрямої вазоконстрикторної дії гомоцистеїну. Частину кільцевих фрагментів аорти інкубували з розчинами гомоцистеїну (10^{-6}–10^{-2}М) протягом 180 хв. Ізольовані фрагменти аорти (інтактні та інкубовані з гомоцистеїном), передскорочені фенілефрином (10^{-6}М), перфузували розчином, що містив одночасно фенілефрин (10^{-6}М) та ацетилхолін (10^{-6}М), протягом 15 хв з наступною реєстрацією змін ізометричного напруження. Рівень ацетилхолін-стимульованого розслаблення представляли у відсотках, які розраховували відносно показника ізометричного напруження фрагменту аорти, досягнутого при дії фенілефрину. Далі оцінювали вазоконстрикторну дії гомоцистеїну (у %), як різницю рівнів ацетилхолін-стимульованого розслаблення інтактних фрагментів аорти та інкубованих з гомоцистеїном.

Кваліфікація використаних в роботі реактивів та препаратів: D,L-гомоцистеїн, D,L-метіонін, L-цистеїн, NAHS, $Na_2S \cdot 9H_2O$, дітіотреітол, D,L-пропаргілгілцин, реактив Елмана (DTNB), L-глутатіон відновлений, L-глутатіон окиснений (дисульфід), NADPH, АТФ, геністеїн, бетаїн, цистатіонін, кверцетин (Sigma, США), тіолактон D,L-гомоцистеїну, α-кетоглутарат, піридоксальфосфат, N,N-диметил-пара-фенілендіамін сульфат,

аденозин (Fluka, Німеччина). Інші реактиви були вітчизняного виробництва категорії х.ч.

2.7 Статистичні методи дослідження

Статистичну обробку 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 $p<0,05$.

Використані моделі та методи дослідження дозволяють об'єктивно та комплексно розкрити статеві особливості обміну гомоцистеїну, цистеїну і гідроген сульфіду, оцінити їх зв'язок зі станом серцево-судинної системи в нормі та при гіпергомоцистеїнемії, і на цій основі оптимізувати підходи до корекції кардіоваскулярної патології, асоційованої з розладами метаболізму сірковмісних амінокислот.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях [30, 31, 399, 400].

РОЗДІЛ 3
РІВЕНЬ СІРКОВМІСНИХ МЕТАБОЛІТІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ Й АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ ОБМІНУ СІРКОВМІСНИХ АМІНОКИСЛОТ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ОБОХ СТАТЕЙ: ЗВ'ЯЗОК З РІВНЕМ СТАТЕВИХ ГОРМОНІВ

В літературі існують дані щодо наявності статевих відмінностей рівня цистеїну та гомоцистеїну в крові [5]. Показано, що у здорових дорослих жінок вміст цих сірковмісних амінокислот у сироватці крові статистично вірогідно менший, ніж у чоловіків того ж віку. В процесі старіння рівень гомоцистеїну зростає в осіб обох статей, однак вектор гендерних відмінностей поступово змінює свою направленість: у жінок в період менопаузи рівень гомоцистеїну стає достовірно вищим, ніж у чоловіків того ж віку [390]. На сьогодні відомо, що важливим біологічно-активним метаболітом гомоцистеїну та цистеїну є H_2S, проте не досліджено наявність гендерних відмінностей в його вмісті у сироватці крові. Невідоме також існування статевих відмінностей активності основних шляхів синтезу та деградації гомоцистеїну, цистеїну та H_2S в печінці (основний орган метаболізму цих речовин). Це до певної міри унеможливлює розкриття основних причин гендерних відмінностей вмісту сірковмісних метаболітів у сироватці крові. Невирішеним залишається питання щодо регуляторного впливу статевих гормонів на активність основних ензиматичних шляхів метаболізму цистеїну, гомоцистеїну та H_2S у печінці та їх рівень сірковмісних у сироватці крові. Тому метою цього розділу є дослідження вмісту гомоцистеїну, цистеїну, H_2S у сироватці крові, активності основних метаболічних шляхів синтезу й утилізації цих сірковмісних речовин у печінці у щурів різної статі та з різним рівнем насиченості організму статевими гормонами. Для вирішення поставленої мети експериментальні дослідження були проведені на 60 статевозрілих тварин: 1 і 2 групи - контрольні групи

самців (n=10) і самок щурів (n=10); 3 і 4 групи - кастровані самці (тестектомія, n=10) і самки (оваріектомія, n=10); 5 та 6 групи - кастровані тварини, яким проводили замісну гормонотерапію (ЗГТ) відповідно естрадіолом (n=10) або тестостероном (n=10).

3.1 Вміст гомоцистеїну, цистеїну та гідроген сульфіду в сироватці крові щурів обох статей залежно від рівня насиченості організму статевими гормонами

З'ясувалося, що стать є одним із чинників, який визначає рівень гомоцистеїну в сироватці крові (рис. 3.1). Результати персентильного аналізу показали, що у самців медіана вмісту цієї сірковмісної амінокислоти становить 7,55 (95% CI 7,15-8,23) мкмоль/л, P_{25}-P_{75} - 7,38-8,04 мкмоль/л. У самок щурів вміст гомоцистеїну на 18,5% менший, ніж у самців, медіана становить 6,08 (95% CI 5,81-6,84) мкмоль/л, P_{25}-P_{75} – 6,04-6,53 мкмоль/л.

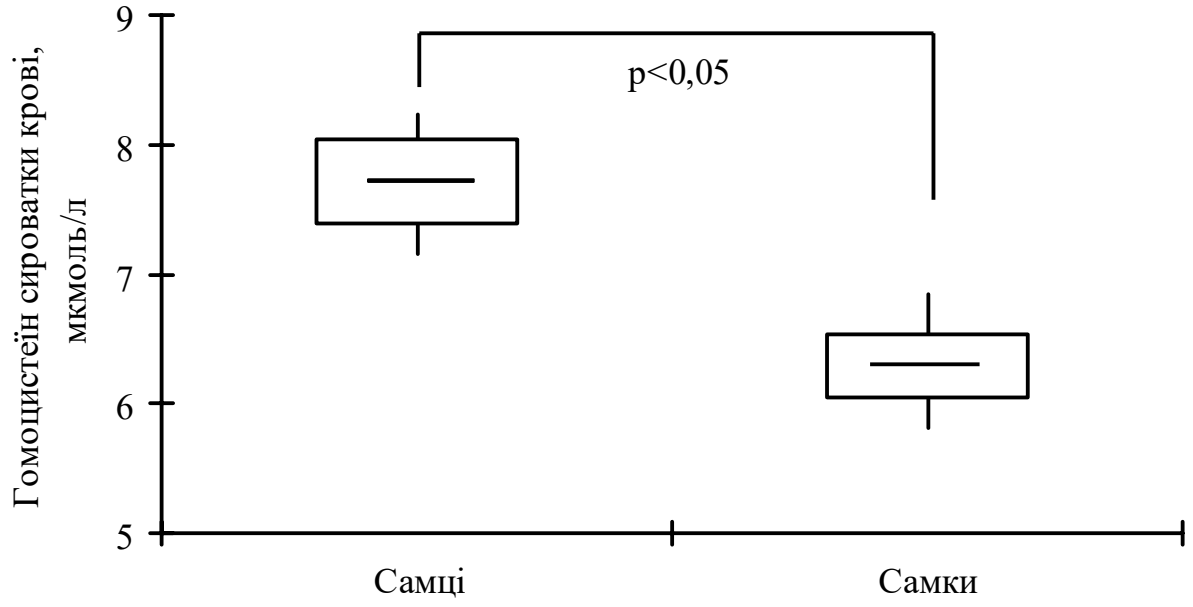


Рис. 3.1. Вміст гомоцистеїну в сироватці крові щурів різної статі (M±m, n=10). Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Кастрація тварин чинила різноспрямований вплив на рівень гомоцистеїну в сироватці крові тварин обох статей (рис. 3.2). Гонадектомія самців супроводжувалася вірогідним зменшенням рівня гомоцистеїну в крові на 13,9% ($p<0,05$), медіана становила 6,57 (95% CI 6,10-7,11) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в діапазоні 6,42-6,82 мкмоль/л. Натомість, овариектомія самок спричиняла статистично достовірне зростання рівня гомоцистеїну в сироватці крові на 16,9% ($p<0,05$), медіана становила 7,29 (95% CI 6,80-7,91) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився у діапазоні 6,86-7,69 мкмоль/л. За цих умов змінюється вектор статевих відмінностей рівня гомоцистеїну в сироватці крові щурів обох статей: у самок щурів вміст цієї амінокислоти стає достовірно вищим на 10,6% ($p<0,05$), ніж у самців.

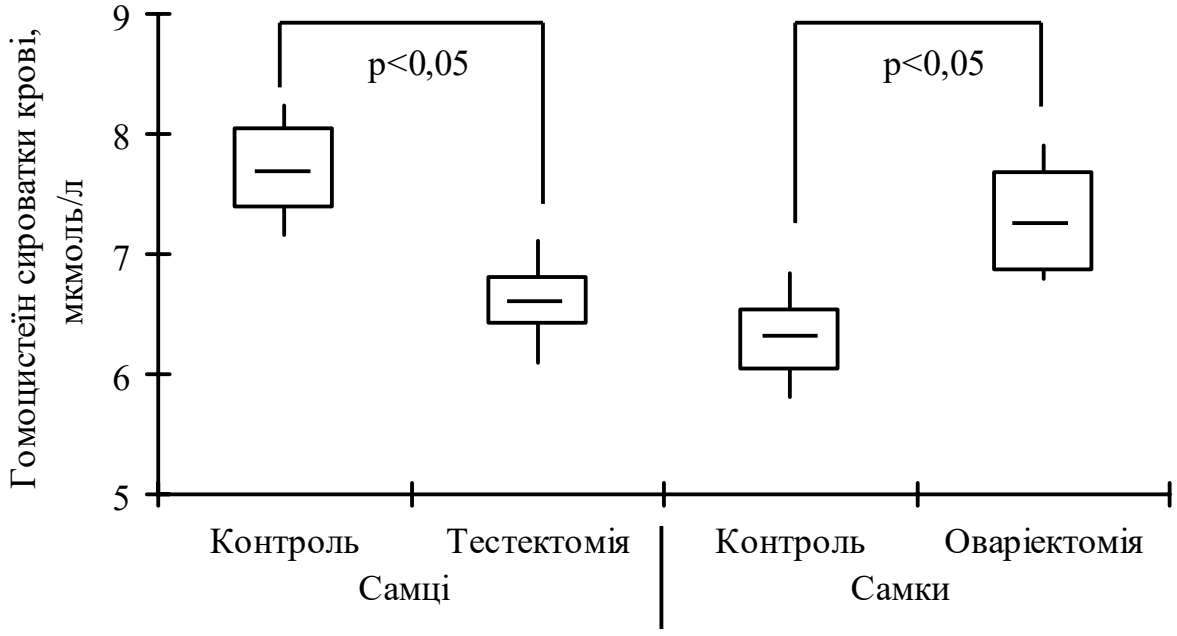


Рис. 3.2. Вплив кастрації щурів різної статі на вміст гомоцистеїну в сироватці крові щурів різної статі (M±m, n=10). Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Проведення замісної гормонотерапії кастрованим тваринам відповідно естрадіолом і тестостероном повертало вектор статевих відмінностей рівня гомоцистеїну в сироватці крові до рівня контрольної групи тварин (рис. 3.3). Замісна терапія кастрованих самців тестостероном спричиняла достовірне зростання її рівня в сироватці крові на 14,9% ($p<0,05$), порівняно з кастрованими самцями, медіана становила 7,58 (95% CI 6,95-8,10) мкмоль/л, P_{25}-P_{75} знаходився в діапазоні 7,32-8,03 мкмоль/л. В той же час введення естрадіолу кастрованим самкам супроводжувалося достовірним зменшенням вмісту гомоцистеїну в сироватці крові на 13,5% ($p<0,05$), порівняно з кастрованими самками, медіана становила 6,33 (95% CI 5,84-6,79) мкмоль/л, P_{25}-P_{75} знаходився в діапазоні 6,15-6,47 мкмоль/л. У самців рівень цього показника на 16,7% вищий ($p<0,05$), ніж у самок, що наближається до контролю.

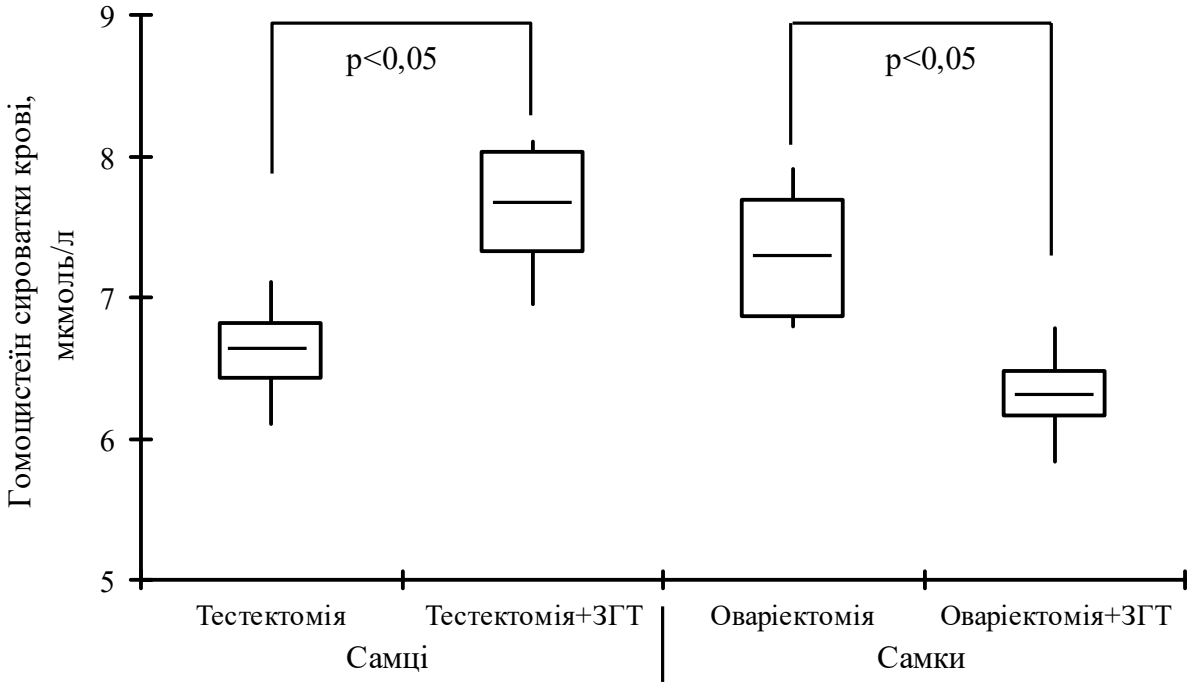


Рис. 3.3. Вплив замісної гормонотерапії кастрованих тварин на вміст гомоцистеїну в сироватці крові щурів різної статі (M±m, n=10). Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Встановлено, що рівень цистеїну в сироватці крові також до певної міри залежить від статі (рис. 3.4). Так, у самців контрольних щурів вміст цієї амінокислоти в сироватці крові достовірно вищий на 22,0%, ніж у контрольних самок. Результати персентильного аналізу засвідчили, що у контрольних самців медіана вмісту цистеїну становить 142 (95% CI 127-153) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходиться в діапазоні 135-147 мкмоль/л. У контрольних самок щурів медіана вмісту цистеїну становить 112 (95% CI 97,7-121) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходиться в діапазоні 104-115 мкмоль/л.

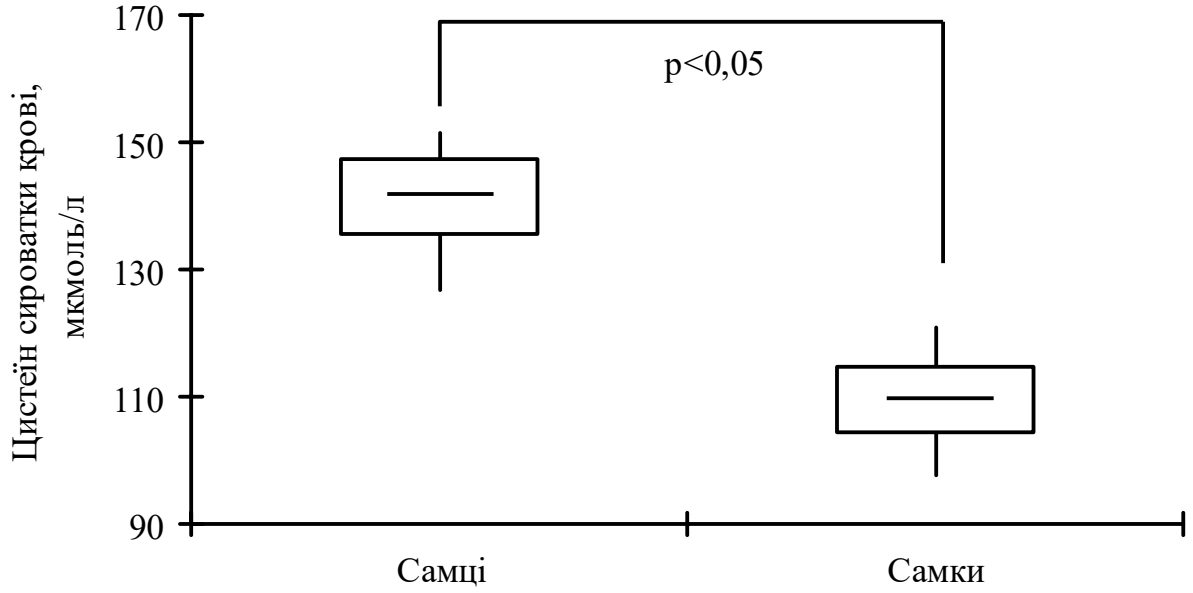


Рис. 3.4. Вміст цистеїну в сироватці крові щурів різної статі (M±m, n=10). Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Кастрація тварин чинила різноспрямований вплив на рівень цистеїну в сироватці крові тварин обох статей (рис. 3.5). Гонадектомія самців супроводжувалася вірогідним зменшенням рівня цистеїну в сироватці крові на 15,6% (p<0,05), порівняно з контрольними самцями, медіана становила 118 (95% CI 105-133) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився у діапазоні 115-126 мкмоль/л. В той же час оваріектомія самок

спричиняла статистично достовірне зростання рівня цистеїну в сироватці крові на 22,7% ($p<0,05$), медіана становила 136 (95% CI 120-147) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в діапазоні 129-144 мкмоль/л. За цих умов змінюється вектор статевих відмінностей рівня цистеїну в сироватці крові щурів, порівняно з таким у контрольних тварин: у кастрованих самок щурів його вміст стає достовірно вищим на 13,5% ($p<0,05$), ніж у кастрованих самців.

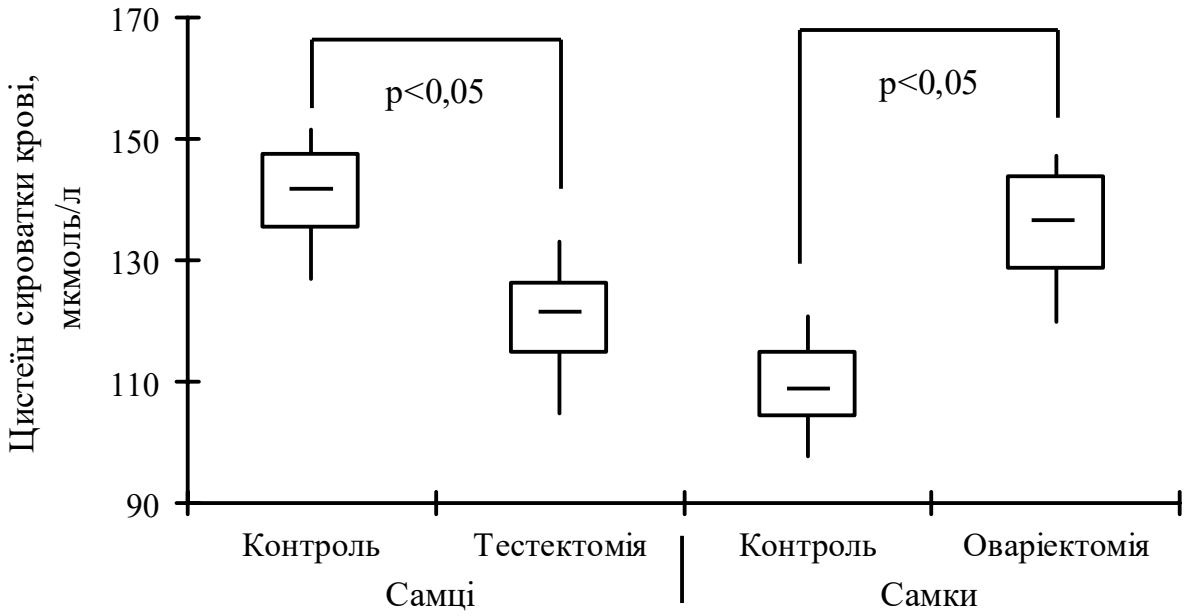


Рис. 3.5. Вплив кастрації щурів різної статі на вміст цистеїну в сироватці крові щурів різної статі (M±m, n=10). Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів - P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Замісна гормонотерапія кастрованих тварин естрадіолом і тестостероном повертала вектор статевих відмінностей рівня цистеїну в сироватці крові до контролю (рис. 3.6). Так, замісна терапія кастрованих самців тестостероном спричиняла достовірне зростання рівня цієї амінокислоти в сироватці крові на 15,1% ($p<0,05$), порівняно з кастрованими самцями, медіана становила 139 (95% CI 125-150) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в діапазоні 128-144 мкмоль/л. В

той же час введення естрадіолу кастрованим самкам спричиняло достовірне зменшенням вмісту цистеїну в сироватці крові на 16,3% ($p<0,05$), порівняно з кастрованими самками, медіана становила 114 (95% CI 100-126) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в діапазоні 106-119 мкмоль/л. За цих умов у самців рівень цистеїну в сироватці крові був на 16,7% вищим ($p<0,05$), ніж у самок, характер статевих відмінностей наближався до такого у контрольних тварин.

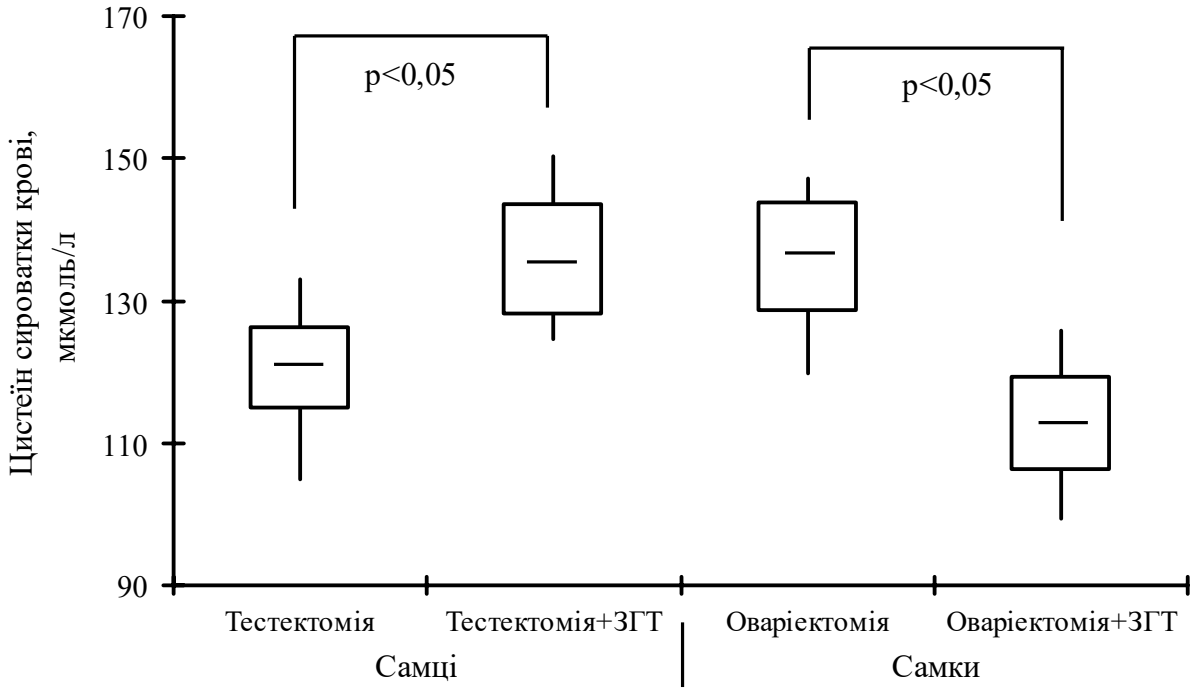


Рис. 3.6. Вплив замісної гормонотерапії кастрованих тварин на вміст цистеїну в сироватці крові щурів різної статі (M±m, n=10). Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Дослідження рівня H_2S у сироватці крові щурів показало, що у тварин обох статей цей показник має статистично вірогідні відмінності (рис. 3.7). Виявилося, що у самок контрольних тварин вміст H_2S в крові на 20,5% вищий ($p<0,05$), ніж у самців. Проведення персентильного аналізу показало, що у самців щурів медіана рівня H_2S становила 76,7 (95% CI 69,4-91,8) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в діапазоні 73,0-82,6 мкмоль/л. У самок контрольних щурів медіана становила 94,6 (95% CI

81,8-108) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився у діапазоні 90,2-99,3 мкмоль/л.

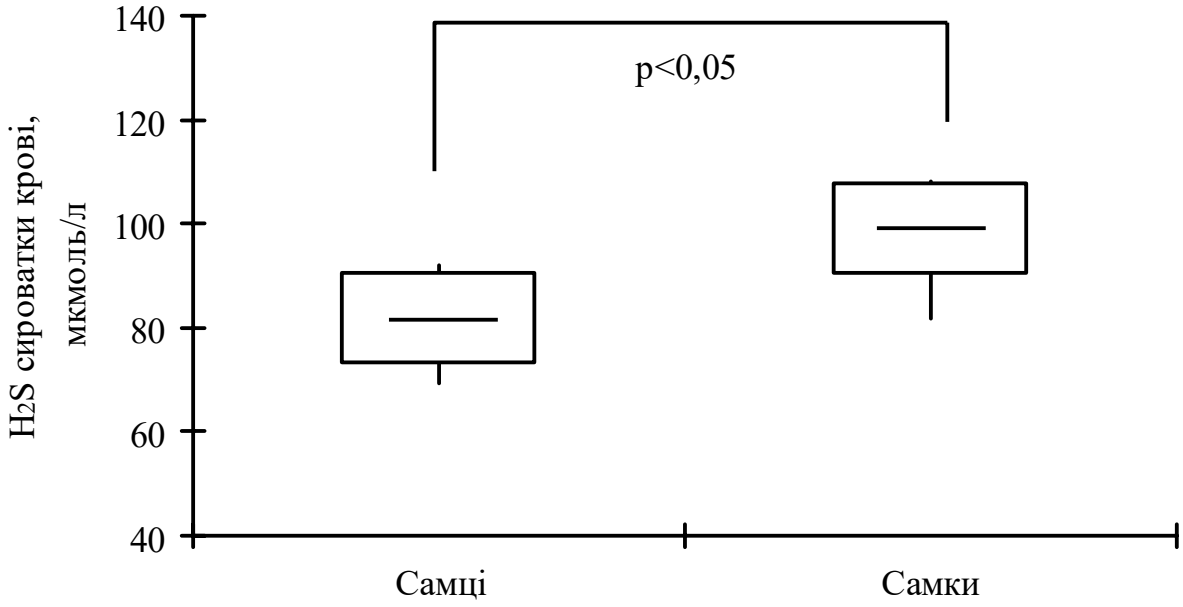


Рис. 3.7. Вміст H_2S в сироватці крові щурів різної статі (M±m, n=10). Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Кастрація самців і самок щурів чинила різноспрямований вплив на рівень H_2S у сироватці крові (рис. 3.8). Тестектомія самців супроводжувалася вірогідним збільшенням рівня H_2S у сироватці крові на 33,8% ($p<0,05$), порівняно з контрольними самцями, медіана становила 105 (95% CI 91,4-118) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в діапазоні 97,8-113 мкмоль/л. Водночас оваріектомія самок спричиняла статистично достовірне зменшення рівня H_2S у сироватці крові на 23,4% ($p<0,05$), медіана становила 72,5 (95% CI 63,6-84,1) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився у діапазоні 66,9-74,3 мкмоль/л. За цих умов змінюється вектор статевих відмінностей рівня H_2S у сироватці крові щурів, порівняно з контрольними тваринами: у кастрованих самок щурів вміст цього сірковмісного газотрансміттера стає достовірно меншим на 31,0% ($p<0,05$), ніж у кастрованих самців.

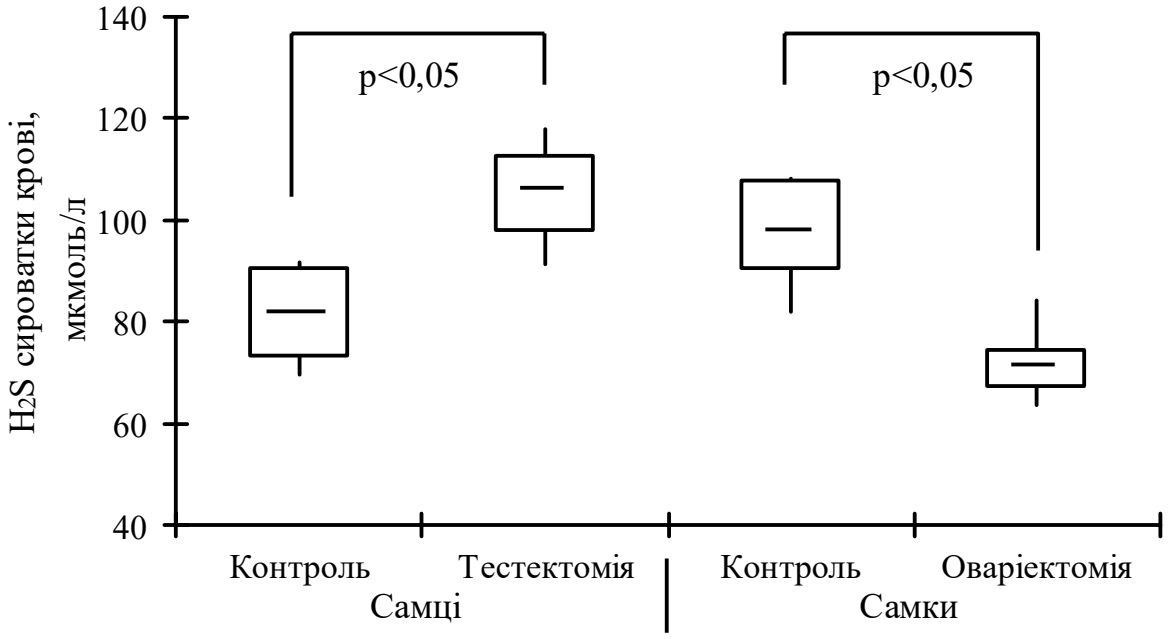


Рис. 3.8. Вплив кастрації щурів різної статі на вміст H_2S в сироватці крові щурів різної статі (M±m, n=10). Верхня і нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Замісна гормонотерапія у кастрованих тварин естрадіолом та тестостероном повертало вектор статевих відмінностей рівня H_2S у сироватці крові до рівня контрольних тварин (рис. 3.9). Замісна терапія кастрованим самцям тестостероном спричиняла достовірне зменшення рівня цього сірковмісного метаболіту в сироватці крові на 23,6% ($p<0,05$), порівняно з кастрованими самцями, медіана становила 78,7 (95% CI 69,8-91,7) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в діапазоні 75,9-85,4 мкмоль/л. В той же час введення естрадіолу кастрованим самкам спричиняло достовірне зростання вмісту H_2S у сироватці крові на 24,8% ($p<0,05$), порівняно з кастрованими самками, медіана становила 90,0 (95% CI 79,7-102) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в діапазоні 84,5-97,3 мкмоль/л. За цих умов у самок рівень H_2S в сироватці крові був вищим на 12,8% ($p<0,05$), ніж у самців, характер статевих відмінностей наближався до контрольних тварин.

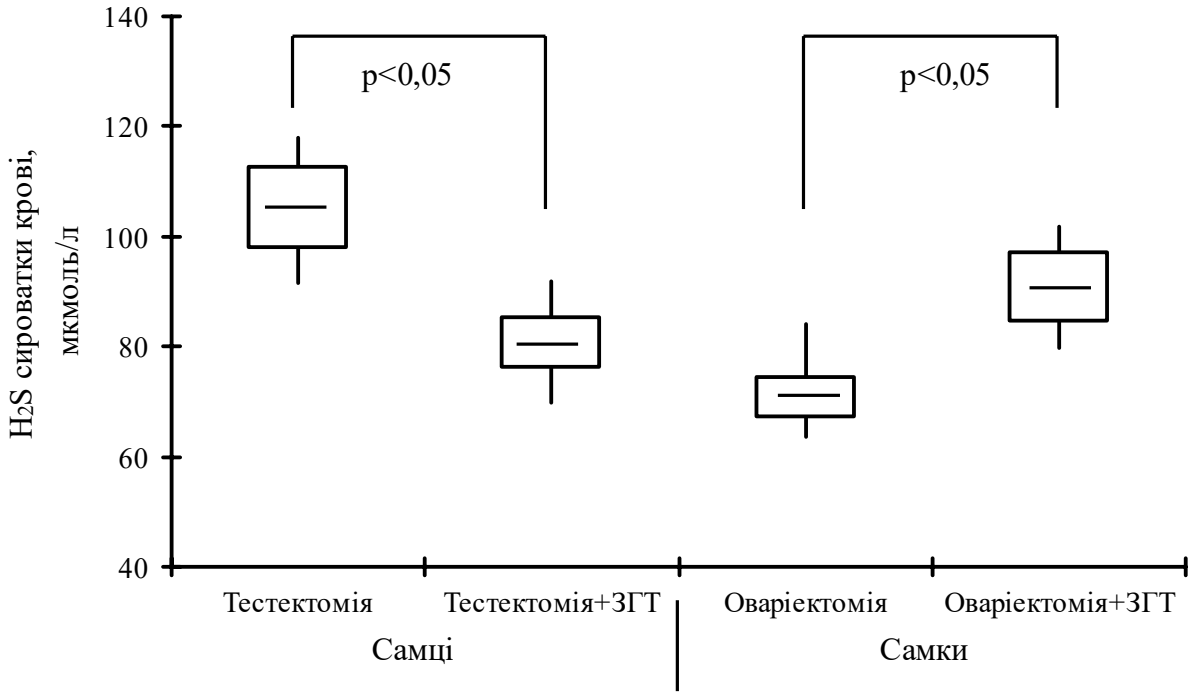


Рис. 3.9. Вплив замісної гормонотерапії кастрованих тварин на вміст H_2S в сироватці крові щурів різної статі (M±m, n=10). Верхня і нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Проведений кореляційний аналіз (табл. 3.1) показав, що між рівнем статевих гормонів і вмістом сірковмісних метаболітів існують статистично вірогідні зв’язки.

Таблиця 3.1

Кореляційний аналіз між рівнем сірковмісних метаболітів і вмістом статевих гормонів у крові щурів (n=60)

Вміст сірковмісних метаболітів в сироватці крові	Вміст статевих гормонів в плазмі крові	
	Тестостерон	Естрадіол
Гомоцистеїн	0,41*	-0,47*
Цистеїн	0,44*	-0,52*
H_2S	-0,52*	0,61*

Примітка. * - достовірність коефіцієнту кореляції при r≥0,36 (p<0,05).

Так, рівень тестостерону в крові виявляє прямий кореляційний зв'язок з вмістом у крові гомоцистеїну та цистеїну й обернений з H_2S. Натомість, рівень естрадіолу в крові виявляє прямий кореляційний зв'язок з вмістом у крові H_2S та обернений з вмістом гомоцистеїну та цистеїну. Найбільш міцні кореляційні зв'язки виникали між рівнем у крові статевих гормонів та H_2S.

Персентильний аналіз засвідчив, що рівень сірковмісних метаболітів у сироватці крові самців до певної міри детермінується рівнем тестостерону в крові (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Персентильний аналіз рівня сірковмісних метаболітів залежно від вмісту тестостерону в плазмі крові самців щурів

Вміст сірковмісних метаболітів в сироватці крові, мкмоль/л	Рівень тестостерону в плазмі крові самців, нг/дл		
	0-25 персентиль n=8	25-75 персентиль n=14	75-100 персентиль n=8
	1 група	2 група	3 група
	6,04±0,68	77,6±8,34*	129±5,82*#
Гомоцистеїн	6,52±0,12	7,33±0,11*	8,17±0,13*#
Цистеїн	118±3,57	134±2,52*	151±2,24*#
H_2S	103±3,66	87,5±3,30*	74,8±2,29*#

Примітки: 1. * - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників 1 групи;

2. # - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників 2 групи.

За низьких концентрацій тестостерону в крові (1 група) відмічається найменший вміст у сироватці крові рівня гомоцистеїну та цистеїну й найвищий H_2S. Зростання рівня тестостерону в 12,9 разів (2 група) супроводжується збільшенням вмісту в сироватці крові гомоцистеїну на

12,4%, ($p<0,05$), цистеїну на 13,6% ($p<0,05$) та зменшенням H_2S на 15,1% ($p<0,05$). За високих концентрацій тестостерону (3 група) відмічаються найбільші рівні гомоцистеїну та цистеїну, та мінімальний вміст H_2S у сироватці крові. Показники сірковмісних метаболітів у 3 групі достовірно відрізняються від аналогічних у 2 групі. Таким чином, зростання рівня тестостерону в крові асоціюється зі зростанням вмісту гомоцистеїну й цистеїну та зменшенням H_2S у сироватці крові.

Рівень естрадіолу в крові самок щурів теж до певної міри визначає вміст сірковмісних речовин у сироватці крові (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Персентильний аналіз рівня сірковмісних метаболітів залежно від вмісту естрадіолу в плазмі крові самок щурів

Вміст сірковмісних метаболітів у сироватці крові, мкмоль/л	Рівень естрадіолу в плазмі крові самок, нг/дл		
	0-25 персентиль n=8	25-75 персентиль n=14	75-100 персентиль n=8
	1 група	2 група	3 група
	0,70±0,01	4,55±0,43*	6,08±0,17$^{*\#}$
Гомоцистеїн	7,22±0,18	6,42±0,16*	5,56±0,0,34$^{*\#}$
Цистеїн	133±3,63	118±4,21*	102±4,00$^{*\#}$
H_2S	70,9±2,49	84,6±2,37*	98,5±3,38$^{*\#}$

Примітки: 1. * - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників 1 групи;

2. $^{\#}$ - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників 2 групи.

За низьких концентрацій естрадіолу в крові (1 група) відмічається найменший вміст у сироватці крові рівня H_2S і найвищий - гомоцистеїну та цистеїну. Зростання рівня естрадіолу в 6,5 разів (2 група) супроводжується зменшенням вмісту в сироватці крові гомоцистеїну на 11,1% ($p<0,05$),

цистеїну на 11,3% ($p<0,05$) та збільшенням рівня H_2S на 19,3% ($p<0,05$). За високих концентрацій естрадіолу (3 група) відмічаються найменші рівні гомоцистеїну та цистеїну і найбільший H_2S у сироватці крові, причому ці показники достовірно відрізняються від таких у 2 групі. Таким чином, зростання рівня естрадіолу в крові асоціюється зі зменшенням вмісту гомоцистеїну й цистеїну та збільшенням H_2S у сироватці крові.

Проведені дослідження показали, що у контрольної групи самців щурів рівень гомоцистеїну та цистеїну у сироватці крові є достовірно вищим, а вміст H_2S вірогідно нижчим, порівняно з контрольною групою самок. Кастрація самців спричиняє достовірне зменшення в крові рівня гомоцистеїну, цистеїну та збільшення вмісту H_2S. Натомість кастрація самок щурів чинить протилежний вплив на рівень досліджуваних сірковмісних речовин у крові: вміст гомоцистеїну та цистеїну достовірно зростає, а рівень H_2S знижується. За цих умов змінюється вектор статевих відмінностей вмісту досліджуваних сірковмісних речовин у крові, порівняно з контрольними тваринами. Замісна гормонотерапія у кастрованих тварин змінює направленість статевих відмінностей вмісту гомоцистеїну, цистеїну та H_2S до такого у контрольних тварин. Проведені кореляційний та персентильний аналізи показали, що рівень статевих гормонів є важливим чинником, який детермінує вміст сірковмісних амінокислот і H_2S в крові. Так, з високим рівнем естрадіолу асоціюється низький вміст у крові гомоцистеїну, цистеїну та високий H_2S. Натомість, високий рівень тестостерону супряжений з високим рівнем гомоцистеїну та цистеїну, а також з низьким вмістом H_2S.

3.2 Дослідження активності ензимів метаболізму гомоцистеїну, цистеїну та гідроген сульфіду у печінці щурів обох статей

Встановлено, що в печінці щурів обох статей виявляються статеві відмінності активності ферментів циклу метилування (рис. 3.10). Спершу ми оцінили активність у печінці бетаїнгомоцистеїнметилтрансферази (БГМТ,

каталізує синтез метіоніну з гомоцистеїну за участю бетаїну). Виявилося, що у самок щурів активність цього ферменту достовірно вища (на 23,3%, p<0,05), порівняно з самцями. Результати персентильного аналізу засвідчили, що в печінці самців медіанна активність БГМТ становить 3,56 (95% CI 3,31-3,78) нмоль/хв·мг протеїну, а у самок - 4,38 (95% CI 4,03-4,74) нмоль/хв·мг протеїну. Дослідження активності метіонінаденозилтрансферази (МАТ, каталізує активацію метіоніну до S-аденозилметіоніну) показало, що у самок вона статистично вірогідно більша на 21,5%, порівняно з самцями. За даними персентильного аналізу в печінці самців медіанна активність МАТ становить 2,75 (95% CI 2,25-3,12) нмоль/хв·мг протеїну, а у самок - 3,28 (95% CI 2,62-3,82) нмоль/хв·мг протеїну. Статеві відмінності виявлені також в активності S-аденозилгомоцистеїнгідролази (S-АГГ, каталізує синтез S-аденозилгомоцистеїну з гомоцистеїну та аденозину). Активність цього ферменту у самок щурів на 17,9% більша (p<0,05), ніж у самців. Медіанна активність S-АГГ у печінці самців щурів становить 3,52 (95% CI 2,99-4,04) нмоль/хв·мг протеїну, а у самок - 4,11 (95% CI 3,54-4,74) нмоль/хв·мг протеїну. Отримані дані свідчать, що в печінці самок щурів швидкість утилізації гомоцистеїну в циклі метилування достовірно вища, ніж у самців.

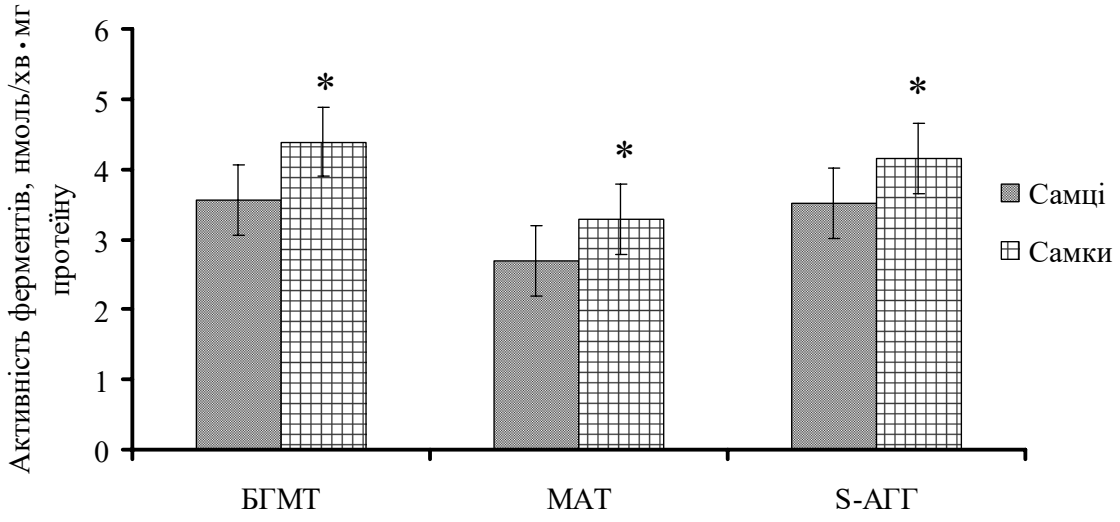


Рис. 3.10. Активність ферментів циклу метилування гомоцистеїну в печінці щурів різної статі (M±m, n=10). * - p<0,05 між показниками тварин обох статей.

Гендерні відмінності реєструються також в активності ензимів транссульфування гомоцистеїну в печінці щурів (рис. 3.11). Виявилось, що активність печінкової цистатіонін-β-синтази (ЦБС, каталізує синтез цистатіоніну конденсацією гомоцистеїну та серину) достовірно вища на 25,0% у самок щурів, порівняно з самцями. Медіанна активність ЦБС у печінці самців щурів становить 15,0 (95% CI 11,4-18,2) нмоль/хв·мг протеїну, а у самок - 18,1 (95% CI 15,2-21,9) нмоль/хв·мг протеїну.

Дослідження активності печінкової цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ, каталізує гідролітичне розщеплення цистатіоніну з утворенням цистеїну) показало, що у самок щурів вона статистично достовірно вища на 28,0%, ніж у самців. Медіанна активність ЦГЛ в печінці самців щурів становить 15,7 (95% CI 14,4-17,0) нмоль/хв·мг протеїну, а у самок - 20,0 (95% CI 19,2-21,1) нмоль/хв·мг протеїну. Отже, в печінці самок швидкість утилізації гомоцистеїну в шляху транссульфування вища, ніж у самців.

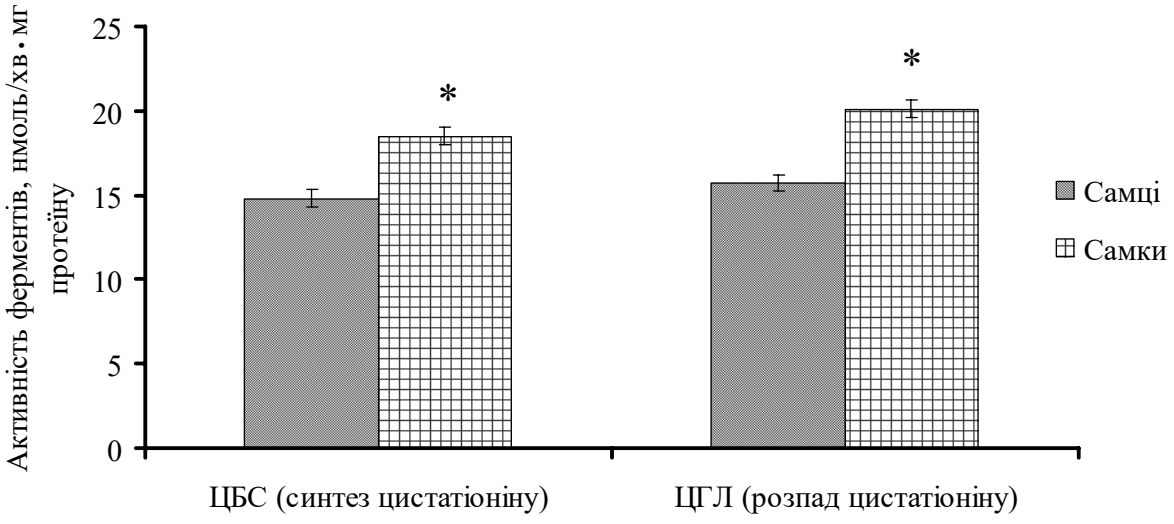


Рис. 3.11. Активність ферментів транссульфування гомоцистеїну в печінці щурів різної статі (M±m, n=10). * - $p<0,05$ між показниками тварин обох статей.

В наступній частині нашої роботи ми оцінили наявність статевих відмінностей в ензиматичних шляхах утилізації цистеїну. Дослідження

активності цистеїндиоксигенази (ЦДО, каталізує окиснення цистеїну з утворенням цистеїнсульфінату) показало, що в печінці самок щурів вона достовірно вища на 31,1%, ніж у самців (рис. 3.12). За даними персентильного аналізу медіанна активність ЦДО в печінці самців щурів становить 2,35 (95% CI 1,86-2,58) мкмоль/хв·мг протеїну, а у самок - 2,95 (95% CI 2,44-3,57) мкмоль/хв·мг протеїну.

Статеві відмінності виявляються також в кон'югаційному шляху утилізації цистеїну. Так, активність печінкової γ-глутамілцистеїнлігази (γ-ГЦЛ, каталізує кон'югацію цистеїну з глутаматом) у самок щурів вірогідно вища на 23,6%, порівняно з самцями. Медіанна активність γ-ГЦЛ у печінці самців щурів становить 3,59 (95% CI 2,89-4,31) нмоль/хв·мг протеїну, а у самок - 4,64 (95% CI 3,62-5,25) нмоль/хв·мг протеїну.

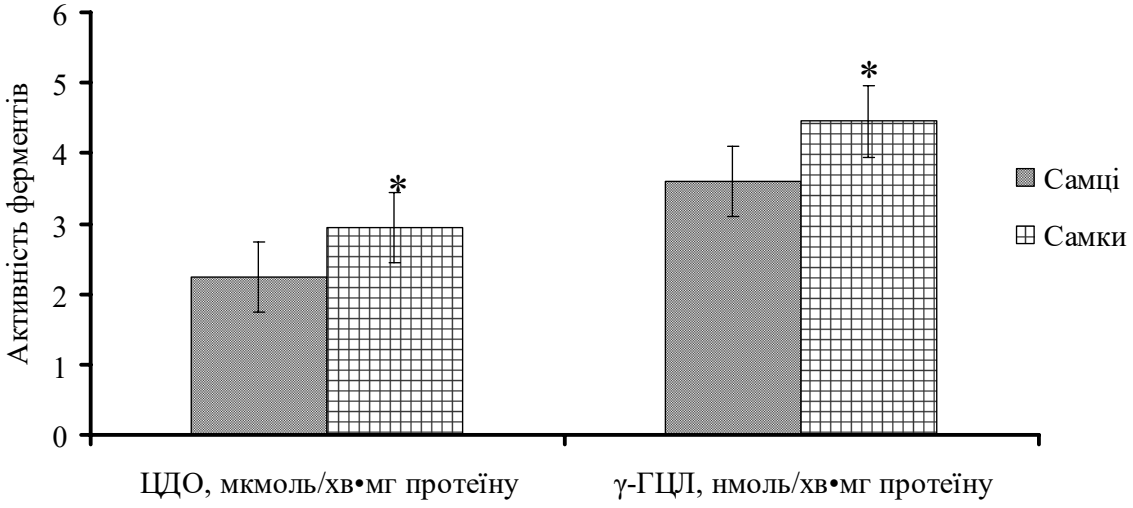


Рис. 3.12. Активність ферментів окисного та кон'югаційного шляхів метаболізму цистеїну в печінці щурів різної статі (M±m, n=10). * - $p<0,05$ між показниками тварин обох статей; # - активність ферменту виражається в мкмоль/хв. на 1 мг протеїну.

Проведені дослідження виявили гендерні відмінності у десульфуразному шляху утилізації цистеїну, який є джерелом важливої біологічно активної молекули – H_2S (рис. 3.13). Виявилося, що

десульфуразна активність цистатіонін-β-синтази (ЦБС, каталізує синтез H_2S конденсацією цистеїну з гомоцистеїном) у печінці самок щурів достовірно вища на 24,7%, ніж у контрольних самців. За даними персентильного аналізу в печінці самців медіанна активність ЦБС становить 3,12 (95% CI 2,37-4,01) нмоль H_2S/хв·мг протеїну, а у самок – 3,91 (95% CI 2,91-4,77) нмоль H_2S/хв·мг протеїну. Нами зафіксовані також статеві відмінності в десульфуразній активності цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ, каталізує розщеплення цистеїну з утворенням H_2S) та цистеїнамінотрансферази (ЦАТ, каталізує утворення H_2S в реакції трансамінування цистеїну). У самок щурів десульфуразна активність ЦГЛ і ЦАТ у печінці статистично вірогідно більша на 26,2 та 25,9% відповідно ($p<0,05$), ніж у самців.

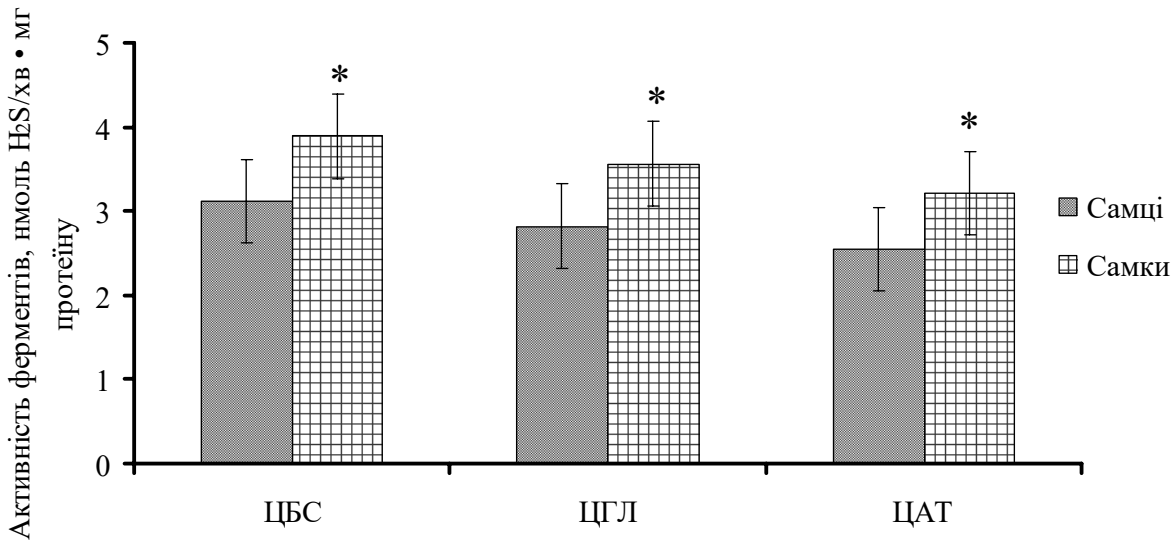


Рис. 3.13. Активність ферментів десульфуразного шляху метаболізму цистеїну в печінці щурів різної статі (M±m, n=10). * - $p<0,05$ між показниками тварин обох статей.

Таким чином виявлено, що в печінці контрольної групи тварин існують гендерні відмінності активності ензимів обміну гомоцистеїну, цистеїну та H_2S. У самок контрольних щурів швидкість утилізації гомоцистеїну в шляхах метилування (БГМТ, МАТ та S-АГГ) та транссульфування (цистатіоніінсинтазна активність ЦБС, цистатіоназна

активність ЦГЛ), а також активність деградації цистеїну в окисному (ЦДО), кон'югаційному (γ-ГЦЛ) та десульфуразному шляхах (утворення H_2S за участі ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ) є достовірно більшою, ніж у самців. Отримані дані, до певної міри, можуть пояснити причину достовірно меншого рівня гомоцистеїну, цистеїну та вірогідно більшого рівня H_2S у самок щурів, порівняно з самцями.

3.3 Вплив кастрації та замісної гормонотерапії на метаболізм гомоцистеїну, цистеїну та гідроген сульфіду в печінці щурів обох статей

Спочатку ми оцінили вплив змін гормонального статусу на активність ензимів циклу метилування гомоцистеїну в печінці щурів обох статей (табл. 3.4.). Виявилося, що кастрація самців супроводжується збільшенням швидкості утилізації гомоцистеїну в циклі метилування. За цих умов активність БГМТ, МАТ та S-АГГ є достовірно більшою відповідно на 18,0; 18,9 та 16,8%, порівняно з контрольними тваринами. Натомість кастрація самок щурів сповільнює утилізацію гомоцистеїну в цьому шляху: активність БГМТ, МАТ та S-АГГ в печінці виявляється достовірно меншою відповідно на 16,2; 14,6 та 13,3%, порівняно з контролем. Кастрація тварин асоціюється зі зміною вектора статевих відмінностей активності ензимів циклу метилування в печінці. Так, у кастрованих самок активність у печінці БГМТ, МАТ та S-АГГ виявляється достовірно меншою відповідно на 12,4; 12,8 та 12,4%, порівняно з кастрованими самцями. Проведення замісної гормонотерапії супроводжується різноспрямованим впливом на активність ензимів циклу метилування в печінці щурів. Введення тестостерону кастрованим самцям призвело до зменшенням активності в печінці БГМТ, МАТ та S-АГГ відповідно на 13,8; 14,6 та 12,9%, порівняно з кастрованими самцями, яким не проводили замісної гормонотерапії. Застосування естрадіолу кастрованим самкам викликає зростання активності в печінці БГМТ, МАТ та S-АГГ відповідно на 20,9; 15,4 та 15,6%, порівняно з

кастрованими самками без замісної гормонотерапії. За цих умов характер статевих відмінностей активності ферментів циклу метилування в печінці наближається до такого у контрольних тварин.

Таблиця 3.4

Вплив кастрації та замісної гормонотерапії на активність ферментів циклу метилування гомоцистеїну в печінці щурів обох статей (M±m; n=10)

Групи тварин	Активність ферментів, нмоль/хв·мг протеїну		
	БГМТ	МАТ	S-АГГ
Самці щурів			
Контроль	3,56±0,06	2,70±0,10	3,52±0,12
Кастрація	4,20±0,10*	3,21±0,11*	4,11±0,11*
Кастрація+ЗГТ	3,62±0,08$^{\#}$	2,74±0,15$^{\#}$	3,58±0,13$^{\#}$
Самки щурів			
Контроль	4,39±0,09	3,28±0,13	4,15±0,14
Кастрація	3,68±0,07*	2,80±0,14*	3,60±0,13*
Кастрація+ЗГТ	4,45±0,05$^{\#}$	3,23±0,12$^{\#}$	4,16±0,12$^{\#}$

Примітки: 1. * - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно контролю;

2. $^{\#}$ - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно групи кастрованих тварин.

Потім ми оцінили вплив різної насиченості організму тварин статевими гормонами на активність ензимів шляху транссульфування гомоцистеїну в печінці щурів обох статей (табл. 3.5). Виявилося, що кастрація самців супроводжується збільшенням швидкості утилізації гомоцистеїну в шляху транссульфування: активність ЦБС та ЦГЛ у печінці виявляється достовірно більшою відповідно на 20,3 та 22,9%, порівняно з контрольними тваринами. Натомість кастрація самок щурів сповільнює перетворення гомоцистеїну до цистеїну: активність ЦБС та ЦГЛ у печінці виявляється достовірно меншою відповідно на 16,8 та 18,4%, порівняно з контрольними тваринами. Кастрація тварин асоціюється зі зміною вектора

статевих відмінностей активності ензимів транссульфування в печінці. Так, у кастрованих самок активність у печінці ЦБС та ЦГЛ виявляється достовірно меншою відповідно на 13,5 та 15,0%, порівняно з кастрованими самцями. Проведення замісної гормонотерапії виявляє різноспрямований вплив на активність ензимів транссульфування в печінці щурів. Введення тестостерону кастрованим самцям супроводжується зменшенням активності в печінці ЦБС та ЦГЛ відповідно на 14,6 та 16,1%, порівняно з самцями, яким не проводили замісної гормонотерапії. Застосування естрадіолу кастрованим самкам викликає зростання активності в печінці ЦБС та ЦГЛ відповідно на 17,5 та 18,9%, порівняно з самками, яким не проводили замісної гормонотерапії. За цих умов характер статевих відмінностей активності ферментів транссульфування в печінці наближається до такого у контрольних тварин.

Таблиця 3.5

Вплив кастрації та замісної гормонотерапії на активність ферментів транссульфування гомоцистеїну в печінці щурів обох статей (M±m; n=10)

Групи тварин	Активність ферментів, нмоль/хв·мг протеїну	
	ЦБС	ЦГЛ
Самці щурів		
Контроль	14,8±0,76	15,7±0,31
Кастрація	17,8±0,67*	19,3±0,30*
Кастрація+ЗГТ	15,2±0,79$^{\#}$	16,2±0,40$^{\#}$
Самки щурів		
Контроль	18,5±081	20,1±0,24
Кастрація	15,4±0,78*	16,4±0,38*
Кастрація+ЗГТ	18,1±0,85$^{\#}$	19,5±0,36$^{\#}$

Примітки: 1. * - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно контролю;

2. $^{\#}$ - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно групи кастрованих тварин.

Дослідження окисного та кон'югаційного шляхів метаболізму цистеїну в печінці показало, що їх активність також змінюється залежно від гормонального статусу тварин (табл. 3.6). Тестектомія самців асоціюється зі зростанням швидкості утилізації цистеїну цими шляхами: активність ЦДО та γ-ГЦЛ у печінці вірогідно більша відповідно на 27,6 та 25,0%, порівняно з контрольними тваринами. В той же час оваріектомія самок супроводжується протилежним впливом на активність цих ензиматичних шляхів у печінці: активність ЦДО та γ-ГЦЛ у печінці вірогідно менша відповідно на 18,6 та 22,5%, порівняно з контрольними тваринами.

Таблиця 3.6

Вплив кастрації та замісної гормонотерапії на активність ферментів окисного та кон'югаційного шляхів метаболізму цистеїну в печінці щурів обох статей (M±m; n=10)

Групи тварин	Активність ферментів	
	ЦДО, мкмоль/хв·мг протеїну	γ-ГЦЛ, нмоль/хв·мг протеїну
Самці щурів		
Контроль	2,25±0,09	3,60±0,17
Кастрація	2,87±0,15*	4,50±0,22*
Кастрація+ЗГТ	2,32±0,17$^{\#}$	3,65±0,17$^{\#}$
Самки щурів		
Контроль	2,95±0,13	4,45±0,20
Кастрація	2,40±0,14*	3,45±0,19*
Кастрація+ЗГТ	2,78±0,12$^{\#}$	4,50±0,20$^{\#}$

Примітки: 1. * - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно контролю;

2. $^{\#}$ - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно групи кастрованих тварин.

У кастрованих тварин відмічається зміна вектора статевих відмінностей активності окисного та кон'югаційного шляхів метаболізму цистеїну в печінці: активність ЦДО та γ-ГЦЛ у печінці самців щурів є вірогідно вищою відповідно на 16,4 та 23,3%, порівняно з самками. Проведення замісної гормонотерапії має різновекторний вплив на активність окисного та кон'югаційного шляхів метаболізму цистеїну в печінці щурів. Так, замісне введення тестостерону кастрованим самцям супроводжується зменшенням активності в печінці ЦДО та γ-ГЦЛ відповідно на 19,2 та 18,9%, порівняно з кастрованими самцями, яким не проводили замісної гормонотерапії. Застосування естрадіолу кастрованим самкам викликає зростання активності в печінці ЦДО та γ-ГЦЛ відповідно на 15,8 та 30,4%, порівняно з кастрованими самками, яким не проводили замісної гормонотерапії. За цих умов характер статевих відмінностей активності окисного та кон'югаційного шляхів обміну цистеїну в печінці наближається до контролю.

Дослідження активності десульфуразного шляху метаболізму цистеїну (утворення гідроген сульфіду) в печінці також виявило його залежність від рівня статевих гормонів (табл. 3.7). Кастрація самців призводить до зростання швидкості утворення H_2S з цистеїну в печінці: активність ЦБС, ЦГЛ та ЦАТ у печінці вірогідно більша відповідно на 26,6; 30,1 та 23,1%, порівняно з контрольними тваринами. В той же час кастрація самок супроводжується протилежним впливом на активність ензимів синтезу H_2S: активність ЦБС, ЦГЛ та ЦАТ у печінці вірогідно менша відповідно на 21,6; 24,2 та 19,0%, порівняно з контрольними тваринами. У кастрованих тварин відмічається зміна вектора статевих відмінностей активності десульфуразного шляху метаболізму цистеїну в печінці: активність ЦБС, ЦГЛ та ЦАТ у печінці у самців щурів є вірогідно вищою відповідно на 22,8; 26,4 та 17,2%, порівняно з самками. Проведення замісної гормонотерапії має різновекторний вплив на десульфуразний шлях метаболізму цистеїну в печінці щурів. Так, замісне введення тестостерону кастрованим самцям веде

до зменшення активності в печінці ЦБС, ЦГЛ та ЦАТ відповідно на 19,5; 22,6 та 19,8%, порівняно з кастрованими самцями, яким не проводили замісної гормонотерапії. Застосування естрадіолу кастрованим самкам супроводжується зростанням активності в печінці ЦБС, ЦГЛ та ЦАТ відповідно на 24,3; 33,3 та 25,0%, порівняно з кастрованими самками.

Таблиця 3.7

Вплив кастрації та замісної гормонотерапії на активність ферментів десульфуразного шляху метаболізму цистеїну в печінці щурів обох статей (M±m; n=10)

Групи тварин	Активність ферментів, нмоль H_2S/хв·мг протеїну		
	ЦБС	ЦГЛ	ЦАТ
Самці щурів			
Контроль	3,12±0,19	2,82±0,25	2,55±0,15
Кастрація	3,95±0,25*	3,67±0,23*	3,14±0,13*
Кастрація+ЗГТ	3,18±0,14$^{\#}$	2,84±0,19$^{\#}$	2,52±0,21$^{\#}$
Самки щурів			
Контроль	3,89±0,23	3,56±0,28	3,21±0,18
Кастрація	3,05±0,16*	2,70±0,20*	2,60±0,20*
Кастрація+ЗГТ	3,79±0,22$^{\#}$	3,60±0,21$^{\#}$	3,25±0,16$^{\#}$

Примітки: 1. * - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно контролю;

2. $^{\#}$ - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно групи кастрованих тварин.

Проведені дослідження показали, що активність основних шляхів метаболізму гомоцистеїну, цистеїну та H_2S у печінці досить чутлива до змін гормонального статусу (кастрації та замісної гормонотерапії). Встановлено, що кастрація самок супроводжується зменшенням швидкості утилізації гомоцистеїну в шляхах метилування (БГМТ, МАТ та S-АГГ),

транссульфування (цистатіонінсинтазна активність ЦБС та цистатіоназна активність ЦГЛ), а також деградації цистеїну в окисному (ЦДО), кон'югаційному (γ-ГЦЛ) та десульфуразному (утворення H_2S за участі ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ) шляхах. Натомість, кастрація самців супроводжується протилежним впливом на активність цих шляхів метаболізму сірковмісних сполук - зростає активність шляхів метилування та транссульфування гомоцистеїну, а також ферментів утилізації цистеїну і синтезу H_2S. Проведення замісної гормонотерапії кастрованим тваринам повертає активність досліджуваних шляхів метаболізму сірковмісних сполук до рівня контрольних тварин.

3.4 Зв'язок між рівнем статевих гормонів, гомоцистеїну, цистеїну та гідроген сульфіду в крові й активністю ензимів метаболізму сірковмісних амінокислот у печінці щурів обох статей

Кореляційний аналіз (табл. 3.8) виявив існування зв'язків між рівнем статевих гормонів у крові та активністю ензимів метаболізму сірковмісних амінокислот у печінці. З'ясувалося, що вміст тестостерону в крові виявляє достовірні обернені кореляційні зв'язки з активністю в печінці гомоцистеїн-метаболізуючих ензимів (БГМТ, МАТ, S-АГГ, цистатіонінсинтазною активністю ЦБС, цистатіоназною активністю ЦГЛ), ензимів обміну цистеїну та H_2S (ЦДО, γ-ГЦЛ, десульфуразною активністю ЦБС, ЦГЛ та ЦАТ). Найсильніші кореляції тестостерон виявляв з десульфуразною активністю ЦБС і ЦГЛ у печінці, а найслабші - з активністю ферментів циклу метилування. Аналогічні за силою, однак протилежні за направленістю зв'язки, виявлялись між рівнем естрадіолу в крові й активністю ферментів обміну сірковмісних амінокислот у печінці. Тобто, високий рівень естрадіолу асоціюється з високою швидкістю утилізації гомоцистеїну в реакціях метилування та транссульфування, а також з високою активністю ферментів

деградації цистеїну в окисному, кон'югаційному та десульфуразному шляхах.

Таблиця 3.8

Кореляційний аналіз між активністю ферментів обміну сірковмісних амінокислот у печінці та вмістом статевих гормонів у плазмі крові щурів (n=60)

Активність ферментів обміну сірковмісних амінокислот	Вміст статевих гормонів в сироватці крові	
	Тестостерон	Естрадіол
БГМТ	-0,38*	0,37*
МАТ	-0,38*	0,39*
S-АГГ	-0,39*	0,38*
ЦБС (цистатіонінсинтазна активність)	-0,44*	0,45*
ЦГЛ (цистатіоназна активність)	-0,46*	0,44*
ЦДО	-0,48*	0,47*
γ-ГЦЛ	-0,40*	0,42*
ЦБС (десульфуразна активність)	-0,54*	0,58*
ЦГЛ (десульфуразна активність)	-0,56*	0,61*
ЦАТ	-0,45*	0,41*

Примітка. * - достовірність коефіцієнту кореляції при $r \geq 0,36$ ($p<0,05$)

Персентильний аналіз засвідчив, що активність ферментів обміну сірковмісних амінокислот у печінці досить чутлива до змін рівня тестостерону в плазмі крові (табл. 3.9). Так, за низьких концентрацій тестостерону в крові (група 1) активність основних ензимів утилізації гомоцистеїну, цистеїну й утворення H_2S є високою. Збільшення концентрації тестостерону в крові супроводжується зменшенням швидкості утилізації сірковмісних амінокислот у печінці (активність досліджуваних ферментів у 3 групі є достовірно вищою, порівняно з аналогічними показниками 2 та 1 групами тварин).

Таблиця 3.9

Персентильний аналіз активності ферментів обміну сірковмісних амінокислот у печінці залежно від вмісту тестостерону в плазмі крові самців щурів (M±m)

Активність ферментів обміну сірковмісних амінокислот, нмоль/хв·мг протеїну	Рівень тестостерону в плазмі крові самців, нг/дл		
	0-25 персентиль n=8	25-75 персентиль n=14	75-100 персентиль n=8
	1 група	2 група	3 група
	6,04±0,68	77,6±8,34*	129±5,82*#
БГМТ	4,19±0,10	3,70±0,07*	3,32±0,09*#
МАТ	3,30±0,12	2,84±0,09*	2,50±0,13*#
S-АГГ	4,24±0,06	3,67±0,11*	3,28±0,11*#
ЦБС (цистатіонінсинтазна активність)	17,7±0,67	15,7±0,64*	13,3±0,65*#
ЦГЛ (цистатіоназна активність)	19,3±0,34	17,0±0,46*	15,2±0,39*#
ЦДО[1]	2,84±0,16	2,48±0,12*	2,02±0,13*#
γ-ГЦЛ	4,27±0,19	3,72±0,17*	3,05±0,19*#
ЦБС (десульфуразна активність)	3,89±0,24	3,40±0,19*	2,82±0,19*#
ЦГЛ (десульфуразна активність)	3,64±0,23	3,16±0,14*	2,47±0,25*#
ЦАТ	3,20±0,12	2,79±0,14*	2,27±0,19*#

Примітки: 1. * - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників 1 групи;

2. # - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників 2 групи;

3. [1] - активність ферменту виражається в мкмоль/хв·мг протеїну

З’ясувалось, що активність основних ферментних систем утилізації сірковмісних амінокислот й утворення H_2S також регулюється рівнем естрадіолу (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

Персентильний аналіз активності ферментів обміну сірковмісних амінокислот у печінці залежно від вмісту естрадіолу в плазмі крові самок

Активність ферментів обміну сірковмісних амінокислот, нмоль/хв·мг протеїну	Рівень естрадіолу в плазмі крові самок, нг/дл		
	0-25 персентиль n=8	25-75 персентиль n=14	75-100 персентиль n=8
	1 група	2 група	3 група
	0,70±0,01	4,55±0,43*	6,08±0,17*#
БГМТ	3,63±0,07	4,10±0,10*	4,59±0,05*#
МАТ	2,65±0,13	3,11±0,10*	3,55±0,08*#
S-АГГ	3,52±0,13	3,96±0,10*	4,44±0,12*#
ЦБС (цистатіонінсинтазна активність)	14,7±0,79	17,4±0,61*	19,8±0,73*#
ЦГЛ (цистатіоназна активність)	16,3±0,45	18,4±0,35*	20,6±0,26*#
ЦДО[1]	2,30±0,16	2,68±0,07*	3,17±0,13*#
γ-ГЦЛ	3,26±0,18	3,89±0,12*	4,66±0,18*#
ЦБС (десульфуразна активність)	2,94±0,17	3,60±0,17*	4,18±0,21*#
ЦГЛ (десульфуразна активність)	2,54±0,21	3,25±0,14*	4,15±0,20*#
ЦАТ	2,50±0,20	3,03±0,14*	3,51±0,16*#

Примітки: 1. * - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників 1 групи;

2. # - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників 2 групи;

3. [1] - активність ферменту виражається в мкмоль/хв. на 1 мг протеїну.

В 1 групі тварин, у яких рівень естрадіолу був найменшим, активність досліджуваних ферментів обміну сірковмісних амінокислот і H_2S також була низькою. Збільшення рівня естрадіолу в крові асоціювалося з достовірним зростанням активності досліджуваних ферментів у печінці: у 2 групі тварин активність цих ферментів у печінці була достовірно вищою, ніж у 1 групі. В той же час у 3 групі тварин, у яких рівень естрадіолу в крові був найвищим, активність досліджуваних ферментних систем також була максимальною та достовірно вищою, порівняно з такими показниками в 2 та 1 групах.

Встановлено, що рівень гомоцистеїну, цистеїну та H_2S у крові до певної міри визначається активністю основних ензимних систем їх метаболізму в печінці (табл. 3.11). Кореляційний аналіз засвідчив, що вміст гомоцистеїну в крові найбільш тісно корелює з цистатіонінсинтазною активністю ЦБС, цистатіоназною активністю ЦГЛ у печінці (обернені зв'язки), дещо менші по силі кореляції виникають з активністю БГМТ, МАТ та S-АГГ (обернені зв'язки) та найменш міцні зв'язки реєструються з десульфуразною активністю ЦБС, ЦГЛ та ЦАТ (обернені зв'язки). За цих умов не виявлено вірогідних кореляцій між рівнем гомоцистеїну в крові й активністю ЦДО та γ-ГЦЛ у печінці. Виявлені кореляційні зв'язки були більш сильними у самців, ніж у самок.

Рівень цистеїну в крові найбільш сильно корелював з активністю ЦДО та γ-ГЦЛ (обернені зв'язки) в печінці, дещо менші за силою кореляційні зв'язки виникали з цистатіоназною активністю ЦГЛ та цистатіонінсинтазною активністю ЦБС (прямі зв'язки), найбільш слабкі кореляції зафіксовані з десульфуразною активністю ЦБС, ЦГЛ та ЦАТ (обернені зв'язки). Натомість, між вмістом цистеїну в крові й активністю ферментів метаболізму гомоцистеїну в печінці (БГМТ, МАТ та S-АГГ) не виявлено вірогідних кореляцій. Вказані асоціативні зв'язки переважали в особин чоловічої статі.

Вміст H_2S у сироватці крові виявляє прямі кореляційні зв'язки з десульфуразною активністю в печінці ЦБС, ЦГЛ та ЦАТ, тоді як з активністю ферментів метаболізму гомоцистеїну (БГМТ, МАТ та S-АГГ) та

цистеїну (ЦДО та γ-ГЦЛ) достовірних кореляцій не виявлено. Кореляції H_2S з досліджуваними ензимами були більш сильними у самок щурів, ніж у самців.

Таблиця 3.11

Кореляційний аналіз між активністю ферментів обміну сірковмісних амінокислот у печінці та вмістом сірковмісних метаболітів у сироватці крові щурів (n=60)

Активність ферментів	Гомоцистеїн		Цистеїн		H_2S	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
БГМТ	-0,45*	-0,54*	-0,21	-0,20	0,15	0,16
МАТ	-0,49*	-0,55*	-0,20	-0,18	-0,24	-0,22
S-АГГ	-0,45*	-0,55*	-0,18	-0,24	0,18	0,20
ЦБС (цистатіонінсинтазна активність)	-0,58*	-0,66*	0,49*	0,55*	-0,15	-0,20
ЦГЛ (цистатіоназна активність)	-0,56*	-0,65*	0,48*	0,56*	-0,15	-0,18
ЦДО[1]	-0,12	-0,13	-0,56*	-0,67*	0,21	0,18
γ-ГЦЛ	-0,16	-0,14	-0,58*	-0,65*	0,22	0,19
ЦБС (десульфуразна активність)	-0,42*	-0,49*	-0,38*	-0,49*	0,68*	0,56*
ЦГЛ (десульфуразна активність)	-0,44*	-0,48*	-0,40*	-0,48*	0,64*	0,52*
ЦАТ	-0,40*	-0,46*	-0,37*	-0,44*	0,59*	0,50*

Примітки: 1. * - достовірність коефіцієнту кореляції при $r \geq 0,36$ ($p<0,05$);

2. [1] - активність ферменту виражається в мкмоль/хв. на 1 мг протеїну.

Проведені дослідження засвідчили, що стать є одним із визначальних чинників рівня гомоцистеїну, цистеїну та H_2S у крові, а також активності основних ензимних систем, які забезпечують їх метаболізм у печінці. У самців щурів вміст гомоцистеїну та цистеїну є вірогідно вищим, а рівень H_2S

достовірно менший, ніж у самок щурів. Поряд з цим у самців відмічається вірогідно менша активність ферментів метилування, транссульфування й обміну цистеїну в печінці, ніж у самок, що до певної міри визначає стать-специфічні співвідношення рівнів гомоцистеїну, цистеїну й H_2S в крові. Кастрація тварин змінює вектор статевих відмінностей: у кастрованих самців рівень сірковмісних амінокислот є достовірно меншим, а вміст H_2S більшим, ніж у кастрованих самок. За цих умов у самців вірогідно зростає активність ферментів утилізації гомоцистеїну, цистеїну й утворення H_2S у печінці, порівняно з самками. Проведення замісної гормонотерапії повертає вектор статевих відмінностей до контролю.

Кореляційний та персентильний аналізи надали додаткові підтвердження, що метаболізм сірковмісних амінокислот і H_2S у печінці до певної міри регулюється статевими гормонами. Виявилося, що високий рівень тестостерону супроводжується низькою активністю ферментів утилізації сірковмісних амінокислот і ферментів синтезу H_2S у печінці, що асоціюється з високим рівнем у сироватці крові гомоцистеїну, цистеїну та низьким вмістом H_2S. Натомість, за високого рівня естрадіолу, активність ферментів деградації сірковмісних амінокислот і ферментів синтезу H_2S у печінці є високою, що супряжено з низьким рівнем у сироватці крові гомоцистеїну, цистеїну та високим вмістом H_2S.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях [49, 65, 66, 67].

РОЗДІЛ 4
МЕТАБОЛІЗМ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В СЕРЦІ Й АОРТІ ЩУРІВ: ЗВ'ЯЗОК З РІВНЕМ СТАТЕВИХ ГОРМОНІВ ТА ВМІСТОМ СІРКОВМІСНИХ МЕТАБОЛІТІВ В КРОВІ

Важливу роль в регуляції стану серця та судин відіграє біологічно-активна молекула H_2S, яка утворюється в процесі катаболізму сірковмісних амінокислот (цистеїну та гомоцистеїну) в різних органах і тканинах, а також міститься у плазмі крові [74, 264]. Статеві особливості обміну H_2S у серцево-судинній системі остаточно не з'ясовані, а інформація про можливі джерела ендогенного H_2S постійно розширюється. На сьогодні відомо, що утворення H_2S в серці та судинах може відбуватися в реакціях десульфурування сірковмісних амінокислот за участі ПАЛФ-залежних ензимів - ЦГЛ (КФ 4.4.1.1), ЦАТ (КФ 2.6.1.3) в асоціації з ПАЛФ-незалежним ензимом 3-МСТ (КФ 2.8.1.2), а також з тіосульфат-аніону за участю ПАЛФ-незалежної ТСТ (КФ 2.8.1.5). Деградація H_2S у тканинах може проходити неензиматичним та ензиматичним шляхом, одним з етапів якого є окиснення сульфіт-аніону за участі сульфітоксидази. Виникає питання, чи існують статеві відмінності тканинного вмісту H_2S, активності ензимів синтезу та деградації H_2S в серці та судинах.

Метою цього розділу було вивчення показників обміну H_2S (активності, кінетичних параметрів, експресії H_2S-синтезуючих ензимів, показників утилізації H_2S, концентрації H_2S) в міокарді й аорті самців і самок щурів з різною насиченістю організму статевими гормонами та встановлення можливих асоціативних зв'язків з рівнем статевих гормонів і вмістом гомоцистеїну, цистеїну та H_2S у крові.

Для вирішення поставленої мети експериментальні дослідження були проведені на 60 статевозрілих тваринах: 1 і 2 групи - контрольна група самців (n=10) і самок щурів (n=10); 3 і 4 групи - кастровані самці (тестектомія, n=10)

та самки (оваріектомія, n=10); 5 та 6 групи - кастровані тварини, яким проводили замісну гормонотерапію відповідно естрадіолом (n=10) чи тестостероном (n=10). Окремі дослідження були проведені на 20 старих щурах (10 самках та 10 самцях).

4.1 Дослідження маркерів метаболізму гідроген сульфіду в серці й аорті щурів обох статей

На першому етапі ми проаналізували питому активність H_2S-синтезуючих ензимів у міокарді й аорті в різних реакціях (Патент №75683) у самців щурів. Склад інкубаційних середовищ для оцінки швидкості утворення H_2S із сірковмісних амінокислот та тіосульфат-аніону у відповідних ензиматичних реакціях наведений у табл. 4.1. Оптимальні концентрації ПАЛФ, субстратів, косубстратів та інші умови для дослідження активності ензимів в реакціях синтезу H_2S були підібрані завчасно у відповідності до загально вживаних підходів [45]. Вміст H_2S у середовищі визначали спектрофотометричним методом за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном як описано раніше (див. розділ 2).

Ключовим джерелом H_2S у серцево-судинній системі вважається реакція десульфурування L-цистеїну за участі ЦГЛ (реакція 1, середовище №1). Результати наших досліджень показали, що у самців при використані інкубаційного середовища №1 швидкість утворення H_2S в міокарді становила 0,28±0,01 (0,25-0,32) нмоль H_2S/хв·мг протеїну, а в аорті – 0,78±0,03 (0,66-0,89) нмоль H_2S/хв·мг протеїну.

ЦГЛ каталізує гідроліз цистеїну до H_2S, пірувату та аміаку, тому вказані продукти повинні з’являтись у середовищі в еквімолярних кількостях. Виявилось, що за даних умов досліду, у самців щурів швидкість утворення пірувату в міокарді становила 0,55±0,01 (0,39-0,73) нмоль/хв·мг, в аорті - 1,50±0,04 (1,10-1,91) нмоль/хв·мг і достовірно перевищувала (на 92-96%, $p<0,05$) швидкість утворення H_2S в обох досліджуваних органах.

Очевидно, частина утвореного H_2S втрачається в процесі інкубації, що може бути пов'язано із високою леткістю та реакційною здатністю цієї молекули.

Таблиця 4.1

Склад інкубаційних середовищ для визначення активності H_2S-синтезуючих ензимів у міокарді й аорті щурів

Субстрат	Ензим	Схема реакції	Склад середовища (кінцеві концентрації)
L-Цистеїн	ЦГЛ	**Реакція 1** L-Цистеїн + H_2O → Піруват + **H_2S** + NH_3	**Середовище №1** L-цистеїн 6,0 мМ, ПАЛФ 1,34 мМ, Трис-HCl буфер 0,08 М (pH 8,5)
L-Цистин	ЦГЛ	**Реакція 2** L-Цистин + H_2O → Піруват + NH_3 + L-Тіоцистеїн → **H_2S**	**Середовище №2** L-цистин 6,0 мМ, ПАЛФ 1,34 мМ, Трис-HCl буфер 0,08 М (pH 8,5)
L-Гомоцистеїн	ЦГЛ	**Реакція 3** L-ГЦ + H_2O → L-гомосерин + **H_2S**	**Середовище №3** DL-ГЦ 6,0 мМ, ПАЛФ 1,34 мМ, Трис-HCl буфер 0,08 М (pH 8,5)
L-Цистеїн, α-кетоглутарат	ЦАТ	**Реакція 4** L-Цистеїн + α-кетоглутарат → глутамат + 3-меркап-топіруват 3-меркаптопіруват + 2H → піруват + **H_2S**	**Середовище №4** L-цистеїн 6,0 мМ, α-кетоглутарат 1,6 мМ, ПАЛФ 1,34 мМ, Трис-HCl буфер 0,08 М (pH 8,5)
Тіосульфат аніон	ТСТ	**Реакція 5** $S_2O_3^{2-}$ + $R(SH)_2$ → SO_3^{2-} + RS_2 + **H_2S**	**Середовище №5** $Na_2S_2O_3$ 0,2 мМ, дитіотреітол 2,3 мМ, Трис-HCl буфер 0,09 М (pH 8,5)

Примітки:

1. до 0,5 мл інкубаційного середовища додавали 0,2 мл (2 мг протеїну) пост'ядерного супернатанту гомогенатів тканин;

2. проби інкубували 60 хв. при 37ºС у стерильних пробірках, герметизованих плівкою "Parafilm" для попередження втрат H_2S.

За даними літератури, при визначенні концентрації H_2S спектрофотометричним методом за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном у біологічних рідинах відкривається біля 50% доданого сульфід-аніону, оскільки частина забарвлених продуктів сорбується протеїнами [9]. При врахуванні цього факту, була встановлена повна відповідність між показниками активності ЦГЛ, визначеної за H_2S та піруватом. В подальшому, для характеристики активності H_2S-синтезуючих ензимів ми користувалися фактичними значеннями приросту сульфід-аніону у інкубаційному середовищі.

Нещодавно з'явились докази, що ЦГЛ, крім класичного субстрату L-цистеїну, може вивільняти H_2S із альтернативних субстратів - L-цистину (реакція 2) та гомоцистеїну (реакція 3) [211, 330]. Для дослідження активності ЦГЛ у цих реакціях замість L-цистеїну в середовище №2 додавали L-цистин, а в середовище №3 - D,L-гомоцистеїн у еквімолярних кількостях. Зауважимо, що при використанні як середовища №2, так і середовища №3 продукція H_2S не реєструвалося. Таким чином, в умовах, наближених до фізіологічних, реакції десульфурування цистину та ГЦ не є ефективними джерелами H_2S в міокарді й аорті, на відміну від класичної реакції десульфурування L-цистеїну, тому в наступних досліженнях ми оцінювали питому активність ЦГЛ лише в цій реакції.

Синтез H_2S із цистеїну також відбувається за участі ЦАТ, яка забезпечує утворення 3-меркаптопірувату, який далі під впливом 3-МСТ або спонтанно розкладається до пірувату та H_2S (реакція 4). Реакція трансамінування цистеїну з α-кетоглутаратом у цьому десульфуразному шляху є визначальною, тому в подальшому ми умовно позначаємо її як «ЦАТ». Використання середовища №4 (із наявністю косубстрату α-кетоглутарату) дає можливість оцінити сумарну швидкість десульфурування цистеїну за участі ЦГЛ та ЦАТ. Швидкість синтезу H_2S власне за участі ЦАТ визначалась як різниця між сумарною швидкістю десульфурування цистеїну (ЦАТ+ЦГЛ), встановленою при наявності в середовищі α-кетоглутарату, і

швидкістю десульфурування цистеїну (ЦГЛ), визначеною за відсутності α-кетоглутарату (середовище №1). Результати наших досліджень показали, що у самців сумарна питома активність ЦАТ+ЦГЛ в міокарді становила 1,01±0,05 (0,85-1,25) нмоль H_2S/хв·мг протеїну, в аорті – 0,57±0,04 (0,36-0,74) нмоль H_2S/хв·мг протеїну. Відповідно, власне активність ЦАТ в міокарді була 0,73±0,05 (0,57-0,94), в аорті – 0,57±0,04 (0,36-0,74) нмоль H_2S /хв·мг протеїну. Слід відмітити, що при заміні в середовищі №4 цистеїну на еквімолярні кількості ГЦ утворення H_2S не спостерігалося. Ймовірно, ГЦ не вступає в реакцію трансамінування з α-кетоглутаратом з утворенням H_2S.

Швидкість синтезу H_2S в міокарді й аорті в реакції відновлення тіосульфат-аніону за участю мітохондріального ензиму ТСТ була вивчена за допомогою середовища №5 (реакція 5). Встановлено, що активність ТСТ в міокарді й аорті самців щурів є найвищою серед усіх інших H_2S-продукуючих ензимів і становить відповідно 1,27±0,04 (1,13-1,51) нмоль H_2S/ хв. на 1 мг протеїну та 1,91±0,08 (1,65-2,30) нмоль H_2S /хв. на 1 мг протеїну. Однак, реальний внесок цього ензиму в утворення H_2S у серці й аорті щурів в цілісному організмі може виявитись менш вагомим, оскільки в реакції був використаний штучний донор атомів гідрогену - потужний відновник дитіотреітол. У фізіологічних умовах альтернативою йому може слугувати відновлений глутатіон, вміст якого достатньо високий в різних тканинах, зокрема й у міокарді.

При розгляді внеску кожного з ензимів у синтез H_2S у міокарді й аорті самців виявилися певні відмінності. За H_2S-синтезуючою активністю міокардіальні ензими можна розташувати у порядку зростання таким чином ЦГЛ < ЦАТ < ТСТ, в той час як аортальні ензими – ЦАТ < ЦГЛ < ТСТ.

Виявилося, що у самців питома активність ЦГЛ та ТСТ в аорті перевищує таку в міокарді в 2,7 та 1,5 рази ($p<0,001$), в той час як активність ЦАТ у міокарді перевищує аналогічну в аорті в 1,3 рази ($p<0,01$).

Далі ми порівняли питому активність H_2S-синтезуючих ензимів у міокарді у самців та самок щурів. Спочатку оцінили активність ЦГЛ у реакції

десульфурування цистеїну. Результати персентильного аналізу показали (рис. 4.1), що у самців щурів медіанна активність ЦГЛ становила 0,28 (95% CI 0,25-0,32) нмоль H_2S/хв·мг протеїну, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} відповідав діапазону 0,26-0,29 нмоль H_2S/хв·мг протеїну. У самок щурів активність ЦГЛ в міокарді за середніми величинами виявилися більшою на 34,5%, ніж у самців, медіана становила 0,36 (95% CI 0,33-0,44) нмоль H_2S/хв·мг протеїну, P_{25}-P_{75} - 0,35-0,41 нмоль H_2S/хв·мг протеїну.

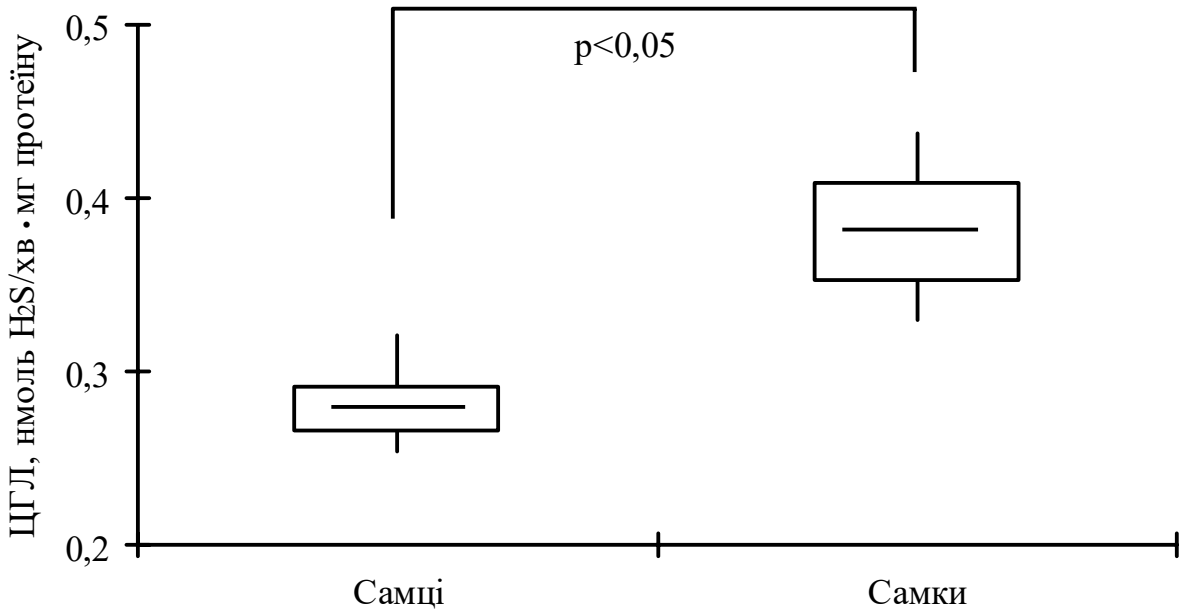


Рис. 4.1. Активність ЦГЛ в міокарді самців та самок щурів. Верхня і нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Аналогічні закономірності виявлені й при аналізі активності ЦГЛ в аорті щурів різної статі (рис. 4.2). Найвищі значення активності ЦГЛ в аорті виявлялись у самок - медіана становила 1,02 (95% CI 0,86-1,12) нмоль H_2S/хв·мг протеїну, P_{25}-P_{75} - 0,96-1,09 нмоль H_2S /хв·мг протеїну. У самців активність ЦГЛ в аорті була в середньому на 22,8% меншою ($p<0,05$), ніж у самок щурів, медіана становила 0,79 (95% CI 0,66-0,89) нмоль H_2S/хв·мг протеїну, P_{25}-P_{75} - 0,72-0,81 нмоль H_2S/хв·мг протеїну. Таким чином,

продукція H_2S у серцево-судинній системі до певної міри визначається статевими чинниками.

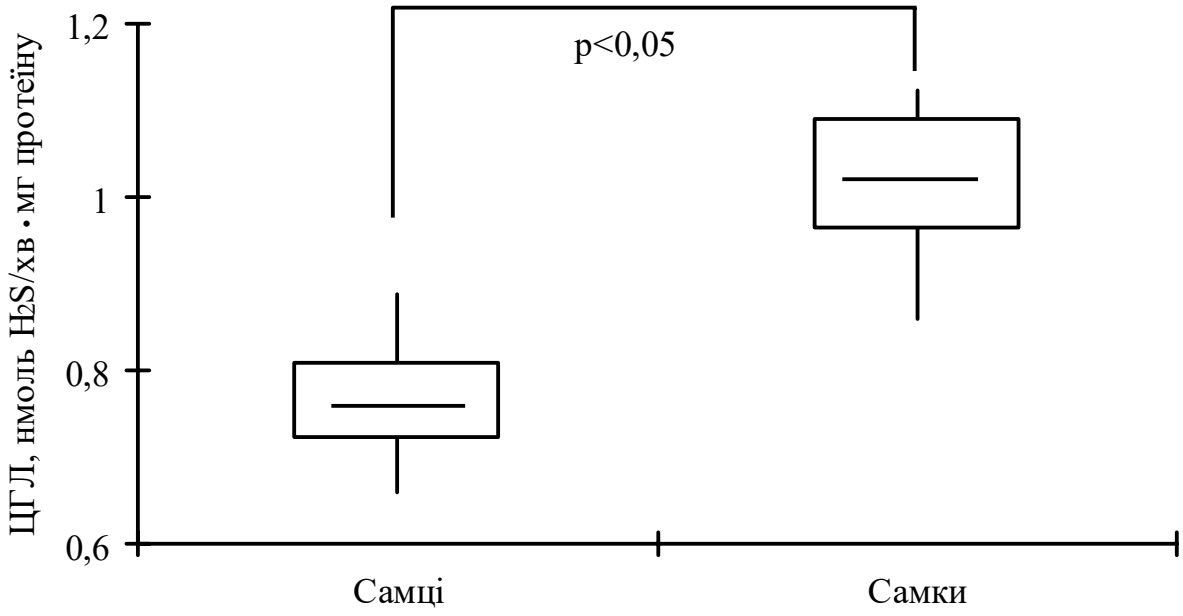


Рис. 4.2. Активність ЦГЛ в аорті самців і самок щурів. Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

З’ясувалося, що не лише активність ЦГЛ у серцево-судинній системі відрізняється у самців і самок щурів, а й рівень експресії гену *CSE* (цистатіонін-γ-ліази) у міокарді має статеві особливості (рис. 4.3). Зокрема, найвищий відносний рівень експресії гену *CSE* у міокарді зафіксований у самок щурів - медіана становить 0,0032 (95% CI 0,0023-0,0039) ум.од., а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} - 0,0026-0,0037 ум.од.. В той же час у самців середній рівень цього показника менший на 46,9% ($p<0,05$), ніж у самок: медіана становить 0,0017 (95% CI 0,0011-0,0023) ум.од., а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} - 0,0014-0,0019 ум.од.

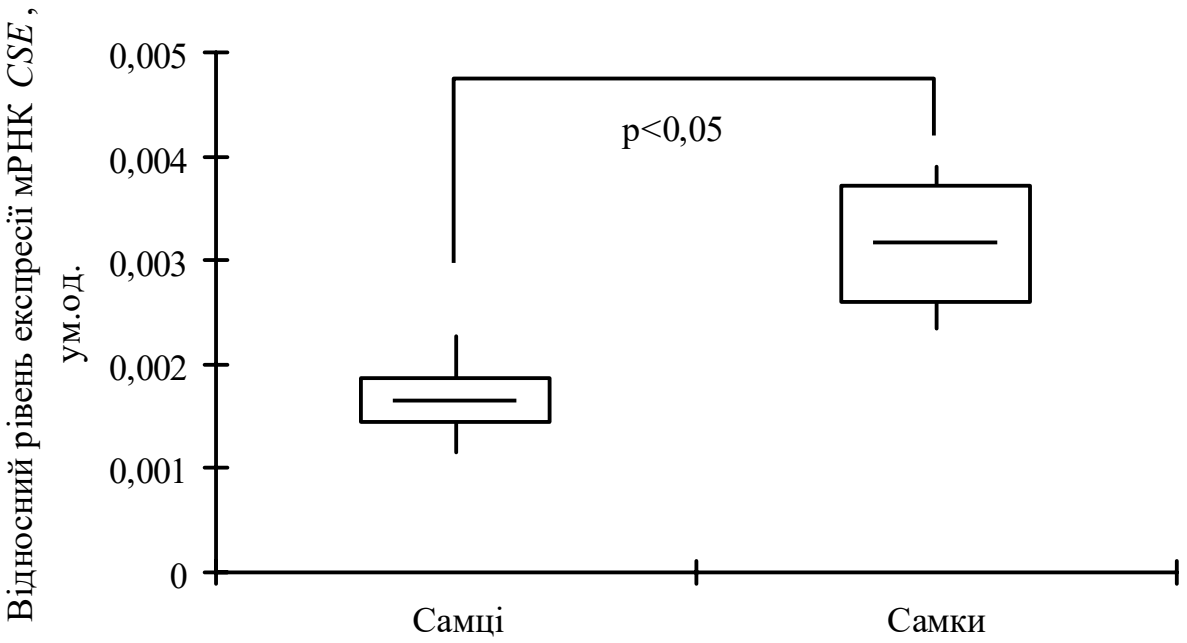


Рис. 4.3. Відносний рівень експресії гену *CSE* у міокарді самців і самок щурів. Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів – медіана.

Далі ми дослідили статеві особливості ПАЛФ-залежного десульфурування цистеїну в серцево-судинній системі за участю ЦАТ. Результати персентильного аналізу показали (рис. 4.4), що в самців щурів медіанна активність ЦАТ становила 0,71 (95% CI 0,57-0,94) нмоль H_2S/хв·мг протеїну, P_{25}-P_{75} - 0,63-0,81 нмоль H_2S/хв·мг протеїну. У самок щурів активність ЦАТ в міокарді за середніми величинами виявилась більшою на 24,1% ($p<0,05$), ніж у самців, медіана становила 0,88 (95% CI 0,65-1,16) нмоль H_2S/хв·мг протеїну, P_{25}-P_{75} - 0,76-1,08 нмоль H_2S/хв·мг протеїну.

Подібні відмінності реєструвались і при аналізі активності ЦАТ в аорті щурів різної статі (рис. 4.5). Найвищі значення активності ЦАТ виявлялись у самок щурів - медіана становила 0,78 (95% CI 0,50-1,00) нмоль H_2S/хв·мг протеїну, P_{25}-P_{75} - 0,57-0,84 нмоль H_2S/хв·мг протеїну. У самців щурів цей показник був в середньому на 23,0% меншим ($p<0,05$), ніж у самок, медіана становила 0,57 (95% CI 0,36-0,74) нмоль H_2S/хв·мг протеїну,

P_{25}-P_{75} - 0,50-0,66 нмоль H_2S/хв·мг протеїну. Отже, продукція H_2S за участі ЦАТ в серцево-судинній системі самок вірогідно вища, ніж у самців щурів.

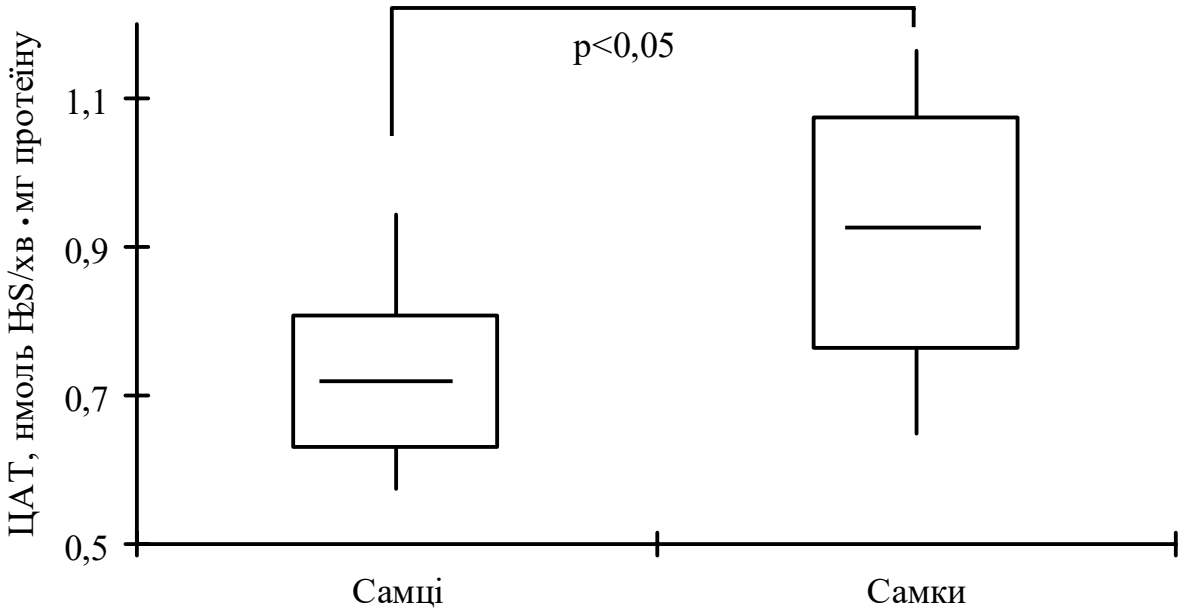


Рис. 4.4. Активність ЦАТ в міокарді самців і самок щурів. Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

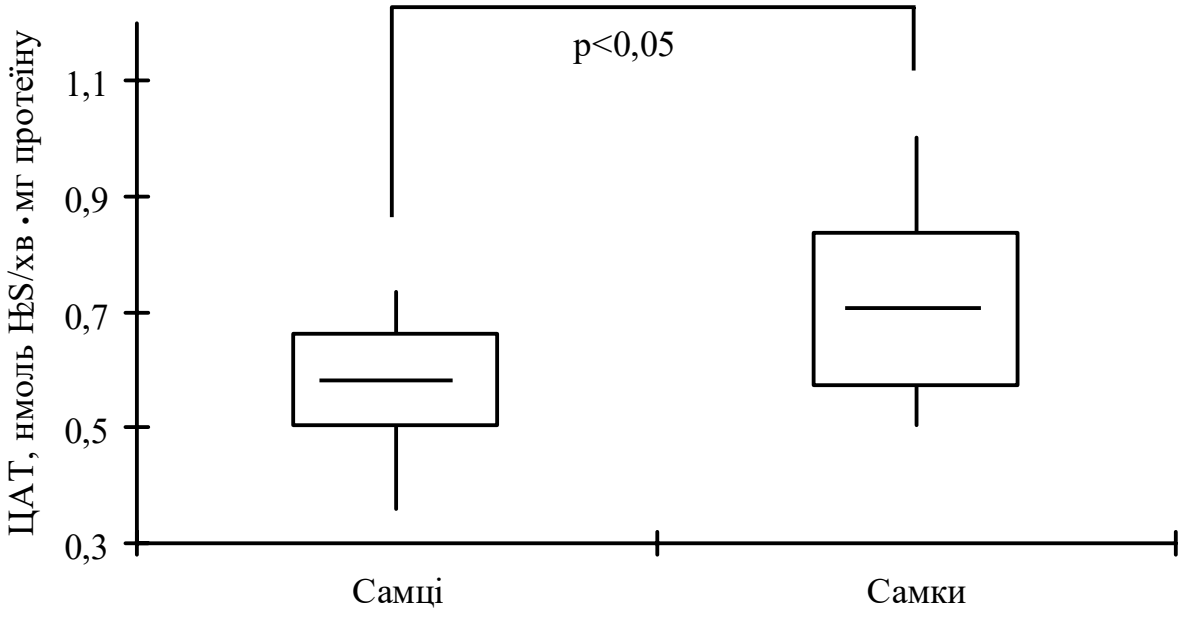


Рис. 4.5. Активність ЦАТ в аорті самців і самок щурів. Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Наостанок ми дослідили існування статевих відмінностей здатності міокарду щурів утворювати H_2S із тіосульфат-аніону ПАЛФ-незалежним шляхом за участі ТСТ. Результати персентильного аналізу засвідчили (рис. 4.6), що у самців щурів медіанна активність ТСТ становила 1,23 (95% CI 1,13-1,51) нмоль H_2S/хв·мг протеїну, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} відповідав діапазону 1,19-1,29 нмоль H_2S/хв·мг протеїну. У самок щурів активність ТСТ у міокарді за середніми величинами виявилась більшою на 26,5% ($p<0,05$), ніж у самців, медіана становила 1,60 (95% CI 1,28-1,93) нмоль H_2S/хв·мг протеїну, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 1,54-1,64 нмоль H_2S/хв·мг протеїну.

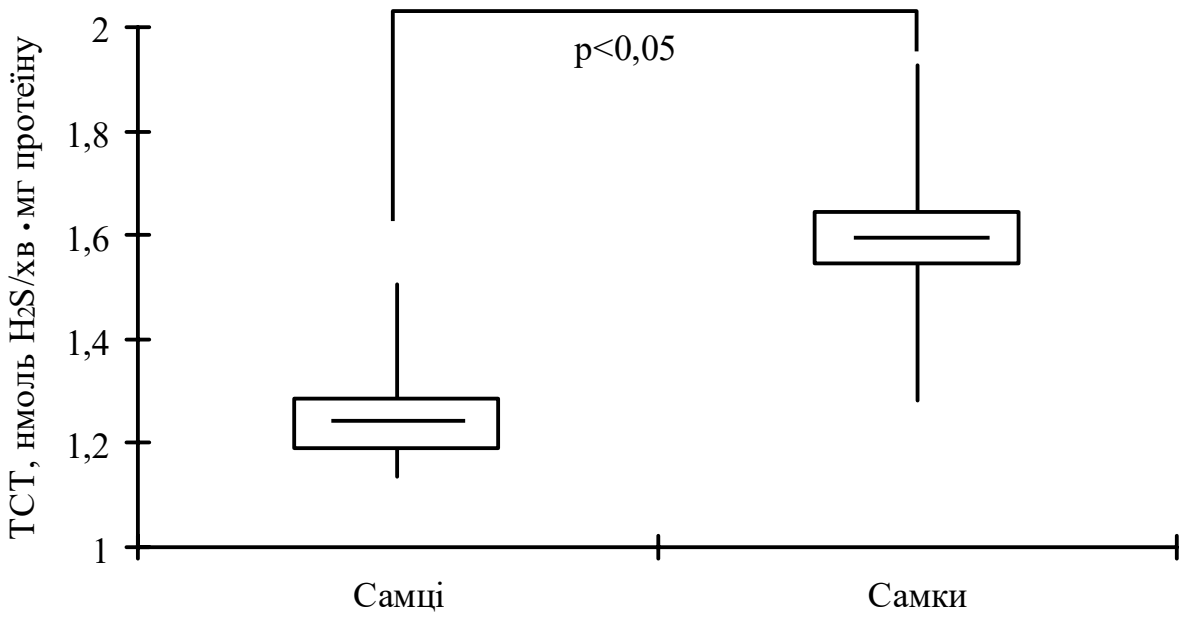


Рис. 4.6. Активність ТСТ в міокарді самців і самок щурів. Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Аналогічні закономірності виявлені й при аналізі активності ТСТ в аорті щурів різної статі (рис. 4.7). Найвищі значення активності ТСТ в аорті виявлялись у самок щурів - медіана становила 2,45 (95% CI 2,01-2,65) нмоль H_2S /хв·мг протеїну, P_{25}-P_{75} - 2,41-2,58 нмоль H_2S /хв·мг протеїну. У самців

щурів активність ТСТ в аорті була в середньому на 21,1% меншою ($p<0,05$), ніж у самок щурів, медіана становила 1,81 (95% CI 1,65-2,30) нмоль H_2S/хв·мг протеїну, P_{25}-P_{75} - 1,72-2,14 нмоль H_2S/хв·мг протеїну.

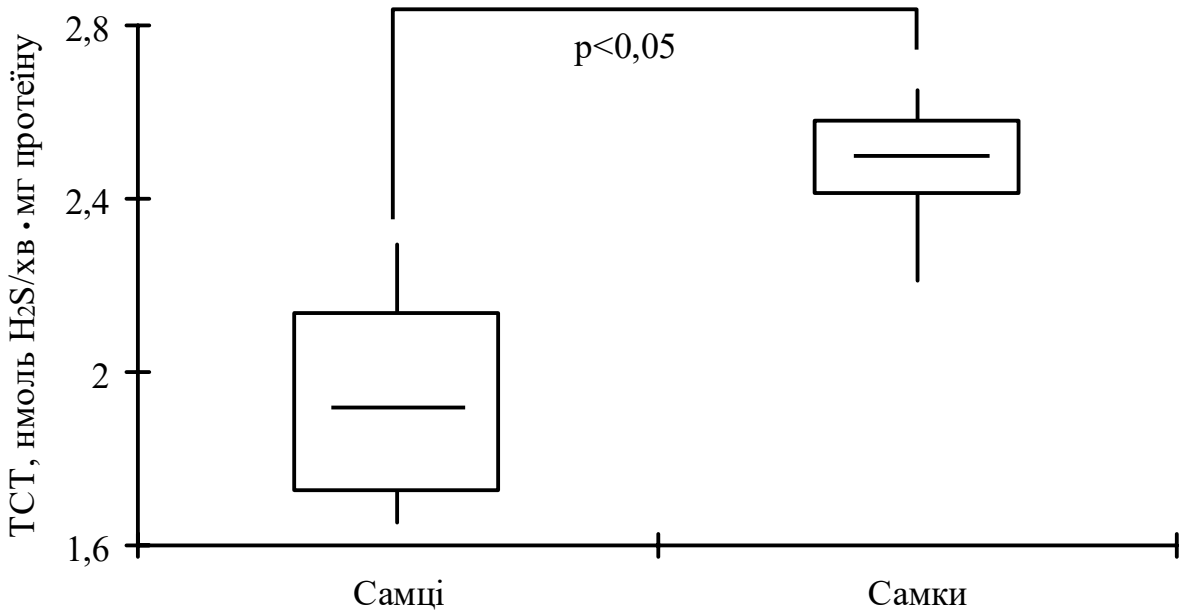


Рис. 4.7. Активність ТСТ в аорті самців і самок щурів. Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Виникає питання, чи існують статеві відмінності кінетики реакцій синтезу H_2S в серцево-судинній системі. Зауважимо, що утворення H_2S за участі ЦАТ і ТСТ може включати декілька етапів на відміну від реакції ПАЛФ-залежного десульфурування цистеїну за участю ЦГЛ, кінетичні параметри якої були оцінені в міокарді й аорті щурів різної статі.

Для оцінки кінетичних параметрів ЦГЛ у міокарді й аорті були використані інкубаційні середовища, які від базового середовища №1 відрізнялись лише концентраціями L-цистеїну (від 0,12 до 30 мМ), всі інші умови дослідження відповідали тим, що описані раніше (див. табл. 3.1). На основі отриманих даних будували кінетичні криві в прямих та обернених координатах Лайнуівера-Берка.

Встановлено, що в міокарді самців щурів у діапазоні концентрацій цистеїну 0,12-0,48 мМ реєструвалася пряма залежність між концентрацією субстрату та швидкістю ензиматичної реакції, яка становила 0,018-0,035 нмоль H_2S/хв·мг протеїну (рис. 4.8). За умов подальшого збільшення концентрації цистеїну в інкубаційному середовищі темпи приросту швидкості реакції зменшувались, і при вмісті цистеїну 7,5 мМ крива виходила на плато. Зростання кількості цистеїну вище 7,5 мМ супроводжувалося зменшенням швидкості утворення H_2S, що може свідчити про субстратне інгібування активності ЦГЛ. У самок щурів швидкість десульфурування цистеїну в діапазоні високих концентрацій субстрату (7,5 мМ та вище) суттєво не відрізнялась від такої у самців щурів. В той же час, у самок щурів у діапазоні низьких концентрацій цистеїну (0,12-0,48 мМ) швидкість реакції була вищою на 31,4-38,8% ($p<0,05$), порівняно з самцями, і становила 0,025-0,046 нмоль H_2S / хв·мг протеїну.

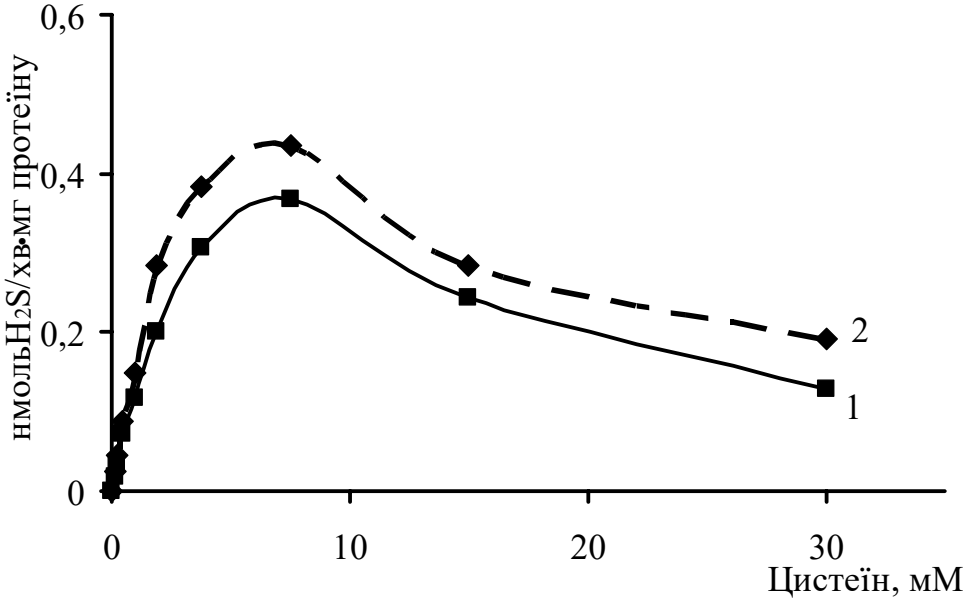


Рис. 4.8. Кінетика утворення H_2S із L-цистеїну за участю ЦГЛ у міокарді самців (1) і самок щурів (2) у прямих координатах.

В обернених координатах (рис. 4.9) у самців і самок відмічалось повне випрямлення кінетичних кривих, що підтверджує участь лише одного ензиму в реакції десульфурування цистеїну (за відсутності косубстратів) з утворенням H_2S у міокарді. На основі графіків Лайнуівера-Берка розраховували константу Міхаеліса (Km) та максимальну швидкість (Vmax) ензиматичної реакції. Встановлено, що в самців щурів Km для міокарду становила 3,01±0,04 мМ, а Vmax - 0,526±0,004 нмоль H_2S/хв·мг протеїну. У самок щурів Km була меншою на 20,3% ($p<0,05$), ніж у самців, і становила 2,40±0,03 мМ. Поряд з цим, у самок Vmax була більшою на 13,3% ($p<0,05$), ніж у самців, і становила 0,596±0,003 нмоль H_2S/хв·мг протеїну.

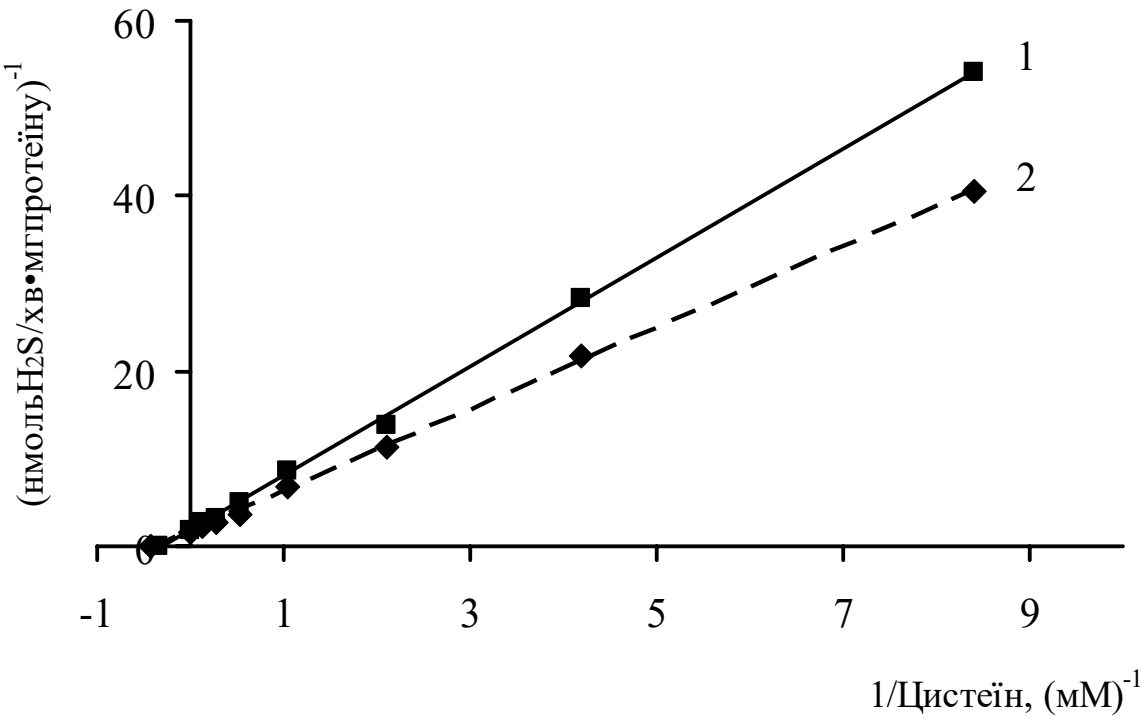


Рис. 4.9. Кінетика утворення H_2S із L-цистеїну за участю ЦГЛ у міокарді самців (1) і самок щурів (2) в обернених координатах Лайнуівера-Берка.

Далі ми оцінили кінетичні параметри ЦГЛ в аорті щурів різної статі. Результати досліджень показали, що у самців щурів в аорті в діапазоні концентрацій цистеїну 0,12-0,95 мМ реєструвалася пряма залежність між

концентрацією субстрату та швидкістю ензиматичної реакції, яка відповідала 0,024-0,215 нмоль H_2S/хв·мг протеїну (рис. 4.10). Таким чином, пряма залежність між концентрацією цистеїну та швидкістю реакції реєструвалась у більш широкому діапазоні концентрацій для аорти порівняно з міокардом. Починаючи з концентрації 1,9 мМ, зростання швидкості реакції уповільнювалось, а при вмісті субстрату в інкубаційній суміші 7,5 мМ крива виходила на плато, що свідчить про майже повне насичення ензиму субстратом. При збільшенні концентрації L-цистеїну в середовищі вище 7,5 мМ, спостерігалось зниження швидкості утворення H_2S гомогентами аорти, що раніше ми відзначали і для міокарду. У самок швидкість десульфурування цистеїну гомогенатами аорти в діапазоні високих концентрацій субстрату (7,5 мМ та вище) суттєво не відрізнялася від такої у самців щурів. В той же час, у діапазоні низьких концентрацій цистеїну (0,12-0,95 мМ) у самок швидкість реакції була вищою на 30,7-87,5%, ніж у самців, і становила 0,045-0,281 нмоль H_2S/хв·мг протеїну. За цих умов кінетична крива в прямих координатах була зміщена ліворуч.

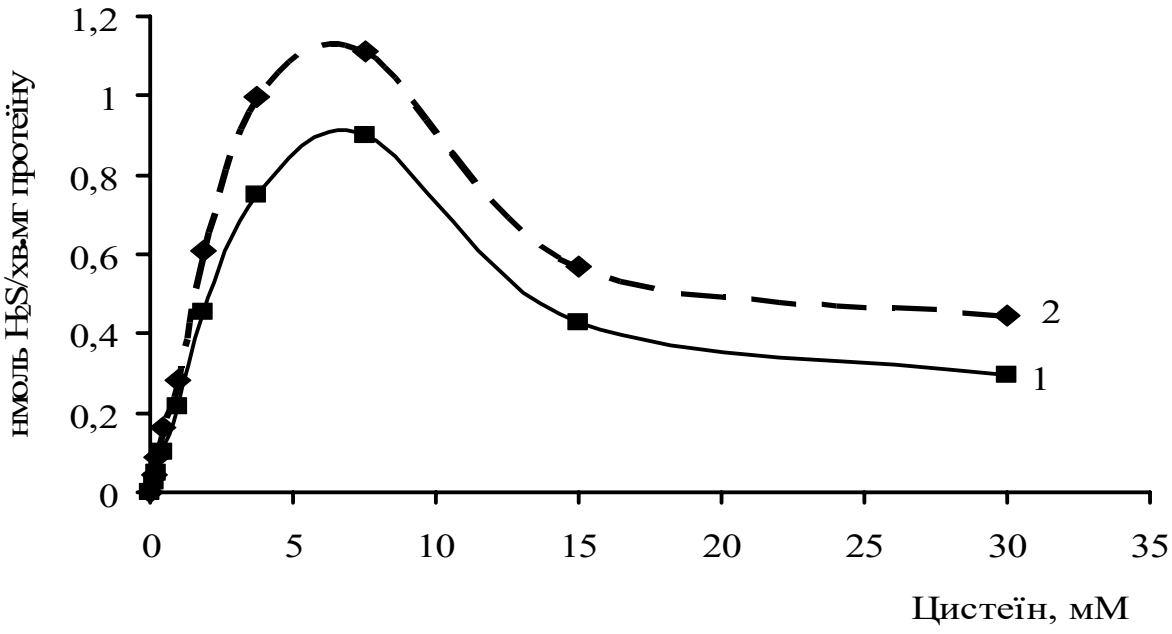


Рис. 4.10. Кінетика утворення H_2S із L-цистеїну за участю ЦГЛ в аорті самців (1) і самок щурів (2) у прямих координатах.

В обернених координатах (рис. 4.11) у самців і самок відмічалося повне випрямлення кінетичних кривих, що також засвідчує участь лише одного ензиму в реакції десульфурування цистеїну з вивільненням H_2S в аорті. Кінетична крива в координатах Лайнуівера-Берка у самок була зміщена праворуч, відносно такої у самців. На основі цих графіків розрахували Km та Vmax ензиматичної реакції в аорті у самців і самок. Встановлено, що в самців щурів Km для аорти становила 4,52±0,06 мМ, а Vmax - 1,50±0,02 нмоль H_2S/хв·мг протеїну. У самок щурів Km була меншою на 19,5% ($p<0,05$), ніж у самців, і становила 3,64±0,04 мМ. Поряд з цим у самок Vmax була більшою на 16,0% ($p<0,05$), ніж у самців, і становила 1,74±0,03 нмоль H_2S/хв·мг протеїну.

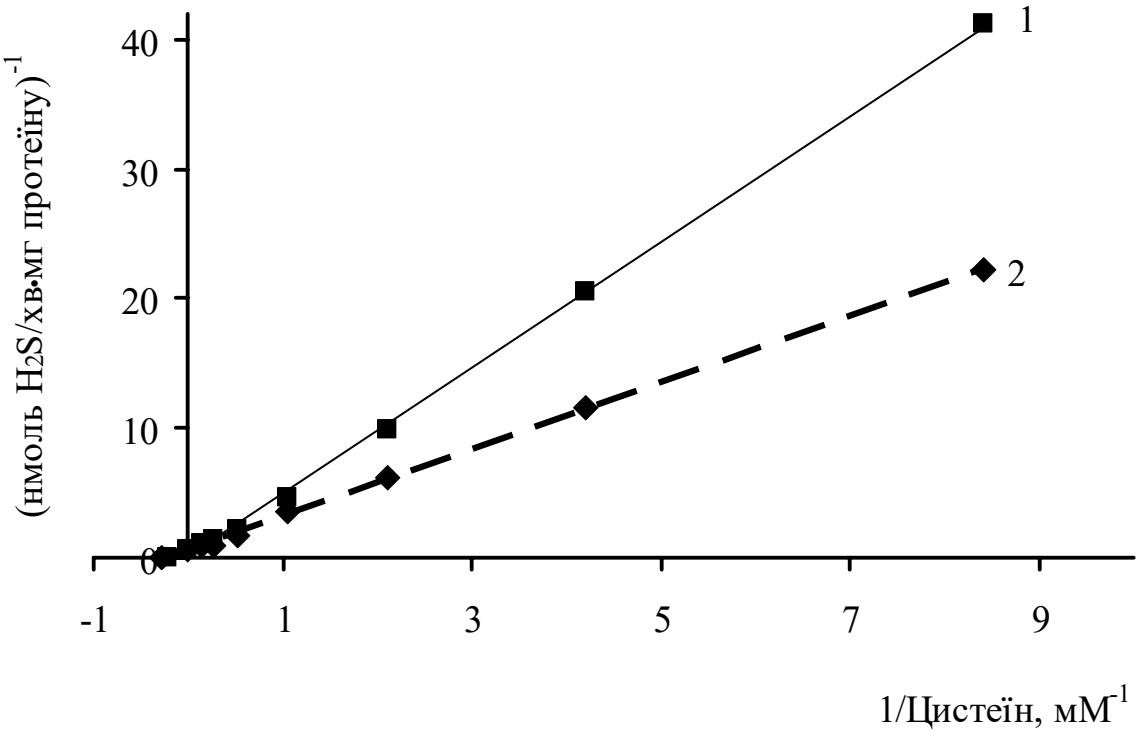


Рис. 4.11. Кінетика утворення H_2S з L-цистеїну за участі ЦГЛ в аорті самців (1) і самок щурів (2) в обернених координатах Лайнуівера-Берка.

На наступному етапі ми оцінили здатність міокарду до утилізації H_2S у самців і самок щурів. Катаболізм H_2S може відбуватись у мітохондріях і

цитозолі клітин ензиматичним та неензиматичним шляхами, які включають процеси окиснення, метилування та депонування H_2S.

Оцінка загальної здатності міокарду до утилізації H_2S була здійснена в модельній системі [31]: до 1 мл інкубаційного середовища, яке містило 312 мкМ Na_2S (донор екзогенного H_2S), 0,47 мМ Трис-HCI буферу (pH 7,4) додавали 0,1 мл (1 мг протеїну) гомогенату міокарду, інкубували при 37°С у герметизованих пробірках, і через 30 хв. визначали вміст S^{2-} за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном. Швидкість утилізації H_2S розраховували за зниженням концентрації S^{2-} в середовищі та виражали у нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну. Результати наших досліджень показали, що у самців щурів здатність міокарду споживати H_2S більша, ніж у самок (рис. 4.12). Так, у самок швидкість утилізації H_2S становила за показником медіани 0,55 (0,42-0,64) нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну, P_{25}-P_{75} - 0,50-0,58 нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну. У самців щурів швидкість утилізації H_2S була вищою на 31,5% ($p<0,05$), ніж у самок щурів, і становила 0,70 (0,61-0,84) нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну, P_{25}-P_{75} - 0,66-0,75 нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну.

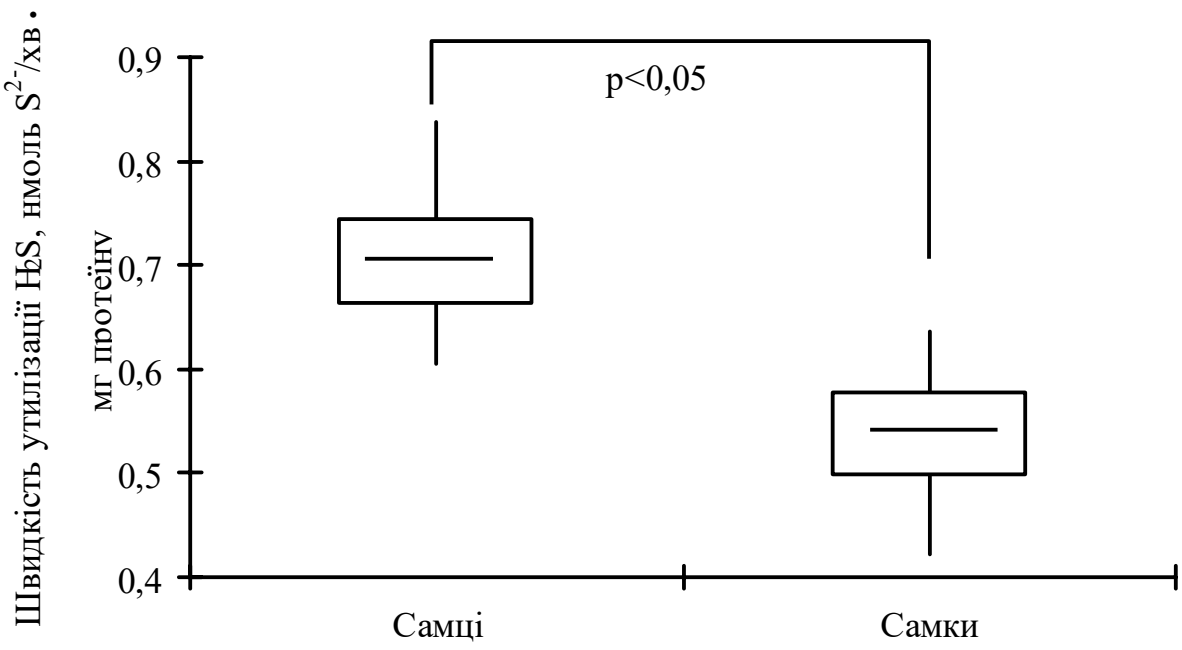


Рис. 4.12. Швидкість утилізації екзогенного H_2S в міокарді самців і самок щурів. Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Одним із ензимів, залучених до деградації H_2S у мітохондріях, є сульфітоксидаза, яка окиснює сульфіти до сульфатів. Результати наших досліджень показали, що самці та самки щурів вірогідно не відрізняються за активністю сульфітоксидази в міокарді (рис. 4.13). Результати персентильного аналізу засвідчили, що у самців щурів медіанна активність сульфітоксидази становила 4,89 (3,38-7,00) нмоль/хв·мг протеїну, P_{25}-P_{75} - 3,98-6,12 нмоль/хв·мг протеїну. У самок щурів за середніми величинами активність сульфітоксидази в міокарді майже не відрізнялася від такої у самців тварин, медіана становила 5,03 (95% CI 4,01-6,86), а P_{25}-P_{75} - 4,34-5,52 нмоль/хв·мг протеїну.

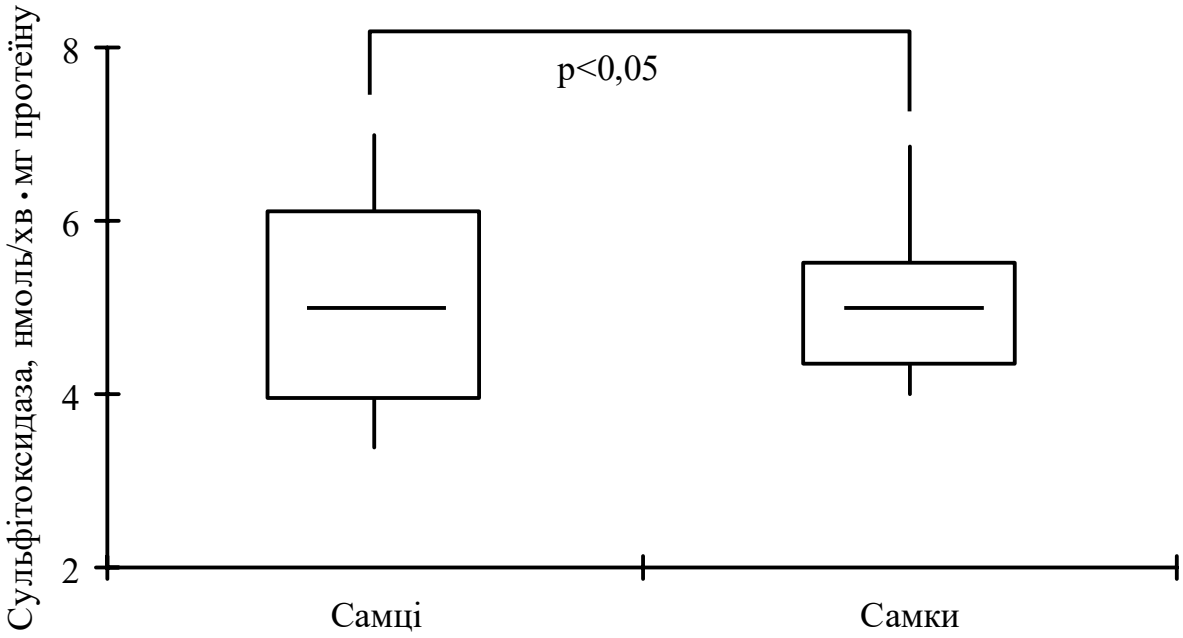


Рис. 4.13. Активність сульфітоксидази в міокарді самців і самок щурів. Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Далі ми дослідили вміст H_2S в міокарді та аорті у самців і самок щурів. Визначення вмісту H_2S за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном дозволяє оцінити суму його вільної та кислото-лабільної фракції у тканинах.

Результати наших досліджень показали (рис. 4.14), що в самців щурів вміст H_2S у міокарді становив 2,57 (2,22-3,13) нмоль/мг протеїну, P_{25}-P_{75} - 2,31-2,76 нмоль/мг протеїну. Натомість, у самок щурів рівень H_2S у міокарді був вищим на 19,1% ($p<0,05$), ніж у самців: медіана становила 3,07 (2,75-3,53) нмоль/мг протеїну, P_{25}-P_{75} - 2,83-3,39 нмоль/мг протеїну.

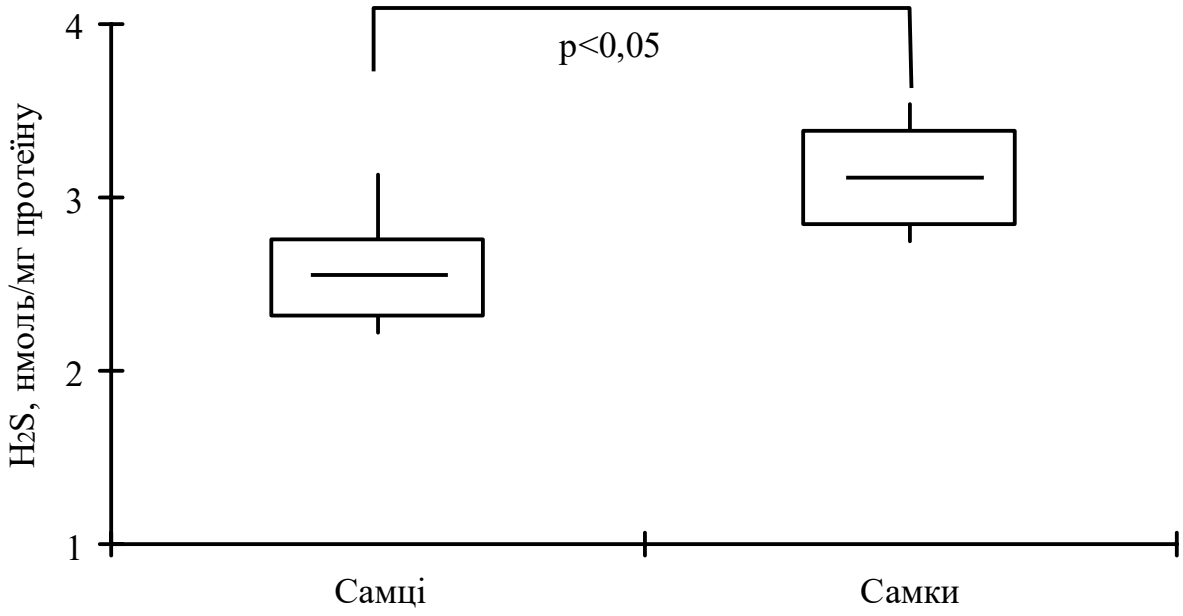


Рис. 4.14. Вміст H_2S в міокарді самців і самок щурів. Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів – P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Подібні закономірності відмічалися і в аорті (рис. 4.15). У самців щурів вміст H_2S у міокарді становив 1,24 (1,01-1,44) нмоль/мг протеїну, P_{25}-P_{75} – 1,211,32 нмоль/мг протеїну. Натомість, у самок щурів рівень H_2S у міокарді був вищим на 20,9% ($p<0,05$), ніж у самців: медіана становила 1,49 (1,34-1,76), а P_{25}-P_{75} - 1,38-1,55 нмоль/мг протеїну. Отже, рівень H_2S у серцево-судинній системі у самців вірогідно менший, ніж у самок.

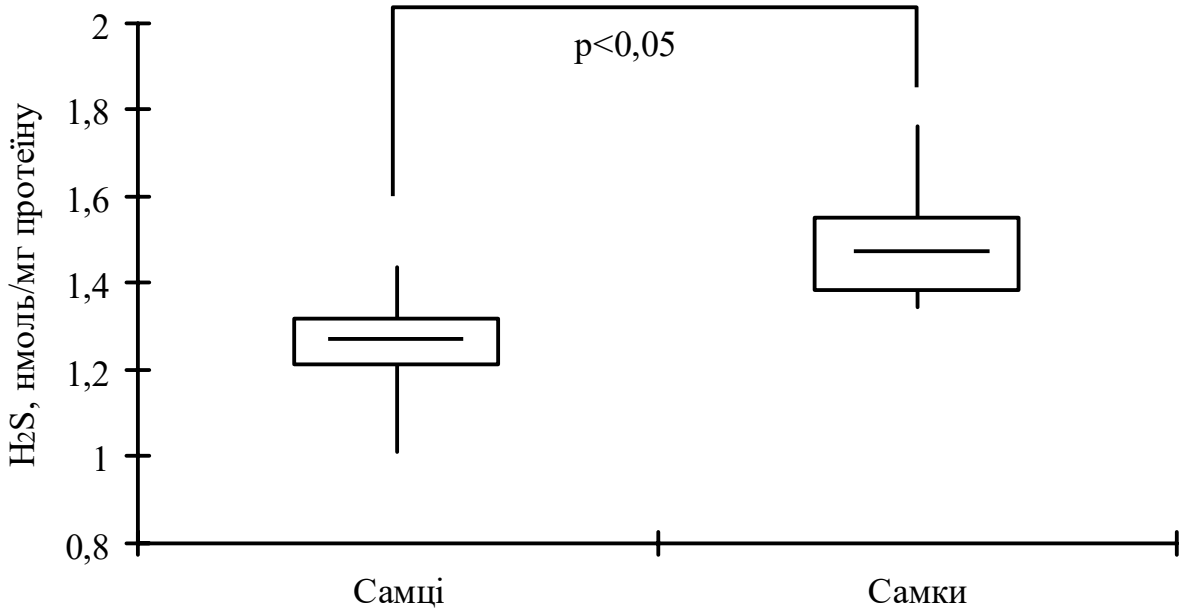


Рис. 4.15. Вміст H_2S в аорті самців і самок щурів. Верхня та нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75}, лінії за межами боксів - P_5 та P_{95}, лінія у середині боксів - медіана.

Таким чином, у самців у серцево-судинній системі відмічається вірогідно менша активність H_2S-продукуючих ензимів (ЦГЛ, ЦАТ, ТСТ), експресія гену ЦГЛ, спорідненість ЦГЛ до цистеїну, максимальна каталітична активність ЦГЛ та достовірно більша швидкість утилізації екзогенного H_2S, що супроводжується вірогідно нижчим рівнем H_2S, порівняно із самками.

4.2 Вплив кастрації та замісної гормонотерапії на показники обміну гідроген сульфіду в серці й аорті щурів обох статей

На наступному етапі нашого дослідження ми дослідили вплив різної насиченості організму щурів статевими гормонами на стан системи H_2S у міокарді й аорті самців і самок щурів.

Спершу ми оцінили зміни активності ЦГЛ у серцево-судинній системі щурів на тлі різної насиченості естрадіолом та тестостероном (табл. 4.2).

Виявилося, що кастрація самців викликає вірогідне збільшення активності ЦГЛ у міокарді й аорті відповідно на 24,6 та 29,4% ($p<0,05$), відносно контролю. В той же час, оваріектомія самок супроводжувалася вірогідним зменшенням активності ЦГЛ у серці й аорті відповідно на 20,6 та 21,7% ($p<0,05$), порівняно з контролем. Кастрація тварин змінювала направленість статевих відмінностей активності ЦГЛ: у самок у контрольній групі активність ЦГЛ у міокарді й аорті була вищою на 30,2-34,5% ($p<0,05$), тоді як у групі кастрованих тварин меншою на 14,3-21,3% ($p<0,05$), порівняно з самцями. Замісна гормонотерапія кастрованим тваринам повертала направленість статевих відмінностей активності ЦГЛ до такої як у контрольній групи тварин.

Таблиця 4.2

Вплив кастрації та замісної гормонотерапії статевими гормонами на активність ЦГЛ у міокарді й аорті самців і самок щурів (M±m, n=10)

Групи тварин		ЦГЛ, нмоль H_2S/хв·мг протеїну	
		Самці	Самки
		Міокард	
1	Контроль	0,28±0,01	0,38±0,01
2	Кастрація	0,35±0,02*	0,30±0,03*
3	Кастрація+ЗГТ	0,30±0,01#	0,38±0,02#
		Аорта	
1	Контроль	0,78±0,03	1,01±0,03
2	Кастрація	1,00±0,04*	0,79±0,02*
3	Кастрація+ЗГТ	0,81±0,01#	0,95±0,02#

Примітки: 1. * - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників контрольної групи;

2. # - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників кастрованих тварин відповідної групи.

Дослідження експресії гену *CSE* у міокарді показало, що кастрація самців і самок спричиняє різноспрямований вплив на цей показник (рис. 4.16). З'ясувалося, що орхідектомія самців викликає вірогідне зростання відносного рівня експресії гену ЦГЛ у 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 ЦГЛ у міокарді в контрольній групі була більшою на 87,5%, а в групі кастрованих тварин – меншою на 10,0%, порівняно з самцями.

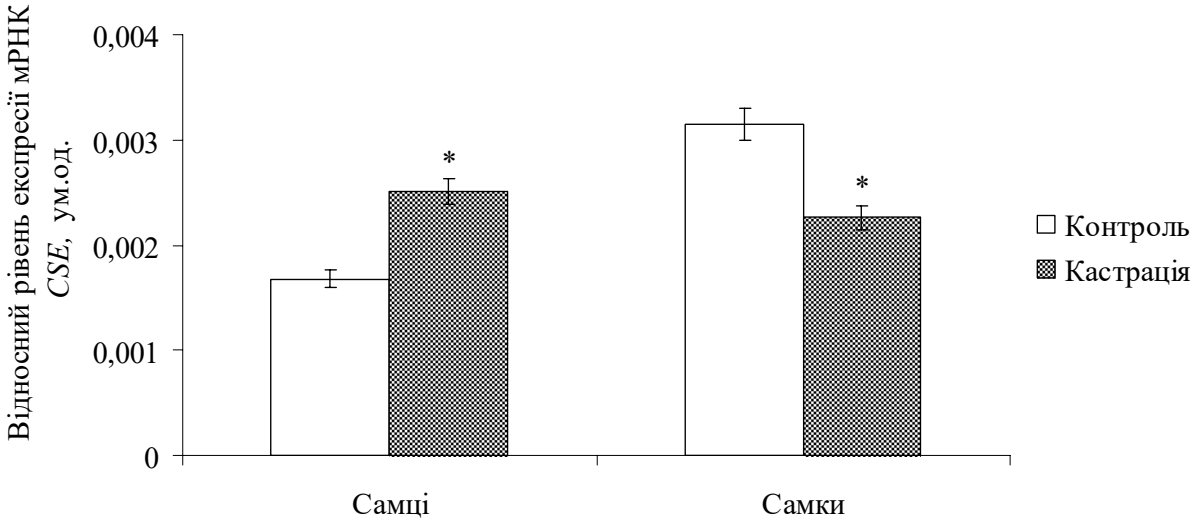


Рис. 4.16. Вплив кастрації на рівень експресії гену *CSE* у міокарді самців і самок щурів. Примітка. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідного контролю.

Далі ми оцінили кінетичні параметри реакції, що каталізується ЦГЛ, у серцево-судинній системі щурів різної статі залежно від рівня насиченості організму статевими гормонами. Встановлено (рис. 4.17), що кастрація самців викликає збільшення швидкості реакції десульфурування цистеїну з утворенням H_2S у міокарді особливо за низького вмісту цистеїну в інкубаційному середовищі. Так, за концентрацій цистеїну 0,12-0,24 мМ у кастрованих самців швидкість реакції була більшою на 27,8-28,6%, а за концентрацій 1,90-3,75 мМ - на 14,5-17,9%, порівняно з контрольною групою

тварин. За цих умов кінетична крива Міхаеліс-Ментен зміщувалася ліворуч, відносно контролю. Проведення замісної гормонотерапії повертало швидкість реакції десульфурування цистеїну до контрольних показників, а кінетична крива в координатах Міхаеліс-Ментен наближалась до такої у контрольній групі.

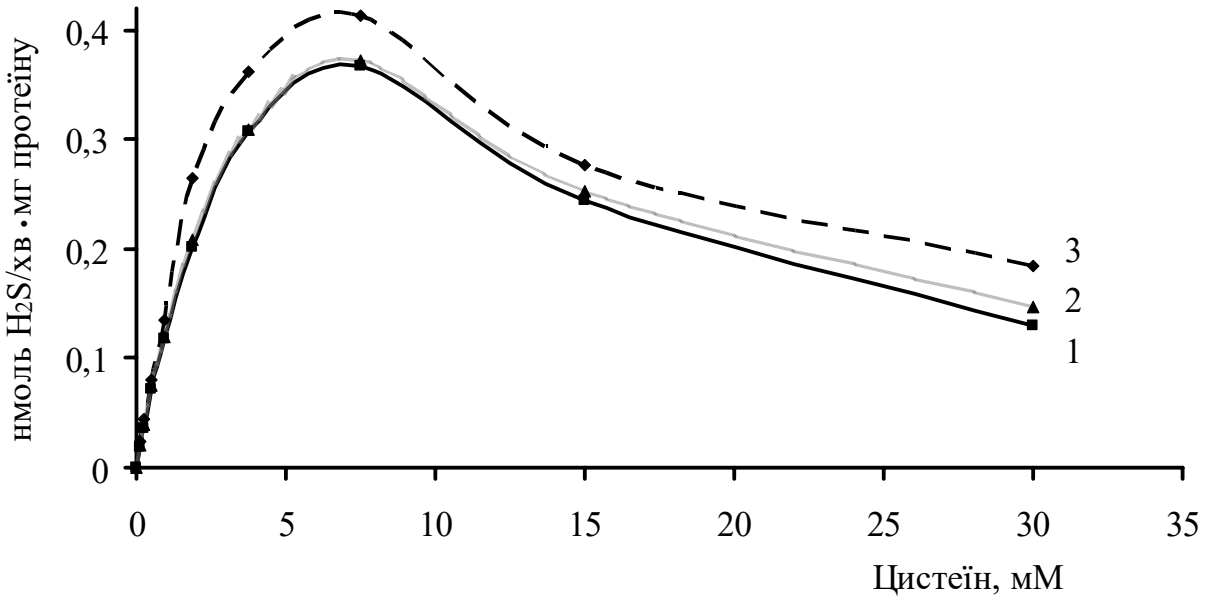


Рис. 4.17. Вплив кастрації та ЗГТ на кінетику утворення H_2S з L-цистеїну за участі ЦГЛ у міокарді самців щурів у прямих координатах. Примітки: 1. - контроль; 2 - кастровані тварини; 3 - кастрація + ЗГТ.

Гонадектомія самців спричиняє зміщення праворуч кінетичної кривої утворення H_2S із L-цистеїну в міокарді в координатах Лайнуівера-Берка, відносно контролю (рис. 4.18). На основі аналізу кінетики утворення H_2S із L-цистеїну в обернених координатах встановлено, що в кастрованих самців Km для міокарду була меншою на 16,6% ($p<0,05$), ніж у контролі, і становила 2,51±0,05 мМ. Поряд з цим Vmax була більше на 11,4% ($p<0,05$), порівняно з контролем, і становила 0,586±0,005 нмоль H_2S/хв·мг протеїну. Замісна гормонотерапія кастрованих тварин тестостероном наближала кінетичні показники до рівня контрольних тварин.

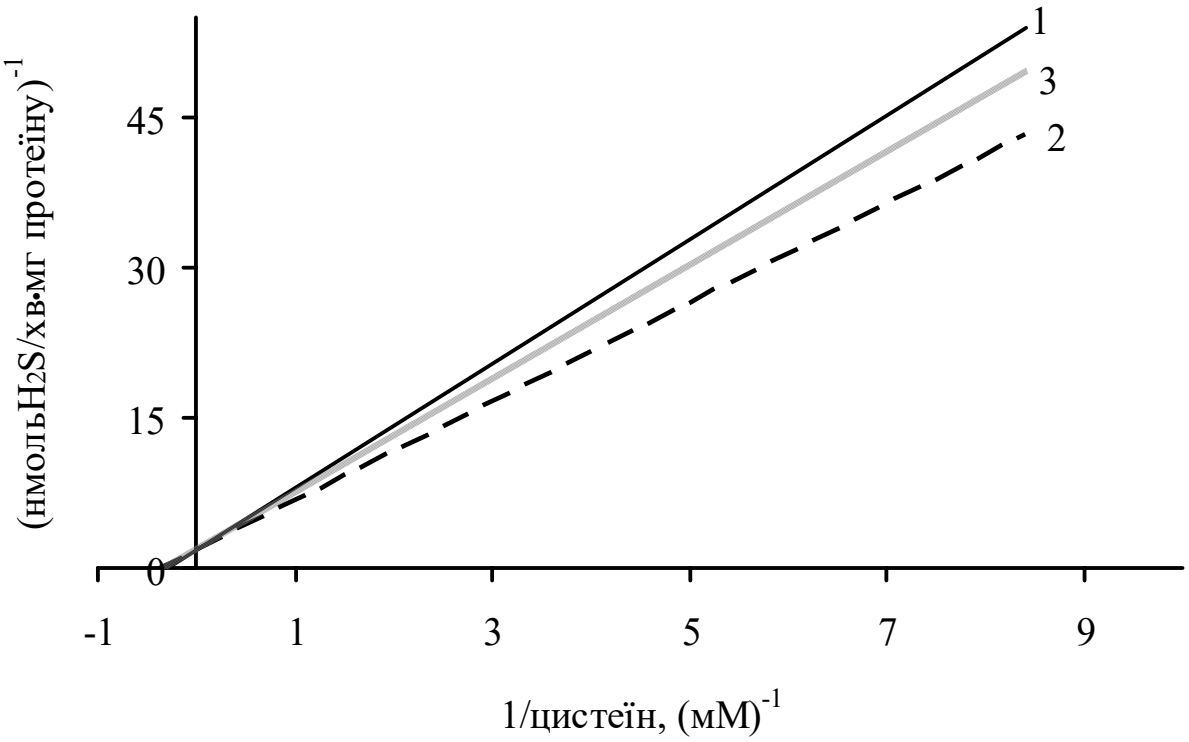


Рис. 4.18. Вплив кастрації та ЗГТ на кінетику утворення H_2S із L-цистеїну за участю ЦГЛ у міокарді самців щурів у обернених координатах Лайнуівера-Берка. Примітки: 1. - контроль; 2 - кастровані тварини; 3 - кастрація + ЗГТ.

Гонадектомія самок зумовлювала протилежні зміни кінетики реакції десульфурування цистеїну за участі ЦГЛ у міокарді, порівняно з самцями. Виявилося (рис. 4.19), що кастрація самок викликає зменшення швидкості цієї реакції у міокарді в діапазоні низьких концентрацій цистеїну (0,12-0,24 мМ) на 24-28%, а в діапазоні високих концентрацій (1,90-3,75 мМ) - на 26,3-32,2%, порівняно з контрольними тваринами. За цих умов кінетична крива Міхаеліс-Ментен зміщувалася праворуч, відносно контролю. Проведення замісної гормонотерапії повертало швидкість реакції десульфурування цистеїну до контрольних показників, а кінетична крива в координатах Міхаеліс-Ментен наближалась до такої у контрольній групі.

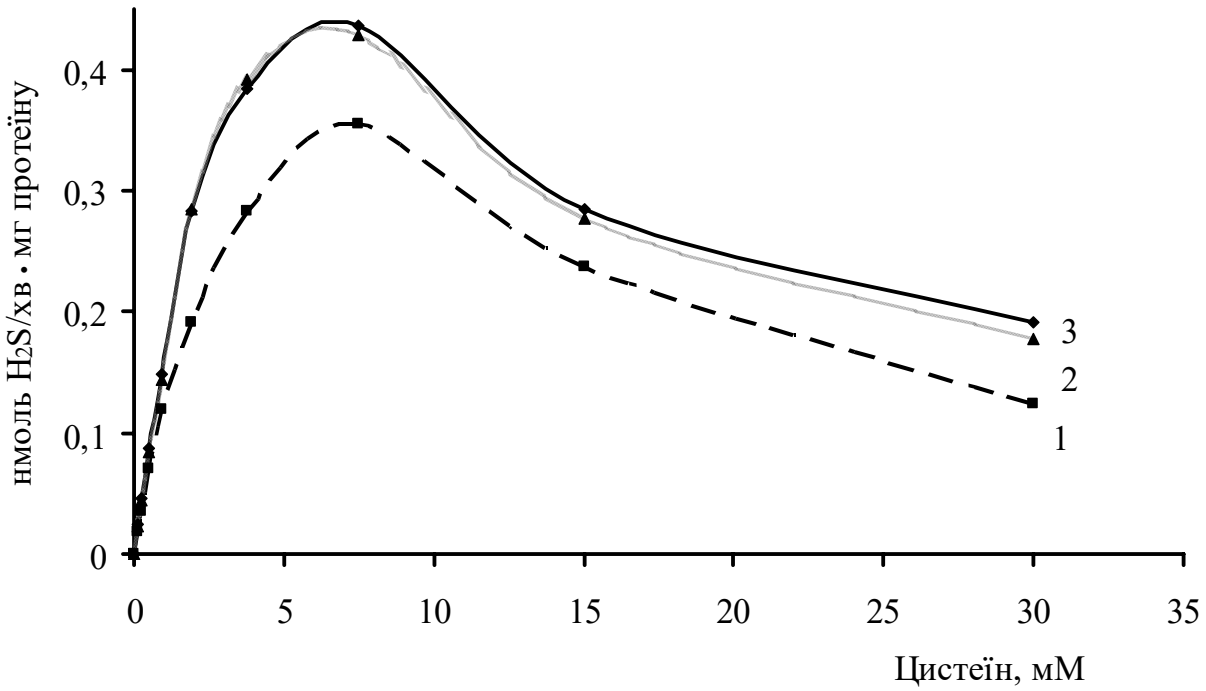


Рис. 4.19. Вплив кастрації та ЗГТ на кінетику утворення H_2S із L-цистеїну за участі ЦГЛ у міокарді самок щурів у прямих координатах. Примітки: 1. - контроль; 2 - кастровані тварини; 3 - кастрація + ЗГТ.

Кастрація самок спричиняє зміщення ліворуч кінетичної кривої утворення H_2S із L-цистеїну в міокарді у координатах Лайнуівера-Берка, відносно такої у контролі (рис. 4.20). Аналіз кінетики утворення H_2S із L-цистеїну в обернених координатах показав, що в кастрованих самок Km для міокарду була більшою на 23,8% ($p<0,05$), ніж у контролі, та становила 2,97±0,05 мМ. Поряд з цим Vmax була менша на 16,4% ($p<0,05$), порівняно з контролем, і становила 0,498±0,004 нмоль H_2S/хв·мг протеїну. Замісна гормонотерапія естрадіолом супроводжувалася вірогідними змінами кінетичних параметрів, порівняно з гонадектомованими тваринами: Km для міокарду була меншою на 20,2% ($p<0,05$) і становила 2,37±0,02 мМ, а Vmax була більше на 18,9% ($p<0,05$) і становила 0,592±0,005 нмоль H_2S/хв·мг протеїну. За цих умов кінетичні показники вірогідно не відрізнялися від контрольної групи тварин, а кінетична крива в координатах Лайнуівера-Берка наближалася до контрольної.

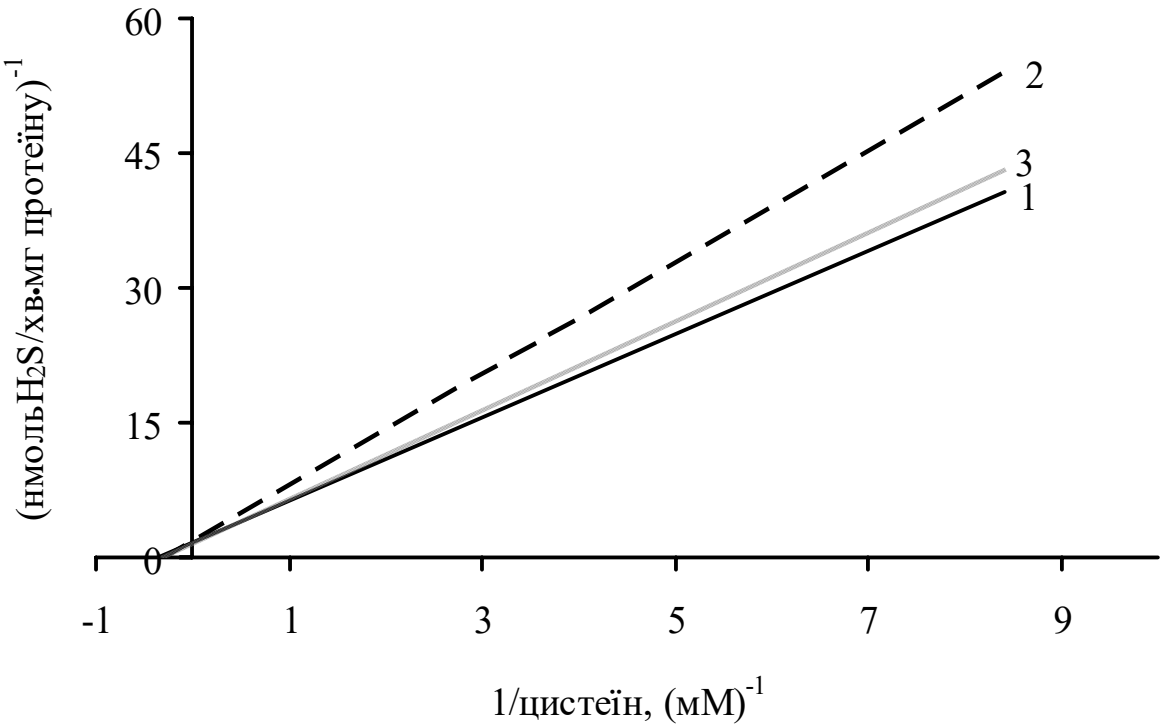


Рис. 4.20. Вплив кастрації та ЗГТ на кінетику утворення H_2S із L-цистеїну за участю ЦГЛ у міокарді самок щурів у обернених координатах Лайнуівера-Берка. Примітки: 1. - контроль; 2 - кастровані тварини; 3 - кастрація + ЗГТ.

Далі ми оцінили зміни кінетичних параметрів реакції утворення H_2S із L-цистеїну за участю ЦГЛ в аорті щурів на тлі різної насиченості статевими гормонами. Показано (рис. 4.21), що кастрація самців викликає збільшення швидкості реакції десульфурування цистеїну з утворенням H_2S в аорті особливо за низького вмісту цистеїну в інкубаційному середовищі. Так, за концентрацій цистеїну 0,12-0,24 мМ у кастрованих самців швидкість реакції була більшою на 49,0-58,3%, а за концентрацій 1,90-3,75 мМ - на 29,6-32,8%, порівняно з контрольною групою тварин. За цих умов кінетична крива Міхаеліс-Ментен зміщувалась ліворуч, відносно контрольної групт тварин. Проведення замісної гормонотерапії повертало швидкість реакції десульфурування цистеїну за участю ЦГЛ до контрольних показників, а кінетична крива в координатах Міхаеліс-Ментен наближалася до такої у контрольній групі.

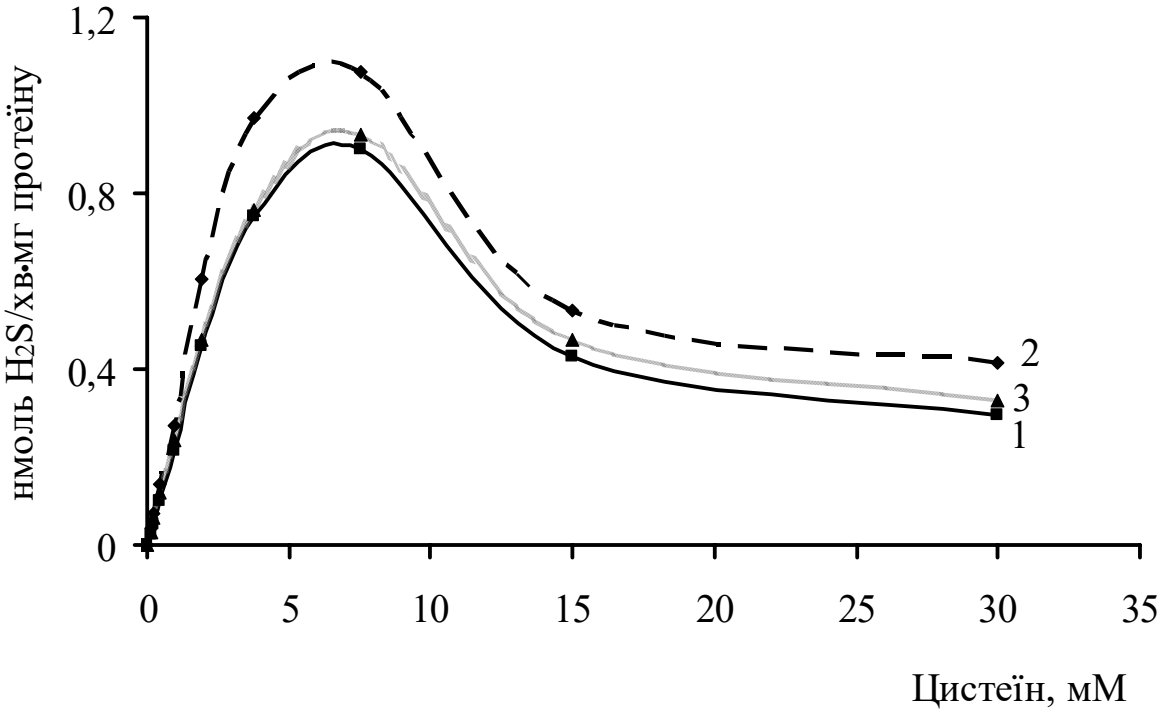


Рис. 4.21. Вплив кастрації та ЗГТ на кінетику утворення H_2S із L-цистеїну за участю ЦГЛ в аорті самців щурів у прямих координатах. Примітки: 1. - контроль; 2 - кастровані тварини; 3 - кастрація + ЗГТ.

Кастрація самців спричиняє зміщення праворуч кінетичної кривої утворення H_2S із L-цистеїну в аорті в координатах Лайнуівера-Берка, відносно такої у контролі (рис. 4.22). На основі аналізу цієї кінетичної кривої встановлено, що у кастрованих самців Km для аорти була меншою на 18,8% ($p<0,05$), ніж у контролі, і становила 3,67±0,04 мМ. Поряд з цим Vmax була більше на 13,0% ($p<0,05$), порівняно з контролем, і становила 1,69±0,01 нмоль H_2S/хв·мг протеїну. Замісна гормонотерапія тестостероном викликала вірогідні зміни кінетичних параметрів, відносно кастрованих тварин: Km для аорти була більшою на 19,6% ($p<0,05$) і становила 4,39±0,07 мМ, а Vmax була менша на 10,0% ($p<0,05$) і становила 1,53±0,03 нмоль H_2S/хв·мг протеїну. За цих умов кінетичні параметри достовірно не відрізняються від контрольної групи тварин, а кінетична крива в координатах Лайнуівера-Берка наближається до контрольної.

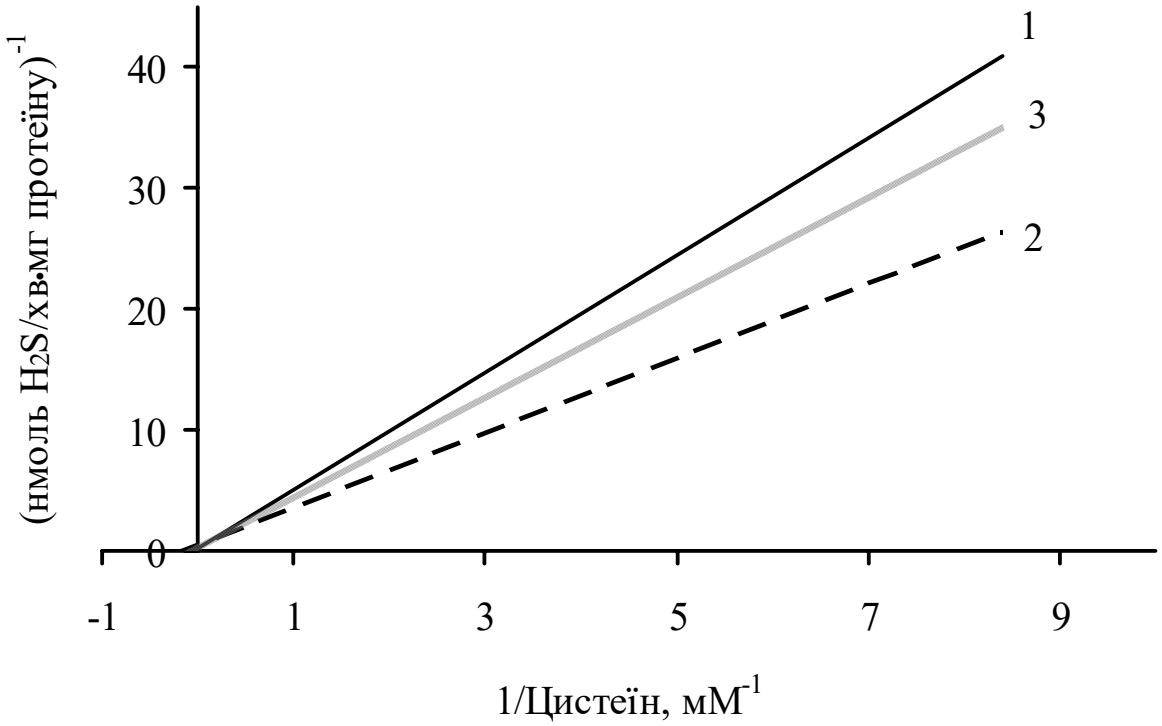


Рис. 4.22. Вплив кастрації та ЗГТ на кінетику утворення H_2S із L-цистеїну за участю ЦГЛ в аорті самців щурів у обернених координатах Лайнуівера-Берка. Примітки: 1. - контроль; 2 - кастровані тварини; 3 - кастрація + ЗГТ.

Гонадектомія самок спричиняла протилежні зміни кінетики реакції десульфурування цистеїну за участю ЦГЛ в аорті, порівняно з самцями. Виявилося (рис. 4.23), що кастрація самок викликає зменшення швидкості цієї реакції в аорті в діапазоні низьких концентрацій цистеїну (0,12-0,24 мМ) на 28,7-37,8%, а у діапазоні високих (1,90-3,75 мМ) - на 23,5-27,5%, порівняно з контрольною групою тварин. За цих умов кінетична крива Міхаеліс-Ментен зміщувалась праворуч, відносно контрольної групи тварин. Проведення замісної гормонотерапії естрадіолом повертало швидкість реакції десульфурування цистеїну до контрольних показників, кінетична крива в координатах Міхаеліс-Ментен наближалася до контролю.

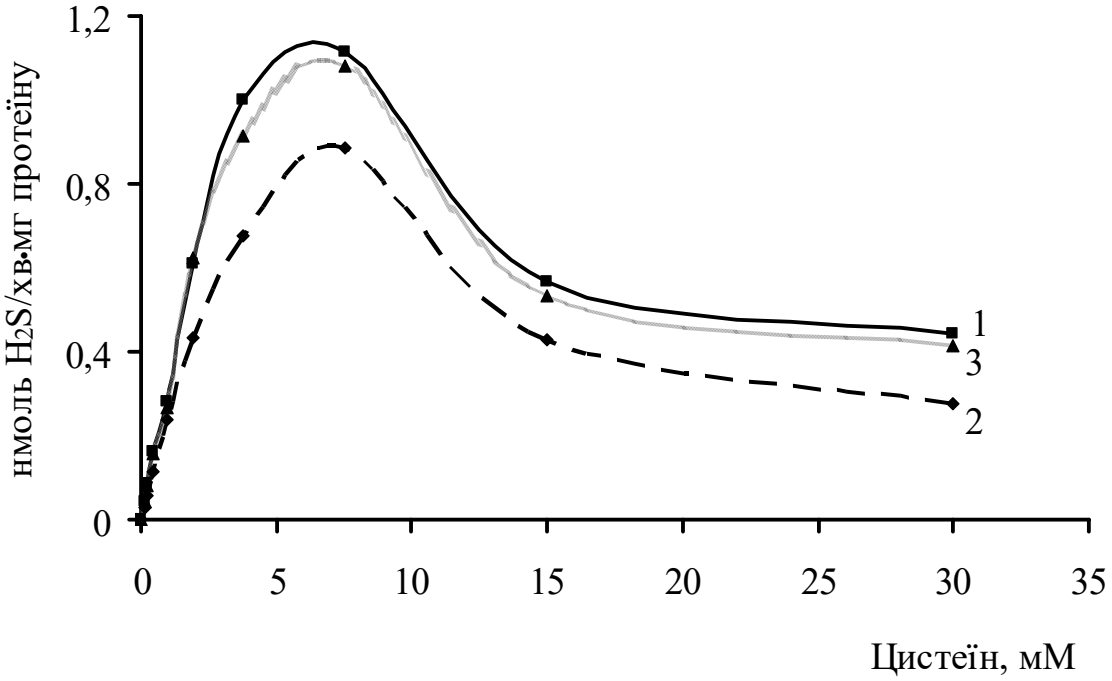


Рис. 4.23. Вплив кастрації та ЗГТ на кінетику утворення H_2S із L-цистеїну за участю ЦГЛ в аорті самок щурів у прямих координатах. Примітки: 1. - контроль; 2 - кастровані тварини; 3 - кастрація + ЗГТ.

Кастрація самок спричиняє зміщення ліворуч кінетичної кривої утворення H_2S із L-цистеїну в аорті в координатах Лайнуівера-Берка, відносно такої у контролі (рис. 4.24). Аналіз кінетики утворення H_2S із L-цистеїну в обернених координатах показав, що у кастрованих самок Km для аорти була більшою на 13,3% ($p<0,05$), ніж в контролі, та становила 4,60±0,06 мМ. Поряд з цим Vmax була менша на 16,7% ($p<0,05$), порівняно з контролем, і становила 1,45±0,02 нмоль H_2S/хв·мг протеїну. Замісна гормонотерапія естрадіолом супроводжувалася вірогідними змінами кінетичних параметрів, порівняно з гонадектомованими тваринами: Km для міокарду була меншою на 21,5% ($p<0,05$) і становила 3,61±0,05 мМ, а Vmax була більше на 15,2% ($p<0,05$) і становила 1,67±0,03 нмоль H_2S/хв·мг протеїну. За цих умов кінетичні показники вірогідно не відрізнялися від контрольної групи тварин, а кінетична крива в координатах Лайнуівера-Берка наближалася до контрольної.

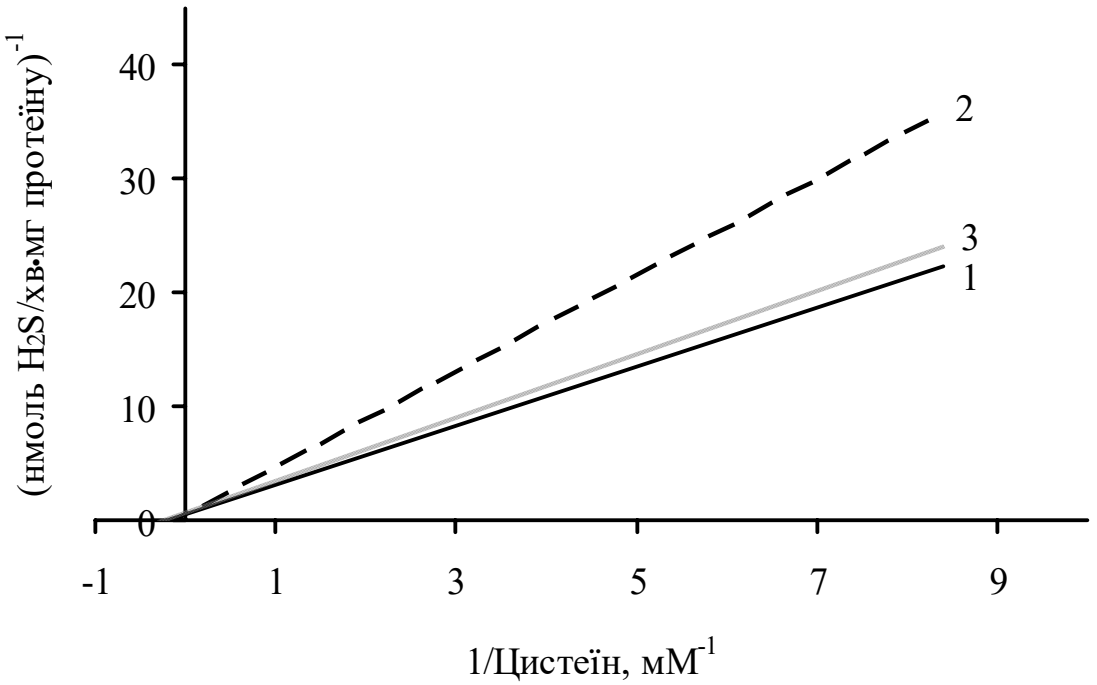


Рис. 4.24. Вплив кастрації та ЗГТ на кінетику утворення H_2S із L-цистеїну за участю ЦГЛ в аорті самок щурів у обернених координатах Лайнуівера-Берка. Примітки: 1. - контроль; 2 - кастровані тварини; 3 - кастрація + ЗГТ.

Далі ми оцінили зміни активності утворення H_2S за участю ЦАТ у серцево-судинній системі щурів на тлі різної насиченості організму тварин статевими гормонами (табл. 4.3). Встановлено, що кастрація самців спричиняє вірогідне зростання активності ЦАТ у міокарді й аорті відповідно на 31,7 та 41,4% ($p<0,05$), відносно контролю. Натомість, кастрація самок викликає вірогідне зменшення активності ЦАТ у міокарді й аорті відповідно на 22,6 та 35,3% ($p<0,05$), відносно контролю. В групі кастрованих тварин у самок активність ЦАТ у серцево-судинній системі була на 27,1-40,0% меншою ($p<0,05$), тоді як у контрольній групі - на 24,1-31,1% більшою ($p<0,05$), ніж у відповідної групи самців. Проведення замісної гормонотерапії відповідно естрадіолом та тестостероном наближає показники активності ЦАТ у серцево-судинній системі самців і самок щурів до рівня контрольної групи тварин.

Таблиця 4.3

Вплив кастрації та замісної гормонотерапії статевими гормонами на активність ЦАТ у міокарді й аорті самців і самок щурів (M±m, n=10)

Групи тварин		ЦАТ, нмоль H_2S/хв·мг протеїну	
		Самці	Самки
		Міокард	
1	Контроль	0,73±0,05	0,90±0,06
2	Кастрація	0,96±0,04*	0,70±0,05*
3	Кастрація+ЗГТ	0,78±0,07#	0,86±0,04#
		Аорта	
1	Контроль	0,57±0,04	0,74±0,06
2	Кастрація	0,80±0,05*	0,48±0,07*
3	Кастрація+ЗГТ	0,62±0,07#	0,70±0,02#

Примітки: 1. * - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників контрольної групи;

2. # - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників кастрованих тварин відповідної групи.

З'ясувалося, що активність утворення H_2S за участю ТСТ залежить від рівня насиченості організму самців і самок щурів статевими гормонами (табл. 4.4). Показно, що гонадектомія спричиняє різнонаправлені зміни активності ТСТ у серці й аорті щурів. Так, кастрація самців спричиняє вірогідне зростання активності ТСТ у міокарді й аорті відповідно на 21,6 та 28,4% ($p<0,05$), тоді як кастрація самок викликає зменшення його активності відповідно на 20,0 та 23,0% ($p<0,05$), відносно контролю. Кастрація спричиняє зміну вектору статевих відмінностей активності ТСТ у серцево-судинній системі: в групі кастрованих тварин у самок активність ТСТ була на 16,9-24,1% меншою ($p<0,05$), тоді як у контрольній групі - на 26,5-26,6% більшою ($p<0,05$), ніж у відповідної групи самців. Проведення замісної гормонотерапії відповідно естрадіолом і тестостероном наближає показники

активності ТСТ у серцево-судинній системі в самців і самок щурів до рівня контрольної групи тварин.

Таблиця 4.4

Вплив кастрації та замісної гормонотерапії статевими гормонами на активність ТСТ у міокарді й аорті самців та самок щурів (M±m, n=10)

Групи тварин		ТСТ, нмоль H_2S/хв·мг протеїну	
		Самці	Самки
		Міокард	
1	Контроль	1,27±0,04	1,60±0,07
2	Кастрація	1,54±0,05*	1,28±0,06*
3	Кастрація+ЗГТ	1,28±0,02#	1,54 ±0,05#
		Аорта	
1	Контроль	1,91±0,08	2,42±0,07
2	Кастрація	2,45±0,06*	1,86±0,05*
3	Кастрація+ЗГТ	1,95±0,07#	2,35±0,08#

Примітки: 1. * - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників контрольної групи;

2. # - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників кастрованих тварин відповідної групи.

Таким чином, нами показано, що зменшення вмісту тестостерону (кастрація самців) супроводжується зростанням активності H_2S-продукуючих ензимів у міокарді й аорті, тоді як дефіцит естрадіолу (кастрація самок) викликає зменшення синтезу H_2S. Тому ми перевірили чи зберігаються виявлені тенденції на тлі фізіологічного зниження рівня статевих гормонів у процесі старіння. Для цього оцінили активність H_2S-продукуючих ензимів у міокарді у статевозрілих (6-8 міс.) та старих (24-26 міс.) тварин обох статей (табл. 4.5). Встановлено, що в процесі старіння самців відмічається вірогідне зменшення активності синтезу H_2S. Так, у старих самців активність ЦГЛ,

ЦАТ та ТСТ вірогідно менша на 13,0; 20,8 та 10,1% ($p<0,05$) відповідно порівняно зі статевозрілими щурами. В процесі старіння самок також відмічається достовірне зменшення активності H_2S-продукуючих ензимів у міокарді, причому виразність змін значно більша, порівняно з самцями. Зокрема, у старих самок активність ЦГЛ, ЦАТ та ТСТ вірогідно менша відповідно на 24,0; 26,7 та 20,0% ($p<0,05$), порівняно зі статевозрілими щурами. Таким чином за умов фізіологічного зниження статевих гормонів у процесі старіння у самців і самок відмічається зменшення ензиматичної продукції H_2S.

Таблиця 4.5

Активність H_2S-продукуючих ензимів у міокарді самців і самок щурів різних вікових груп (M±m, n=10)

Групи тварин			ЦГЛ	ЦАТ	ТСТ
			нмоль H_2S/хв·мг протеїну		
1	Самці	Статевозрілі	0,23±0,010	0,72±0,04	1,29±0,03
2		Старі	0,20±0,004*	0,57±0,01*	1,16±0,02*
1	Самки	Статевозрілі	0,38±0,010	0,90±0,06	1,60±0,07
2		Старі	0,29±0,020*	0,66±0,03*	1,28±0,04*

Примітка. * - статистично вірогідна відмінність відносно відповідної групи статевозрілих тварин.

Встановлено, що швидкість утилізації екзогенного H_2S у міокарді змінюється залежно від рівня насиченості організму самців і самок щурів статевими гормонами (табл. 4.6). 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. За цих умов змінюється вектор статевих відмінностей питомої швидкості утилізації екзогенного H_2S у міокарді: в групі кастрованих тварин у самок цей показник був більшим на 24,5%

(p<0,05), а в контрольній групі меншим на 81,0% (p<0,05), відносно відповідної групи самців. 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. За цих умов показники споживання H_2S міокардом наближалися до рівня контролю.

Таблиця 4.6

Вплив кастрації та замісної гормонотерапії статевими гормонами на швидкість утилізації екзогенного H_2S у міокарді самців і самок щурів (M±m, n=10)

Групи тварин		Швидкість утилізації H_2S, нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну	
		Самці	Самки
1	Контроль	0,71±0,03	0,54±0,02
2	Кастрація	0,42±0,04*	0,76±0,05*
3	Кастрація+ЗГТ	0,68±0,05#	0,57±0,02#

Примітки: 1. * - статистично достовірна різниця (p<0,05) відносно показників контрольної групи;

2. # - статистично достовірна різниця (p<0,05) відносно показників кастрованих тварин відповідної групи.

З’ясувалося, що різний рівень насиченості статевими гормонами впливає на активність мітохондріальної сульфітоксидази в міокарді самців і самок щурів (табл. 4.7). Гонадектомія тварин викликає зменшення активності сульфітоксидази у самців і самок щурів відповідно на 29,4 та 31,0% (p<0,05), відносно контрольної групи тварин. Натомість проведення ЗГТ кастрованим тваринам спричиняє збільшення активності цього ферменту в міокарді відповідно на 37,2 та 38,6% у самців і самок щурів (p<0,05). За цих умов

активність міокардіальної сульфітоксидази вірогідно не відрізняється від показників контрольної групи тварин.

Таблиця 4.7

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

Групи тварин		Сульфітоксидаза, нмоль/хв·мг протеїну	
		Самці	Самки
1	Контроль	4,96±0,45	5,14±0,33
2	Кастрація	3,50±0,30*	3,55±0,27*
3	Кастрація+ЗГТ	4,80±0,35#	4,92±0,38#

Примітки: 1. * - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників контрольної групи;

2. # - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників кастрованих тварин відповідної групи.

Наприкінці ми оцінили зміни вмісту H_2S у самців і самок щурів залежно від рівня насиченості статевими гормонами (табл. 4.8). Гонадектомія тварин спричиняє різноспрямований вплив на рівень цього метаболіту. Виявилося, що кастрація самців викликає вірогідне збільшення вмісту H_2S у міокарді й аорті відповідно на 22,2 та 24,8% ($p<0,05$), відносно контролю. В той же час, оваріектомія самок супроводжувалася вірогідним зменшенням рівня H_2S у серці й аорті відповідно на 16,3 та 18,8% ($p<0,05$), порівняно з контролем. Кастрація тварин змінювала направленість статевих відмінностей вмісту H_2S у серцево-судинній системі: у самок у контрольній групі його рівень був вищим на 19,1-20,9%, тоді як у групі кастрованих тварин - меншим на 18,4-21,4%, порівняно з самцями. Замісна гормонотерапія кастрованим тваринам повертала направленість статевих відмінностей рівня H_2S до контролю.

Таблиця 4.8

Вплив кастрації та замісної гормонотерапії статевими гормонами на вміст H_2S у міокарді й аорті самців і самок щурів (M±m, n=10)

Групи тварин		H_2S, нмоль/мг протеїну	
		Самці	Самки
		Міокард	
1	Контроль	2,61±0,11	3,11±0,10
2	Кастрація	3,19±0,14*	2,60±0,08*
3	Кастрація+ЗГТ	2,73±0,09#	3,07±0,06#
		Аорта	
1	Контроль	1,25±0,05	1,51±0,05
2	Кастрація	1,56±0,04*	1,22±0,03*
3	Кастрація+ЗГТ	1,33±0,03#	1,44±0,04#

Примітки: 1. * - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників контрольної групи;

2. # - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників кастрованих тварин відповідної групи.

Дослідження показали, що стан системи H_2S у міокарді й аорті залежить від рівня насиченості організму тварин статевими гормонами. Показано, що гонадектомія самців і самок спричиняє різновекторну дію на метаболізм H_2S у серцево-судинній системі. Так, кастрація самок викликає зменшення активності H_2S-продукуючих ензимів (ЦГЛ, ЦАТ та ТСТ), зниження експресії гену ЦГЛ, зменшення спорідненості ЦГЛ до цистеїну та її максимальної каталітичної активності, збільшення питомої швидкості утилізації H_2S, зниження мітохондріальної активності сульфітоксидази, що супроводжується зменшенням рівня H_2S у міокарді й аорті. Натомість тестектомія самців викликає протилежні зміни в системі H_2S (за винятком того, що активність сульфітоксидази зменшувалась). Замісна гормонотерапія повертала показники стану системи H_2S до рівня контрольних тварин.

4.3 Зв'язок між вмістом статевих гормонів, рівнем сірковмісних метаболітів у крові та маркерами обміну H_2S у серці й аорті щурів обох статей

Кореляційний аналіз надав докази причетності статевих гормонів до регуляції метаболізму H_2S у серцево-судинній системі щурів (табл. 4.9). Показано, що рівень тестостерону в крові обернено корелює з рівнем H_2S, активністю ЦГЛ, ЦАТ, ТСТ у міокарді й аорті, відносною експресією гену ЦГЛ, а також виявляє прямі зв'язки зі швидкістю утилізації екзогенного H_2S у міокарді. Натомість, рівень естрогену, навпаки, виявляє прямі асоціативні зв'язки з рівнем H_2S, активністю ЦГЛ, ЦАТ, ТСТ, відносною експресією гену ЦГЛ у міокарді й аорті та обернений зв'язок із швидкістю утилізації екзогенного H_2S у міокарді. Найбільш сильні асоціативні зв'язки виникали між рівнем статевих гормонів і відносною експресією гену ЦГЛ. В той же час, рівень статевих гормонів вірогідно не корелює з активністю мітохондріальної сульфітоксидази у міокарді.

Таблиця 4.9

Кореляційний аналіз між показниками обміну H_2S у серцево-судинній системі та вмістом статевих гормонів у плазмі крові щурів (n=60)

Показники	Вміст статевих гормонів в сироватці крові	
	Тестостерон	Естрадіол
1	2	3
	Міокард	
Активність ЦГЛ	-0,45*	0,51*
Відносна експресія гена ЦГЛ	-0,58*	0,62*
Активність ЦАТ	-0,50*	0,45*
Активність ТСТ	-0,52*	0,42*

Продовження табл. 4.9

1	2	3
Швидкість утилізації екзогенного H_2S	0,51*	-0,40*
Активність сульфітоксидази	0,22	0,26
Вміст H_2S	-0,40*	0,45*
	Аорта	
Активність ЦГЛ	-0,51*	0,50*
Активність ЦАТ	-0,58*	0,42*
Активність ТСТ	-0,54*	0,46*
Вміст H_2S	-0,48*	0,58*

Примітка. * - достовірність коефіцієнту кореляції при $r \geq 0,36$ ($p<0,05$)

Персентильний аналіз (табл. 4.10) показав, що високий вміст тестостерону в плазмі крові асоціюється з низьким вмістом H_2S і низькою активністю ЦГЛ, ЦАТ, ТСТ у міокарді й аорті, низьким рівнем експресії гену ЦГЛ, високою швидкістю утилізації екзогенного H_2S й активністю сульфітоксидази в міокарді. Так, збільшення рівня тестостерону в плазмі крові в 12,9 разів (2 група) супроводжується зменшенням у серцево-судинній системі вмісту H_2S на 11,5-12,8%, активності ЦГЛ, ЦАТ, ТСТ на 11,5-23,2%, зниженням у міокарді відносного рівня експресії гену ЦГЛ на 13,0%, в порівнянні з показниками 1 групи. Поряд з цим відмічається зростання в міокарді швидкості утилізації екзогенного H_2S й активності сульфітоксидази на 30-68,5%, порівняно з 1 групою. В групі тварин з максимальним рівнем тестостерону в плазмі крові (3 група) вміст H_2S, активність ЦГЛ, ЦАТ, ТСТ у міокарді й аорті, рівень експресії гену ЦГЛ у міокарді є найменшими, а швидкість утилізації екзогенного H_2S й активність сульфітоксидази в міокарді найбільшою. Зауважимо, що показники обміну H_2S у серцево-судинній системі в 3 групі статистично достовірно відрізняються від таких в 1 та 2 групах тварин.

Таблиця 4.10

Персентильний аналіз показників обміну H_2S у серцево-судинній системі від вмісту тестостерону в плазмі крові самців щурів (M±m)

Показники	Рівень тестостерону в плазмі крові самців, нг/дл		
	0-25 персентиль n=8	25-75 персентиль n=14	75-100 персентиль n=8
	1 група	2 група	3 група
	6,04±0,68	77,6±8,34*	129±5,82*#
	Міокард		
ЦГЛ, нмоль/хв·мг протеїну	0,35±0,02	0,31±0,01*	0,27±0,03*#
Відносна експресія гена ЦГЛ	0,0026±0,0002	0,0022±0,0001*	0,0015±0,0001*#
ЦАТ, нмоль/хв·мг протеїну	0,99±0,04	0,82±0,05*	0,66±0,04*#
ТСТ, нмоль/хв·мг протеїну	1,53±0,05	1,35±0,04*	1,21±0,02*#
Швидкість утилізації екзогенного H_2S, нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну	0,38±0,03	0,64±0,02*	0,77±0,03*#
Сульфітоксидаза, нмоль/хв·мг протеїну	3,37±0,36	4,35±0,24*	5,60±0,47*#
H_2S, нмоль/мг протеїну	3,26±0,17	2,84±0,07*	2,42±0,06*#
	Аорта		
ЦГЛ, нмоль/хв·мг протеїну	1,03±0,04	0,84±0,02*	0,74±0,02*#
ЦАТ, нмоль/хв·мг протеїну	0,85±0,04	0,65±0,04*	0,49±0,06*#
ТСТ, нмоль/хв·мг протеїну	2,40±0,06	2,09±0,08*	1,83±0,07*#
H_2S, нмоль/мг протеїну	1,56±0,05	1,38±0,03*	1,19±0,05*#

Примітки: 1. * - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників 1 групи;

2. # - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників 2 групи.

Виявлено (табл. 4.11), що високий вміст естрадіолу в плазмі крові пов'язаний з високим вмістом H_2S та високою активністю ЦГЛ, ЦАТ, ТСТ у

міокарді й аорті, високим рівнем експресії гену ЦГЛ, низькою швидкістю утилізації екзогенного H_2S й активністю сульфітоксидази в міокарді. Так, збільшення рівня естрадіолу в плазмі крові в 6,5 разів (2 група) супроводжується збільшенням у серцево-судинній системі вмісту H_2S на 12,7-13,4%, активності ЦГЛ, ЦАТ, ТСТ на 15,1-61,2%, зростанням у міокарді відносного рівня експресії гену ЦГЛ на 39,5%, порівняно з показниками 1 групи. Водночас відмічається зменшення в міокарді швидкості утилізації екзогенного H_2S на 26,9%, порівняно з 1 групою. В групі тварин з максимальним рівнем естрадіолу в плазмі крові (3 група) вміст H_2S, активність ЦГЛ, ЦАТ, ТСТ і рівень експресії гену ЦГЛ є найвищими, а швидкість утилізації екзогенного H_2S – найменшою. Зауважимо, що показники обміну H_2S у серцево-судинній системі в 3 групі статистично достовірно відрізняються від таких у 1 та 2 групах тварин.

Таблиця 4.11

Персентильний аналіз показників обміну H_2S у серцево-судинній системі залежно від вмісту естрадіолу в плазмі крові самців щурів (M±m)

Показники	Рівень естрадіолу в плазмі крові самок, нг/дл		
	0-25 персентиль n=8	0-25 персентиль n=8	0-25 персентиль n=8
	1 група	1 група	1 група
	0,70±0,01	4,55±0,43*	6,08±0,17*#
1	2	3	4
	Міокард		
ЦГЛ, нмоль/хв·мг протеїну	0,30±0,01	0,35±0,02*	0,39±0,01*#
Відносна експресія гена ЦГЛ	0,0020±0,0002	0,0027±0,0002*	0,0036±0,0001*#
ЦАТ, нмоль/хв·мг протеїну	0,67±0,05	0,80±0,03*	1,01±0,06*#
ТСТ, нмоль/хв·мг протеїну	1,26±0,06	1,47±0,04*	1,71±0,06*#

Продовження табл. 4.11

1	2	3	4
Швидкість утилізації екзогенного H_2S, нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну	0,73±0,06	0,54±0,02*	0,66±0,05*#
Сульфітоксидаза, нмоль/хв·мг протеїну	3,39±0,30	4,51±0,23*	5,73±0,37*#
H_2S, нмоль/мг протеїну	2,58±0,07	2,92±0,07*	3,29±0,07*#
	Аорта		
ЦГЛ, нмоль/хв·мг протеїну	0,78±0,03	0,92±0,02*	1,04±0,04*#
ЦАТ, нмоль/хв·мг протеїну	0,41±0,06	0,66±0,03*	0,83±0,04*#
ТСТ, нмоль/хв·мг протеїну	1,82±0,05	2,26±0,07*	2,51±0,06*#
H_2S, нмоль/мг протеїну	1,23±0,03	1,39±0,04*	1,55±0,05*#

Примітки: 1. * - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників 1 групи;

2. # - статистично достовірна різниця ($p<0,05$) відносно показників 2 групи.

Кореляційний аналіз (табл. 4.12) між показниками обміну H_2S у серцево-судинній системі та вмістом сірковмісних метаболітів у сироватці крові щурів показав, що рівень гомоцистеїну, цистеїну та H_2S у крові є важливими детермінантами статевих особливостей обміну H_2S у міокарді й аорті щурів. Встановлено, що рівні гомоцистеїну та цистеїну в крові виявляють вірогідні обернені зв'язки з вмістом H_2S, активністю ЦГЛ, ЦАТ, ТСТ у міокарді й аорті, рівнем експресії гену ЦГЛ у міокарді та достовірний прямий зв'язок зі швидкістю утилізації екзогенного H_2S у міокарді. Натомість, рівень H_2S у сироватці крові виявляє прямі асоціативні зв'язки з вмістом H_2S, активністю ЦГЛ, ЦАТ, ТСТ у міокарді й аорті, рівнем експресії гену ЦГЛ у міокарді та обернений зв'язок зі швидкістю утилізації екзогенного H_2S у міокарді. Зауважимо, що рівні гомоцистеїну, цистеїну та H_2S у крові не виявляють зв'язків з активністю сульфітоксидази в міокарді.

Таблиця 4.12

Кореляційний аналіз між показниками обміну H_2S в серцево-судинній системі та вмістом сірковмісних метаболітів у сироватці крові щурів (n=60)

Показники	Гомоцистеїн		Цистеїн		H_2S	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
	Міокард					
Активність ЦГЛ	-0,54*	-0,60*	-0,56*	-0,69*	0,64*	0,70*
Відносний рівень експресії гена ЦГЛ	-0,49*	-0,50*	-0,44*	-0,48*	0,42*	0,45*
Активність ЦАТ	-0,60*	-0,64*	-0,61*	-0,65*	0,66*	0,71*
Активність ТСТ	-0,58*	-0,62*	-0,56*	-0,67*	0,56*	0,68*
Швидкість утилізації екзогенного H_2S	0,50*	0,56*	0,48*	0,52*	-0,50*	-0,61*
Активність сульфітоксидази	-0,22	-0,12	-0,11	-0,24	0,26	0,25
Вміст H_2S	-0,62*	-0,69*	-0,64*	-0,66*	0,71*	0,75*
	Аорта					
Активність ЦГЛ	-0,61*	-0,65*	-0,58*	-0,63*	0,66*	0,71*
Активність ЦАТ	-0,56*	-0,60*	-0,54*	-0,58*	0,60*	0,69*
Активність ТСТ	-0,53*	-0,56*	-0,52*	-0,60*	0,54*	0,62*
Вміст H_2S	-0,60*	-0,63*	-0,66*	-0,68*	0,73*	0,77*

Примітка. * - достовірність коефіцієнту кореляції при $r \geq 0,36$ ($p<0,05$).

Підсумовуючи результати цього розділу, можна зробити висновок, що стать, рівень статевих гормонів і вміст гомоцистеїну, цистеїну й H_2S у крові є важливими регуляторними чинниками, які визначають характер метаболізму H_2S у серцево-судинній системі самців і самок щурів. Встановлено, що в самців у серцево-судинній системі відмічається менша активність H_2S-продукуючих ензимів, нижча спорідненість до цистеїну та максимальна каталітична активність ЦГЛ, менший рівень експресії гену *CSE*, більша швидкість утилізації H_2S у міокарді, що супроводжується більш низьким вмістом H_2S у серці й аорті, порівняно з самками щурів.

Гонадектомія тварин спричиняє різноспрямований вплив на метаболізм H_2S у серцево-судинній системі самців і самок щурів. Кастрація самців викликає збільшення ензиматичної продукції H_2S, експресії гену *CSE* і зменшення швидкості утилізації H_2S, що веде до збільшення рівня H_2S у міокарді й аорті, тоді як оваріектомія самок має протилежний вплив на вказані показники. Проведення замісної гормонотерапії повертає вектор статевих відмінностей до контролю. Кореляційний та персентильний аналізи показали, що рівень статевих гормонів, вміст гомоцистеїну, цистеїну й H_2S у крові залучені до регуляції процесів синтезу й утилізації H_2S, експресії гену *CSE* і кінетичних параметрів ЦГЛ.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях [47, 50, 51, 53-56, 79, 80, 287, 412].

РОЗДІЛ 5
БІОХІМІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ СТАНУ СЕРЦЯ Й АОРТИ В НОРМІ ТА ЗА УМОВ ІШЕМІЇ / РЕПЕРФУЗІЇ: ЗВ'ЯЗОК З РІВНЕМ СТАТЕВИХ ГОРМОНІВ Й ВМІСТОМ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В СЕРЦЕВО-СУДИННІЙ СИСТЕМІ ЩУРІВ

В попередньому розділі роботи була показана наявність статевих відмінностей обміну H_2S у серцево-судинній системі: у самців відмічається менша активність H_2S-продукуючих ензимів, нижча спорідненість до цистеїну та максимальна каталітична активність ЦГЛ, менший рівень експресії гену ЦГЛ, більша швидкість утилізації H_2S у міокарді, що супроводжується більш низьким вмістом H_2S у серці й аорті, порівняно з самками щурів.

Виникає питання, чи мають статеві особливості обміну H_2S у міокарді та судинах самостійне значення у формуванні стать-асоційованої патології, чи вони є лише наслідком інших процесів (мітохондріальної дисфункції, посиленої генерації активних форм кисню, тіол-дисульфідного дисбалансу тощо), які інтегровані у механізми гендерного диморфізму серцево-судинних захворювань? Не виключено, що у самців і самок щурів існують відмінності в чутливості серця та судин до дії модуляторів обміну H_2S - екзогенних донорів, специфічних і неспецифічних інгібіторів H_2S-синтезуючих ензимів. Залишається відкритим питання щодо зміни чутливості серцево-судинної системи до дії модуляторів обміну H_2S у самців і самок щурів на тлі експериментальної патології (наприклад ішемії / реперфузії).

Тому метою цього розділу роботи була оцінка функціональних показників стану серця та судин у самців і самок щурів залежно від рівня статевих гормонів (кастрація та замісна гормонотерапія), вмісту H_2S у міокарді й аорті (введення донору H_2S - натрій гідрогенсульфіду й інгібітору його синтезу - пропаргілгліцину), а також на тлі ішемії / реперфузії.

5.1 Біохімічні та функціональні показники стану серця й аорти щурів обох статей залежно від рівня статевих гормонів та їх зв'язок з рівнем гідроген сульфіду в міокарді й аорті

Експериментальні дослідження були проведені на 60 статевозрілих тваринах: 1 і 2 групи - відповідно контрольна група самців (n=10) і самок щурів (n=10); 3 і 4 групи - кастровані самці (тестектомія, n=10) та самки (оваріектомія, n=10); 5 та 6 групи - кастровані тварини, яким проводили замісну гормонотерапію відповідно естрадіолом (n=10) чи тестостероном (n=10). Окремі дослідження були проведені на 20 старих щурах (10 самках та 10 самцях).

Стан прооксидантної системи міокарду й аорти оцінювали за активністю НАДФН-оксидази як головного продуцента супероксид-аніону (табл. 5. 1). Встановлено, що у самців у міокарді й аорті активність НАДФН-оксидази достовірно більша відповідно на 55,7 та 31,7% ($p<0,05$), ніж у самок. Гонадектомія тварин виявляє різний вплив на активність вказаного ферменту у самців і самок. Так, кастрація самців супроводжується зменшенням активності НАДФН-оксидази в міокарді й аорті відповідно на 51,2 та 30,1% ($p<0,05$). Натомість оваріектомія самок викликає протилежні зміни: в міокарді й аорті активність НАДФН-оксидази зростала на 60,8 і 30,1% ($p<0,05$). За цих умов відмічається зміна вектору статевих відмінностей: у групі кастрованих самок активність НАДФН-оксидази в міокарді й аорті достовірно більша на 112 та 55,2% ($p<0,05$), ніж у самців. Проведення замісної гормонотерапії статевими гормонами наближає показники активності досліджуваного ензиму до рівня контрольної групи тварин. Кореляційний аналіз засвідчив, що між рівнем тестостерону й активністю НАДФН-оксидази в міокарді й аорті виникає прямий зв'язок ($r=0,60-0,64$, $p<0,05$). Натомість зв'язок з рівнем естрадіолу мав протилежну направленість ($r=-(0,50-0,52)$, $p<0,05$). Між рівнем H_2S й активністю НАДФН-

оксидази в міокарді й аорті виникав обернений зв'язок (у самців r=-(0,68-0,70), а у самок r=-(0,61-0,64), p<0,05).

Таблиця 5.1

Активність НАДФН-оксидази в міокарді й аорті тварин різної статі та з різним рівнем статевих гормонів (M±m, n=10)

Групи тварин		НАДФН-оксидаза, нмоль/хв·мг протеїну	
		Самці	Самки
		Міокард	
1	Контроль	1,23±0,08	0,79±0,04°
2	Кастрація	0,60±0,07*	1,27±0,075*°
3	Кастрація+ЗГТ	1,18±0,13#	0,85±0,03#°
		Аорта	
1	Контроль	0,83±0,03	0,63±0,04°
2	Кастрація	0,58±0,05*	0,90±0,02*°
3	Кастрація+ЗГТ	0,80±0,04#	0,66±0,06#°

Примітки: 1. * - статистично достовірна (p<0,05) відмінність відносно відповідного контролю;

2. # - статистично достовірна (p<0,05) відмінність відносно відповідної групи кастрованих тварин;

3. ° - статистично достовірна (p<0,05) відмінність між самцями та самками.

Стан антиоксидантної системи в міокарді характеризували за активністю супероксиддисмутази (табл. 5.2). Виявилося, що у самців у міокарді й аорті активність супероксиддисмутази вірогідно менша відповідно на 21,1 та 18,6% (p<0,05), ніж у самок. Гонадектомія тварин має різний вплив на активність цього ферменту у самців і самок. Так, кастрація самців супроводжується зростанням активності супероксиддисмутази в міокарді й аорті відповідно на 32,8 та 30,0% (p<0,05), відносно контролю. Натомість оваріектомія самок викликає протилежні зміни: у міокарді й аорті активність супероксиддисмутази зменшується відповідно на 22,8 та 23,4% (p<0,05),

відносно контролю. За цих умов відмічається зміна вектору статевих відмінностей: у групі кастрованих самок активність супероксиддисмутази в міокарді й аорті вірогідно менша відповідно на 26,4 та 27,6% ($p<0,05$), ніж у самців. Проведення замісної гормонотерапії статевими гормонами наближає показники активності досліджуваних ензимів до рівня контрольної групи тварин. Кореляційний аналіз засвідчив, що між рівнем тестостерону й активністю супероксиддисмутази виник обернений зв'язок ($r=-(0,58-0,60)$, $p<0,05$). Натомість зв'язок з рівнем естрадіолу мав протилежну направленість ($r=0,62-0,64$, $p<0,05$). Між рівнем H_2S й активністю супероксиддисмутази в міокарді й аорті виявляється прямий зв'язок (у самців $r=0,74-0,76$, у самок $r=0,65-0,68$, $p<0,05$).

Таблиця 5.2

Активність супероксиддисмутази в міокарді й аорті тварин різної статі та з різним рівнем статевих гормонів (M±m, n=10)

Групи тварин		Супероксиддисмутаза, ум.од./мг протеїну	
		Самці	Самки
		Міокард	
1	Контроль	3,60±0,13	4,56±0,16°
2	Кастрація	4,78±0,19*	3,52±0,14*°
3	Кастрація+ЗГТ	3,78±0,11#	4,49±0,12#°
		Аорта	
1	Контроль	2,23±0,09	2,74±0,13°
2	Кастрація	2,90±0,10*	2,10±0,08*°
3	Кастрація+ЗГТ	2,30±0,09#	2,68±0,11#°

Примітки: 1. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю;

2. # - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідної групи кастрованих тварин;

3. ° - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність між самцями та самками.

Також ми дослідили, як змінюється активність іншого антиоксидантного ензиму – тіоредоксинредуктази (табл. 5.3). На відміну від супероксиддисмутази, яка забезпечує інактивацію супероксид-аніону, тіоредоксинредуктаза забезпечує відновлення тіоредоксину, який відіграє важливу роль у тіол-дисульфідному обміні, регуляції активності редокс-чутливих протеїнів, депонуванні H_2S, синтезі дезоксирибонуклеотидів і багатьох інших процесах. З'ясувалося, що у самців тварин активність тіоредоксинредуктази в міокарді вірогідно менша на 18,6% ($p<0,05$), ніж у самок. Гонадектомія самців викликала зростання активності цього ферменту на 25,0% ($p<0,05$), тоді як кастрація самок супроводжується зменшенням його активності на 22,1% ($p<0,05$). Проведення замісної гормонотерапії наближає показники активності тіоредоксинредуктази до рівня контрольної групи. Виявилось, що між рівнем тестостерону й активністю тіоредоксинредуктази виникає обернений зв'язок ($r=-0,62$, $p<0,05$), тоді як з рівнем естрадіолу - пряма кореляція ($r=0,65$, $p<0,05$). Між рівнем H_2S й активністю ферменту зафіксований прямий зв'язок (у самців $r=0,75$, а у самок $r=0,72$, $p<0,05$).

Таблиця 5.3

Активність тіоредоксинредуктази в міокарді тварин різної статі та з різним рівнем статевих гормонів (M±m, n=10)

Групи тварин		Тіоредоксинредуктаза, нмоль/хв·мг протеїну	
		Самці	Самки
1	Контроль	4,28±0,25	5,26±0,21°
2	Кастрація	5,35±0,17*	4,10±0,19*°
3	Кастрація+ЗГТ	4,32±0,1805#	5,16±0,23#°

Примітки: 1. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю;

2. # - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідної групи кастрованих тварин;

3. ° - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність між самцями та самками.

Система глутатіону відіграє важливу роль не лише в інактивації активних форм кисню та підтримці тіол-дисульфідної рівноваги, а й у регуляції функцій багатьох редокс-чутливих протеїнів (табл. 5.4). Виявилося, що тварини різної статі відрізняються за фракційним розподілом глутатіону в міокарді. Так, у самців відмічається вірогідно більший рівень дисульфіду глутатіону на 42,6% ($p<0,05$) та достовірно менший вміст відновленого глутатіону й співвідношення GSH/GSSG відповідно на 15,5 та 40,1% ($p<0,05$), відносно самок. Кастрація самців супроводжується зменшенням рівня GSSG на 38,1% ($p<0,05$) та зростанням рівня GSH і співвідношення GSH/GSSG відповідно на 19,7 та 94,5% ($p<0,05$), відносно контролю. В той же час кастрація самок викликає збільшення рівня GSSG на 48,5% ($p<0,05$) та зменшення вмісту GSH і співвідношення GSH/GSSG відповідно на 19,3 та 45,7% ($p<0,05$), відносно контролю. За умов гонадектомії змінюється вектор статевих відмінностей системи глутатіону в серці: у самців рівень GSSG менший на 40,6% ($p<0,05$), а вміст GSH і співвідношення GSH/GSSG більші відповідно на 25,3 та 115% ($p<0,05$), ніж у самок. Проведення замісної гормонотерапії відповідно тестостероном та естрадіолом повертає направленість статевих відмінностей у системі глутатіону до показників контрольної групи тварин; за цих умов показники фракційного розподілу глутатіону наближаються до контролю. Вміст відновленого глутатіону та співвідношення GSH/GSSG виявляють обернені кореляції з рівнем тестостерону ($r=-(0,57-0,59$, $p<0,05$), тоді як із вмістом естрадіолу в сироватці крові виникають прямі зв'язки ($r=0,54-0,56$, $p<0,05$). Рівень дисульфідної форми глутатіону навпаки виявляє прямі кореляції з рівнем тестостерону ($r=0,58$, $p<0,05$), тоді як із вмістом естрадіолу - обернені зв'язки ($r=-0,61$, $p<0,05$). Встановлено, що асоціативні зв'язки виникають також між вмістом H_2S у серці та рівнем окисненого глутатіону - обернена кореляція (у самців $r=-0,68$, у самок $r=-0,64$, $p<0,05$), тоді як із вмістом відновленого глутатіону та його співвідношення GSH/GSSG прямі зв'язки (у самців $r=0,70-74$, у самок $r=0,68-0,71$, $p<0,05$).

Таблиця 5.4

Вміст фракцій глутатіону в міокарді тварин різної статі та з різним рівнем статевих гормонів (M±m, n=10)

Групи тварин			GSH, нмоль/мг протеїну	GSSG, нмоль/мг протеїну	GSH/GSSG
1	Самці	Контроль	2,94±0,08	0,097±0,003	30,8±1,23
2		Кастрація	3,52±0,14*	0,060±0,004*	59,9±2,89*
3		Кастрація+ЗГТ	3,05±0,09#	0,090±0,006#	35,1±2,52#
1	Самки	Контроль	3,48±0,12°	0,068±0,002°	51,4±1,76°
2		Кастрація	2,81±0,14*°	0,101±0,005*°	27,9±0,99*°
3		Кастрація+ЗГТ	3,35±0,17#°	0,062±0,005#°	55,9±3,50#°

Примітки: 1. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю;

2. # - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідної групи кастрованих тварин;

3. ° - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність між самцями та самками.

Активність процесів вільнорадикального окиснення ліпідів оцінювали за вмістом у міокарді й аорті вторинного продукту ліпопероксидації малонового диальдегіду (МДА) (табл. 5.5). Встановлено, що в міокарді й аорті рівень МДА у самців вірогідно більший відповідно на 37,2 та 28,5% ($p<0,05$), порівняно з самками. Кастрація самців викликає достовірне зменшення цього показника в міокарді та аорті відповідно на 32,6 та 22,2% ($p<0,05$), а гонадектомія самок - збільшення його рівня на 41,3 та 27,7% ($p<0,05$), відносно контролю. В групі гонадектомованих тварин змінюється направленість статевих відмінностей рівня МДА: у самців його рівень у міокарді й аорті відповідно на 34,6 та 22,7% менший ($p<0,05$), ніж у самок. Замісна гормонотерапія повертає направленість гендерних відмінностей процесів ліпопероксидації до контролю. За результатами кореляційного

аналізу виявлено, що рівень МДА в міокарді й аорті виявляє вірогідний прямий зв'язок з вмістом тестостерону в плазмі крові (r=0,65-0,68, p<0,05) та обернений зв'язок з рівнем естрадіолу (r=-(0,68-0,72), p<0,05). Рівень H_2S в серці та аорті виявляє обернені кореляції з вмістом МДА (у самців r=-(0,72-0,75), у самок r=-(0,70-0,73), p<0,05).

Таблиця 5.5

Активність процесів ліпопероксидації у міокарді й аорті тварин різної статі та з різним рівнем статевих гормонів (M±m, n=10)

Групи тварин		МДА, нмоль/мг протеїну	
		Самці	Самки
		Міокард	
1	Контроль	10,0±0,33	7,29±0,27°
2	Кастрація	6,74±0,13*	10,3±0,18*°
3	Кастрація+ЗГТ	9,75±0,27#	7,40±0,24#°
		Аорта	
1	Контроль	6,36±0,17	5,01±0,09°
2	Кастрація	4,95±0,10*	6,40±0,14*°
3	Кастрація+ЗГТ	6,28±0,15#	5,11±0,11#°

Примітки: 1. * - статистично достовірна (p<0,05) відмінність відносно відповідного контролю;

2. # - статистично достовірна (p<0,05) відмінність відносно відповідної групи кастрованих тварин;

3. ° - статистично достовірна (p<0,05) відмінність між самцями та самками.

Активність процесів вільнорадикального окиснення білків оцінювали за вмістом у міокарді й аорті КГП (табл. 5.6). Виявлено, що в міокарді й аорті рівень КГП у самців вірогідно більший відповідно на 40,6 та 44,9% (p<0,05), порівняно з самками. Кастрація самців викликає достовірне зменшення цього

показника в міокарді й аорті відповідно на 43,3 та 43,7% ($p<0,05$), а гонадектомія самок - збільшення його рівня на 55,1 та 61,2% ($p<0,05$), відносно контролю. В групі гонадектомованих тварин змінюється направленість статевих відмінностей рівня КГП: у самців його рівень в міокарді та аорті відповідно на 48,6 та 49,4% менший ($p<0,05$), ніж у самок. Замісна гормонотерапія повертає направленість гендерних відмінностей процесів окисної модифікації протеїнів до показників контрольної групи. Кореляційний аналіз показав, що рівень КГП у міокарді й аорті виявляє вірогідний прямий зв'язок із вмістом тестостерону в плазмі крові ($r=0,72-0,78$, $p<0,05$) та обернений з рівнем естрадіолу ($r=-(0,70-0,76)$, $p<0,05$). Рівень H_2S у серці й аорті виявляє обернені кореляції з вмістом МДА (у самців $r=-(0,77-0,79)$, у самок $r=-(0,68-0,74)$, $p<0,05$).

Таблиця 5.6

Активність процесів пероксидації протеїнів у міокарді й аорті тварин різної статі та з різним рівнем статевих гормонів (M±m, n=10)

Групи тварин		КГП, нмоль/мг протеїну	
		Самці	Самки
		Міокард	
1	Контроль	0,97±0,04	0,69±0,03°
2	Кастрація	0,55±0,05*	1,07±0,07*°
3	Кастрація+ЗГТ	0,90±0,08#	0,79±0,05#°
		Аорта	
1	Контроль	0,71±0,02	0,49±0,03
2	Кастрація	0,40±0,04*	0,79±0,05*°
3	Кастрація+ЗГТ	0,65±0,03#	0,53±0,06#°

Примітки: 1. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю;

2. # - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідної групи кастрованих тварин;

3. ° - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність між самцями та самками.

Дослідження показників клітинного циклу (табл. 5.7) показало, що у самців відносна кількість клітин у синтетичній фазі S, фазі проліферації G2M та інтервалі SUB-G0G1 достовірно більша відповідно на 30,3; 25,4 та 17,2% ($p<0,05$), порівняно з самками (рис. 5.1). Гонадектомія самців супроводжується зменшенням відносної кількості клітин у фазах S, G2M й інтервалі SUB-G0G1 відповідно на 28,7; 23,3 та 12,7% ($p<0,05$), відносно контролю (рис. 5.2). Натомість, оваріектомія самок викликає збільшення відсотка клітин у фазах S, G2M й інтервалі SUB-G0G1 відповідно на 80,8; 18,3 та 27,3% ($p<0,05$), порівняно контролю. На тлі кастрації тварин у самців кількість клітин у фазах S, G2M та інтервалі SUB-G0G1 відповідно на 48,6; 18,7 та 19,6% ($p<0,05$) менша, ніж у самок. Між рівнем тестостерону в плазмі крові та відносною кількість клітин у фазах S, G2M та інтервалі SUB-G0G1 виникають вірогідні прямі зв'язки ($r=0,51-0,56$, $p<0,05$), тоді як з рівнем естрадіолу - обернені кореляції ($r=-(0,54-0,58)$, $p<0,05$). Вміст H_2S у міокарді обернено корелював з відносною кількістю клітин у фазах S, G2M та інтервалі SUB-G0G1 (у самців $r=-(0,59-0,66)$, а у самок $r=-(0,57-0,63)$, $p<0,05$).

Таблиця 5.7

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. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю;

2. ° - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність між самцями та самками.

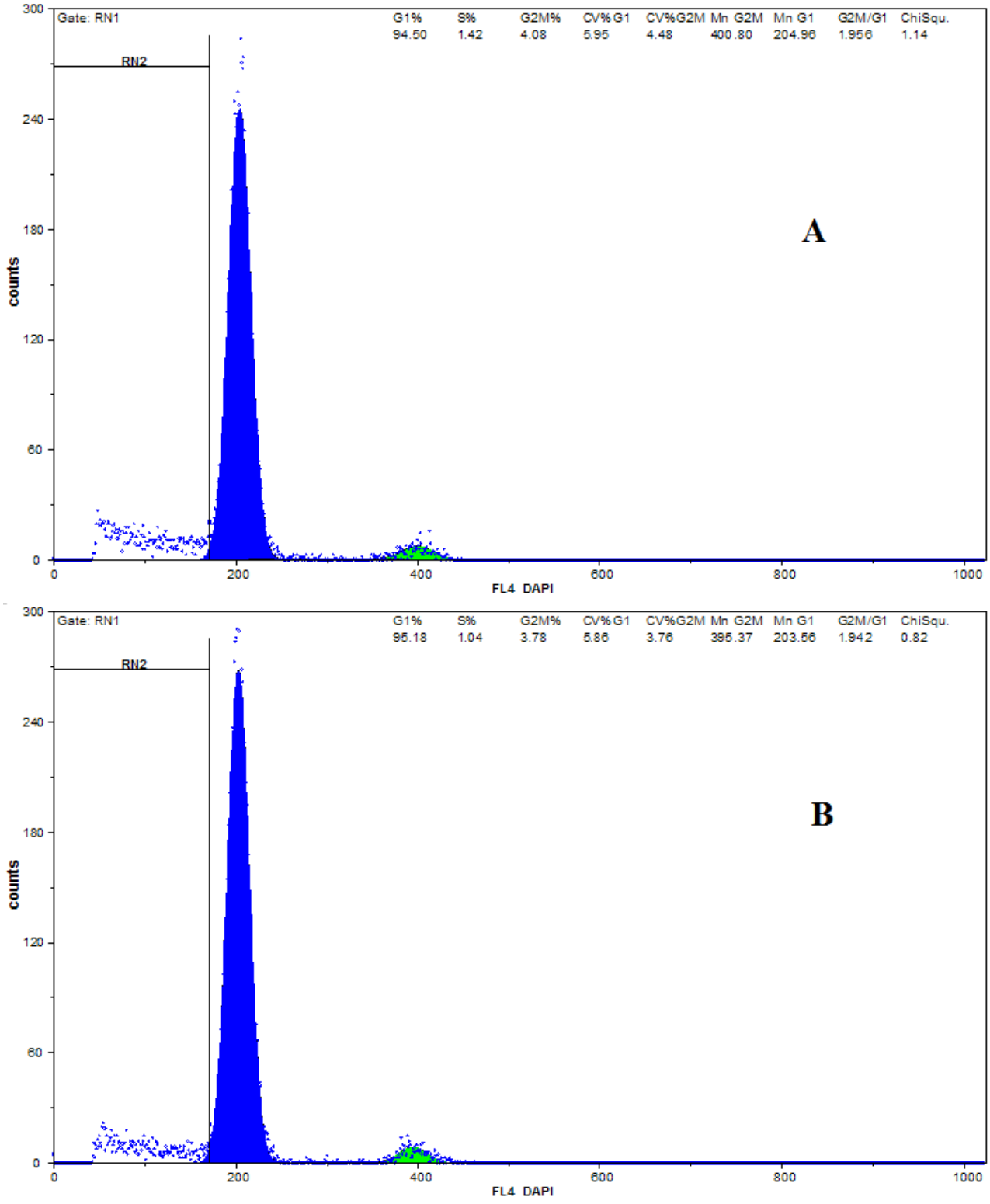


Рис. 5.1. ДНК-гістограми ядерних суспензій клітин міокарда контрольної групи самців (А) і самок (В). На гістограмі А (RN2 (SUB-G0G1, фрагментація ДНК) = 16,7%), а на В (RN2 (SUB-G0G1, фрагментація ДНК) = 12,4%).

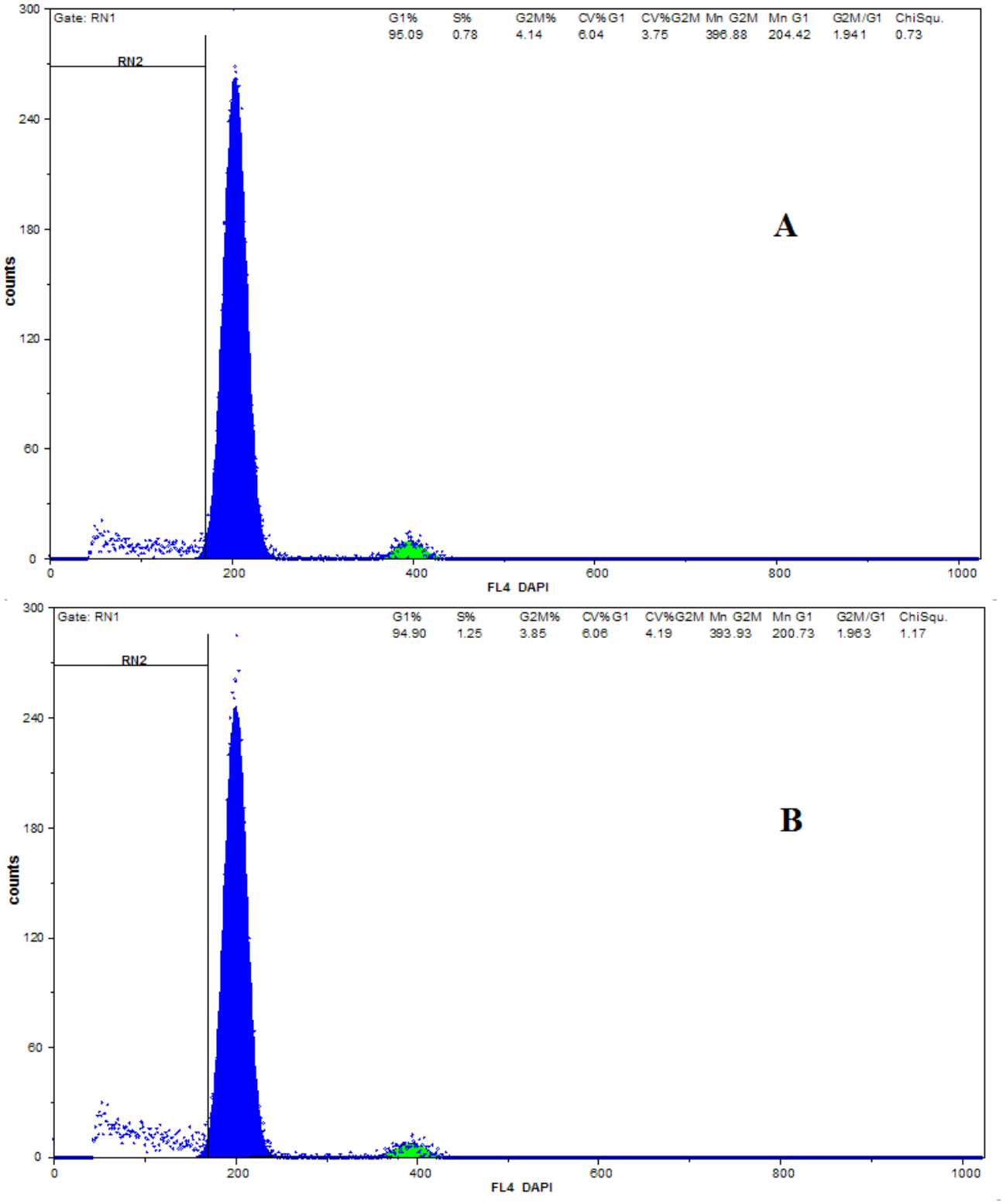


Рис. 5.2. ДНК-гістограми ядерних суспензій клітин міокарда кастрованих самців (A) і кастрованих самок (B). На гістограмі A (RN2 (SUB-G0G1, фрагментація ДНК) = 11,1%), а на гістограмі B (RN2 (SUB-G0G1, фрагментація ДНК) = 17,6%).

Дослідження показників кардіогемодинаміки (табл. 5.8) засвідчило, що в контрольній групі існують статеві відмінності лише у КМ, його рівень у самців вірогідно менший на 11,1% ($p<0,05$), 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. 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 у міокарді виявляв пряму кореляцію з КМ (у самців $r=0,55$, а у самок $r=0,60$, $p<0,05$).

Таблиця 5.8

Вплив різного рівня насиченості організму тварин статевими гормонами на параметри мікроциркуляції у міокарді лівого шлуночка та тиску в порожнинах серця (M±m, n=10)

Показники	Самці			Самки		
	Контроль	Кастрація	Кастрація +ЗГТ	Контроль	Кастрація	Кастрація +ЗГТ
КМ, у.о.	3966± 22,7	4460± 46,2*	4010± 41,8#	4401± 62,0°	3910± 36,8*°	4270± 48,7#°
SaO_2, %	98,6±0,16	98,2±0,25	98,5±0,22	98,1±0,31	98,3±0,30	98,0±0,26
ТЛШ, мм.рт.ст.	79,7±0,37	80,7±0,75	80,3±0,73	82,1±1,17	80,1±0,72	80,6±0,60
ТПШ, мм.водн.ст.	79,7±0,30	80,3±0,42	79,6±0,37	81,6±1,14	80,4±0,50	81,7±0,37

Примітки: 1. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю;

2. # - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідної групи кастрованих тварин;

3. ° - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність між самцями та самками.

Дослідження H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти (рис. 5.3) показало, що у самців H_2S у концентраціях 10^{-3}-10^{-6}М викликав дозозалежне розслаблення відповідно на 5,69±0,43%; 10,4±0,50%; 29,3±1,22% та 56,7±1,01%, тоді як у самок ступінь релаксації був більшим відповідно на 17,6; 25,0; 19,5 та 9,17% ($p<0,05$) і становив 6,69±0,22%; 13,0±0,49%; 35,0±1,46% та 61,9±0,34%. Крива «доза-ефект» у самок зміщена ліворуч відносно такої у самців.

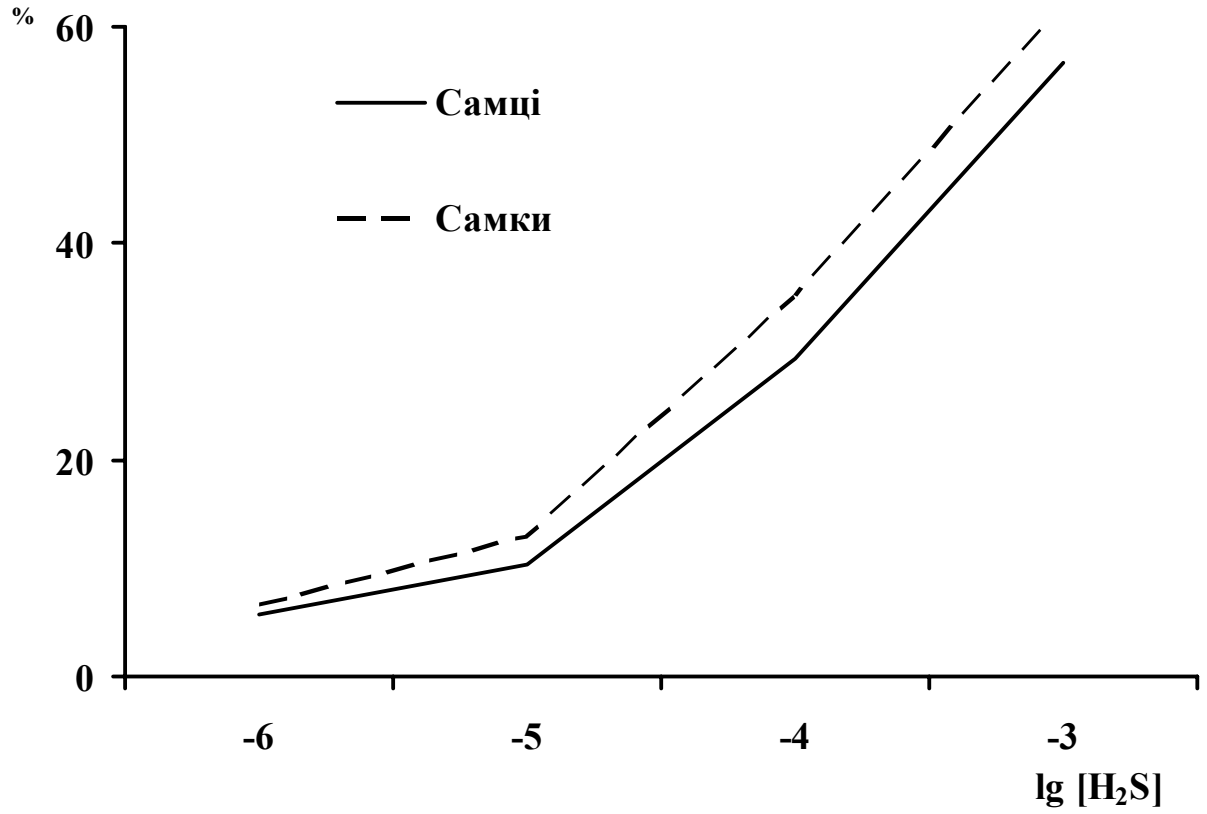


Рис. 5.3. Дозозалежність H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти самців і самок щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у перфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій H_2S. За 100% прийнятий рівень H_2S-стимульованого розслаблення фрагментів аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення. На цьому та наступних рисунках наведені усереднені дані 4 дослідів і значення похибок середнього.

Кастрація самців (рис. 5.4) супроводжується збільшенням H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти: H_2S у концентраціях 10^{-3}-10^{-6}М викликає дозозалежне розслаблення відповідно на 7,09±0,36%; 13,2±0,28%; 36,9±0,45% та 64,0±0,23%, яке є більшим відповідно на 24,6; 27,1; 25,9 та 12,9% ($p<0,05$), ніж у контрольній групі. Крива «доза-ефект» у кастрованих самців зміщена ліворуч відносно контрольній групі. Замісна гормонотерапія кастрованих самців наближає показники H_2S-стимульованого розслаблення аорти до рівня контролю.

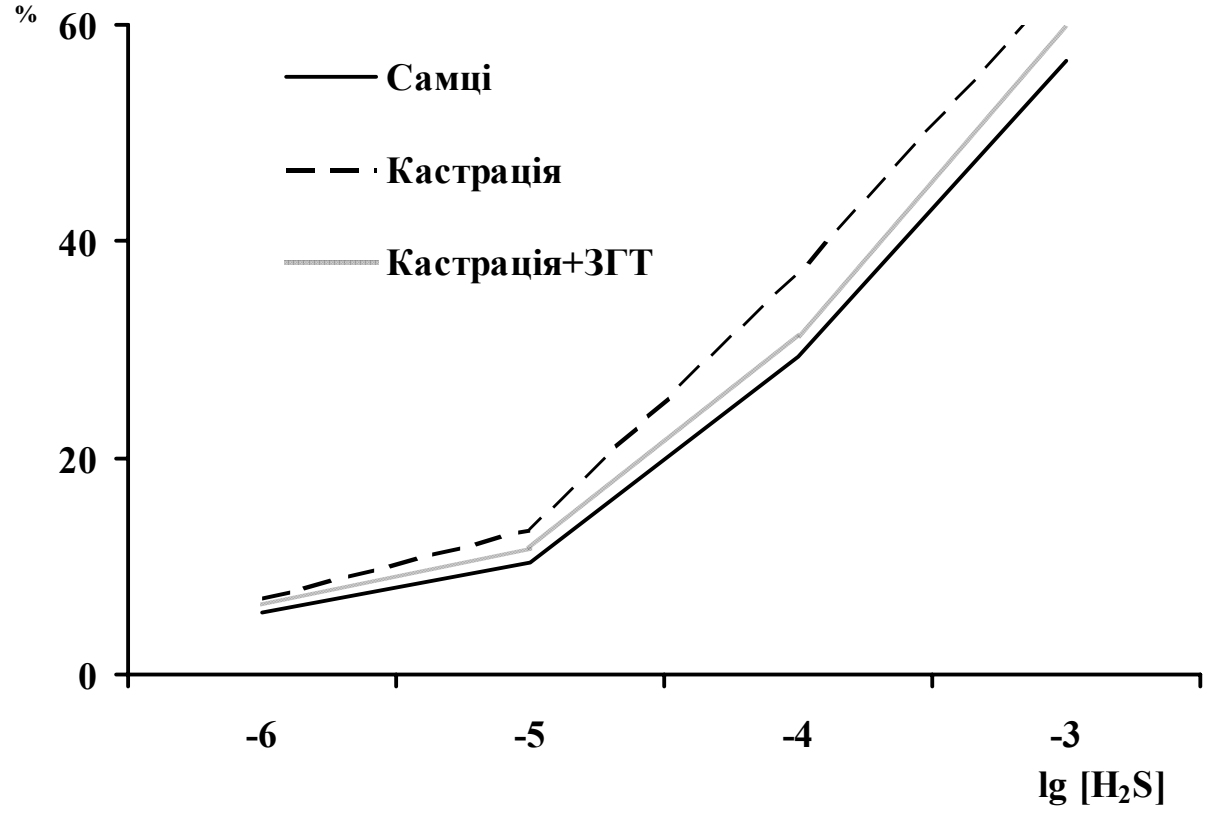


Рис. 5.4. Вплив кастрації та ЗГТ на дозозалежність H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самців щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у перфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій H_2S. За 100% прийнятий рівень H_2S-стимульованого розслаблення фрагментів аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення.

Кастрація самок (рис. 5.5) викликає зменшення H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти: H_2S в концентраціях 10^{-3}-10^{-6}М викликає дозозалежне розслаблення відповідно на 4,98±0,45%; 9,60±0,38%; 28,7±0,32% та 55,4±0,30%, яке є меншим відповідно на 25,6; 26,2; 18,0 та 10,5% ($p<0,05$), ніж в контрольній групі. Крива «доза-ефект» у кастрованих самок зміщена праворуч відносно такої у контрольній групі. Замісна гормонотерапія кастрованим самкам наближає показники H_2S-стимульованого розслаблення аорти до рівня контрольної групи.

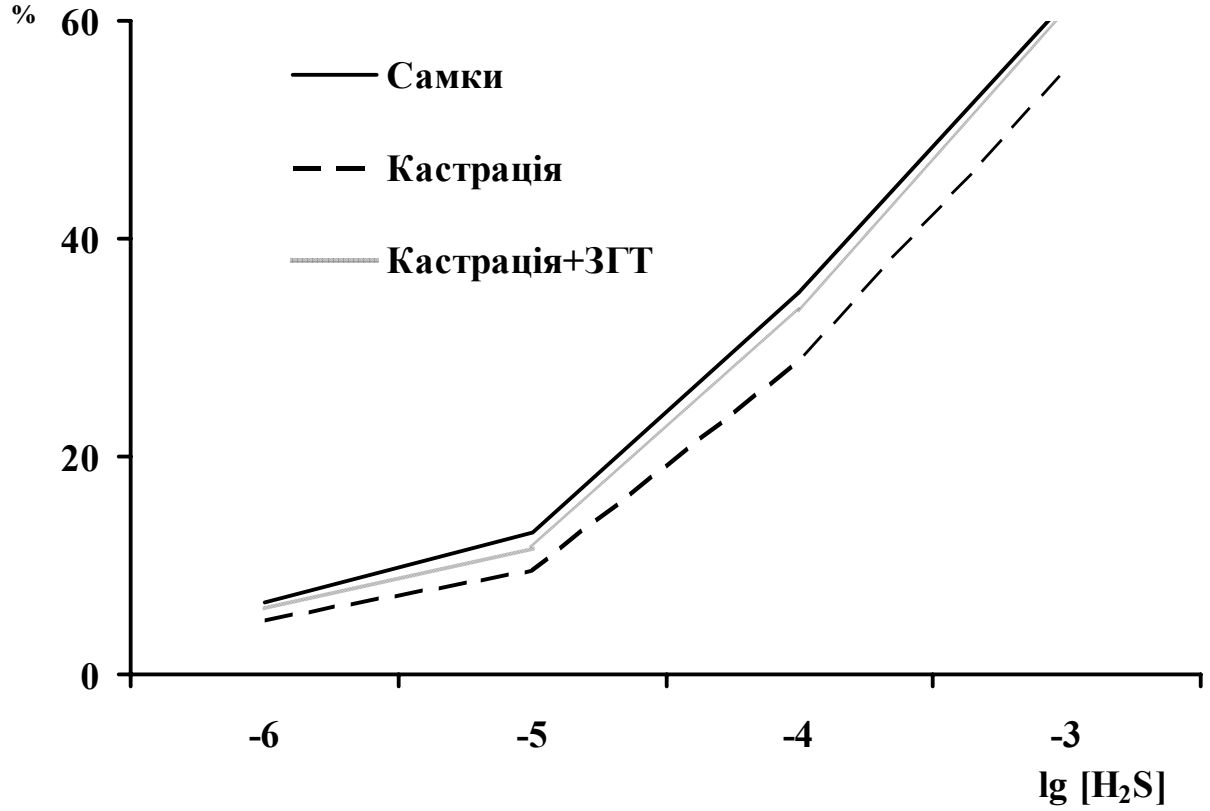


Рис. 5.5. Вплив кастрації та ЗГТ на дозозалежність H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самок щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у перфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій H_2S. За 100% прийнятий рівень H_2S-стимульованого розслаблення фрагментів аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення.

Аналіз середньоефективних концентрацій H_2S в аорті (рис. 5.6) показав, що у самців цей показник становить 94,7±4,32 мкМ, тоді як у самок він менший на 22,8% ($p<0,05$) і становить 73,1±4,11 мкМ. Кастрація самців викликає зменшення EC_{50} H_2S в аорті на 23,4% (72,5±3,12 мкМ), порівняно з контрольною групою. В той же час гонадектомія самок супроводжується зростанням цього показника на 33,0% (96,5±3,88 мкМ), порівняно з контролем. В групі кастрованих тварин змінюється вектор статевих відмінностей спорідненості аорти до вазодилятуючої дії H_2S: у самців EC_{50} H_2S в аорті є меншим на 24,9%, ніж у самок. Замісна гормонотерапія у кастрованих самців призводить до зростання EC_{50} H_2S в аорті на 27,6% ($p<0,05$), а у самок – зменшення на 21,8% ($p<0,05$), відносно нелікованих тварин. За цих умов EC_{50} H_2S в аорті наближається до рівня контрольної групи. Кореляційний аналіз показав, що EC_{50} H_2S в аорті виявляє обернені кореляції з рівнем естрадіолу ($r=-0,56$, $p<0,05$) та прямі - з тестостероном ($r=0,51$, $p<0,05$). Між EC_{50} H_2S та рівнем H_2S в аорті виявляються достовірні обернені зв'язки (у самок $r=-0,62$, у самців $r=-0,55$; $p<0,05$).

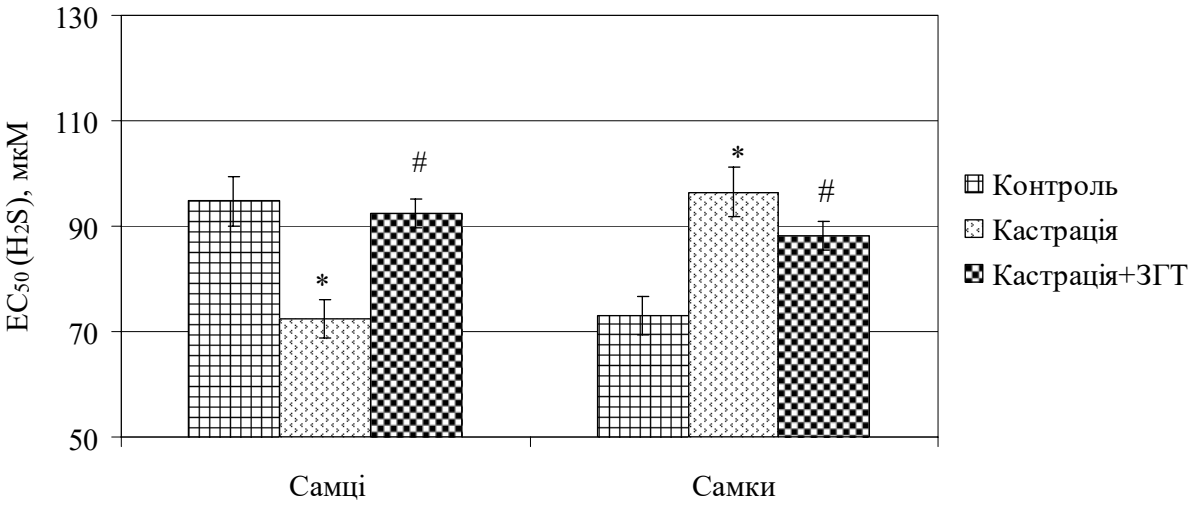


Рис 5.6. Вплив кастрації та ЗГТ на EC_{50} H_2S в аорті щурів обох статей. Примітки: 1. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю; 2. # - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідної групи кастрованих тварин.

Раніше нами показано, що в процесі старіння самців і самок щурів, яке супроводжується зменшенням рівня статевих гормонів, знижується ензиматична продукція H_2S в серцево-судинній системі. Оскільки зміни у тварин різної статі були односпрямовані, тому ми перевірили, як змінюється H_2S-стимульоване розслаблення аорти в ході старіння самців (рис. 5.7). Встановлено, що у самців-щурів віком 6-8 міс. інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти в присутності H_2S у концентраціях 10^{-6}-10^{-3}М становила 5,93±0,58%; 10,9±2,53%; 29,6±1,23%; 57,0±1,10%, а у старих щурів була меншою і становила 5,94±1,93%; 10,7±1,01%; 20,6±1,61% ($p<0,05$); 45,5±0,48% ($p<0,05$).

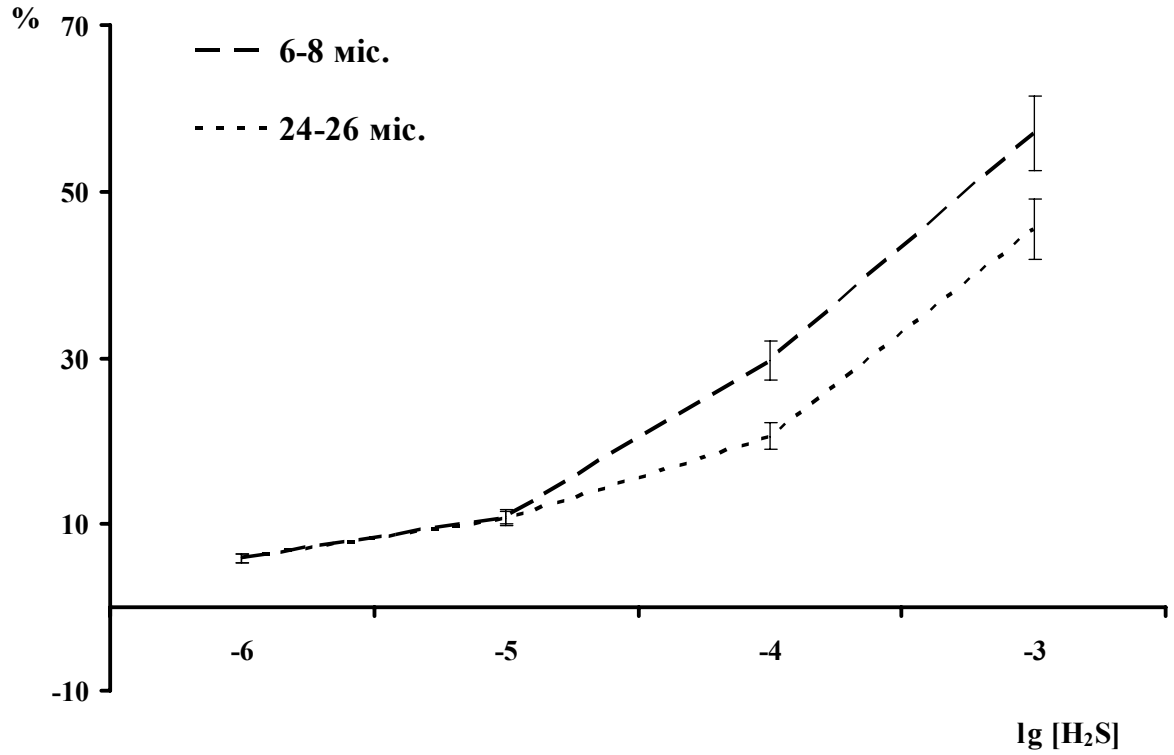


Рис. 5.7. Дозозалежність H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самців щурів різних вікових груп. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у перфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій H_2S. За 100% прийнятий рівень H_2S-стимульованого розслаблення фрагментів аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення.

Дослідження цистеїн-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти (рис. 5.8) показало, що у самців щурів цистеїн у концентраціях 10^{-2}-10^{-6}М викликав дозозалежне розслаблення відповідно на 7,84±0,77%; 9,91±0,41%; 15,6±0,20%; 21,4±0,46% та 49,9±1,10%, тоді як у самок ступінь релаксації був більшим відповідно на 41,6; 33,2; 25,6; 24,3 та 12,6% ($p<0,05$) і становив 11,1±0,62%; 13,2±0,57%; 19,6±0,31%; 26,6±1,23% та 56,2±0,84%. Крива «доза-ефект» у самок зміщена ліворуч відносно такої у самців.

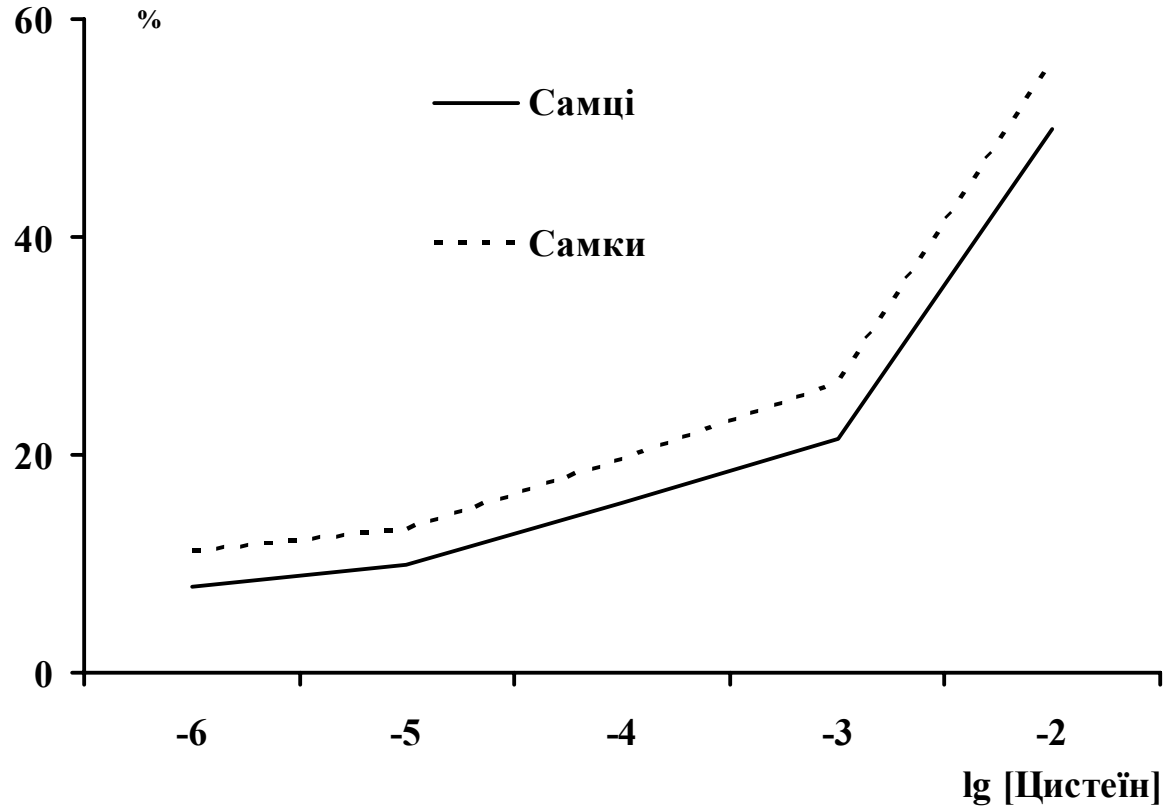


Рис. 5.8. Дозозалежність цистеїн-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самців та самок щурів. По осі абсцис - десятковий логарифм концентрації цистеїну (М) у перфузійному розчині, по осі ординат - нормована інтенсивність розслаблення фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій цистеїну. За 100% прийнятий рівень цистеїн-стимульованого розслаблення аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефринового передскорочення.

Кастрація самців (рис. 5.9) супроводжується збільшенням цистеїн-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти: цистеїн у концентраціях 10^{-2}-10^{-6}М викликає дозозалежне розслаблення відповідно на 11,6±0,66%; 13,4±0,19%; 19,9±0,49%; 27,7±0,54% та 58,3±0,44%, яке є більшим відповідно на 48,3; 35,6; 27,9; 29,4 та 16,8% ($p<0,05$), ніж у контрольній групі. Крива «доза-ефект» у кастрованих самців зміщена ліворуч відносно контрольної групи. Замісна гормонотерапія кастрованих самців наближає показники цистеїн-стимульованого розслаблення аорти до рівня контрольної групи.

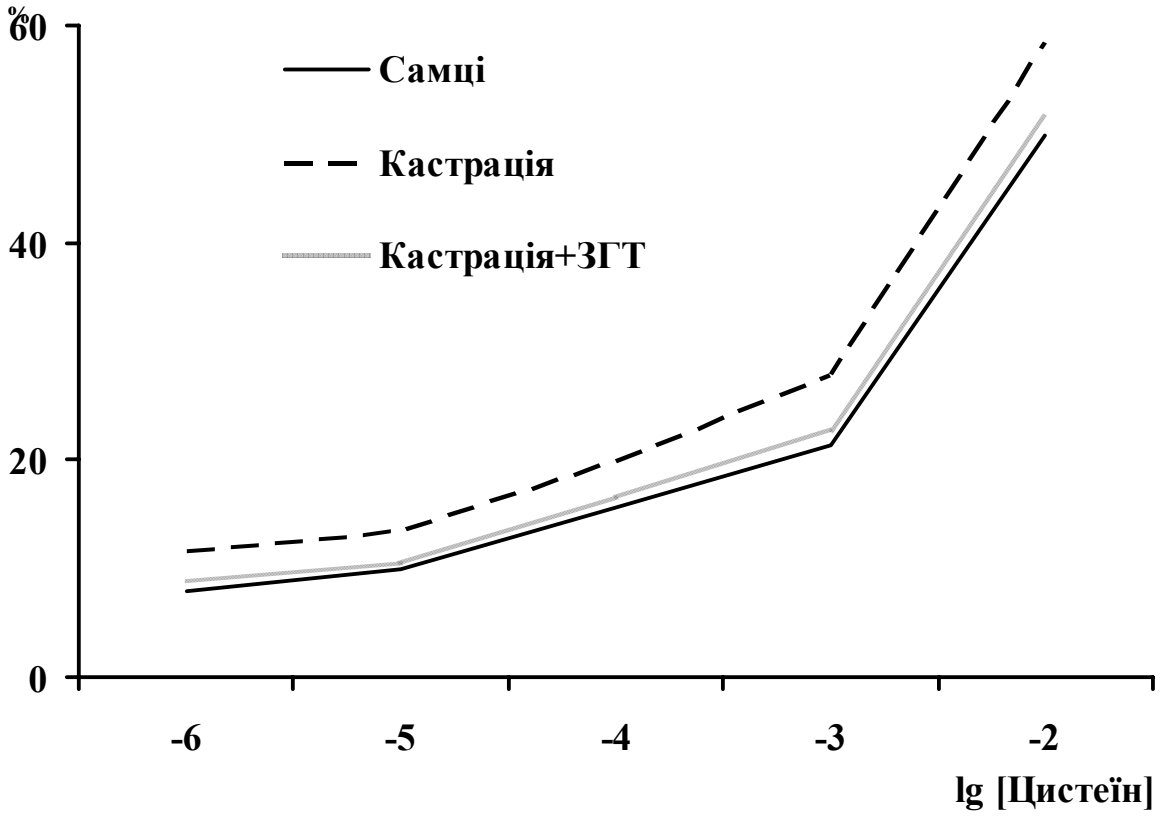


Рис. 5.9. Вплив кастрації та ЗГТ на дозозалежність цистеїн-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самців щурів. По осі абсцис - десятковий логарифм концентрації цистеїну (М) у перфузійному розчині, по осі ординат - нормована інтенсивність розслаблення фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій цистеїну. За 100% прийнятий рівень цистеїн-стимульованого розслаблення аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефринового передскорочення.

Кастрація самок (рис. 5.10) викликає зменшення цистеїн-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти: цистеїн у концентраціях 10^{-2}-10^{-6}М викликає дозозалежне розслаблення відповідно на 7,26±0,68%; 9,61±0,31%; 14,7±0,22%; 21,6±0,52% та 48,9±0,84%, яке є меншим відповідно на 34,8; 26,9; 25,3; 19,0 та 12,9% ($p<0,05$), ніж у контрольній групі. Крива «доза-ефект» у кастрованих самок зміщена праворуч відносно такої у контрольній групі. Замісна гормонотерапія кастрованих самок наближає показники цистеїн-стимульованого розслаблення аорти до рівня контрольної групи.

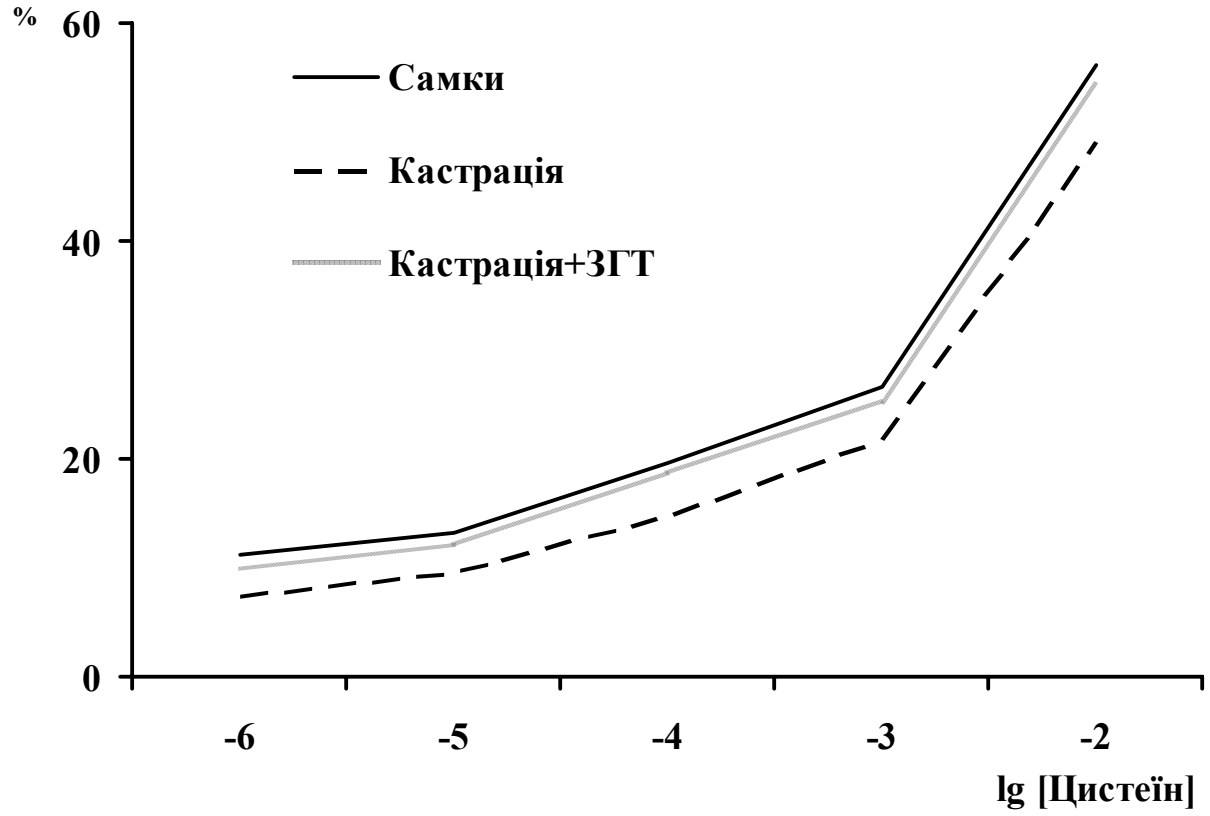


Рис. 5.10. Вплив кастрації та ЗГТ на дозозалежність цистеїн-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самок щурів. По осі абсцис - десятковий логарифм концентрації цистеїну (М) у перфузійному розчині, по осі ординат - нормована інтенсивність розслаблення фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій цистеїну. За 100% прийнятий рівень цистеїн-стимульованого розслаблення аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефринового передскорочення.

Аналіз середньоефективних концентрацій цистеїну в аорті (рис. 5.11) виявив, що у самців цей показник становить 1030±40,2 мкМ, тоді як у самок він менший на 26,3% ($p<0,05$) - 759±25,8 мкМ. Кастрація самців викликає зменшення EC_{50} цистеїну в аорті на 29,1% (становить 730±32,2 мкМ), порівняно з контрольною групою. В той же час гонадектомія самок супроводжується зростанням цього показника на 42,3% (становить 1080±41,1 мкМ), порівняно з контролем. У групі кастрованих тварин змінюється вектор статевих відмінностей спорідненості аорти до вазодилятуючої дії цистеїну: у самців EC_{50} цистеїну в аорті є меншим на 32,4%, ніж у самок. Замісна гормонотерапія кастрованих тварин у самців призводить до зростання EC_{50} цистеїну в аорті на 35,3% ($p<0,05$), а у самок - зменшення на 26,8% ($p<0,05$), відносно нелікованих тварин. За цих умов EC_{50} цистеїну в аорті наближається до рівня контрольної групи. Кореляційний аналіз показав, що EC_{50} цистеїну в аорті виявляє обернені кореляції з рівнем естрадіолу ($r=-0,53$, $p<0,05$) та прямі - з тестостероном ($r=0,49$, $p<0,05$). Між EC_{50} цистеїну та рівнем H_2S в аорті виявляються достовірні обернені зв'язки (у самок $r=-0,56$, у самців $r=-0,54$; $p<0,05$).

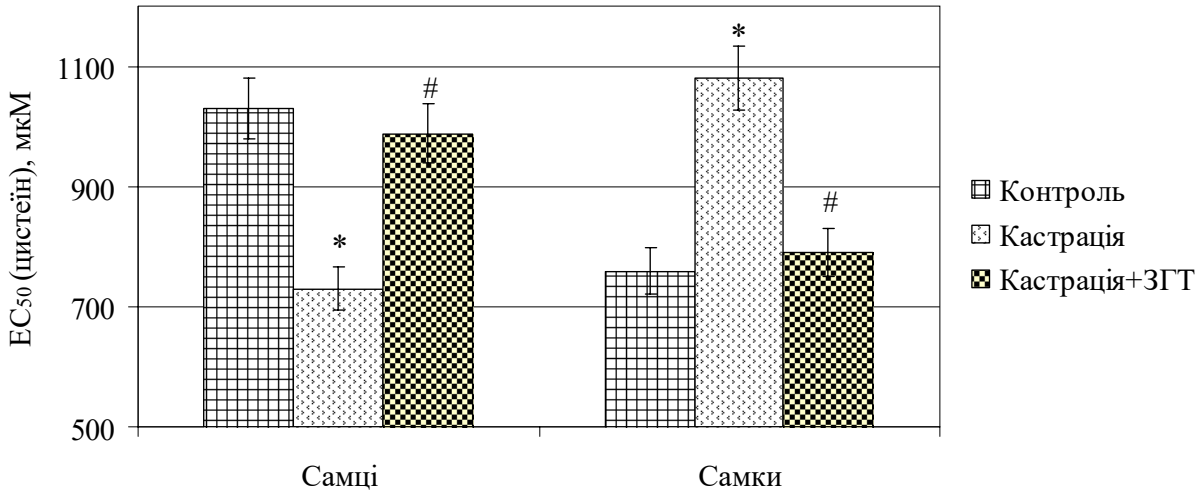


Рис 5.11. Вплив кастрації та ЗГТ на EC_{50} цистеїну в аорті щурів обох статей. Примітки: 1. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю; 2. # - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідної групи кастрованих тварин.

Дослідження гомоцистеїн-стимульованого скорочення кільцевих фрагментів аорти (рис. 5.12) засвідчило, що у самців гомоцистеїн у концентраціях 10^{-2}-10^{-6}М викликав дозозалежне зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення відповідно на 2,50±0,43%; 3,97±0,29%; 26,1±2,78%; 42,7±1,91% та 59,9±0,49%, тоді як у самок ступінь зменшення релаксації був меншим відповідно на 69,2; 28,2; 29,2; 18,0 та 20,5% ($p<0,05$) і становив 0,77±0,05%; 2,85±0,41%; 18,5±0,58%; 35,0±0,40% та 47,6±0,69%. Крива «доза-ефект» у самок зміщена праворуч відносно такої у самців.

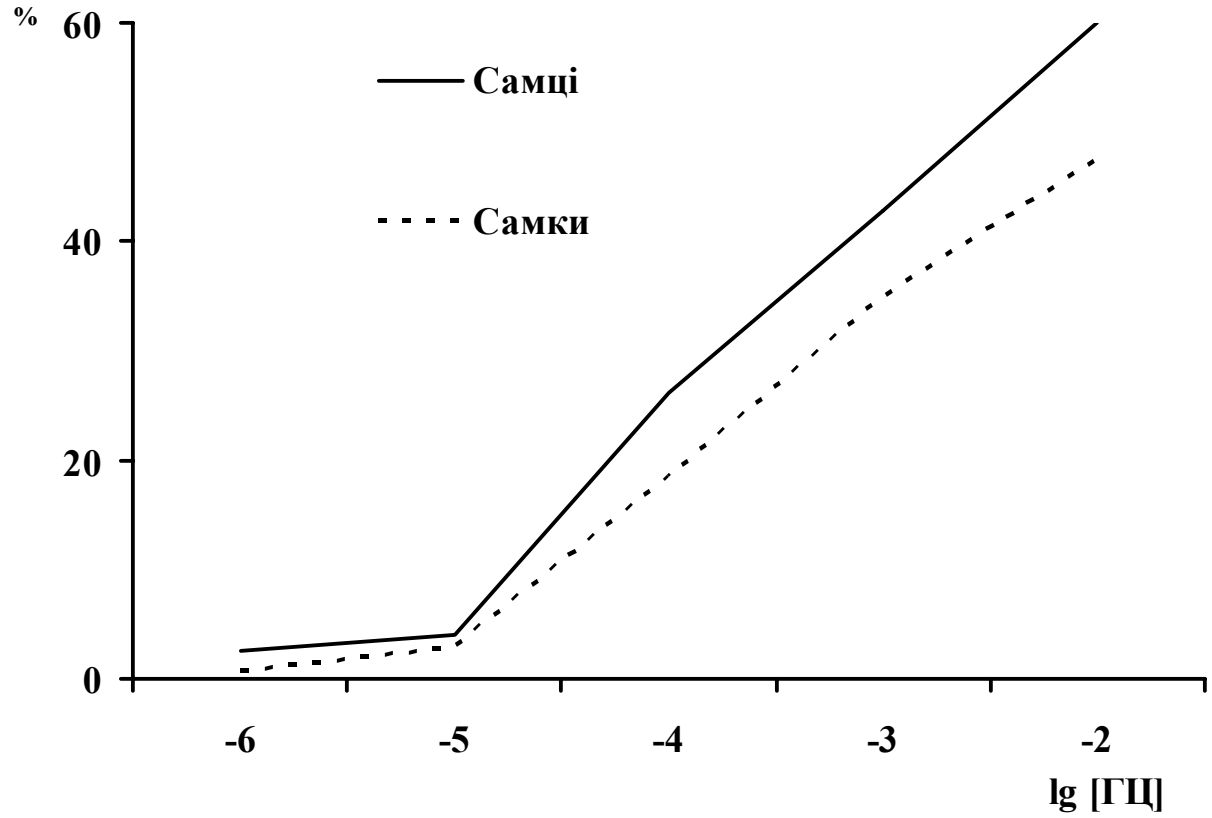


Рис. 5.12. Дозозалежність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самців і самок щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації ГЦ (М) у суперфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій ГЦ. За 100% прийнято повне інгібування ацетихолін-індукованого розслаблення фрагментів аорти під впливом ГЦ.

Кастрація самців (рис. 5.13) супроводжується зменшенням гомоцистеїн-стимульованого скорочення кільцевих фрагментів аорти: гомоцистеїн в концентраціях 10^{-2}-10^{-6}М викликає дозозалежне зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення відповідно на 0,31±0,04%; 1,92±0,16%; 17,6±0,54%; 34,1±0,61% та 47,0±0,66%, яке є меншим відповідно на 87,6; 51,6; 32,6; 20,3 та 21,6% ($p<0,05$), ніж в контрольній групі. Крива «доза-ефект» у кастрованих самців зміщена праворуч відносно контрольній групі. Замісна гормонотерапія кастрованих самців наближає показники гомоцистеїн-стимульованого скорочення аорти до рівня контрольної групи.

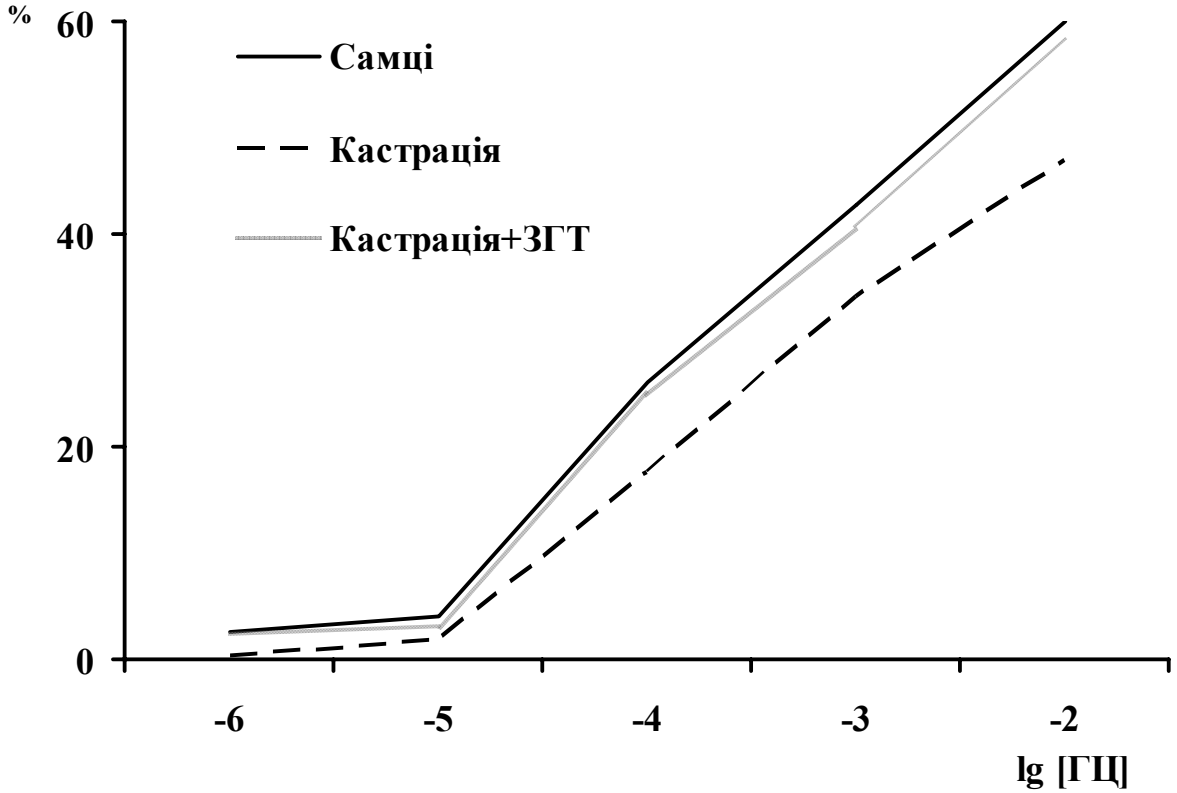


Рис. 5.13. Вплив кастрації та ЗГТ на дозозалежність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самців щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації ГЦ (М) у суперфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій ГЦ. За 100% прийнято повне інгібування ацетихолін-індукованого розслаблення фрагментів аорти під впливом ГЦ.

Кастрація самок (рис. 5.14) викликає збільшення гомоцистеїн-стимульованого скорочення кільцевих фрагментів аорти: гомоцистеїн в концентраціях 10^{-2}-10^{-6}М викликає дозозалежне зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення відповідно на 1,80±0,15%; 3,72±0,33%; 25,2±0,31%; 40,3±0,41% та 53,8±0,31%, яке є більшим відповідно на 33,8; 30,5; 35,9; 15,3 та 13,0% ($p<0,05$), ніж у контрольній групі. Крива «доза-ефект» у кастрованих самок зміщена ліворуч відносно такої у контрольній групі. Замісна гормонотерапія кастрованих самок наближає показники гомоцистеїн-стимульованого скорочення аорти до рівня контрольної групи.

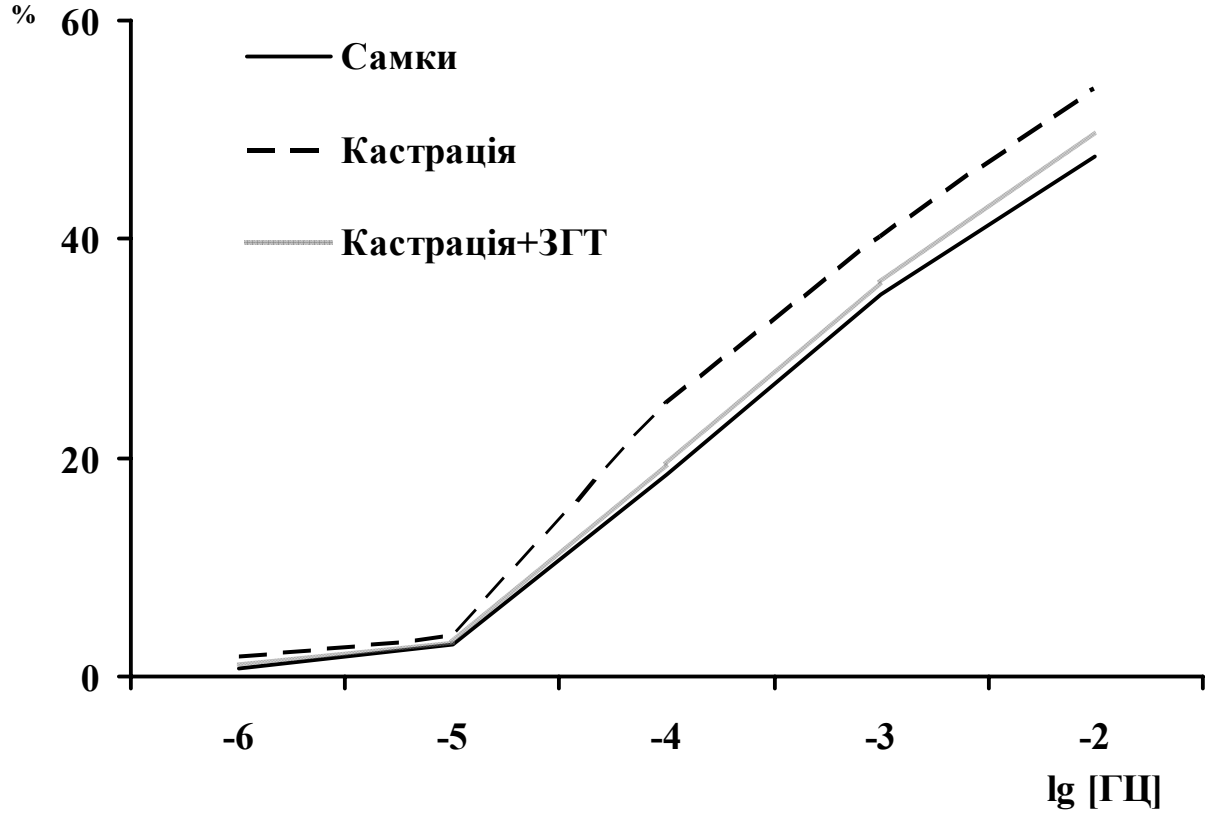


Рис. 5.14. Вплив кастрації та ЗГТ на дозозалежність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самців щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації ГЦ (М) у суперфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій ГЦ. За 100% прийнято повне інгібування ацетихолін-індукованого розслаблення фрагментів аорти під впливом ГЦ.

Аналіз середньоефективних концентрацій гомоцистеїну в аорті (рис. 5.15) показав, що у самців цей показник становить 129±7,23 мкМ, тоді як у самок він більший на 27,9% ($p<0,05$) і становить 165±7,88 мкМ. Кастрація самців викликає збільшення EC_{50} гомоцистеїну в аорті на 33,3% (становить 172±7,95 мкМ), порівняно з контрольною групою. В той же час гонадектомія самок супроводжується зменшенням цього показника на 24,9% (124±6,28 мкМ), порівняно з контролем. В групі кастрованих тварин змінюється вектор статевих відмінностей спорідненості аорти до вазоконстрикторної дії гомоцистеїну: у самців EC_{50} гомоцистеїну в аорті є більшим на 38,7%, ніж у самок. Замісна гормонотерапія кастрованих тварин у самців призводить до зменшення EC_{50} гомоцистеїну в аорті на 23,3% ($p<0,05$), а у самок - збільшення на 29,8% ($p<0,05$), відносно нелікованих тварин. За цих умов EC_{50} гомоцистеїну в аорті наближається до рівня контрольної групи. EC_{50} гомоцистеїну в аорті виявляє прямі кореляції з рівнем естрадіолу ($r=0,50$, $p<0,05$) та обернені - з тестостероном ($r=-0,57$, $p<0,05$). Між EC_{50} гомоцистеїну та рівнем H_2S в аорті виявляються достовірні прямі зв'язки (у самок $r=0,58$, у самців $r=0,66$; $p<0,05$).

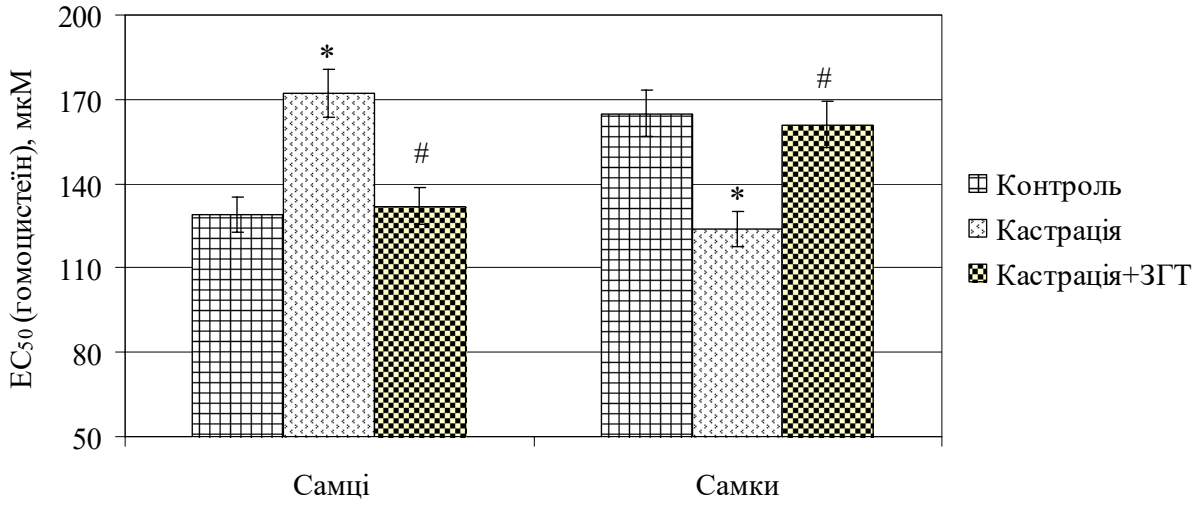


Рис 5.15. Вплив кастрації та ЗГТ на EC_{50} гомоцистеїну в аорті щурів обох статей. Примітки: 1. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю; 2. # - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідної групи кастрованих тварин.

Проведені дослідження засвідчили існування статевих відмінностей біохімічних і функціональних показників стану міокарда й аорти щурів. Виявилося, що у самців у міокарді й аорті відмічається вірогідно менша активність супероксиддисмутази, тіоредоксинредуктази, менший вміст відновленого глутатіону і більший окисненого, вища активність НАДФН-оксидази, що супроводжується більшою активністю процесів пероксидації ліпідів і протеїнів, ніж у самок. Поряд з цим у самців вищий рівень апоптозу, поліплоїдизації кардіоміоцитів і проліферації міофібробластів, порівняно з самками. Також 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.

Кастрація самців супроводжується збільшенням активності супероксиддисмутази, тіоредоксинредуктази, вмісту відновленого глутатіону, зменшенням активності НАДФН-оксидази, рівня окисненого глутатіону, зниженням інтенсивності процесів пероксидації ліпідів і протеїнів у міокарді й аорті щурів, зменшенням рівня апоптозу, поліплоїдизації кардіоміоцитів і проліферації міофібробластів, зростанням коефіцієнту мікроциркуляції, чутливості аорти до вазодилятуючої дії H_2S, цистеїну та падіння чутливості аорти до констрикторної дії гомоцистеїну, порівняно з контролем. Гонадектомія самок супроводжується протилежними змінами. На тлі кастрації змінюється вектор статевих відмінностей функціональних і біохімічних параметрів стану серця і аорти, порівняно з контролем. Натомість, замісна гормонотерапії повертає показники до рівня контрольної групи тварин.

Кореляційний аналіз засвідчив, що низький рівень тестостерону, високий естрадіолу та H_2S у міокарді й аорті асоціюються з високою активністю супероксиддисмутази, високим вмістом відновленого глутатіону, низькою активністю НАДФН-оксидази, процесів вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів у міокарді й аорті, низьким рівнем апоптозу, поліплоїдизації кардіоміоцитів і проліферації міофібробластів, а також

високою швидкістю мікроциркуляції міокарду лівого шлуночка, більшою чутливістю аорти до вазодилятуючої дії H_2S і цистеїну та меншою спорідненістю до вазоконстрикторної дії гомоцистеїну.

5.2 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфіду на показники стану міокарду й аорти щурів обох статей

Вплив пропаргілгліцину (50 мг/кг) та NaHS (3 мг/кг) на стан серцево-судинної системи вивчали у статевозрілих самців і самок щурів. Модулятори обміну H_2S вводили упродовж 14 діб інтраперитонеально у дозах, які не викликають загибелі тварин і використовуються у більшості досліджень *in vivo* (по 10 самців та самок отримували вказані модулятори). Зауважимо, що NaHS вводився в умовно терапевтичній дозі, яка виявляє цитопротекторні, антиоксиданті та протизапальні властивості [14, 209]. Тваринам контрольних підгруп (по 10 самців та самок) вводили еквівалентні об'єми фізіологічного (0,15 М) розчину NaCl.

Спершу ми оцінили вплив модуляторів обміну H_2S (пропаргілгліцину та NaHS) на показники активності H_2S-синтезуючих ензимів і вміст H_2S у міокарді щурів різної статі (табл. 5.9). Виявилося, що застосування пропаргілгліцину призводить до вірогідного зменшення активності лише ЦГЛ у міокарді у самців і самок щурів відповідно на 58,6 та 39,5% ($p<0,05$), відносно контролю. Поряд з цим реєструється достовірне зменшення вмісту H_2S у міокарді у самців і самок щурів відповідно на 46,2 та 23,0% ($p<0,05$), порівняно з контрольною групою. В той же час введення NaHS не супроводжується достовірною зміною активності H_2S-продукуючих ензимів у міокарді щурів, однак викликає вірогідне зростання рівня H_2S у міокарді у самців і самок відповідно на 20,3 та 11,1% ($p<0,05$), проти контролю. Отже, інгібуючий вплив пропаргілгліцину на активність ЦГЛ та вміст H_2S, а також стимулююча дія NaHS на рівень H_2S у міокарді більш виразні у самців, ніж у самок.

Таблиця 5.9

Вплив модуляторів обміну H_2S на активність H_2S-продукуючих ензимів і вміст H_2S у міокарді самців та самок щурів (M±m, n=10)

Групи тварин			ЦГЛ	ЦАТ	ТСТ	H_2S
			нмоль H_2S/хв·мг протеїну			нмоль/ мг протеїну
1	Самці	Контроль	0,29±0,01	0,73±0,04	1,26±0,05	2,61±0,11
2		ППГ	0,12±0,02*	0,71±0,05	1,20±0,04	1,58±0,08*
3		NaHS	0,32±0,03	0,75±0,06	1,27±0,06	3,14±0,13*
1	Самки	Контроль	0,39±0,03	0,87±0,05	1,60±0,08	3,17±0,12
2		ППГ	0,21±0,04*	0,84±0,03	1,58±0,06	2,44±0,13*
3		NaHS	0,41±0,04	0,90±0,07	1,63±0,05	3,52±0,08*

Примітка. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю.

Аналогічні закономірності виявлені при дослідженні впливу модуляторів обміну H_2S на показники активності H_2S-синтезуючих ензимів і вміст H_2S в аорті щурів різної статі (табл. 5.10). З'ясувалося, що застосування пропаргілгліцину викликає вірогідне зменшення активності лише ЦГЛ в аорті у самців і самок відповідно на 42,9 та 26,9% ($p<0,05$), відносно контролю. Поряд з цим реєструється достовірне зменшення вмісту H_2S в аорті у самців та самок щурів відповідно на 30,2 та 20,0% ($p<0,05$), порівняно з контрольною групою. Натомість, введення NaHS не супроводжується достовірною зміною активності досліджуваних H_2S-продукуючих ензимів в аорті щурів, однак призводить до вірогідного зростання рівня H_2S в аорті у самців і самок відповідно на 22,5 та 12,7% ($p<0,05$), порівняно з контрольними тваринами. Таким чином, інгібуючий вплив пропаргілгліцину на активність ЦГЛ і вміст H_2S, а також стимулююча дія NaHS на рівень H_2S в аорті також більш виразні у самців, ніж у самок.

Таблиця 5.10

Вплив модуляторів обміну H_2S на активність H_2S-продукуючих ензимів в аорті самців і самок щурів (M±m, n=10)

Групи тварин			ЦГЛ	ЦАТ	ТСТ	H_2S
			нмоль H_2S/хв·мг протеїну			нмоль/ мг протеїну
1	Самці	Контроль	0,70±0,03	0,57±0,04	1,87 ±0,07	1,29±0,05
2		ППГ	0,40±0,06*	0,54±0,03	1,85±0,06	0,90±0,06*
3		NaHS	0,75±0,05	0,60±0,05	1,90±0,08	1,58±0,07*
1	Самки	Контроль	0,93±0,04	0,75±0,07	2,41±0,09	1,65±0,07
2		ППГ	0,68±0,05*	0,70±0,06	2,35±0,05	1,32±0,08*
3		NaHS	0,97±0,08	0,80±0,04	2,44±0,10	1,86±0,08*

Примітка. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю.

Модулятори обміну H_2S мають різноспрямований вплив на активність НАДФН-оксидази в міокарді й аорті щурів, причому їх дія більш виражена у самців (табл. 5.11). Виявилось, що пропаргілгліцин викликає збільшення активності цього ферменту в міокарді й аорті у самців відповідно на 38,8 та 29,7% ($p<0,05$), тоді як у самок - на 22,0 та 17,2% ($p<0,05$), порівняно з контрольною групою. За умов застосування пропаргілгліцину поглиблюються статеві відмінності активності НАДФН-оксидази в міокарді й аорті: у самок контрольної групи активність цього ферменту менша відповідно на 35,5 та 31,9% ($p<0,05$), а у групі, яка отримувала пропаргілгліцин - на 43,2 та 38,5% ($p<0,05$), ніж у самців. Натомість, застосування NaHS супроводжується зменшенням активності НАДФН-оксидази в міокарді й аорті у самців - на 25,9 та 29,9% ($p<0,05$), а у самок - на 18,4 та 20,1% ($p<0,05$), відносно контрольних показників. За цих умов зменшуються статеві відмінності активності НАДФН-оксидази: у самок активність цього ферменту в міокарді і аорті менша відповідно на 28,9 та 22,4% ($p<0,05$), ніж у самців.

Таблиця 5.11

Вплив модуляторів обміну H_2S на активність НАДФН-оксидази в міокарді та аорті тварин різної статі (M±m, n=10)

Групи тварин		НАДФН-оксидаза, нмоль/хв·мг протеїну	
		Самці	Самки
		Міокард	
1	Контроль	1,28±0,07	0,83±0,04
2	ППГ	1,78±0,10*	1,01±0,12*
3	NaHS	0,95±0,06*	0,68±0,03*
		Аорта	
1	Контроль	0,88±0,06	0,60±0,03
2	ППГ	1,15±0,07*	0,71±0,03*
3	NaHS	0,62±0,07*	0,48±0,02*

Примітка. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю.

Пропаргілгліцин та NaHS мають різновекторну дію на активність супероксиддисмутази в міокарді й аорті щурів, причому їх дія більш істотна для самців, ніж самок (табл. 5.12). Показано, що пропаргілгліцин призводить до зменшення активності цього ферменту в міокарді й аорті у самців відповідно на 29,9 та 29,2% ($p<0,05$), а у самок - на 21,7 та 16,4% ($p<0,05$), порівняно з контрольною групою. На тлі застосування пропаргілгліцину поглиблюються статеві відмінності активності супероксиддисмутази в міокарді й аорті: у самок контрольної групи активність цього ферменту більша відповідно на 25,1 та 23,2% ($p<0,05$), у групі, яка отримувала пропаргілгліцин, на 39,8 та 45,6% ($p<0,05$), ніж у самців. Натомість, застосування NaHS супроводжується збільшенням активності супероксиддисмутази в міокарді й аорті у самців - на 19,0 та 21,4% ($p<0,05$), у самок - на 13,1 та 14,1% ($p<0,05$), відносно контрольних показників. За цих умов зменшуються статеві відмінності активності супероксиддисмутази: у

самок активність цього ферменту в міокарді й аорті більша відповідно на 19,0 та 15,8% ($p<0,05$), відносно самців.

Таблиця 5.12

Вплив модуляторів обміну H_2S на активність супероксиддисмутази в міокарді й аорті тварин різної статі (M±m, n=10)

Групи тварин		Супероксиддисмутаза, ум.од./мг протеїну	
		Самці	Самки
		Міокард	
1	Контроль	3,65±0,14	4,57±0,17
2	ППГ	2,56±0,11*	3,58±0,13*
3	NaHS	4,35±0,10*	5,17±0,14*
		Аорта	
1	Контроль	2,23±0,09	2,75±0,13
2	ППГ	1,58±0,06*	2,30±0,08*
3	NaHS	2,71±0,10*	3,14±0,10*

Примітка. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю.

Модулятори рівня H_2S мають різнонаправлений вплив на активність тіоредоксинредуктази в міокарді щурів, причому їх дія виражена сильніше у самців (табл. 5.13). Встановлено, що пропаргілгліцин викликає зменшення активності цього ферменту в міокарді самців на 31,7% ($p<0,05$), у самок - на 22,7% ($p<0,05$), порівняно з контрольною групою. На тлі застосування пропаргілгліцину поглиблюються статеві відмінності активності тіоредоксинредуктази в міокарді: у самок контрольної групи активність цього ферменту більша на 23,3% ($p<0,05$), в групі, яка отримувала пропаргілгліцин, на 39,6% ($p<0,05$), ніж у самців. Натомість, застосування NaHS супроводжується збільшенням активності тіоредоксинредуктази в міокарді у самців на 18,5% ($p<0,05$), а у самок - на 12,1% ($p<0,05$), відносно контрольних

показників. За цих умов зменшуються статеві відмінності активності тіоредоксинредуктази: у самок активність цього ферменту в міокарді більша на 16,6% ($p<0,05$), відносно самців.

Таблиця 5.13

Вплив модуляторів обміну H_2S на активність тіоредоксинредуктази в міокарді тварин різної статі (M±m, n=10)

Групи тварин		Тіоредоксинредуктаза, нмоль/хв·мг протеїну	
		Самці	Самки
1	Контроль	4,32±0,25	5,33±0,23
2	ППГ	2,95±0,19*	4,12±021*
3	NaHS	5,12±0,19*	5,97±0,22*

Примітка. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю.

Пропаргілгліцин та NaHS відрізняються за впливом на фракційний розподіл глутатіону в міокарді щурів, до того ж їх дія більш виражена у самців (табл. 5.14). З'ясувалося, що введення пропаргілгліцину супроводжується збільшенням вмісту GSSG та зменшенням рівня GSH і співвідношення GSH/GSSG у міокарді самців відповідно на 31,0; 40,4 та 52,9% ($p<0,05$), а у самок - на 13,0; 29,9 та 39,4% ($p<0,05$), порівняно з контрольною групою. На тлі застосування пропаргілгліцину поглиблюються статеві відмінності фракційного розподілу глутатіону в міокарді: у самок контрольної групи вміст GSSG менший, а рівень GSH та GSH/GSSG більший відповідно на 30,4; 22,0 та 78,4% ($p<0,05$), а в групі, яка отримувала пропаргілгліцин - на 39,9; 43,6 та 130% ($p<0,05$), ніж у самців. Натомість, застосування NaHS супроводжується зменшенням вмісту GSSG та збільшенням рівня GSH та співвідношення GSH/GSSG в міокарді самців відповідно на 29,6; 21,4 та 73,9% ($p<0,05$), а у самок - на 18,1; 14,6 та 45,5%

(p<0,05), відносно контрольних показників. За цих умов зменшуються статеві відмінності фракційного розподілу глутатіону: у самок вміст GSSG менший, а рівень GSH та GSH/GSSG у міокарді більший відповідно на 19,0; 15,2 та 49,2% (p<0,05), відносно самців.

Таблиця 5.14

Вплив модуляторів обміну H_2S на вміст фракцій глутатіону в міокарді тварин різної статі (M±m, n=10)

Групи тварин			GSH, нмоль/мг протеїну	GSSG, нмоль/мг протеїну	GSH/GSSG
1	Самці	Контроль	2,93±0,08	0,097±0,003	30,6±1,22
2		ППГ	1,75±0,07*	0,127±0,007*	14,4±1,23*
3		NaHS	3,56±0,11*	0,068±0,004*	53,3±2,28*
1	Самки	Контроль	3,58±0,14	0,067±0,004	54,7±3,73
2		ППГ	2,51±0,11*	0,076±0,003*	33,2±1,34*
3		NaHS	4,10±0,17*	0,055±0,006*	79,5±6,24*

Примітка. * - статистично достовірна (p<0,05) відмінність відносно відповідного контролю.

Модулятори обміну H_2S мають різноспрямований вплив на активність пероксидації ліпідів у міокарді й аорті щурів, причому їх дія більш істотна у самців, ніж у самок (табл. 5.15). Виявилося, що пропаргілгліцин викликає збільшення вмісту МДА у міокарді й аорті у самців відповідно на 71,1 та 62,5% (p<0,05), а у самок - на 52,0 та 51,8% (p<0,05), порівняно з контрольною групою. За умов застосування пропаргілгліцину поглиблюються статеві відмінності рівня МДА у міокарді й аорті: у самок контрольної групи його рівень менший відповідно на 29,2 та 22,7% (p<0,05), а в групі, яка отримувала пропаргілгліцин, на 37,1 та 27,7% (p<0,05), ніж у самців. Натомість, застосування NaHS супроводжується зменшенням вмісту МДА в міокарді та аорті у самців на 30,6 та 21,1% (p<0,05), а у самок - на 15,4 та

13,1% (p<0,05), відносно контрольних показників. За цих умов зменшуються статеві відмінності рівня МДА: у самок у міокарді й аорті він менший відповідно на 13,7 та 14,8% (p<0,05), відносно самців.

Таблиця 5.15

Вплив модуляторів обміну H_2S на активність процесів пероксидації ліпідів у міокарді й аорті тварин різної статі (M±m, n=10)

Групи тварин		МДА, нмоль/мг протеїну	
		Самці	Самки
		Міокард	
1	Контроль	10,2±0,40	7,24±0,26
2	ППГ	17,5±0,22*	11,0±0,24*
3	NaHS	7,10±0,37*	6,13±0,24*
		Аорта	
1	Контроль	6,46±0,22	5,00±0,09
2	ППГ	10,5±0,26*	7,59±0,16*
3	NaHS	5,10±0,23*	4,34±0,13*

Примітка. * - статистично достовірна (p<0,05) відмінність відносно відповідного контролю.

Модулювання рівня H_2S у серцево-судинній системі по різному впливає на активність пероксидації білків у міокарді й аорті щурів, причому у самців ефекти більш виражені (табл. 5.16). Пропаргілгліцин викликає збільшення вмісту КГП у міокарді й аорті самців відповідно на 85,9 та 70,2% (p<0,05), а у самок - на 64,7 та 55,2% (p<0,05), порівняно з контрольною групою. За умов застосування пропаргілгліцину поглиблюються статеві відмінності рівня КГП у міокарді й аорті: у самок контрольної групи його вміст менший відповідно на 31,9 та 31,1% (p<0,05), а в групі, яка отримувала пропаргілгліцин, на 39,7 та 37,1% (p<0,05), ніж у самців. Натомість, застосування NaHS супроводжується зменшенням вмісту КГП у міокарді й

аорті: у самців - на 31,3 та 22,6% ($p<0,05$), у самок - на 16,9 та 16,6% ($p<0,05$), відносно контрольних показників. За цих умов зменшуються статеві відмінності рівня КГП: у самок його рівень у міокарді й аорті менший відповідно на 17,6 та 25,7% ($p<0,05$), відносно самців.

Таблиця 5.16

Вплив модуляторів обміну H_2S на активність процесів пероксидації протеїнів у міокарді й аорті тварин різної статі (M±m, n=10)

Групи тварин		КГП, нмоль/мг протеїну	
		Самці	Самки
		Міокард	
1	Контроль	0,99±0,04	0,67±0,03
2	ППГ	1,84±0,08*	1,11±0,11*
3	NaHS	0,68±0,05*	0,56±0,04*
		Аорта	
1	Контроль	0,71±0,02	0,49±0,01
2	ППГ	1,21±0,08*	0,76±0,04*
3	NaHS	0,55±0,04*	0,41±0,06*

Примітка. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю.

Застосування пропаргілгліцину супроводжується розвитком цитолізу кардіоміоцитів (табл. 5.17), про що доказово свідчить зростання в крові активності АСТ і КФК у самців відповідно на 36,5 та 32,5% ($p<0,05$), а у самок - на 22,8 та 23,3% ($p<0,05$), відносно контролю. За цих умов реєструється поява статевих відмінностей інтенсивності цитолізу кардіоміоцитів: у самок активність АСТ і КФК у крові вірогідно менша відповідно на 11,9 та 11,7% ($p<0,05$), ніж у самців. Введення NaHS не супроводжується вірогідним впливом на активність вказаних ферментів.

Таблиця 5.17

Вплив модуляторів обміну H_2S на вміст в крові маркерів цитолізу кардіоміоцитів у щурів різної статі (M±m, n=10)

Групи тварин			АСТ, мкмоль/хв·л	КФК, Од./л
1	Самці	Контроль	36,5±1,06	76,2±4,64
2		ППГ	49,8±0,84*	101±3,91*
3		NaHS	35,7±0,62	74,4±4,10
1	Самки	Контроль	35,8±0,81	72,4±3,63
2		ППГ	43,9±0,72*	89,2±3,59*
3		NaHS	34,9±0,63	71,1±3,81

Примітка. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю.

Модулятори обміну H_2S мають різновекторний вплив на вміст у крові sVCAM-1, більш виразний у самців (табл. 5.18). Введення пропаргілгліцину викликає розвиток ендотеліальної дисфункції, доказом чого є зростання рівня цієї молекули адгезії у крові самців на 44,4% ($p<0,05$), а у самок – на 30,4% ($p<0,05$), відносно контролю. За цих умов відмічається поглиблення статевих відмінностей функціонування ендотелію: в контрольній групі самок рівень sVCAM-1 у крові менший на 13,2% ($p<0,05$), а в групі ППГ - на 21,6% ($p<0,05$), ніж у самців. Застосування NaHS викликає вірогідне зменшення рівня sVCAM-1 у крові у самців на 17,1% ($p<0,05$), а у самок – на 10,5% ($p<0,05$), відносно контролю. У самок, які отримували донор H_2S, вміст цієї молекули адгезії менший на 6,40%, ніж у самців, що свідчить про зникнення гендерних відмінностей рівня sVCAM-1 у крові за цих умов експерименту.

Таблиця 5.18

Вплив модуляторів обміну H_2S на вміст у крові sVCAM-1 у тварин різної статі (M±m, n=10)

Групи тварин		sVCAM-1, нг/мл	
		Самці	Самки
1	Контроль	513±14,6	445±17,4
2	ППГ	740±14,4*	580±22,2*
3	NaHS	425±13,2*	398±18,2*

Примітка. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю.

В наступній частині роботи досліджений вплив модуляторів обміну H_2S на чутливість стінки аорти самців і самок до вазодилятуючої дії H_2S і цистеїну та констрикторної дії гомоцистеїну. Встановлено, що у самців щурів інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти, передскорочених фенілефрином, у присутності H_2S у діапазоні концентрацій 10^{-6}-10^{-3}М після двотижневого введення пропаргілгліцину становила 4,19±0,37%; 6,48±0,47%; 18,1±0,48%; 40,1±1,18%, а після введення NaHS – 5,89±0,27%; 10,9±0,23%; 34,1±0,67%; 62,2±0,49%; відповідно (рис. 5.16).

За середніми величинами показники H_2S-індукованої вазодилятації у дорослих щурів, що отримували пропаргілгліцин, були меншими на 19,4; 35,8; 37,6 та 29,2% ($p<0,05$), а у щурів, що отримували NaHS, навпаки, вищими на 13,3; 17,9; 19,7 та 10,1% ($p<0,05$), ніж у контролі. В цілому, введення пропаргілгліцину викликало вірогідний зсув кривої «доза-ефект» праворуч, а введення NaHS - ліворуч відносно кривої «доза-ефект» у контрольній групі тварин.

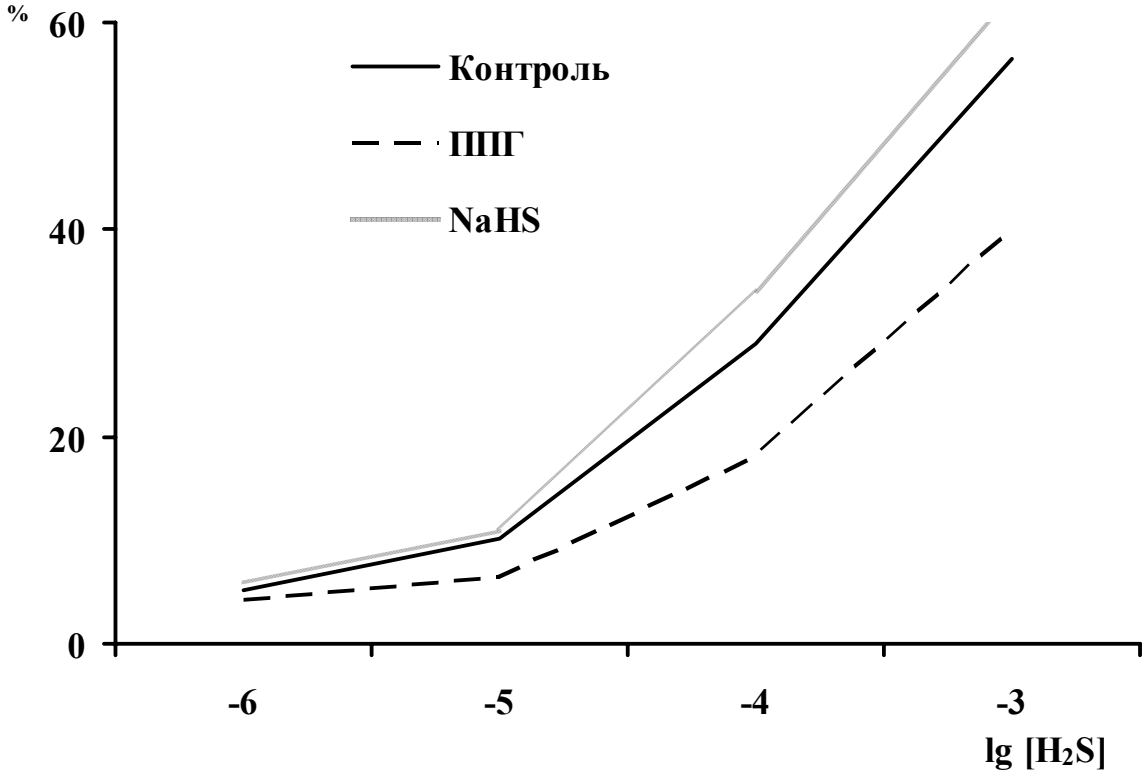


Рис. 5.16. Вплив модуляторів обміну H_2S на дозозалежність H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самців щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у перфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій H_2S. За 100% прийнятий рівень H_2S-стимульованого розслаблення фрагментів аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення.

Вплив пропаргілгліцину та NaHS на H_2S-стимульоване розслаблення аорти у самок був менш виразним, ніж у самців. У самок інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти, передскорочених фенілефрином, в присутності H_2S у діапазоні концентрацій 10^{-6}-10^{-3}М після двотижневого введення пропаргілгліцину становила 5,22±0,48%; 10,4±0,57%; 29,3±0,34%; 56,0±0,49%, а після введення NaHS – 7,85±0,43%; 14,5±0,33%; 39,4±0,55%; 67,2±0,81%; відповідно (рис. 5.17). За середніми величинами показники H_2S-індукованої вазодилятації у самок щурів, що отримували пропаргілгліцин, були меншими на 25,1; 21,8; 17,0 та 10,3% ($p<0,05$), а у щурів, що отримували

NaHS, навпаки, вищими на 12,6; 9,1; 11,6 та 7,70% ($p<0,05$), ніж в групі контролю. В цілому, введення пропаргілгліцину викликало вірогідний зсув кривої «доза-ефект» праворуч, а введення NaHS - ліворуч відносно такої кривої у контрольній групі тварин.

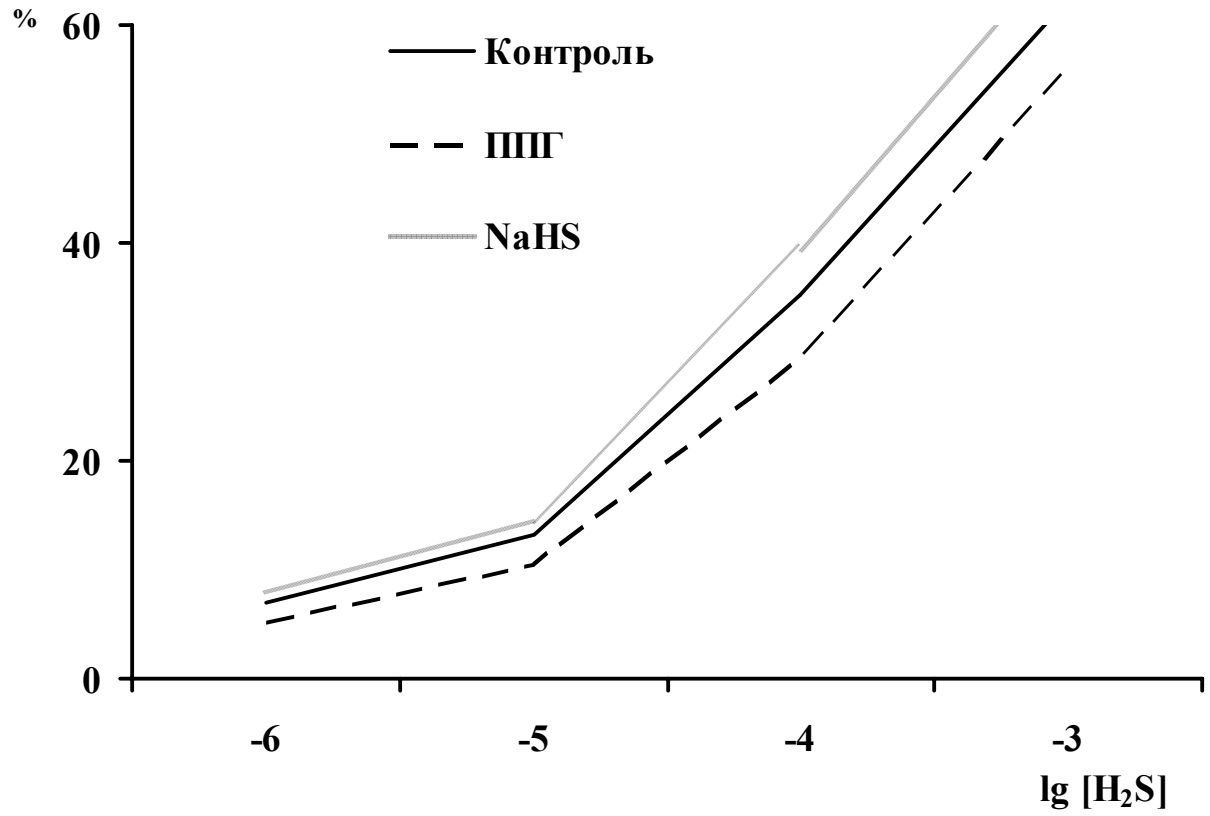


Рис. 5.17. Вплив модуляторів обміну H_2S на дозозалежність H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самок щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у перфузійному розчині, по осі ординат - інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій H_2S. За 100% прийнятий рівень H_2S-стимульованого розслаблення аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення.

Аналіз середньоефективних концентрацій H_2S в аорті (рис. 5.18) показав, що на тлі застосування пропаргілгліцину відмічається зростання цього показника у самців на 35,8% ($p<0,05$), а у самок – на 25,1% ($p<0,05$), відносно контролю. Введення NaHS викликає зменшення EC_{50} H_2S в аорті

самців на 21,3% ($p<0,05$), а у самок - на 14,5% ($p<0,05$), порівняно з контролем.

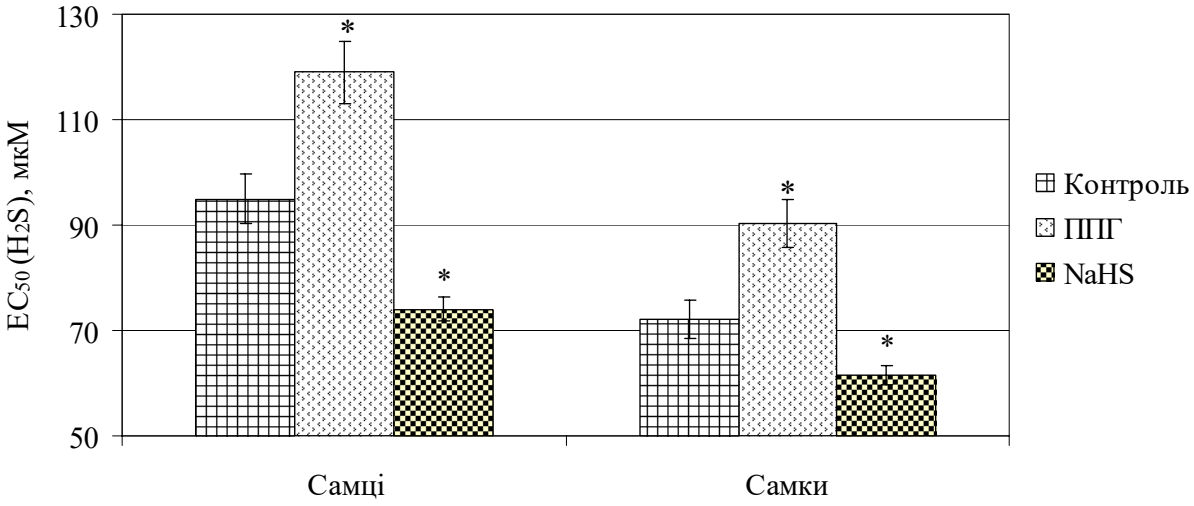


Рис. 5.18. Вплив модуляторів обміну H_2S на EC_{50} H_2S в аорті у самців та самок щурів. Примітка. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю.

У попередньому підрозділі показано, що в процесі старіння знижується здатність аорти до H_2S-індукованої релаксації у широкому діапазоні концентрацій (10^{-6}-10^{-3}М). Виникає питання, в якій мірі коливання концентрацій ендогенного H_2S у судинній стінці, індуковані введенням модуляторів, можуть відображатися на здатності судин до дилятації у тварин різного віку. Встановлено, що у щурів віком 6-8 міс. інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти, передскорочених фенілефрином, в присутності H_2S у концентраціях 10^{-6}-10^{-3}М після двотижневого введення пропаргілгліцину становила 4,82±0,20%; 7,65±0,21%; 21,8±0,37%; 44,8±1,34%, а після введення NaHS - 6,39±0,24%; 12,7±0,65%; 34,7±1,49%; 61,5±0,54%; відповідно (рис. 5.19). За середніми величинами показники H_2S-індукованої вазодилятації у дорослих щурів, що отримували пропаргілгліцин, були меншими на 18,7; 29,8; 26,4 та 25,0%, а у щурів, що отримували NaHS, навпаки, вищими на 32,6; 16,5; 17,2 та 3,0%, ніж в групі контролю. В цілому, введення пропаргілгліцину викликало вірогідний зсув кривої «доза-ефект» праворуч, а введення NaHS - ліворуч відносно контролю.

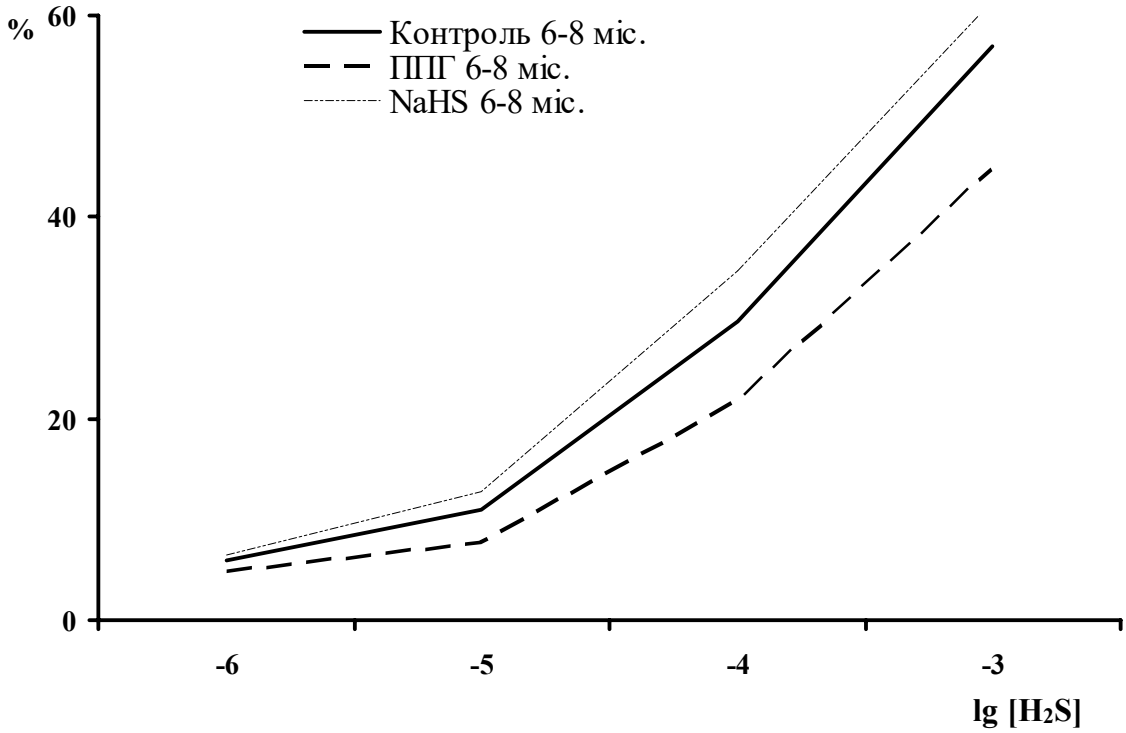


Рис. 5.19. Вплив модуляторів обміну H_2S на дозозалежність H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у статевозрілих самців щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у перфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій H_2S. За 100% прийнятий рівень H_2S-стимульованого розслаблення фрагментів аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення.

Відмінності щодо вазорелаксуючого ефекту H_2S між групами щурів віком 24-26 міс., яким вводили пропаргілгліцин або NaHS, та контрольною групою були більш суттєвими за низьких концентрацій H_2S - 10^{-6}-10^{-5}М, але виявлялись й у діапазоні високих концентрацій 10^{-4}-10^{-3}М (рис. 5.20). Привертає увагу той факт, що у старих щурів зміни скоротливості аорти, індуковані введенням модуляторів, були менш виразним, ніж у дорослих тварин. Інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти в присутності H_2S у концентраціях 10^{-6}-10^{-3}М у щурів віком 24-26 міс. після двотижневого введення пропаргілгліцину становила 4,10±0,20%; 7,36±0,39%; 17,6±0,37%; 42,0±0,17%, а після введення NaHS - 7,10±0,65%; 11,4±0,89%;

23,8±1,02%; 49,5±1,02%; відповідно. За середніми величинами показники H_2S-індукованої вазодилятації у старих щурів, що отримували пропаргілгліцин, були меншими на 31,0; 30,9; 14,7 та 7,7%, а у щурів, що отримували NaHS, навпаки, вищими на 19,5; 6,5; 15,5 та 8,8%, ніж у групі контролю. В цілому, введення пропаргілгліцину викликало вірогідний зсув кривої «доза-ефект» праворуч, а введення NaHS - ліворуч відносно такої кривої у контролі.

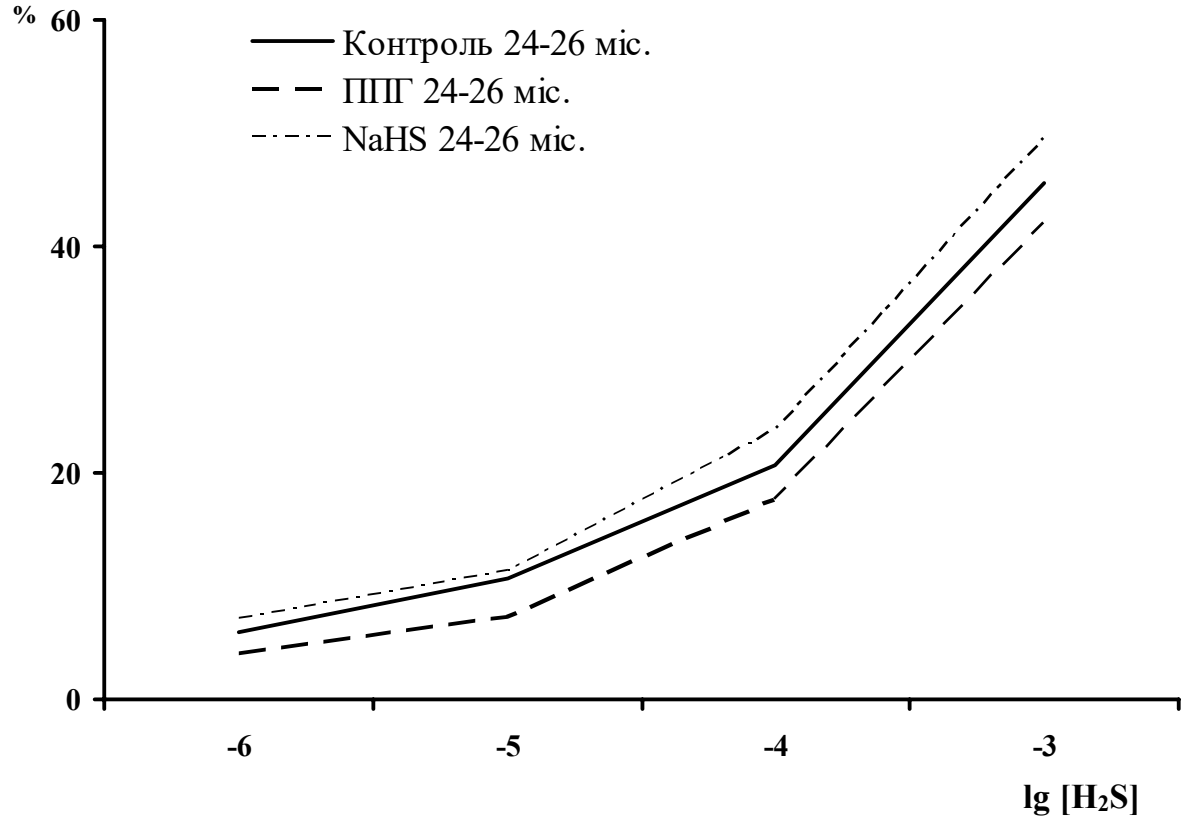


Рис. 5.20. Вплив модуляторів обміну H_2S на дозозалежність H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у старих самців щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у перфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій H_2S. За 100% прийнятий рівень H_2S-стимульованого розслаблення фрагментів аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення.

У самців щурів інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти в присутності цистеїну в концентраціях 10^{-6}-10^{-2}М після введення пропаргілгліцину становила відповідно 5,75±0,35%; 8,27±0,48%; 11,9±0,60%; 16,8±0,19%; 41,5±0,61%, а після введення NaHS - 10,7±0,58%; 13,1±0,22%; 19,5±0,37%; 27,3±0,51%; 56,9±0,97% (рис. 5.21). За середніми величинами показники цистеїн-індукованої вазодилятації у самців щурів, що отримували пропаргілгліцин, були меншими на 32,0; 16,6; 23,7; 23,0 та 17,5% ($p<0,05$), а у щурів, що отримували NaHS, вищими на 25,9; 32,1; 25,3; 25,3 та 13,2% ($p<0,05$), ніж в контролі. За умов введення пропаргілгліцину відмічалось зсув кривої «доза-ефект» праворуч, а NaHS - ліворуч відносно контрольної кривої.

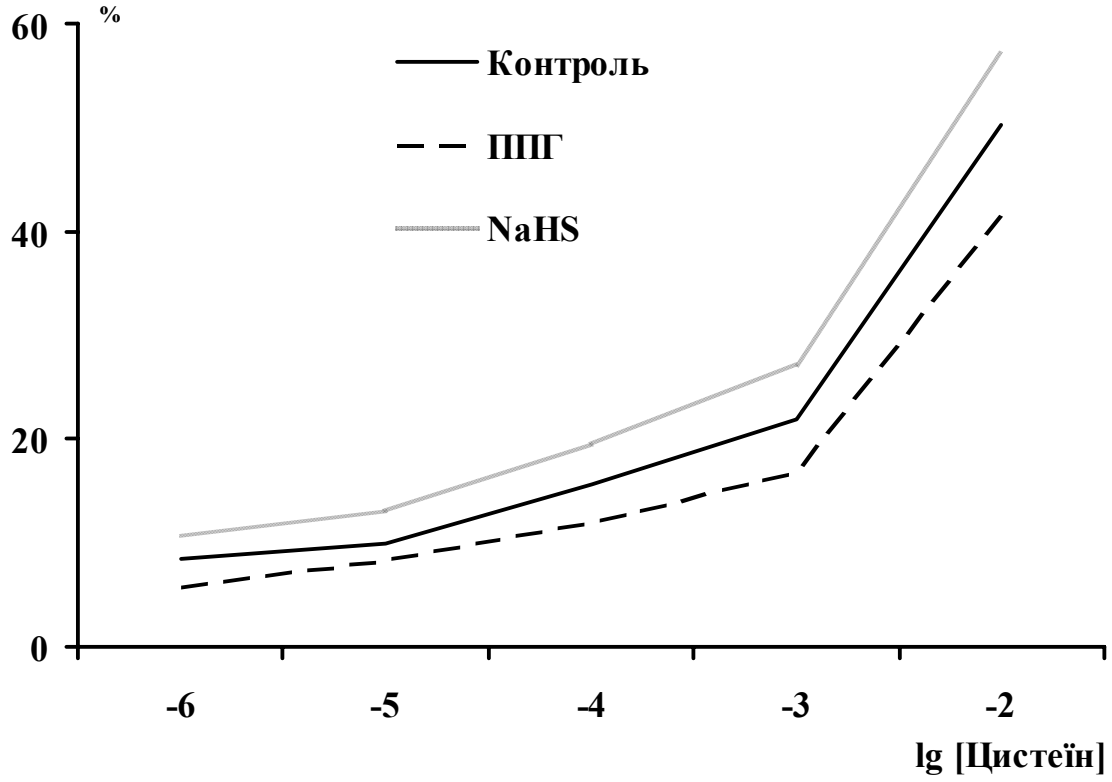


Рис. 5.21. Вплив модуляторів обміну H_2S на дозозалежність цистеїн-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самців щурів. По осі абсцис - десятковий логарифм концентрації цистеїну (М) у перфузійному розчині, по осі ординат - нормована інтенсивність розслаблення фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій цистеїну. За 100% прийнятий рівень цистеїн-стимульованого розслаблення аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефринового передскорочення.

У самок щурів інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти в присутності цистеїну в концентраціях 10^{-6}-10^{-2}М після введення пропаргілгліцину становила відповідно 7,88±0,36%; 10,2±0,34%; 15,3±0,29%; 22,8±0,40%; 50,5±0,48%, а NaHS - 13,3±0,22%; 16,4±0,94%; 22,3±0,55%; 31,5±0,39%; 61,8±0,68% (рис. 5.22). За середніми величинами показники цистеїн-індукованої вазодилятації у самок щурів, що отримували пропаргілгліцин, були меншими на 32,9; 25,6; 22,3; 16,1 та 11,2% ($p<0,05$), а що отримували NaHS, вищими на 13,4; 18,7; 13,6; 15,8 та 8,80% ($p<0,05$), ніж в контролі, однак масштабність змін була меншою, ніж у самців.

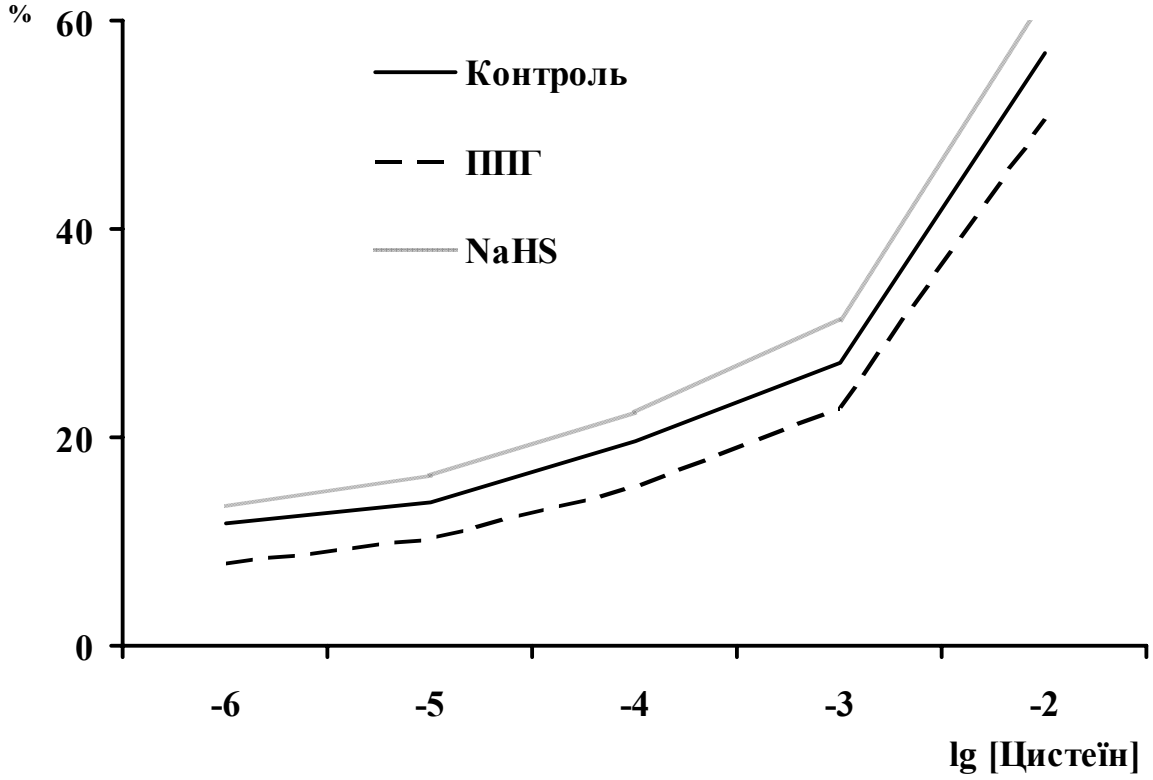


Рис. 5.22. Вплив модуляторів обміну H_2S на дозозалежність цистеїн-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самок щурів. По осі абсцис - десятковий логарифм концентрації цистеїну (М) у перфузійному розчині, по осі ординат - нормована інтенсивність розслаблення фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій цистеїну. За 100% прийнятий рівень цистеїн-стимульованого розслаблення аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефринового передскорочення.

Аналіз EC_{50} цистеїну в аорті показав (рис. 5.23), що на тлі застосування пропаргілгліцину відмічалось зростання цього показника у самців на 36,6% ($p<0,05$), а у самок – на 23,2% ($p<0,05$), відносно контрольної групи тварин. При цьому у самців EC_{50} цистеїну в аорті становив 1395±41,9мкМ, у самок - 925±41,1мкМ. На тлі застосування пропаргілгліцину відмічалось поглиблення статевих відмінностей EC_{50} цистеїну в аорті: в контрольній групі у самок цей показник був меншим на 26,4% ($p<0,05$), а в групі ППГ – на 33,7% ($p<0,05$), відносно самців. Введення NaHS викликає протилежні зміни: відмічається зниження EC_{50} цистеїну в аорті у самців – на 24,1% ($p<0,05$), а у самок – на 14,1% ($p<0,05$), відносно показників контрольної групи. За цих умов EC_{50} цистеїну в аорті самців становила 775±33,8мкМ, а у самок - 645±29,9мкМ. На тлі двотижневого застосування донору H_2S відмічалось зменшення статевих відмінностей EC_{50} цистеїну в аорті: у самок цей показник був меншим на 16,8% ($p<0,05$), ніж у самців.

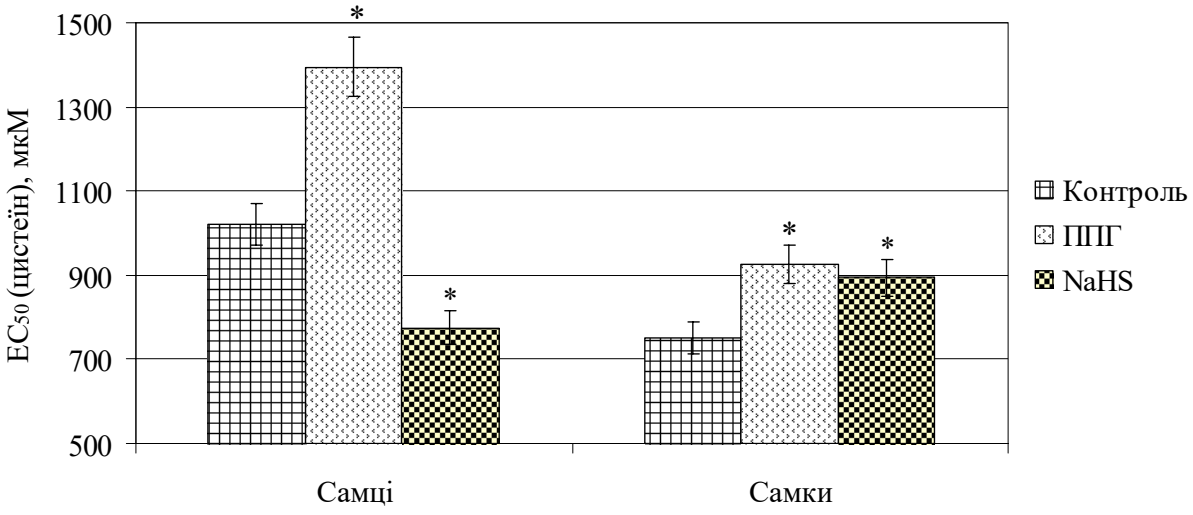


Рис. 5.23. Вплив модуляторів обміну H_2S на EC_{50} цистеїну в аорті у самців та самок щурів. Примітка. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю.

Дослідження гомоцистеїн-індукованої вазоконстрикції аорти у самців показало, що на тлі застосування пропаргілгліцину гомоцистеїн у

концентраціях 10^{-6}-10^{-2}М викликав дозозалежне зменшення ацетилхолінового розслаблення відповідно на 3,68±0,13%; 7,74±1,11%; 34,5±1,67%; 51,3±0,57%; 67,1±0,66%, що було на 11,5; 55,1; 30,6; 17,8 та 11,4% більшим ($p<0,05$), ніж в контролі (рис. 5.24). За умов застосування NaHS гомоцистеїн в цих концентраціях викликав дозозалежне зменшення ацетилхолінового розслаблення відповідно на 0,29±0,03%; 2,58±0,26%; 17,8±0,90%; 33,0±0,62%; 45,6±0,51%, що було на 91,2; 48,3; 32,6; 24,2 та 24,4% меншим ($p<0,05$), ніж в контролі.

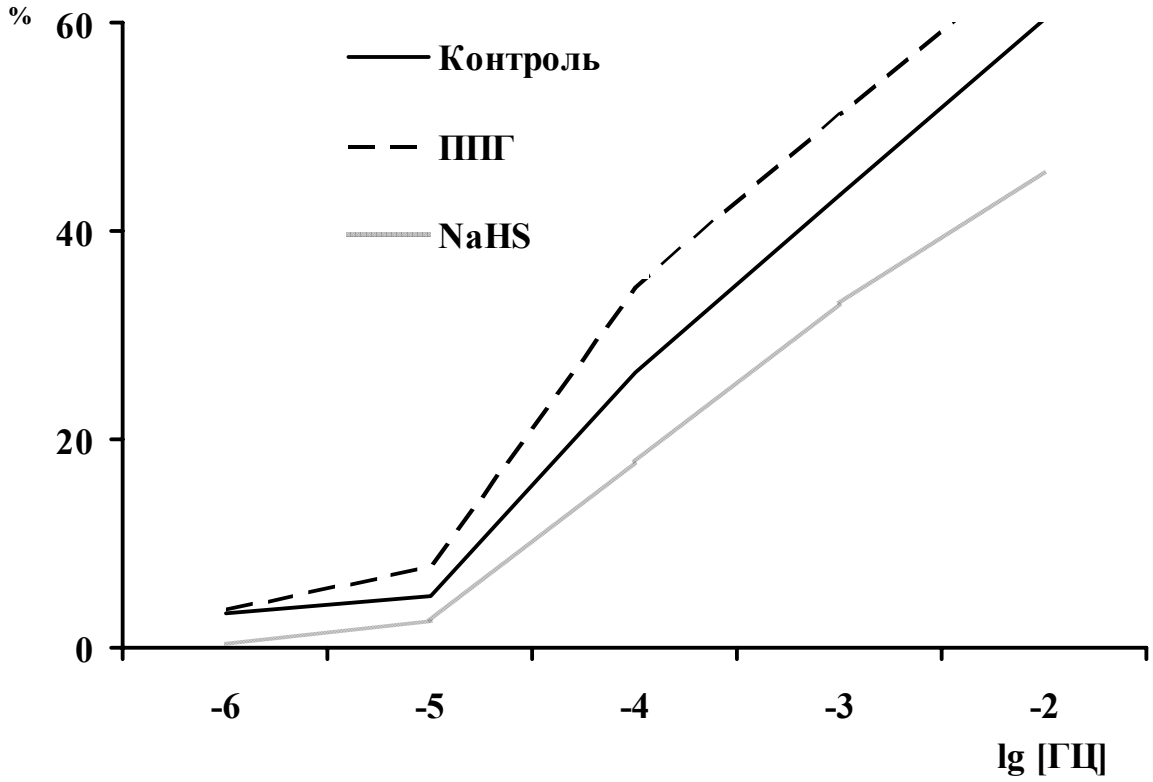


Рис. 5.24. Вплив модуляторів обміну H_2S на дозозалежність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом гомоцистеїну у самців щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації ГЦ (М) у суперфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій ГЦ. За 100% прийнято повне інгібування ацетихолін-індукованого розслаблення фрагментів аорти під впливом ГЦ.

У самок гомоцистеїн на тлі застосування пропаргілгліцину в концентраціях 10^{-6}-10^{-2}М викликав дозозалежне зменшення ацетилхолінового розслаблення відповідно на 1,39±0,39%; 2,90±0,34%; 24,3±0,39%; 39,6±0,50%; 53,0±0,64%, що було на 30,4; 20,8; 34,6; 14,8 та 13,0% більшим ($p<0,05$), ніж у контролі (рис. 5.25). При застосуванні NaHS гомоцистеїн у цих концентраціях викликав дозозалежне зменшення ацетилхолінового розслаблення відповідно на 0,37±0,04%; 2,17±0,23%; 15,0±1,01%; 30,4±0,80%; 42,3±1,29%, що було меншим на 0; 9,60; 17,2; 12,1 та 9,81% ($p<0,05$), ніж у контролі. Вплив модуляторів на зміни гомоцистеїн-індукованої вазоконстрикції у самок є менш масштабним, ніж у самців.

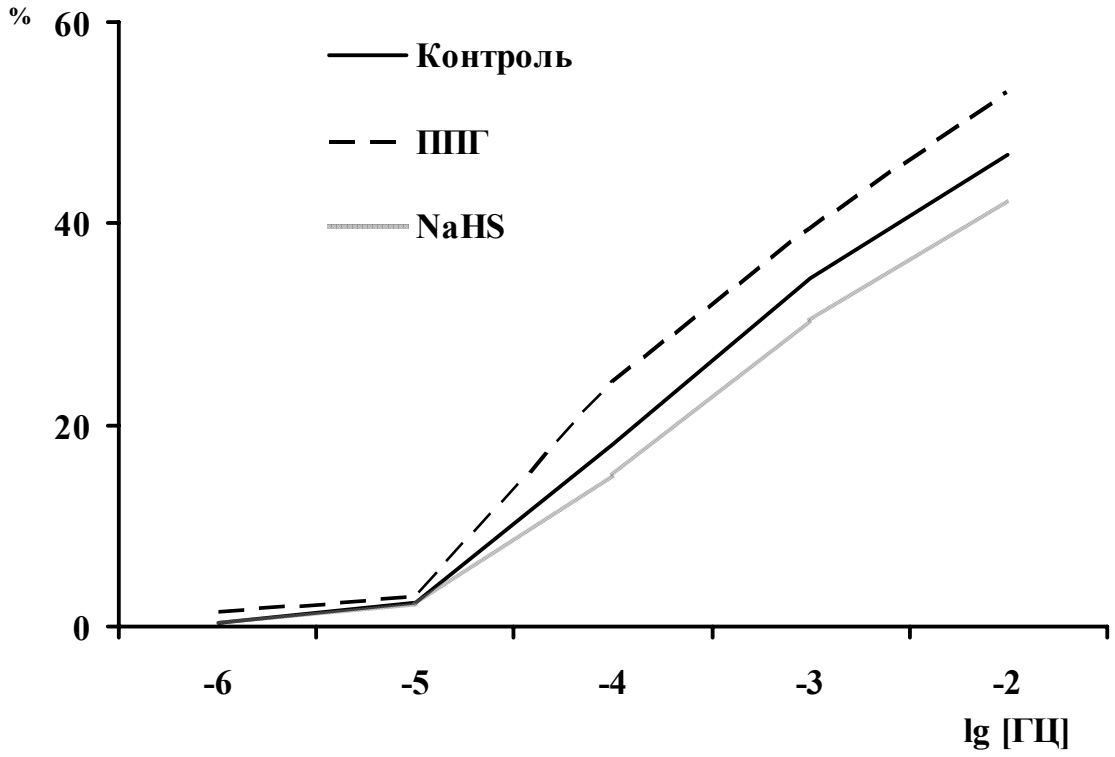


Рис. 5.25. Вплив модуляторів обміну H_2S на дозозалежність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом гомоцистеїну у самок щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації ГЦ (М) у суперфузійному розчині, по осі ординат –інтенсивність зменшення ацетилхолінового розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій ГЦ. За 100% прийнято повне інгібування ацетихолін-індукованого розслаблення фрагментів аорти під впливом ГЦ.

Аналіз EC_{50} гомоцистеїну в аорті показав (рис. 5.26), що на тлі застосування пропаргілгліцину відмічалось зменшення цього показника у самців на 31,9% ($p<0,05$), а у самок – на 21,9% ($p<0,05$), відносно контрольної групи тварин. При цьому у самців EC_{50} гомоцистеїну в аорті становив 91,2±7,35мкМ, у самок 132±6,28мкМ. На тлі застосування пропаргілгліцину відмічалось поглиблення статевих відмінностей EC_{50} гомоцистеїну в аорті: в контрольній групі самок цей показник був більшим на 26,1% ($p<0,05$), а в групі ППГ – на 44,7% ($p<0,05$), відносно самців. Введення NaHS викликає протилежні зміни: відмічається зростання EC_{50} гомоцистеїну в аорті самців на 26,9% ($p<0,05$), а у самок – на 14,8% ($p<0,05$), відносно показників контрольної групи. За цих умов EC_{50} гомоцистеїну в аорті самців становила 170±8,26мкМ, а у самок - 194±5,55мкМ. На тлі двотижневого застосування донору H_2S відмічалось зменшення статевих відмінностей EC_{50} цистеїну в аорті: у самок цей показник був більшим на 14,1% ($p<0,05$), ніж у самців.

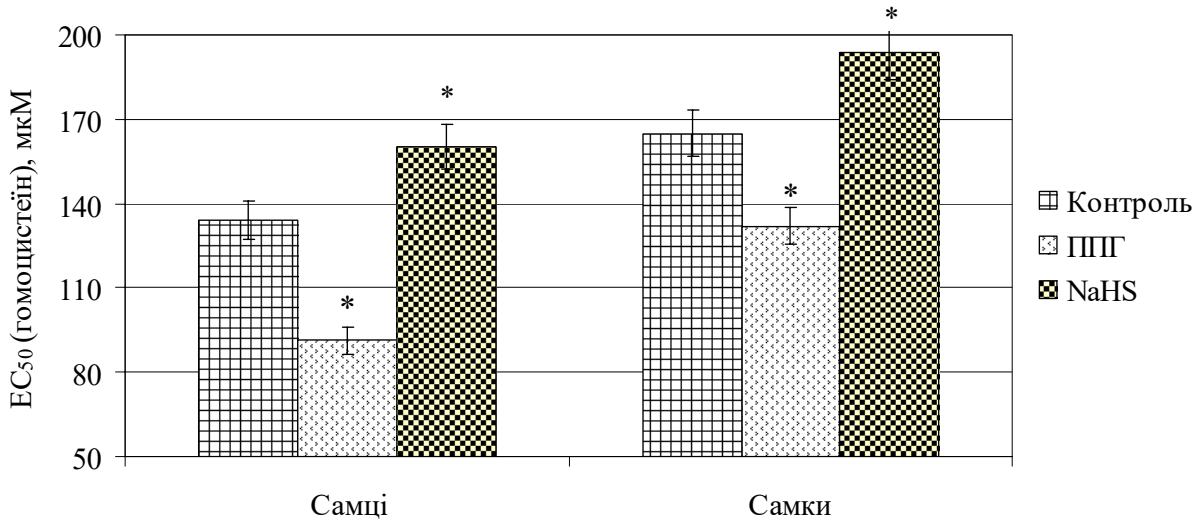


Рис. 5.26. Вплив модуляторів обміну H_2S на EC_{50} гомоцистеїну в аорті у самців і самок щурів. Примітка. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно відповідного контролю.

Таким чином, застосування модуляторів обміну H_2S виявляє різноспрямований вплив на показники стану міокарда й аорти, причому

виразність їх дії більша у самців, ніж у самок. Двотижневе введення пропаргілгліцину викликає у міокарді й аорті вірогідне зменшення активності ЦГЛ, вмісту H_2S, що супроводжується зменшенням активності супероксиддисмутази, тіоредоксинредуктази, запасів відновленого глутатіону, зростанням активності НАДФН-оксидази, процесів вільнорадикального окиснення ліпідів і протеїнів, розвитком цитолізу кардіоміоцитів, ендотеліальної дисфункції, зменшенням чутливості стінки аорти до вазодилятуючої дії H_2S, цистеїну та збільшенням констрикторної дії гомоцистеїну. Двотижневе використання NaHS супроводжувалось протилежними змінами. Отримані дані вкотре підтверджують важливу роль системи ЦГЛ / H_2S в формуванні гендерного диморфізму біохімічних та функціональних показників стану серця.

5.3 Вплив донору гідроген сульфіду на функціональні показники стану міокарда щурів обох статей за умов ішемії / реперфузії: зв'язок з рівнем гідроген сульфіду в крові

Дослідження проведені на двох групах статевозрілих тварин: 1) тварини з ішемією / реперфузією (IP), яким вводили фізіологічний розчин за 15 хв. до ішемії та впродовж 1 год після реперфузії (10 самців та 10 самок); 2) щурі, яким вводили NaHS за 15 хв. до ішемії та впродовж 1 год після реперфузії (10 самців та 10 самок). Параметри гемодинаміки та вміст H_2S реєстрували тричі у кожній групі: фоновий рівень (вихідні дані) після їх стабілізації, після лігування судини (ішемія) та через 1 год на тлі реперфузії.

Спершу оцінено зміни показників мікроциркуляції та тиску в порожнинах серця у самців та самок щурів на тлі ішемії / реперфузії і за умов застосування донору H_2S (табл. 5.19). Виявилось, що фоновий рівень показників кардіогемодинаміки вірогідно не відрізняється у тварин різної статі, за виключенням КМ, рівень якого у самців вірогідно менший на 8,82% ($p<0,05$), ніж у самок.

Таблиця 5.19

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. * - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно контрольної патології;

2. # - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно фонового рівня в межах групи;

3. ° - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність відносно рівня на тлі ішемії в межах групи;

4. $^{\&}$ - статистично достовірна ($p<0,05$) відмінність між самцями та самками.

За умов ішемії серця відмічається зниження функціональних показників у тварин обох статей, причому у самців вони були більш вираженими. 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. Отже, на тлі ішемії між самцями і самками з'являються вірогідні відмінності за показниками SaO_2, ТЛШ та ТПШ і поглиблюються відмінності КМ. 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. За цих умов зберігаються статеві відмінності між досліджуваними показниками. 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 - на 1,66; 1,17; 1,58 та 1,33 рази ($p<0,05$), відносно показників у контрольній групі.

В подальшому була оцінена динаміка вмісту H_2S у сироватці крові на тлі ішемії / реперфузії та при застосування NaHS (табл. 5.20). Виявилося, що фоновий рівень H_2S у сироватці крові самців вірогідно менший на 17,8% ($p<0,05$), ніж у самок. На тлі ішемії міокарда реєструється зменшення рівня H_2S у 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 концентрації 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 у сироватці крові: у самців зменшення його вмісту становить 47,7% ($p<0,05$), а у самок 43,7% ($p<0,05$), відносно фонового рівня.

Таблиця 5.20.

Вплив NaHS на рівень H_2S в сироватці крові (мкмоль/л) у самців та самок щурів за умов ішемії / реперфузії (M±m, n=10)

Групи тварин		Самці			Самки		
		Фон	Ішемія	Репер-фузія	Фон	Ішемія	Репер-фузія
1	IP (Контрольна патологія)	80,2± 2,54	28,5± 2,02#	37,5± 2,94#°	97,6± 2,21$^{\&}$	47,7± 2,51#$^{\&}$	66,5± 2,36#°$^{\&}$
2	IP + NaHS	85,0± 2,70	44,5± 2,72#	62,6± 3,92#°	102± 3,11$^{\&}$	57,6± 2,86#$^{\&}$	86,1± 2,20#°$^{\&}$

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. $^{\&}$ - $p<0,05$ між самцями та самками.

Через 1 годину після початку реперфузії реєструється зростання рівня H_2S у 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 у сироватці крові самців - на 40,6% ($p<0,05$), у самок - на 49,5% ($p<0,05$), відносно такого на тлі ішемії.

Кореляційний аналіз надав вагомі докази причетності системи H_2S до порушень мікроциркуляції та кардіогемодинаміки у самців та самок щурів на тлі ішемії / реперфузії. Виявилось, що рівень H_2S в сироватці крові виявляє прямі асоціативні зв'язки з КМ, SaO_2, ТЛШ та ТПШ (у самців $r=0,54$-$0,62$; у самок $r=0,60$-$0,70$, $p<0,05$), причому у самок вони дещо сильніші.

Таким чином, проведені дослідження засвідчили, що ішемія міокарду на тлі оклюзії лівої коронарної артерії у самців і самок щурів

супроводжується зменшенням рівня H_2S у сироватці крові, що асоціюється з пригніченням мікроциркуляції та кисневого забезпечення кардіоміоцитів ЛШ (зменшується КМ та SaO_2), послабленням його скоротливої здатності та порушенням внутрішньошлуночкової гемодинаміки (знижується ТЛШ та ТПШ). Реперфузія вінцевої судини у тварин обох статей не викликала повного відновлення вмісту H_2S у сироватці крові та показників кардіогемодинаміки до фонового рівня, що свідчить про формування синдрому невідновленого вінцевого кровообігу (no-reflow). Отже, пошкодження міокарду на тлі ішемії та реперфузії до певної міри можна пояснити зменшенням вмісту H_2S у сироватці.

Підсумовуючи результати цього розділу можна припустити, що різний вміст H_2S у міокарді й аорті самців та самок щурів є важливим чинником, який визначає статеві відмінності функціонування серцево-судинної системи в нормі та при патології, а також різної чутливості серця та судин до дії патогенних факторів.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях [52, 58, 69, 70, 287].

РОЗДІЛ 6
ВПЛИВ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ НА МЕТАБОЛІЗМ СІРКОВМІСНИХ АМІНОКИСЛОТ І ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ У ЩУРІВ ОБОХ СТАТЕЙ: ЗВ'ЯЗОК ЗІ СТАНОМ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ СИСТЕМИ

В попередніх розділах нами показано, що рівень гомоцистеїну, цистеїну та H_2S в сироватці крові до певної міри детермінує секс-специфічні особливості функціонування серця та судин. Порушення обміну цих сірковмісних метаболітів, а саме, зростання в крові вмісту гомоцистеїну (ГГЦ), цистеїну (гіперцистеїнемія) та зменшення рівня H_2S є важливими чинниками розвитку кардіоваскулярної патології [3, 295]. Однак, залишається невивченим існування статевих відмінностей у кардіо- та вазотоксичній дії високих концентрацій гомоцистеїну, цистеїну та дефіциту H_2S, що і стало метою дослідження цього розділу. Задля вирішення поставленої мети, нами був обраний модельний патологічний стан (тіолактонова ГГЦ), який супроводжується одночасним зростанням у крові вмісту гомоцистеїну, цистеїну та зменшенням рівня H_2S [28]. На цій експериментальній моделі досліджували особливості впливу тривалого введення тіолактону гомоцистеїну на метаболізм сірковмісних амінокислот у печінці, рівень сірковмісних метаболітів у крові, обмін H_2S у міокарді й аорті, а також стан серцево-судинної системи у щурів різної статі.

Дослідження були проведені на 40 статевозрілих тваринах: 1 і 2 групи (контрольні) - самці (n=10) та самки щурів (n=10), які протягом 28 діб отримували 1% розчин крохмалю в/шл з розрахунку 1 мл на 100 г маси щура 1 раз на добу; 3 і 4 групи (дослідні) - самці (n=10) та самки (n=10), які протягом 28 діб отримували тіолактон гомоцистеїну (100 мг/кг маси тіла в/шл на 1% розчині крохмалю 1 раз на добу).

6.1 Вплив гіпергомоцистеїнемії на маркери метаболізму сірковмісних амінокислот у печінці та вміст сірковмісних метаболітів у крові щурів обох статей

Тіолактонова ГГЦ супроводжується зростанням у крові вмісту гомоцистеїну у щурів обох статей, при чому у самців ступінь гомоцистеїнемії був вірогідно вищим, ніж у самок (рис. 6.1). Введення тіолактону гомоцистеїну викликає статистично достовірне зростання рівня гомоцистеїну у самців в 2,1 рази, у самок - в 1,8 рази, порівняно з відповідними показниками контролю. Виявилося, що в контрольній групі тварин вміст гомоцистеїну коливався в межах 7,25-8,25 мкмоль/л (у самців) та 5,73-6,79 мкмоль/л (у самок), тоді як у дослідній групі - 14,3-18,6 мкмоль/л (у самців) та 9,85-12,8 мкмоль/л (у самок). ГГЦ поглиблює базальні відмінності рівня гомоцистеїну в крові: у самок дослідної групи рівень цієї сірковмісної амінокислоти менший на 30,0%, тоді як в контрольній групі - на 19,0%, відносно показників у самців.

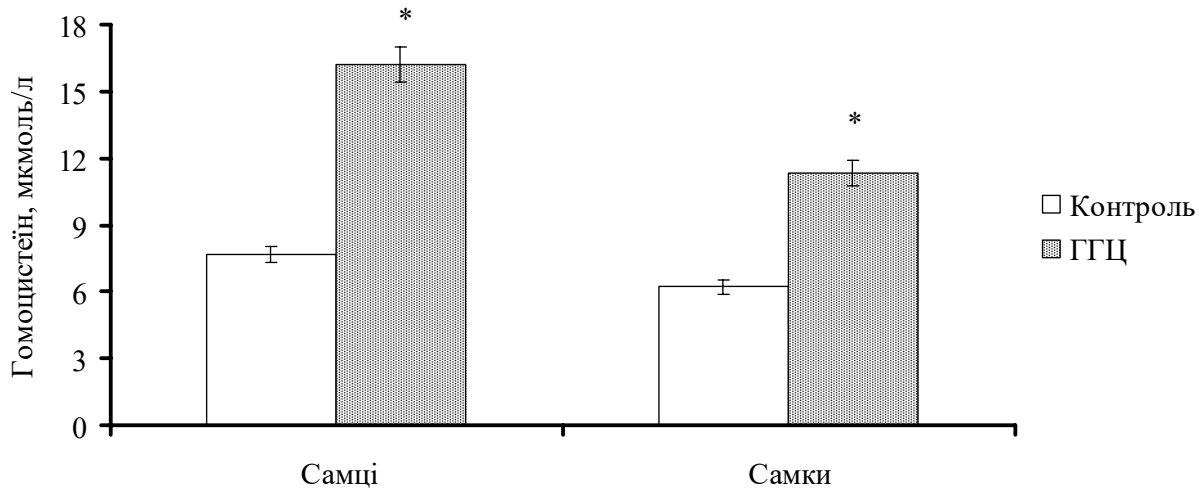


Рис 6.1. Вплив ГГЦ на вміст гомоцистеїну в сироватці крові щурів обох статей. Примітка: * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

Застосування тіолактону гомоцистеїну викликало достовірне зростання рівня цистеїну ($p<0,05$) в сироватці крові щурів різної статі. За цих умов рівень цистеїнемії був вірогідно вищим у самців, ніж у самок (рис. 6.2). Виявилося, що тіолактонова ГГЦ спричиняла зростання рівня цистеїну в сироватці крові самців на 59,2% ($p<0,05$), а у самок на 38,0% ($p<0,05$), порівняно з відповідними показниками контролю. Так, у дослідній групі щурів медіана вмісту цистеїну в крові становила 230 (95% CI 208-244) мкмоль/л (у самців) та 152 (95% CI 140-164) мкмоль/л (у самок), а в контрольній групі тварин - 143 (95% CI 128-153) мкмоль/л (у самців) та 110 (95% CI 100-121) мкмоль/л (у самок). За умов тіолактонової ГГЦ відмічається поглиблення статевих відмінностей рівня цистеїну в крові: у контрольній групі тварин у самок вміст цієї сірковмісної амінокислоти менший на 23,0% ($p<0,05$), ніж у самців, тоді як в дослідній групі - на 33,2% ($p<0,05$).

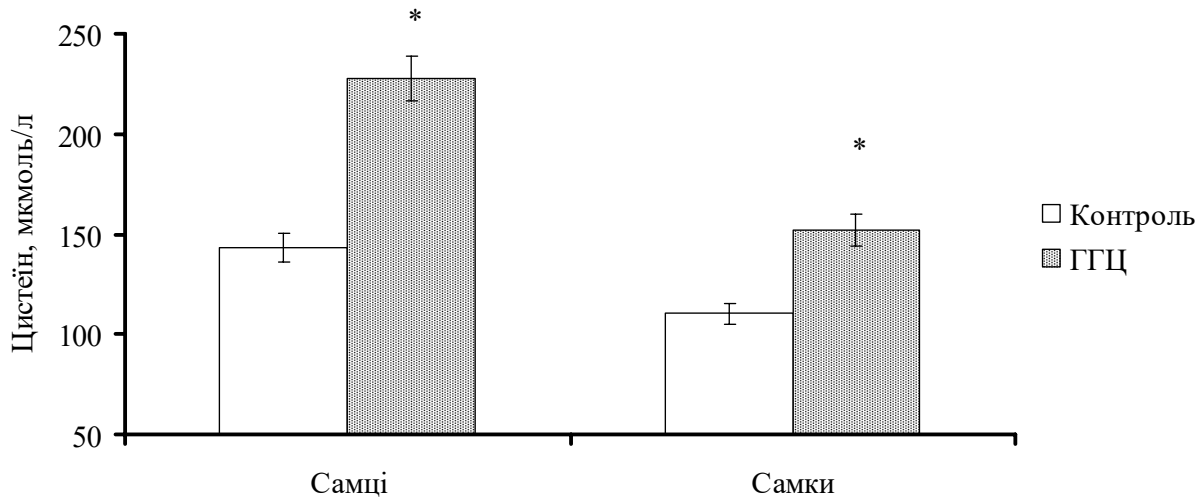


Рис 6.2. Вплив ГГЦ на вміст цистеїну в сироватці крові щурів обох статей. Примітка: * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

Тривале введення тіолактону гомоцистеїну приводить до зменшення вмісту H_2S у сироватці крові самців та самок. Депримуюча дія високих концентрацій тіолактону гомоцистеїну на рівень цього газотрансміттера

більш виразна у самців щурів, ніж у самок (рис. 6.3). За цих умов зменшення вмісту H_2S в сироватці крові у самців становить 59,4% ($p<0,05$), тоді як у самок - 47,5% ($p<0,05$), порівняно з показниками контролю. В групі тварин з ГГЦ вміст H_2S в сироватці крові коливається в межах 27,5-36,3 мкмоль/л (у самців) та 43,4-56,7 мкмоль/л (у самок), натомість в контрольній групі діапазон коливань цього метаболіту становить 69,0-91,8 мкмоль/л (у самців) та 86,4-104 мкмоль/л (у самок). Виявилось, що у самок дослідної групи тварин вміст H_2S в сироватці крові більший на 59,3%, тоді як в контрольній групі лише на 23,3%, порівняно із самцями. Отримані дані свідчать про збільшення масштабності змін в системі сироваткового H_2S за умов модельованої патології.

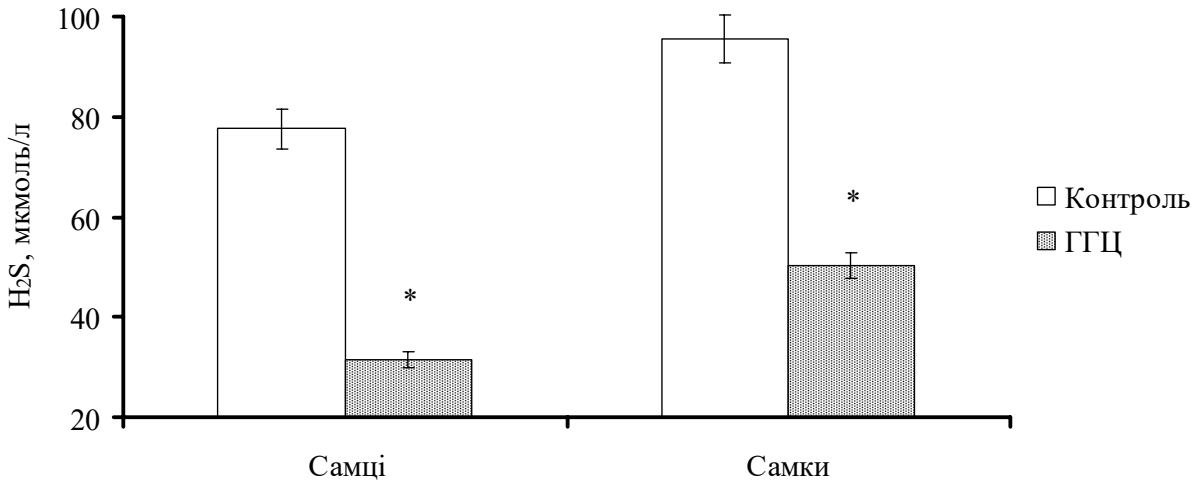


Рис 6.3. Вплив ГГЦ на вміст H_2S в сироватці крові щурів обох статей. Примітка: * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

Далі ми оцінили впив експериментальної ГГЦ на активність ензимних систем утилізації гомоцистеїну в печінці щурів обох статей. Виявилось, що тривале введення тіолактону гомоцистеїну супроводжується зменшенням швидкості утилізації гомоцистеїну в циклі метилування у тварин обох статей, причому більш виразний ефект відмічався у самців (табл. 6.1). За цих умов

зменшується утворення метіоніну з гомоцистеїну та бетаїну за участі БГМТ у самців на 19,4% ($p<0,05$), у самок на 11,2% ($p<0,05$), порівняно з контрольними групами. Поряд з цим реєструється сповільнення реакції активації метіоніну за участі МАТ у самців на 20,5% ($p<0,05$), у самок на 13,4% ($p<0,05$), порівняно з відповідним контролем. Також зменшується швидкість синтезу S-аденозилгомоцистеїну за участі S-АГГ у самців та самок щурів відповідно на 20,9 та 14,2% ($p<0,05$), відносно контролю. Тривала тіолактонова ГГЦ поглиблює базальні статеві відмінності активності ферментів циклу метилування гомоцистеїну в печінці: у самок контрольної групи тварин активність БГМТ, МАТ та S-АГГ на 19,6-21,9% перевищує показники самців, тоді як в дослідній групі - на 29,7-34,3%.

Таблиця 6.1

Вплив ГГЦ на активність ферментів циклу метилування гомоцистеїну в печінці щурів обох статей (M±m, n=10)

Групи тварин			Активність ферментів, нмоль/хв·мг протеїну		
			БГМТ	МАТ	S-АГГ
1	Контроль	Самці	3,60±0,06	2,73±0,11	3,54±0,11
2		Самки	4,40±0,08	3,29±011	4,23±0,12
3	ГГЦ	Самці	2,91±0,11*	2,17±0,09*	2,80±0,14*
4		Самки	3,90±0,10*	2,85±0,16*	3,63±0,12*

Примітка. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

Тіолактонова ГГЦ викликає зменшення активності реакцій транссульфування гомоцистеїну в печінці щурів обох статей. Інгібуючий вплив високих концентрацій тіолактону гомоцистеїну на процеси транссульфування вірогідно більший у самців щурів, порівняно з самками (табл. 6.2). З'ясувалось, що за умов тривалої тіолактонової ГГЦ відмічається

зменшення швидкості реакції конденсації гомоцистеїну та серину з утворенням цистатіоніну за участі ЦБС у самців на 24,8% ($p<0,05$), а у самок щурів - на 15,4% ($p<0,05$), порівняно з відповідними показниками контролю. Також реєструється падіння активності реакції гідролітичного розщеплення цистатіоніну до цистеїну та α-кетобутирату за участі ЦГЛ у самців на 21,6% ($p<0,05$), а у самок на 14,2% ($p<0,05$), порівняно з відповідним контролем. За умов тіолактонової ГГЦ посилюються стать-специфічні відмінності активності основних ензимів у печінці, які каталізують перетворення гомоцистеїну в цистеїн: у самок дослідніої групі тварин активність ЦБС та ЦГЛ на 41,3 та 40,8% більша ($p<0,05$), ніж у самців, тоді як в контрольній групі ці відмінності є меншими і становлять відповідно 25,6 та 28,5% ($p<0,05$).

Таблиця 6.2

Вплив ГГЦ на активність ферментів транссульфування гомоцистеїну в печінці щурів обох статей (M±m, n=10)

Групи тварин			Активність ферментів, нмоль/хв·мг протеїну	
			ЦБС (синтез цистатіоніну)	ЦГЛ (гідроліз цистатіоніну)
1	Контроль	Самці	14,9±0,67	15,9±0,32
2		Самки	18,7±0,38	20,4±0,35
3	ГГЦ	Самці	11,2±0,33*	12,5±0,41*
4		Самки	15,8±0,76*	17,5±0,36*

Примітка. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

Виявилось, що у тварин обох статей ензими окисного та кон'югаційного шляхів утилізації цистеїну в печінці дуже чутливі до високих концентрацій тіолактону гомоцистеїну. Введення препарату спричиняє більш виразне падіння активності вказаних ензимів у самців (табл. 6.3). У них за

умов ГГЦ реєструється зменшення швидкості окиснення цистеїну до цистеїнсульфнату за участі ЦДО на 21,1% ($p<0,05$), тоді як у самок щурів - на 13,4% ($p<0,05$), порівняно з відповідними показниками в групі контролю. Водночас зменшується активність реакції кон'югації цистеїну з глутаматом за участі γ-ГЦЛ (започатковує синтез глутатіону) на 22,0% ($p<0,05$), а у самок щурів - на 15,9% ($p<0,05$), порівняно з контролем. Статеві відмінності активності ензимів окисного та кон'югаційного шляхів утилізації цистеїну в печінці значно посилюються за умов модельованої патології: у самок контрольної групи активності ЦДО та γ-ГЦЛ є більшими відповідно на 30,0 та 24,0% ($p<0,05$), тоді як в дослідній групі відповідно на 42,7 та 33,8% ($p<0,05$), порівняно з тваринами протилежної статі.

Таблиця 6.3

Вплив ГГЦ на активність ферментів окисного та кон'югаційного шляхів утилізації цистеїну в печінці щурів обох статей (M±m, n=10)

Групи тварин			Активність ферментів	
			ЦДО, мкмоль/хв·мг протеїну	γ-ГЦЛ, нмоль/хв·мг протеїну
1	Контроль	Самці	2,29±0,07	3,62±0,15
2		Самки	2,98±0,09	4,49±0,19
3	ГГЦ	Самці	1,81±0,08*	2,82±0,17*
4		Самки	2,58±0,07*	3,78±0,12*

Примітка. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

Тривале введення тіолактону гомоцистеїну супроводжується зменшенням активності H_2S-продукуючих ензимів у печінці тварин обох статей, причому більш істотне зниження синтезу H_2S відмічалось у самців (табл. 6.4). За умов ГГЦ відмічається зменшення активності синтезу H_2S в реакції конденсації цистеїну та гомоцистеїну за участі ЦБС у самців та самок щурів відповідно на 21,4 та 13,6% ($p<0,05$), порівняно з відповідним

контролем. Високі концентрації тіолактону гомоцистеїну також викликають зменшення утворення H_2S в реакції десульфурування цистеїну за участі ЦГЛ у самців та самок щурів відповідно на 25,9 та 17,5% ($p<0,05$), порівняно з відповідним контролем. Поряд з цим відмічається зменшення продукції H_2S в реакції трансамінування цистеїну з α-кетоглутаратом за участі ЦАТ у самців та самок щурів на 20,6 та 13,5% ($p<0,05$), порівняно з відповідним контролем. Тіолактонова ГГЦ потенціює статеві відмінності активності H_2S-продукуючих ензимів у печінці: в контрольній групі активність ЦБС, ЦГЛ та ЦАТ у самок була вищою відповідно на 24,3; 25,6 та 26,4% ($p<0,05$), ніж у самців, в дослідній групі ці відмінності становили відповідно 36,6; 39,7 та 37,7% ($p<0,05$).

Таблиця 6.4

Вплив ГГЦ на активність H_2S-синтезуючих ферментів в печінці щурів обох статей (M±m, n=10)

Групи тварин			Десульфуразна активність ферментів, нмоль H_2S/хв·мг протеїну		
			ЦБС	ЦГЛ	ЦАТ
1	Контроль	Самці	3,17±0,19	2,85±0,24	2,56±0,15
2		Самки	3,94±0,22	3,58±0,27	3,24±0,18
3	ГГЦ	Самці	2,49±0,08*	2,11±0,18*	2,03±0,13*
4		Самки	3,40±0,13*	2,95±0,19*	2,80±0,08*

Примітка. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

Проведені дослідження показали, що хронічна ГГЦ чинить стать-специфічний вплив на активність основних ензиматичних шляхів метаболізму сірковмісних амінокислот в печінці щурів та вміст сірковмісних метаболітів в крові. Виявилось, що тривале введення тіолактону гомоцистеїну має вірогідно більший депримуючий вплив на активність в печінці ензимів утилізації гомоцистеїну (БГМТ, МАТ, S-АГГ, ЦБС, ЦГЛ),

деградації цистеїну (ЦДО, γ-ГЦЛ) та синтезу H_2S (десульфуразна активність ЦБС, ЦГЛ та ЦАТ) у самців щурів, що супроводжується більш істотним зростанням у сироватці крові вмісту гомоцистеїну, цистеїну і зменшенням рівня H_2S у тварин цієї статі. За умов тіолактонової ГГЦ значно поглиблюються статеві відмінності активності основних ензимів метаболізму сірковмісних амінокислот в печінці щурів та вмісту сірковмісних метаболітів в крові, порівняно з показниками контрольної групи.

6.2 Вплив гіпергомоцистеїнемії на показники обміну гідроген сульфіду в серці та аорті щурів обох статей

ГГЦ спричиняє розвиток дефіциту H_2S в міокарді щурів обох статей, причому виразність зменшення вмісту цього метаболіту була вищою у самців (рис. 6.4).

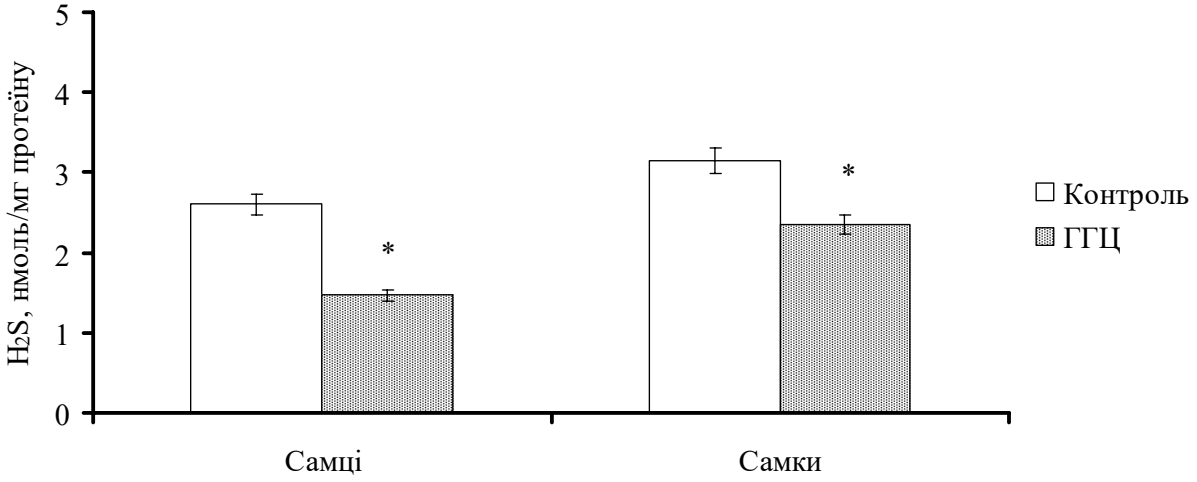


Рис 6.4. Вплив ГГЦ на вміст гідроген H_2S в міокарді щурів обох статей. Примітка: * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

З'ясувалось, що введення тіолактону гомоцистеїну веде до зменшення вмісту H_2S в міокарді на 43,3% (у самців, $p<0,05$) та 25,1% (у самок, $p<0,05$), порівняно з контролем. В дослідній групі медіана вмісту H_2S в міокарді

становить 1,53 (95% CI 1,11-1,72) нмоль/мг протеїну (у самців) та 2,35 (95% CI 1,96-2,73) нмоль/мг протеїну (у самок), а в контрольній групі - 2,57 (95% CI 2,19-3,15) нмоль/мг протеїну (у самців) та 3,08 (95% CI 2,78-3,53) нмоль/мг протеїну (у самок). Високі концентрації тіолактону гомоцистеїну спричиняють поглиблення статевих відмінностей рівня H_2S в серці щурів: у самок контрольної групі тварин вміст H_2S більший на 20,6% ($p<0,05$), а в дослідній групі на 59,5% ($p<0,05$), ніж у самців.

Введення тіолактону гомоцистеїну протягом 28 діб зменшує ензиматичну продукцію H_2S в міокарді щурів обох статей, причому у самців цей ефект істотно вищий, ніж у самок (табл. 6.5).

Таблиця 6.5

Вплив ГГЦ на активність H_2S-синтезуючих ферментів в міокарді щурів обох статей (M±m, n=10)

Групи тварин			Десульфуразна активність ферментів, нмоль H_2S/хв·мг протеїну		
			ТСТ	ЦГЛ	ЦАТ
1	Контроль	Самці	1,25±0,05	0,28±0,01	0,71±0,05
2		Самки	1,58±0,08	0,38±0,02	0,85±0,05
3	ГГЦ	Самці	0,86±0,03*	0,14±0,02*	0,42±0,04*
4		Самки	1,20±0,06*	0,24±0,01*	0,64±0,05*

Примітка. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

За умов ГГЦ відмічається достовірне зменшення синтезу H_2S в реакції десульфурування цистеїну за участі ЦГЛ у самців на 49,8% ($p<0,05$), а у самок на 36,8% ($p<0,05$), порівняно з контролем. Зменшується й активність ензиматичної продукції H_2S в реакції трансамінування цистеїну за участі ЦАТ у самців та самок щурів відповідно на 40,5 та 25,1%, порівняно з групою контролю. Відмічається також достовірне зменшення синтезу H_2S в реакції відновлення тіосульфат-аніону за участі ТСТ у самців на 30,8%

($p<0,05$), а у самок на 24,0% ($p<0,05$), порівняно з контролем. ГГЦ поглиблює статеві відмінності активності H_2S-продукуючих ферментів в міокарді: у самок контрольної групи тварин активність цих ферментів більша на 21,2-36,2%, а в дослідній групі – на 39,0-71,4%, порівняно з самцями.

Тіолактонова ГГЦ супроводжується зменшенням активності мітохондріального окиснення ендогенного H_2S сульфітоксидазою та збільшенням загальної швидкості утилізації екзогенного H_2S в міокарді щурів. Ці ефекти високих концентрацій тіолактону гомоцистеїну більш виражені у самців щурів (табл. 6.6). Встановлено, що за умов ГГЦ відмічається зменшення активності сульфітоксидази в міокарді самців та самок щурів відповідно на 31,4 та 18,0% ($p<0,05$), порівняно з контролем. Персентильний аналіз показав, що в дослідній групі медіанна активність сульфітоксидази становить 3,33 (95% CI 2,03-4,75) нмоль/хв·мг протеїну (у самців) та 4,27 (95% CI 3,18-5,04) нмоль/хв·мг протеїну (у самок), в той час як в контрольній групі - 4,33 (95% CI 3,23-7,01) нмоль/хв·мг протеїну (у самців) та 5,0 (95% CI 3,92-6,89) нмоль/хв·мг протеїну (у самок). ГГЦ поглиблює статеві відмінності активності сульфітоксидази в кардіоміоцитах: в контрольній групі активність цього ферменту у самок на 4,20% більша, ніж у самців, тоді як в дослідній групі ці відмінності сягають статистично достовірних значень 24,5% ($p<0,05$).

Станом на 28 добу введення тіолактону гомоцистеїну відмічається збільшення швидкості утилізації екзогенного H_2S в міокарді щурів відповідно на 36,5 та 22,5% ($p<0,05$) у самців та самок, порівняно з контролем. Виявилось, що в групі з ГГЦ медіанна швидкість утилізації екзогенного H_2S становить 0,96 (95% CI 0,78-1,12) нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну (у самців) та 0,66 (95% CI 0,49-0,86) нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну (самки), тоді як в контрольній групі - 0,69 (95% CI 0,57-0,84) нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну (самці) та 0,53 (95% CI 0,45-0,65) нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну (самки). Тривале застосування тіолактону гомоцистеїну збільшує масштабність статевих відмінностей швидкості утилізації екзогенного H_2S у кардіоміоцитах: в

контрольній групі у самок цей показник на 22,6% менший ($p<0,05$), ніж у самців, тоді як в дослідній групі ці відмінності досягають 30,5% ($p<0,05$).

Таблиця 6.6

Вплив ГГЦ на активність сульфітоксидази та швидкість утилізації екзогенного H_2S в міокарді щурів обох статей (M±m, n=10)

Групи тварин			Сульфітоксидаза, нмоль/хв·мг протеїну	Швидкість утилізації H_2S, нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну
1	Контроль	Самці	4,92±0,47	0,70±0,03
2		Самки	5,12±0,34	0,54±0,02
3	ГГЦ	Самці	3,37±0,32*	0,95±0,04*
4		Самки	4,20±0,22*	0,66±0,05*

Примітка. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

ГГЦ супроводжується формуванням дефіциту H_2S в аорті щурів обох статей, причому у самців падіння рівня цього месенджера в аорті є достовірно більшим (рис. 6.5). Введення тіолактону гомоцистеїну викликає статистично достовірне зменшення рівня H_2S у самців на 31,4% ($p<0,05$), а у самок - на 20,0% ($p<0,05$), порівняно з відповідними показниками контролю. В контрольній групі тварин вміст H_2S змінювався в межах 1,05-1,53 нмоль/мг протеїну (у самців) та 1,36-1,87 нмоль/мг протеїну (у самок), тоді як в дослідній групі - 0,72-1,01 нмоль/мг протеїну (у самців) та 0,96-1,52 нмоль/мг протеїну (у самок). З'ясувалось, що у самок в дослідній групі вміст H_2S в аорті більший на 48,2% ($p<0,05$), а в контрольній групі - на 27,0% ($p<0,05$), ніж у самців, що свідчить про поглиблення статевих відмінностей вмісту H_2S в сироватці крові на тлі модельованої патології.

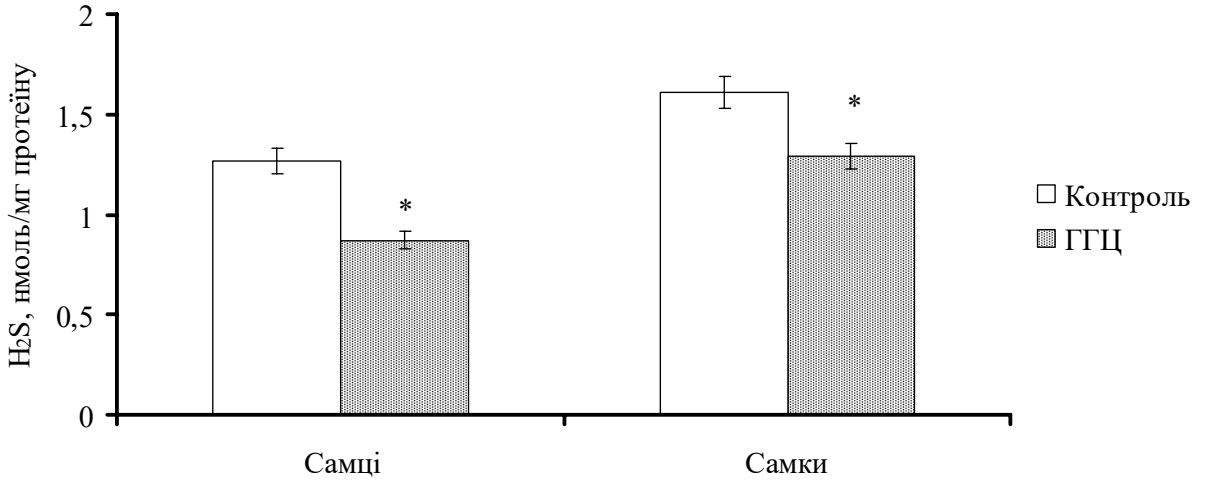


Рис 6.5. Вплив ГГЦ на вміст H_2S в аорті щурів обох статей. Примітка: * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

Високі концентрації тіолактону гомоцистеїну спричиняють падіння активності H_2S-синтезуючих ферментів в аорті щурів, особливо у самців (табл. 6.7).

Таблиця 6.7

Вплив ГГЦ на активність H_2S-синтезуючих ферментів в аорті щурів обох статей (M±m, n=10)

Групи тварин			Десульфуразна активність ферментів, нмоль H_2S/хв·мг протеїну		
			ТСТ	ЦГЛ	ЦАТ
1	Контроль	Самці	1,89±0,08	0,69±0,03	0,56±0,04
2		Самки	2,39±0,09	0,91±0,05	0,72±0,06
3	ГГЦ	Самці	1,35±0,05*	0,47±0,02*	0,40±0,03*
4		Самки	1,98±0,10*	0,70±0,04*	0,58±0,03*

Примітка. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

Встановлено, що ГГЦ супроводжується зменшенням активності ЦГЛ, ЦАТ та ТСТ у самців відповідно на 32,3; 28,3 та 28,6% ($p<0,05$), а у самок на

22,7; 18,8 та 17,1%, порівняно з відповідною групою контролю. За умов ГГЦ у самок активність H_2S-синтезуючих ферментів на 46,5-49,7% більша ($p<0,05$), ніж у самців, тоді як в контрольній групі ця різниця становить 26,1-31,2% ($p<0,05$). Отримані дані свідчать, що ГГЦ ініціює поглиблення статевих відмінностей активності H_2S-синтезуючих ферментів в аорті.

Проведені дослідження засвідчили, що тривале введення тіолактону гомоцистеїну викликає секс-специфічні порушення метаболізму H_2S в міокарді та аорті щурів. Експериментальна ГГЦ викликає зменшення вмісту H_2S в міокарді та аорті, що асоціюється зі зниженням активності H_2S-синтезуючих ферментів (ТСТ, ЦГЛ та ЦАТ), зменшенням активності мітохондріального окиснення H_2S за участі сульфітоксидази та збільшенням загальної швидкості утилізації екзогенного H_2S в міокарді та аорті щурів обох статей, причому вказані зміни є більш масштабними у самців. За цих умов поглиблюється статевий диморфізм показників обміну H_2S у серцево-судинній системі щурів, порівняно з контролем.

6.3 Вплив гіпергомоцистеїнемії на показники стану серця та аорти щурів обох статей

Станом на 28 добу введення тіолактону гомоцистеїну розвиваються тіол-дисульфідні порушення та дисбаланс про/антиоксидантів у міокарді щурів обох статей. Вказані зміни більш виражені у самців (табл. 6.8). Встановлено, що в дослідній групі тварин активність тіоредоксинредуктази у самців була менше на 33,3% ($p<0,05$), а у самок - на 24,8% ($p<0,05$), ніж у відповідній групі контролю. Поряд з цим активність НАДФН була більшою на 52,7% (самці) та 33,3% (самки), порівняно з контролем. Також в дослідній групі відмічається зменшення активності супероксиддисмутази відповідно на 33,2 та 23,7% ($p<0,05$) у самців та самок, порівняно з контролем. За цих умов між вмістом гомоцистеїну в крові та активністю НАДФН-оксидази виникав прямий зв’язок та обернений з активністю в міокарді супероксиддисмутази

та тіоредоксинредуктази (у самців r=0,67; -0,63; -0,65, p<0,05; у самок r=0,61; -0,59; -0,60, p<0,05). Водночас, між вмістом H_2S в міокарді та активністю НАДФН-оксидази, супероксиддисмутази та тіоредоксинредуктази виявились більш сильні та протилежно спрямовані кореляції (у самців r=-0,77; 0,76; 0,70, p<0,05; у самок r=-0,68; 0,65; 0,63, p<0,05). ГГЦ збільшувала статевий диморфізм активності досліджуваних про-антиоксидантних ензимів в міокарді. В дослідній групі тварин у самок активність НАДФН-оксидази була на 41,5% меншою (проти 33,0% в контрольній групі, p<0,05), а активність тіоредоксинредуктази та супероксиддисмутази на 37,3-41,7% більшою (проти 21,7-24,2% в контрольній групі, p<0,05), ніж у самців.

Таблиця 6.8

Вплив ГГЦ на активність про- та антиоксидантних ензимів в міокарді щурів обох статей (M±m, n=10)

Групи тварин			Тіоредоксин-редуктаза, нмоль/хв·мг протеїну	НАДФН-оксидаза, нмоль/хв·мг протеїну	Супероксид-дисмутаза, ум.од./мг протеїну
1	Контроль	Самці	4,30±0,25	1,23±0,07	3,66±0,14
2		Самки	5,24±0,21	0,82±0,04	4,55±0,16
3	ГГЦ	Самці	2,87±0,21*	1,88±0,09*	2,45±0,10*
4		Самки	3,94±0,19*	1,10±0,11*	3,47±0,12*

Примітка. * - статистично достовірна відмінність (p<0,05) відносно відповідної групи контролю.

ГГЦ супроводжується розвитком дисбалансу між окремими фракціями глутатіону в міокарді щурів обох статей, причому у самців ці зміни є істотно більшими (табл. 6.9). Виявилось, що введення тіолактону гомоцистеїну викликає зменшення запасів відновленого глутатіону у самців та самок відповідно на 37,9 та 25,6% (p<0,05), порівняно з контролем. За цих умов відмічається зростання окисненої форми глутатіону на 32,1% (у самців, p<0,05) та 20,0% (у самок, p<0,05). Також реєструється достовірне зменшення співвідношення між відновленою та окисненою формою

глутатіону у самців та самок відповідно на 53,3 та 38,% ($p<0,05$), порівняно з контролем. Рівень відновленого глутатіону в серці виявляє обернений зв'язок з рівнем гомоцистеїну в крові (у самців $r=-0,64$; у самок $r=-0,60$; $p<0,05$) та прямий ізі вмістом гідроген сульфіду в міокарді (у самців $r=0,70$, у самок $r=0,65$, $p<0,05$). В групі тварин з ГГЦ статеві відмінності співвідношення між окремими фракціями глутатіону є більш виразними, ніж в контролі. Так, у міокарді самок вміст окисненого глутатіону менший (на 33,3% в дослідній групі проти 26,6% в контрольній групі, $p<0,05$), а рівень відновленого глутатіону та співвідношення GSH / GSSG більші (відповідно на 44,0 та 120% в дослідній групі проти 20,1 та 65,3% в контрольній групі, $p<0,05$), порівняно з самцями.

Таблиця 6.9

Вплив ГГЦ на вміст глутатіону та його фракцій в міокарді щурів обох статей (M±m, n=10)

Групи тварин			GSH, нмоль/мг протеїну	GSSG, нмоль/мг протеїну	GSH / GSSG
1	Контроль	Самці	2,97±0,09	0,095±0,003	31,4±1,35
2		Самки	3,56±0,13	0,070±0,004	51,9±2,91
3	ГГЦ	Самці	1,84±0,07*	0,126±0,005*	14,7±0,39*
4		Самки	2,65±0,10*	0,084±0,005*	32,2±1,73*

Примітка. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

За умов тіолактонової ГГЦ збільшується активність процесів пероксидації ліпідів та окисної модифікації білків в міокарді щурів обох статей, однак більш виразні зміни реєструються у самців (табл. 6.10). Виявилось, що на тлі ГГЦ відмічається вірогідне зростання вмісту в міокарді МДА (на 89,3% у самців проти 68,3% у самок, $p<0,05$) та КГП (на 102% у самців проти 78,6% у самок, $p<0,05$), порівняно з відповідним контролем. Рівень МДА та КГП в серці виявляє прямий зв'язок з рівнем гомоцистеїну в крові (у самців $r=0,65$-$0,69$; у самок $r=0,60$-$0,62$; $p<0,05$) та обернений зв'язок

з вмістом H_2S в міокарді (у самців r=-0,72; -0,76, p<0,05; у самок r=-0,66; -0,68, p<0,05). За умов ГГЦ статеві відмінності активності процесів пероксидації ліпідів та протеїнів в міокарді є більш виразними: в контрольній групі у самок вміст МДА та КГП є вірогідно меншим на 26,5-27,4% (p<0,05), ніж у самців; на тлі ГГЦ ці відмінності є більш суттєвими і становлять 34,9-35,4% (p<0,05).

Таблиця 6.10

Вплив ГГЦ на вміст продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів в міокарді щурів обох статей (M±m, n=10)

Групи тварин			МДА, мкмоль/г тканини	КГП, нмоль/мг протеїну
1	Контроль	Самці	10,0±0,35	0,95±0,04
2		Самки	7,25±0,27	0,70±0,03
3	ГГЦ	Самці	18,9±0,27*	1,92±0,09*
4		Самки	12,2±0,24*	1,25±0,12*

Примітка. * - статистично достовірна відмінність (p<0,05) відносно відповідної групи контролю.

ГГЦ спричиняє розвиток цитолізу кардіоміоцитів у тварин обох статей, але виразність вказаних змін більша у самців (табл. 6.11). Показано, що тривале введення тіолактону гомоцистеїну спричиняє вірогідне зростання в крові активності АСТ (на 39,2% у самців проти 24,9% у самок, p<0,05) та КФК (на 42,5% у самців проти 31,3% у самок, p<0,05), порівняно з відповідним контролем. За цих умов між активністю АСТ і КФК та вмістом гомоцистеїну в крові виникають прямі (у самців r=0,66-0,69; у самок r=0,59-0,64; p<0,05), тоді як з вмістом H_2S в міокарді - обернені зв'язки (у самців r=-0,79; -0,76, p<0,05; у самок r=-0,65; -0,66, p<0,05). Виявляється, що в контрольній групі тварин відсутні статистично достовірні відмінності активності АСТ та КФК між самцями та самками щурів і з'являються вони

лише за умов ГГЦ - у самок активність вказаних ензимів на 12,4-12,7% менша (p<0,05), ніж у самців.

Таблиця 6.11

Вплив ГГЦ на активність маркерних ферментів цитолізу кардіоміоцитів в сироватці крові щурів обох статей (M±m, n=10)

Групи тварин			АСТ, мкмоль/хв·л	КФК, Од./л
1	Контроль	Самці	37,0±0,90	77,2±4,26
2		Самки	36,1±0,71	73,1±3,65
3	ГГЦ	Самці	51,5±0,96*	110±3,67*
4		Самки	45,1±0,65*	96,0±3,83*

Примітка. * - статистично достовірна відмінність (p<0,05) відносно відповідної групи контролю.

Тіолактонова ГГЦ супроводжується розвитком дисбалансу про- і антиоксидантних систем в аорті щурів обох статей, хоча більш масштабні порушення виникали саме у самців (табл. 6.12). Так, 28-денне введення тіолактону гомоцистеїну викликає достовірне зростання в аорті активності НАДФН-оксидази у самців на 46,2% (p<0,05), у самок на 31,6% (p<0,05) та зменшення активності супероксиддисмутази відповідно на 34,1 та 20,7% (p<0,05) у самців та самок щурів, порівняно з показниками контролю. В групі з ГГЦ між вмістом гомоцистеїну в крові та активністю НАДФН-оксидази виникав прямий зв'язок та обернений зв'язок з активністю в аорті супероксиддисмутази (у самців r=0,69; -0,64, p<0,05; у самок r=0,62; -0,60, p<0,05). В той же час, між вмістом H_2S в аорті та активністю НАДФН-оксидази і супероксиддисмутази виявлялись більш сильні та протилежно спрямовані кореляції (у самців r=-0,75; 0,73, p<0,05; у самок r=-0,68; -0,66, p<0,05). За умов тіолактонової ГГЦ істотно збільшувався статевий диморфізм активності досліджуваних про- і антиоксидантних ензимів в аорті щурів: в

групі з ГГЦ у самок активність НАДФН-оксидази була на 28,2% меншою, а активність супероксиддисмутази на 20,4% більшою, ніж у самців, тоді як в групі контролю ці відмінності становили відповідно 35,4 та 44,9% ($p<0,05$).

Таблиця 6.12

Вплив ГГЦ на активність про- та антиоксидантних ензимів в аорті щурів обох статей (M±m, n=10)

Групи тварин			НАДФН-оксидаза, нмоль/хв·мг протеїну	Супероксиддисмутаза, ум.од./мг протеїна
1	Контроль	Самці	0,85±0,04	2,25±0,09
2		Самки	0,61±0,03	2,71±0,11
3	ГГЦ	Самці	1,24±0,08*	1,48±0,04*
4		Самки	0,80±0,04*	2,15±0,09*

Примітка. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

Тривале введення тіолактону гомоцистеїну збільшує активність процесів перекисного окиснення ліпідів та окисної деструкції протеїнів в аорті щурів обох статей, причому у самців виразність цих змін була значно вищою (табл. 6.13). У тварин з ГГЦ в аорті відмічається достовірне зростання рівня МДА та КГП: у самців відповідно на 83,1 та 99,7% ($p<0,05$), а у самок - на 60,5 та 76,4% ($p<0,05$), порівняно з контролем. Вміст в аорті МДА та КГП виявляє прямий зв'язок з рівнем гомоцистеїну в крові (у самців r=0,67-0,71; у самок r=0,60-0,64; $p<0,05$) та обернений зв'язок з вмістом H_2S в аорті (у самців r=-0,74; -0,78, $p<0,05$; у самок r=-0,68; -0,70, $p<0,05$). За умов тіолактонової ГГЦ поглиблюються гендерні відмінності рівня окисномодифікованих ліпідів і протеїнів в аорті: в контрольній групі у самок вміст МДА та КГП на 21,3 та 31,1% менший, ніж у самців, тоді як в дослідній групі - на 31,0 та 39,1%.

Таблиця 6.13

Вплив ГГЦ на вміст продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів в аорті щурів обох статей (M±m, n=10)

Групи тварин			МДА, мкмоль/г тканини	КГП, нмоль/мг протеїну
1	Контроль	Самці	6,45±0,21	0,74±0,03
2		Самки	5,08±0,14	0,51±0,02
3	ГГЦ	Самці	11,8±0,34*	1,48±0,06*
4		Самки	8,15±0,22*	0,90±0,03*

Примітка. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

Експериментальна ГГЦ ініціює розвиток ендотеліальної дисфункції у тварин обох статей, причому її виразність достовірно вища у самців, ніж у самок (рис. 6.6). Встановлено, що в контрольній групі тварин медіана вмісту в крові sVCAM-1 становить 537 (95% CI 433-584) нг/мл (у самців) та 432 (95% CI 374-523) нг/мл (у самок). Тривала ГГЦ супроводжується зростанням в крові вмісту sVCAM-1 у самців на 50,3% ($p<0,05$), у самок - на 35,6% ($p<0,05$): медіана вмісту в крові sVCAM-1 становить 787 (95% CI 708-831) нг/мл (у самців) та 629 (95% CI 526-688) нг/мл (у самок). За цих умов між рівнем sVCAM-1 та вмістом гомоцистеїну в крові виникають прямі (у самців $r=0,70$; у самок $r=0,66$; $p<0,05$), тоді як з вмістом H_2S в аорті - обернені зв'язки (у самців $r=-0,78$, $p<0,05$; у самок $r=-0,69$, $p<0,05$). Слід зазначити, що у самців базальний рівень sVCAM-1 у сироватці крові був вищим, ніж у самок, і за умов ГГЦ ці відмінності суттєво поглиблювались. Так, у самок в контрольній групі вміст sVCAM-1 в крові був на 13,5% менший ($p<0,05$), ніж у самців. Натомість, за умов ГГЦ у самок рівень цієї адгезивної молекули був на 22,0% меншим, порівняно з самцями ($p<0,05$).

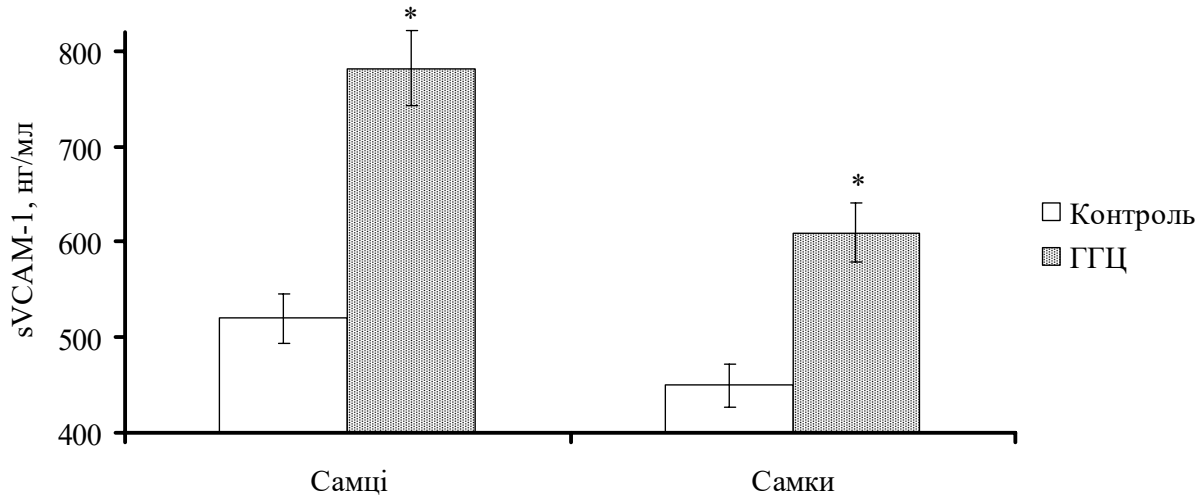


Рис 6.6. Вплив ГГЦ на вміст sVCAM-1 в крові щурів обох статей. Примітка: * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

Модулювання обміну сірковмісних амінокислот супроводжується вірогідним зменшенням H_2S-стимульованого розслаблення аорти самців щурів (рис. 6.7). Так, в контрольній групі тварин H_2S в концентраціях 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ та 1000 мкМ викликав дозозалежне розслаблення кільцевих фрагментів аорти відповідно на 5,93±0,58%; 10,9±0,69%; 29,6±1,23% та 57,0±1,10%. В той же час в групі тварин з ГГЦ розслаблення кілець аорти за цих концентрацій H_2S було меншим і становило відповідно 4,48±0,49%; 7,06±0,36% ($p<0,05$); 18,7±0,42% ($p<0,05$) та 40,3±1,30% ($p<0,05$), при цьому крива «доза-ефект» зміщувалась праворуч. За цих умов відмічалось статистично достовірне збільшення середньоефективної концентрації H_2S в аорті: в контрольній групі тварин EC_{50} H_2S становила 94,1±4,28 мкМ, тоді як за умов ГГЦ вона зростала на 32,8% ($p<0,05$) і становила 125±5,26 мкМ.

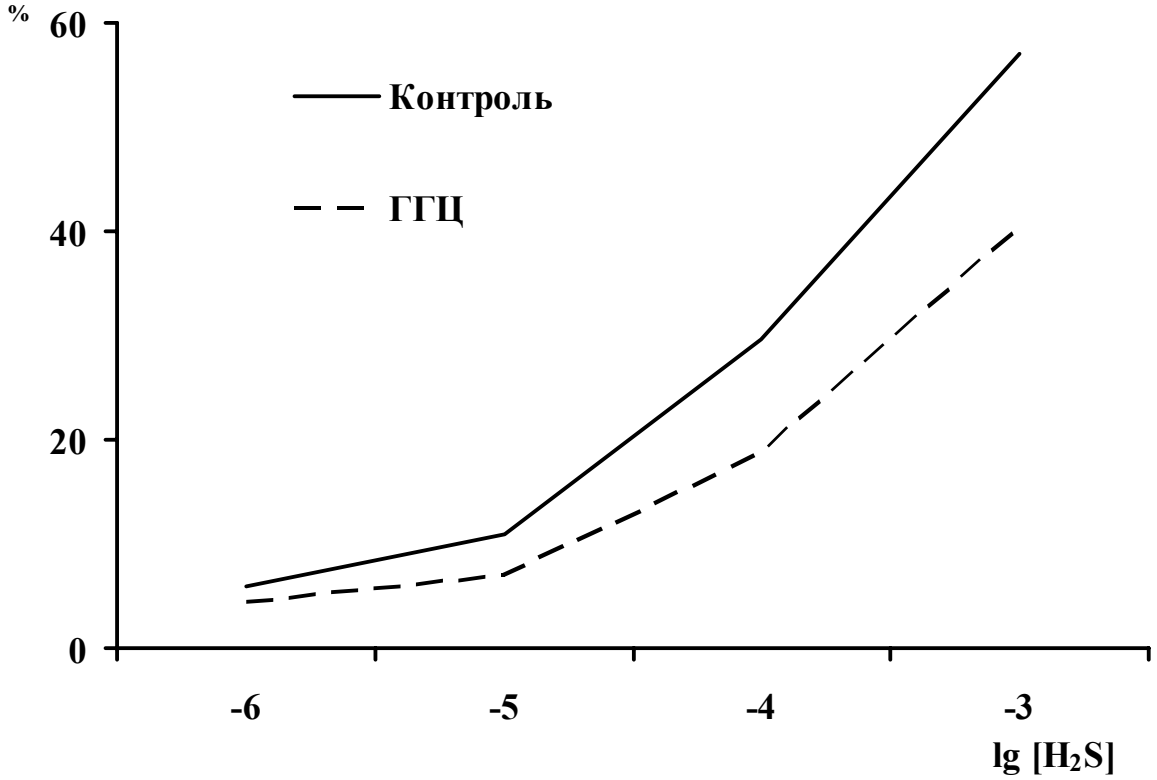


Рис. 6.7. Вплив ГГЦ на дозозалежність H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти самців щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у перфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій H_2S. За 100% прийнятий рівень H_2S-стимульованого розслаблення фрагментів аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення. На цьому та наступних рисунках наведені усереднені дані 4 дослідів і значення похибок середнього.

ГГЦ також супроводжувалась вірогідним зменшенням H_2S-стимульованого розслаблення аорти у самок щурів, однак виразність цих змін була достовірно меншою, ніж у самців (рис. 6.8). Виявилось, що в контрольній групі тварин H_2S в концентраціях 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ та 1000 мкМ викликав дозозалежне розслаблення кільцевих фрагментів аорти відповідно на 6,39±0,24%; 12,7±0,65%; 34,7±1,49% та 61,5±0,54%. Натомість, за умов тіолактонової ГГЦ розслаблення кілець аорти за цих концентрацій

H_2S було меншим і становило відповідно 5,57±0,26%; 10,6±0,11% ($p<0,05$); 29,6±0,18% ($p<0,05$) та 55,7±0,33% ($p<0,05$), при цьому крива «доза-ефект» зміщувалась праворуч. За цих умов відмічалось вірогідне збільшення середньоефективної концентрації H_2S в аорті: у контрольній групі тварин EC_{50} H_2S становила 73,9±4,35 мкМ, тоді як за умов ГГЦ вона зростала на 21,1% ($p<0,05$) і становила 89,5±4,12 мкМ.

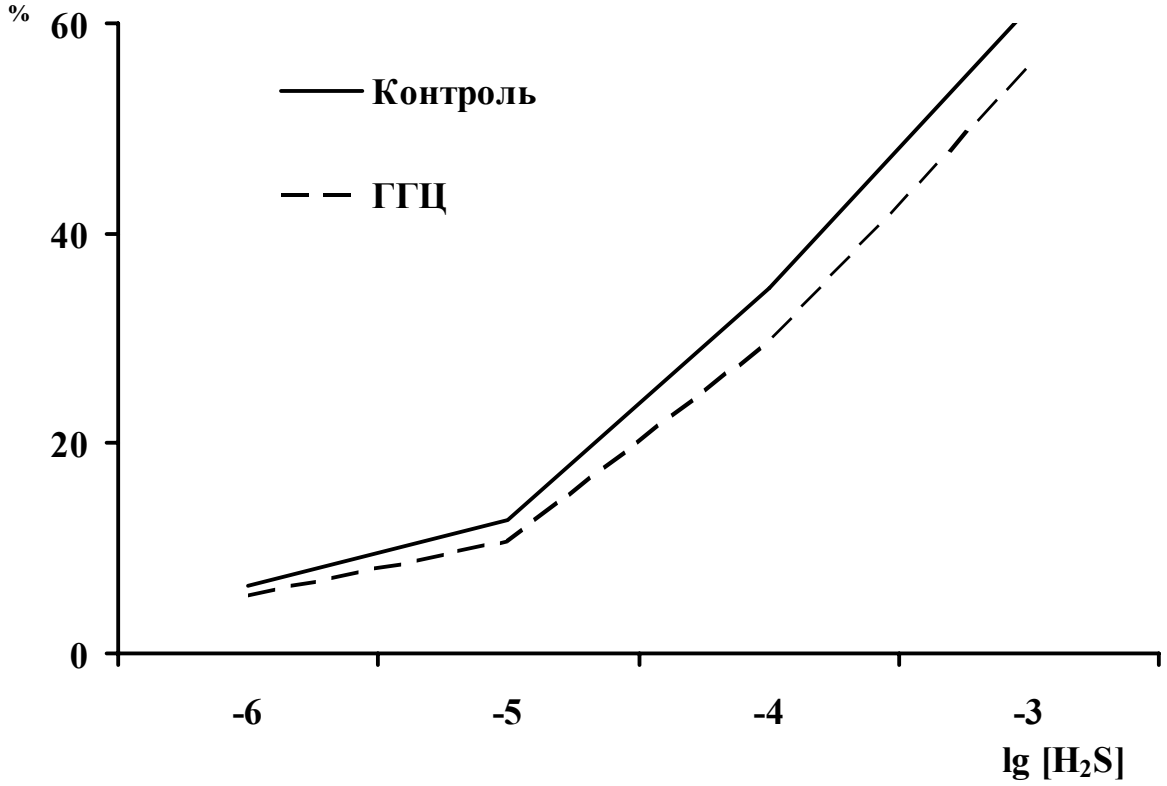


Рис. 6.8. Вплив ГГЦ на дозозалежність H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти самок щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у перфузійному розчині, по осі ординат - нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій H_2S. За 100% прийнятий рівень H_2S-стимульованого розслаблення аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення.

ГГЦ викликає зменшення цистеїн-стимульованої релаксації аорти у самців щурів (рис. 6.9). Виявляється, що в контрольній групі самців цистеїн в концентраціях 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ та 10 мМ викликав

дозозалежну релаксацію кілець аорти відповідно на 8,17±0,84%; 10,3±0,40%; 16,0±0,41%; 22,2±0,22% та 50,3±1,29%. За умов ГГЦ вказані вище концентрації цистеїну викликали достовірно меншу релаксацію кільцевих фрагментів аорти, яка відповідно становила 4,81±0,68% ($p<0,05$); 7,60±0,46% ($p<0,05$); 11,3±0,29% ($p<0,05$); 16,2±0,35% ($p<0,05$) та 40,5±0,77% ($p<0,05$), крива «доза-ефект» зміщувалась праворуч.

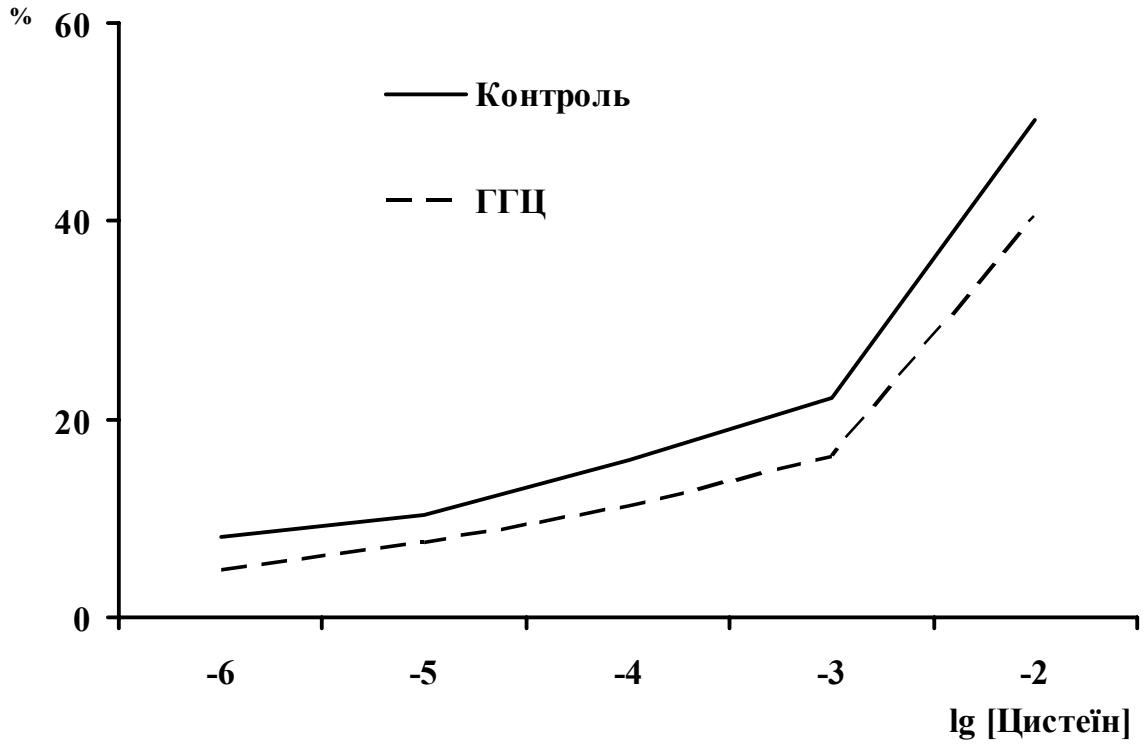


Рис. 6.9. Вплив ГГЦ на дозозалежність цистеїн-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти самців щурів. По осі абсцис - десятковий логарифм концентрації цистеїну (М) у перфузійному розчині, по осі ординат - нормована інтенсивність розслаблення фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій цистеїну. За 100% прийнятий рівень цистеїн-стимульованого розслаблення аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефринового передскорочення.

ГГЦ у самок щурів також спричиняла зменшення розслаблення кілець аорти під впливом цистеїну, але виразність змін була меншою, порівняно з самцями (рис. 6.10). У самок контрольної групи цистеїн в концентраціях 1

мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ та 10 мМ викликав дозозалежну релаксацію кілець аорти відповідно на 10,8±0,86%; 13,2±0,57%; 19,3±0,28%; 26,6±1,23% та 55,9±0,95%. В групі самок з ГГЦ за цих концентрацій цистеїну релаксація кільцевих фрагментів аорти була меншою і становила 8,63±0,28%; 10,8±0,46% ($p<0,05$); 16,6±0,22% ($p<0,05$); 23,1±0,94% ($p<0,05$) та 51,1±0,16% ($p<0,05$), крива «доза-ефект» зміщувалась праворуч.

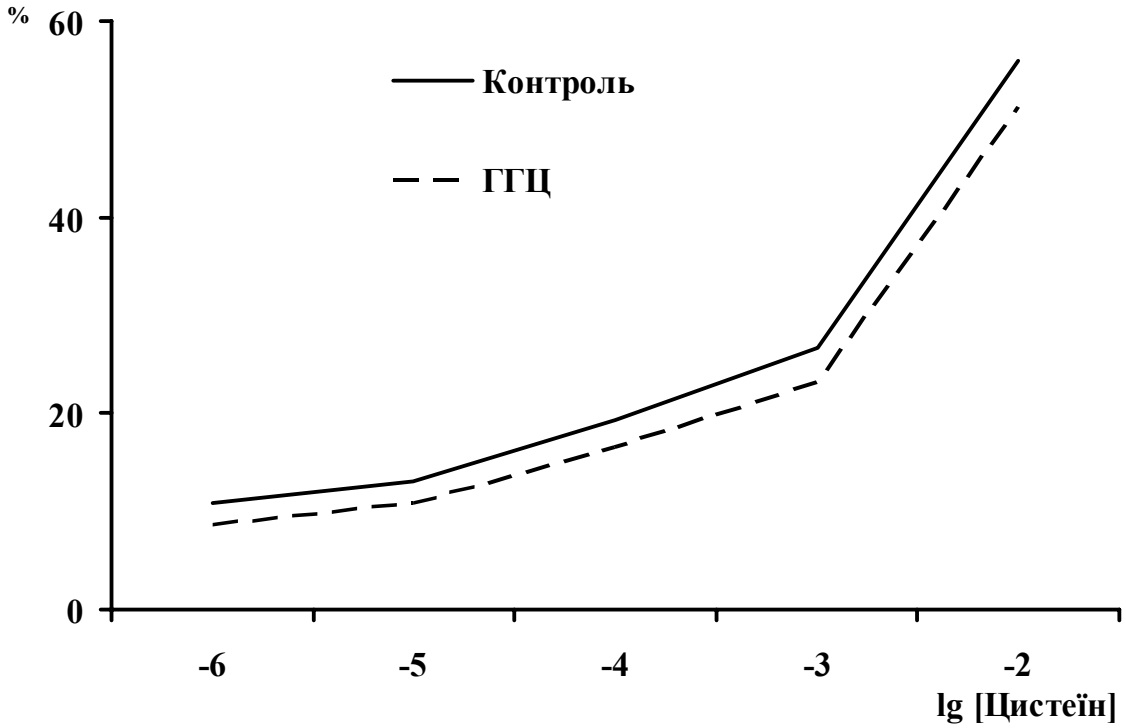


Рис. 6.10. Вплив ГГЦ на дозозалежність цистеїн-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти самок щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації цистеїну (М) у перфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій цистеїну. За 100% прийнятий рівень цистеїн-стимульованого розслаблення фрагментів аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення.

Додаткові докази щодо стать-специфічного впливу ГГЦ на цистеїн-стимульоване розслаблення кільцевих фрагментів аорти надає порівняльний аналіз середньо ефективних концентрацій цистеїну (рис. 6.11). Так, в

контрольній групі тварин EC_{50} цистеїну в аорті самців становить 1034±45,9 мкМ, тоді як у самок вона достовірно менша на 27,5% ($p<0,05$) і становить 750±28,9 мкМ. ГГЦ спричиняє зростання EC_{50} цистеїну в аорті самців на 40,0% (вона становить 1446±51,1 мкМ, $p<0,05$), а у самок на 26,8% (951±32,6 мкМ, $p<0,05$). За цих умов EC_{50} цистеїну в аорті на 52,0% більша у самців ($p<0,05$), ніж у самок.

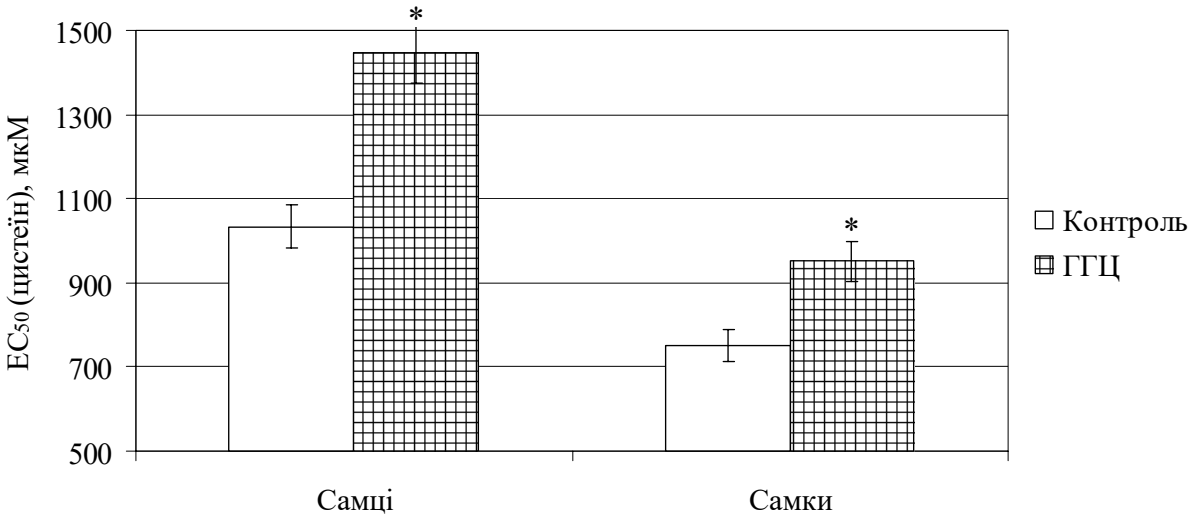


Рис 6.11. Вплив ГГЦ на EC_{50} цистеїну в аорті щурів обох статей. Примітка: * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

Введення тіолактону гомоцистеїну протягом 28 діб викликає збільшення вазоконстрикторної дії гомоцистеїну на тонус аорти у самців щурів (рис. 6.12). Показано, що в контрольній групі самців гомоцистеїн в концентраціях 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ та 10 мМ викликав дозозалежну констрикцію кільцевих фрагментів аорти відповідно на 2,19±0,50%; 3,67±0,19%; 26,1±2,78%; 42,2±1,77% та 59,6±0,50%. В групі самців з тіолактоновою ГГЦ вище вказані концентрації гомоцистеїну викликали достовірно більшу констрикцію кільцевих фрагментів аорти, яка відповідно становила 4,38±0,94%; 8,54±1,26% ($p<0,05$); 35,3±1,88% ($p<0,05$);

52,1±1,13% (p<0,05) та 68,7±0,48% (p<0,05), крива «доза-ефект» зміщувалась ліворуч.

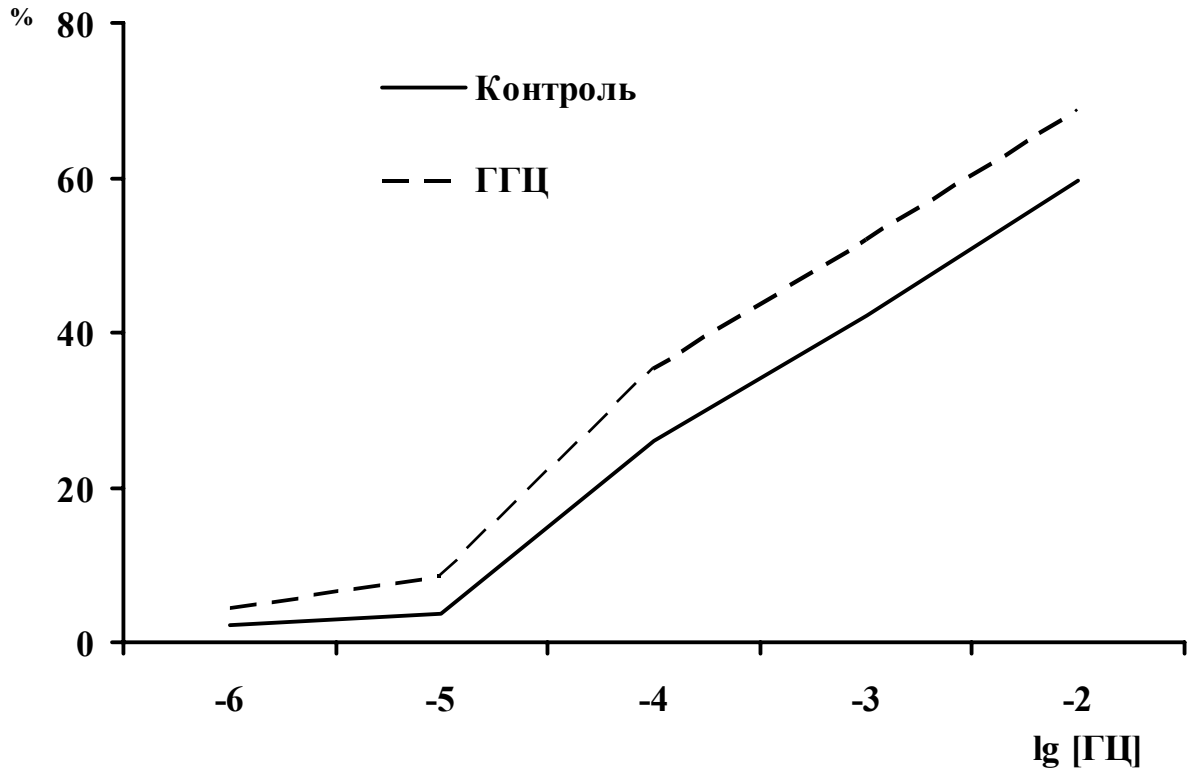


Рис. 6.12. Вплив ГГЦ на дозозалежність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти самців щурів під впливом ГЦ. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації ГЦ (М) у суперфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій ГЦ. За 100% прийнято повне інгібування ацетихолін-індукованого розслаблення фрагментів аорти під впливом ГЦ.

У самок щурів модулювання обміну сірковмісних амінокислот також супроводжується збільшенням констрикторної дії гомоцистеїну на тонус кільцевих фрагментів аорти, проте ступінь виразності цих змін вірогідно менша, ніж у самців (рис. 6.13). Встановлено, що у самок контрольної групи гомоцистеїн у наростаючих концентраціях 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ та 10 мМ викликав дозозалежну констрикцію кільцевих фрагментів аорти

відповідно на 1,24±0,34%; 3,32±0,69%; 19,0±0,74%; 35,0±0,40% та 48,0±0,89%. В той же час, у самок з ГГЦ гомоцистеїн в тих же концентраціях викликав більш виразну констрикцію кільцевих фрагментів аорти відповідно на 1,80±0,15%; 3,72±0,33% ($p<0,05$); 25,2±0,31% ($p<0,05$); 41,2±0,80% ($p<0,05$) та 54,4±0,61% ($p<0,05$), крива «доза-ефект» зміщувалась ліворуч.

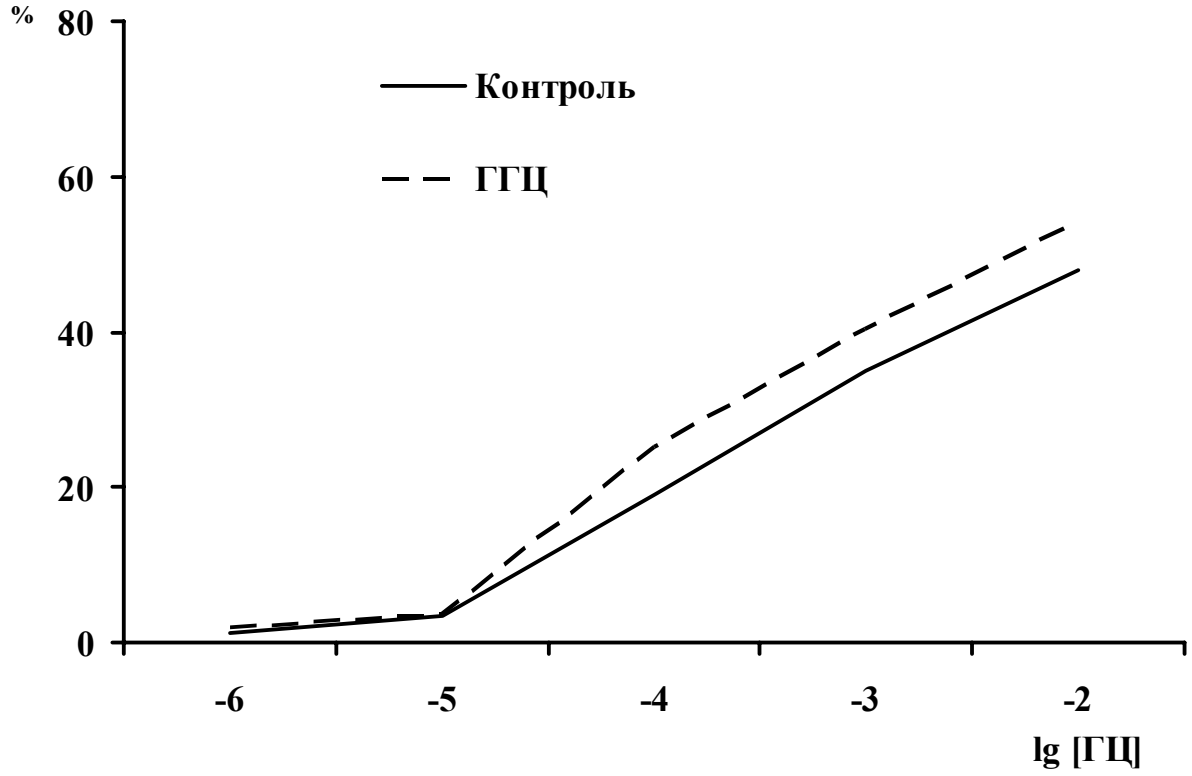


Рис. 6.13. Вплив ГГЦ на дозозалежність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти самок щурів під впливом ГЦ. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації ГЦ (М) у суперфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій ГЦ. За 100% прийнято повне інгібування ацетихолін-індукованого розслаблення фрагментів аорти під впливом ГЦ.

Порівняння середньоефективних концентрацій гомоцистеїну в аорті надає додаткові докази існування статевих відмінностей в токсичній дії ГГЦ на стінку аорти (рис. 6.14). Виявилось, що в контрольній групі тварин EC_{50}

гомоцистеїну в аорті самців становить 132±7,12 мкМ, тоді як у самок вона достовірно більша на 28,8% ($p<0,05$) і становить 170±7,88 мкМ. За умов ГГЦ реєструється зменшення EC_{50} гомоцистеїну в аорті самців на 40,0% (84,3±6,25 мкМ, $p<0,05$), а у самок на 34,9% (126±6,78 мкМ, $p<0,05$). За цих умов EC_{50} гомоцистеїну в аорті самок на 49,5% більша ($p<0,05$), ніж у самців.

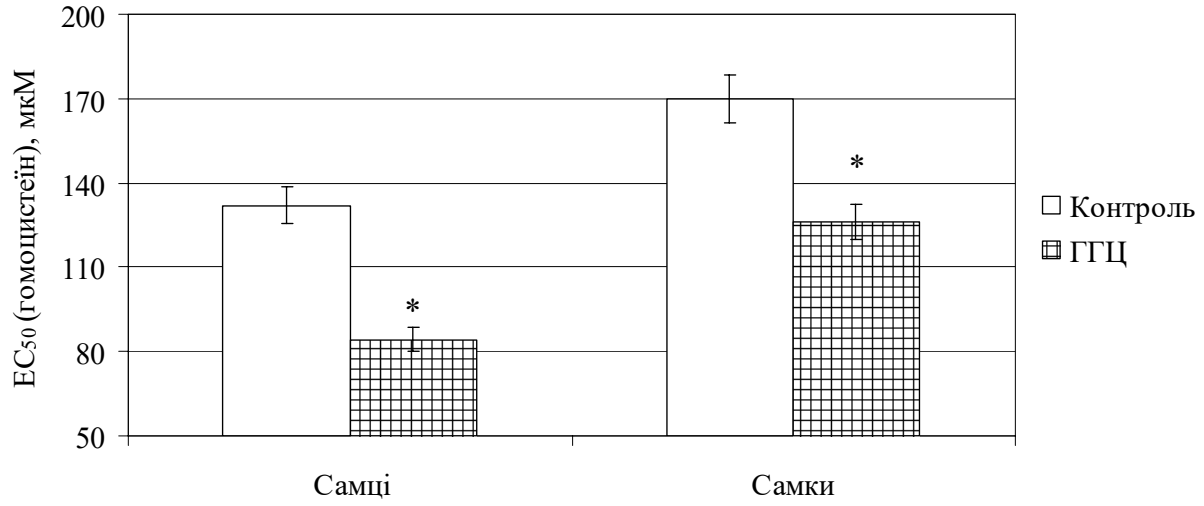


Рис 6.14. Вплив ГГЦ на EC_{50} гомоцистеїну в аорті щурів обох статей. Примітка: * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

Проведені дослідження показали, що тривале введення тіолактону гомоцистеїну супроводжується змінами біохімічних та фізіологічних процесів у печінці та серцево-судинній системі щурів обох статей, причому у самців виразність порушень вірогідно більша, ніж у самок:

1) зменшується швидкість утилізації гомоцистеїну, цистеїну та утворення H_2S в печінці;
2) зростає вміст гомоцистеїну, цистеїну та зменшується рівень H_2S у сироватці крові;
3) зменшується рівень H_2S, активність H_2S-синтезуючих ензимів в міокарді та аорті, зростає швидкість утилізації екзогенного H_2S

та знижується активність його мітохондріального окиснення за участі сульфітоксидази в міокарді;

4) виникає дисбаланс в про- і антиоксидантних системах серця та аорти, змінюється фракційний розподіл глутатіону (зростає рівень його окисненої та зменшується відновленої форми), формуються тіол-дисульфідні порушення в міокарді, що супроводжується активацією вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів в серці та аорті;
5) розвивається цитоліз кардіоміоцитів та ендотеліальна дисфункція, зменшується релаксуюча дія на кільцеві фрагменти аорти H_2S й цистеїну та зростає констрикторна дія гомоцистеїну.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях [59, 61, 62, 63, 68].

РОЗДІЛ 7
ВПЛИВ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК ГЕНІСТЕЇНУ ТА КВЕРЦЕТИНУ НА ОБМІН СІРКОВМІСНИХ АМІНОКИСЛОТ І ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ, СТАН СЕРЦЯ Й АОРТИ У ЩУРІВ ОБОХ СТАТЕЙ ЗА УМОВ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ

У попередньому розділі нами показано, що ГГЦ спричиняє стать-специфічні розлади метаболізму сірковмісних амінокислот і H_2S у печінці та серцево-судинній системі, тіол-дисульфідні порушення, зміни в про- і антиоксидантних системах, що супроводжується гіперактивацією вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів у міокарді й аорті, розвитком ендотеліальної дисфункції, причому виразність цих порушень істотно превалює у самців щурів, порівняно з самками.

З метою корекції стать-специфічних розладів, індукованих ГГЦ, нами були обрані поліфенольні сполуки кверцетин та геністеїн, які володіють політропними фармакологічними властивостями. Відомо, що ці препарати виявляють потужні антиоксиданті властивості, мають виразний кардіопротекторний та ендотеліотропний ефекти [125, 323, 326, 404]. До того ж у ізофлавоноїда геністеїна присутня естрогеноподібна дія [309]. Останім часом показано, що геністеїн володіє також гіпогомоцистеїнемічним ефектом у жінок у постменопаузі з метаболічним синдромом [190]. В експериментальних дослідженнях встановлено, що фітоестроген геністеїн збільшує продукцію H_2S у слизовій оболонці шлунка тварин з диклофенак-індукованою гастротоксичністю [12]. Проте, залишається невивченим, у якій мірі вказані поліфенольні сполуки здатні коригувати індуковані ГГЦ секс-специфічні порушення метаболізму сірковмісних амінокислот й H_2S та стану серцево-судинної системи у щурів обох статей. Тому, метою нашого дослідження була оцінка впливу геністеїну та кверцетину на метаболізм сірковмісних амінокислот у печінці, вміст сірковмісних метаболітів у крові,

обмін H_2S у міокарді, біохімічні та функціональні показники серця й аорти у щурів обох статей за умов ГГЦ.

З метою корекції ГГЦ-індукованих змін статевозрілі тварини протягом всього терміну введення тіолактону гомоцистеїну (100 мг/кг маси тіла в/шл на 1% розчині крохмалю 1 раз на добу) отримували геністеїн (2,5 мг/кг маси тіла в/шл на 1% розчині крохмалю 1 раз на добу; по 10 самців та самок) або кверцетин (25 мг/кг маси тіла в/шл на 1% розчині крохмалю 1 раз на добу; по 10 самців та самок).

7.1 Вплив геністеїну та кверцетину на показники метаболізму сірковмісних амінокислот у печінці та крові у щурів обох статей за умов гіпергомоцистеїнемії

Серед досліджуваних поліфенольних сполук лише геністеїн стримував формування гомоцистеїнемії у щурів на тлі введення тіолактону гомоцистеїну, причому ефект був більш виражений у самців (рис. 7.1). У самців і самок щурів, які отримували геністеїн, рівень гомоцистеїну в крові був відповідно на 50,3 та 37,1% ($p<0,05$) меншим, ніж у нелікованих тварин.

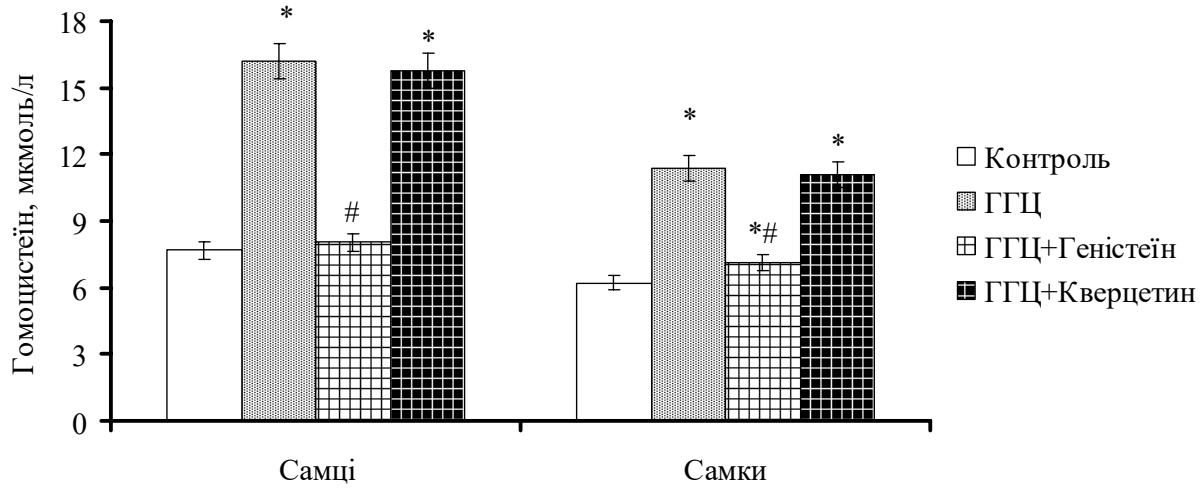


Рис 7.1. Вплив геністеїну та кверцетину на вміст гомоцистеїну в сироватці крові щурів обох статей за умов ГГЦ. Примітки: * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю; # - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Виявилося, що із досліджуваних поліфенолів лише геністеїн попереджає наростання рівня цистеїну в крові, ініційоване введенням тіолактону гомоцистеїну. Гіпоцистеїнемічна дія геністеїну переважала у самців (рис. 7.2). Так, у тварин з ГГЦ, які не отримували лікування, вміст цистеїну в крові коливався в межах 208-244 мкмоль/л (у самців) та 140-164 мкмоль/л (у самок). Щурі, які отримували геністеїн, мали менший рівень цистеїну на 30,7% (самці, $p<0,05$) та 13,4% (самки, $p<0,05$), порівняно з групою нелікованих тварин. За цих умов вміст цистеїну в крові знаходився у діапазоні 138-179 мкмоль/л (у самців) та 116-150 мкмоль/л (у самок).

Використання кверцетину не виявляє гіпоцистеїнемічної дії за умов ГГЦ: у групі тварин, які отримували кверцетин, рівень цистеїну в крові коливався практично в тому ж діапазоні, що й у групі «ГГЦ» (у самців 199-233 мкмоль/л; у самок 135-159 мкмоль/л).

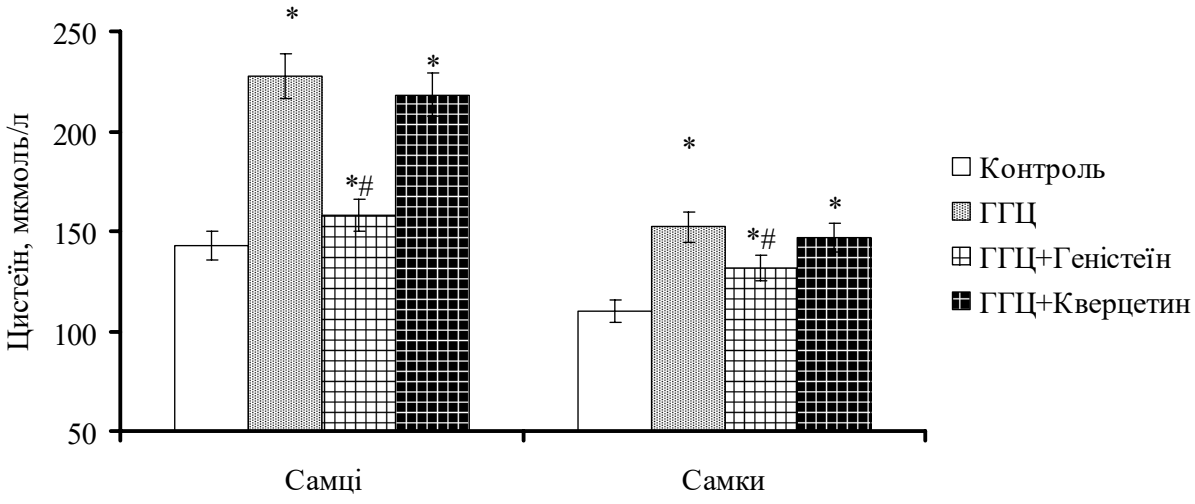


Рис 7.2. Вплив геністеїну та кверцетину на вміст цистеїну в сироватці крові щурів обох статей за умов ГГЦ. Примітки: * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю; # - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Досліджувана фармакотерапія з різною ефективністю впливала на рівень H_2S у крові за умов ГГЦ. Виявилось, що за даних умов, геністеїн ефективно стримував формування дефіциту H_2S у сироватці крові, причому

така його дія була більш помітною у самців (рис. 7.3). Встановлено, що в групі «ГГЦ» медіанний рівень H_2S в крові становив 30,5 (95% CI 27,5-36,3) мкмоль/л (у самців) та 50,6 (95% CI 43,4-56,7) мкмоль/л (у самок). Натомість, в групі тварин «ГГЦ+Геністеїн» рівень H_2S в сироватці крові був відповідно в 2,2 та 1,6 рази більшим ($p<0,05$), ніж у нелікованих тварин: медіана вмісту становила 70,0 (95% CI 59,9-76,5) мкмоль/л (самці) та 81,3 (95% CI 75,1-88,9) мкмоль/л (самки).

Введення кверцетину в однаковій мірі стримувало падіння рівня H_2S у тварин обох статей на тлі ГГЦ, однак його ефективність значно поступалась геністеїну. В групі тварин «ГГЦ+Кверцетин» вміст H_2S у крові виявився відповідно на 35,0 та 28,0% більшим ($p<0,05$) у самців і самок, порівняно з групою «ГГЦ»: медіана вмісту становила 42,4 (95% CI 33,2-52,4) мкмоль/л (у самців) та 64,7 (95% CI 57,6-71,2) мкмоль/л (у самок).

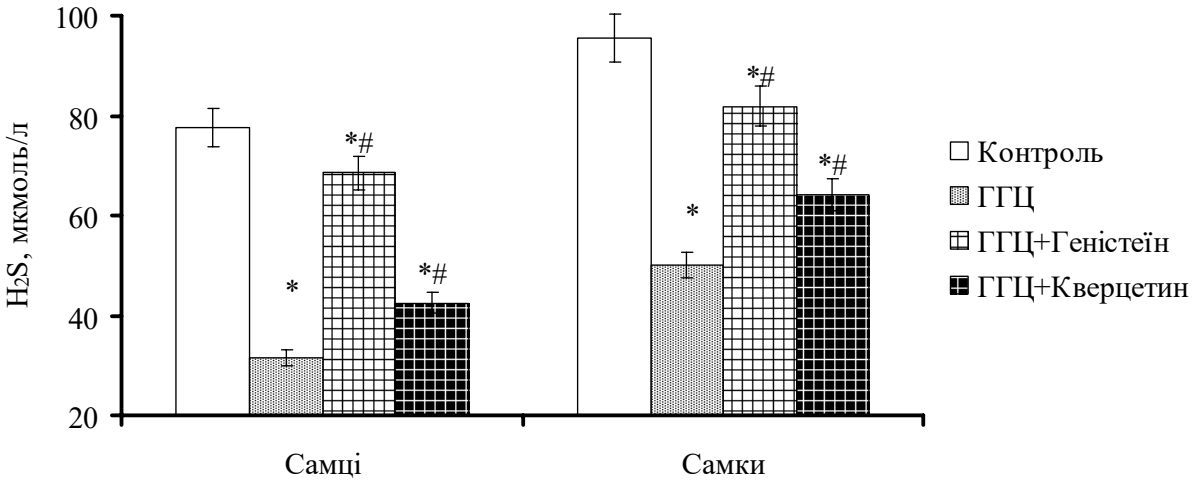


Рис 7.3. Вплив геністеїну та кверцетину на вміст H_2S у сироватці крові щурів обох статей за умов ГГЦ. Примітки: * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю; # - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Застосована фармакотерапія не впливала на активність утилізації гомоцистеїну в реакціях реметилування та трансметилування у печінці за умов модельованої патології (табл. 7.1). В групах тварин, які на тлі тіолактонової ГГЦ отримували поліфенольні сполуки геністеїн та кверцетин,

активність ензимів БГМТ, МАТ та S-АГГ була вірогідно вищою, порівняно з контролем і достовірно не відрізнялась від показників у групі «ГГЦ».

Таблиця 7.1

Вплив геністеїну та кверцетину на активність ферментів циклу метилування гомоцистеїну в печінці щурів обох статей за умов ГГЦ

(M±m, n=10)

Групи тварин			Активність ферментів, нмоль/хв·мг протеїну		
			БГМТ	МАТ	S-АГГ
1	Контроль	Самці	3,60±0,06	2,73±0,11	3,54±0,11
2		Самки	4,40±0,08	3,29±011	4,23±0,12
3	ГГЦ	Самці	2,91±0,11*	2,17±0,09*	2,80±0,14*
4		Самки	3,90±0,10*	2,85±0,16*	3,63±0,12*
5	ГГЦ+Геністеїн	Самці	3,05±0,15*	2,30±0,15*	3,10±0,14*
6		Самки	4,10±0,14*	3,02±0,13*	3,80±0,13*
7	ГГЦ+Кверцетин	Самці	2,90±0,13*	2,20±0,10*	2,92±0,15*
8		Самки	3,95±0,09*	3,00±0,11*	3,70±0,13*

Примітка. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю.

Виявлено, що із біофлавоноїдів, які досліджувались, лише геністеїн попереджував зменшення швидкості утилізації гомоцистеїну в реакціях транссульфування в печінці на тлі ГГЦ, і його ефективність була вірогідно вищою у самців (табл. 7.2). В групі тварин, які отримували геністеїн, активність синтезу цистатіоніну в реакції конденсації гомоцистеїну та серину за участі ЦБС була достовірно більшою на 24,8% (у самців, $p<0,05$) та 15,4% (у самок, $p<0,05$), порівняно з показниками нелікованих тварин. Поряд із цим активність гідролітичного розпаду цистатіоніну за участю ЦГЛ була вищою відповідно на 21,6 та 14,2% ($p<0,05$) у самців та самок щурів, порівняно з

групою «ГГЦ». Натомість у групі щурів, які отримували кверцетин, активність ферментів ЦБС та ЦГЛ у печінці була достовірно вищою, порівняно з контролем, та достовірно не відрізнялась від показників нелікованих тварин.

Таблиця 7.2

Вплив геністеїну та кверцетину на активність ферментів транссульфування гомоцистеїну в печінці щурів обох статей за умов ГГЦ

(M±m, n=10)

Групи тварин			Активність ферментів, нмоль/хв·мг протеїну	
			ЦБС (синтез цистатіоніну)	ЦГЛ (гідроліз цистатіоніну)
1	Контроль	Самці	14,9±0,67	15,9±0,32
2		Самки	18,7±0,38	20,4±0,35
3	ГГЦ	Самці	11,2±0,33*	12,5±0,41*
4		Самки	15,8±0,76*	17,5±0,36*
5	ГГЦ+Геністеїн	Самці	13,4±0,24*#	14,8±0,33*#
6		Самки	17,6±0,36*#	19,3±0,34*#
7	ГГЦ+Кверцетин	Самці	11,6±0,27*	13,0±0,33*
8		Самки	16,2±0,23*	17,6±0,28*

Примітки: 1. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю;

2. # - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Застосування геністеїну стримувало ініційоване тіолактоном гомоцистеїну падіння швидкості утилізації гомоцистеїну в окисному та кон'югаційному шляхах у печінці щурів обох статей, але більш ефективно у самців, тоді як кверцетин взагалі не володів таким фармакологічним ефектом (табл. 7.3). В групі тварин «ГГЦ+Геністеїн» активність окиснення цистеїну

до цистеїнсульфінату в печінці за участю ЦДО була більшою відповідно на 19,4 та 10,6% ($p<0,05$) у самців та самок, ніж у групі «ГГЦ». За цих умов активність кон'югації цистеїну з глутаматом у печінці за участю γ-ГЦЛ була вищою у самців – на 20,4% ($p<0,05$), а у самок – на 11,8% ($p<0,05$), порівняно з групою нелікованих тварин. В групі «ГГЦ+Кверцетин» активність ЦДО та γ-ГЦЛ у печінці статистично достовірно не відрізнялася від показників тварин з гіпергомоцистеїнемією, які не отримували лікування.

Таблиця 7.3

Вплив геністеїну та кверцетину на активність ферментів окисного та кон'югаційного шляхів утилізації цистеїну в печінці щурів обох статей за умов ГГЦ (M±m, n=10)

Групи тварин			Активність ферментів, нмоль/хв·мг протеїну	
			ЦДО, мкмоль/хв·мг протеїну	γ-ГЦЛ, нмоль/хв·мг протеїну
1	Контроль	Самці	2,29±0,07	3,62±0,15
2		Самки	2,98±0,09	4,49±0,19
3	ГГЦ	Самці	1,81±0,08*	2,82±0,17*
4		Самки	2,58±0,07*	3,78±0,12*
5	ГГЦ+Геністеїн	Самці	2,16±0,06#	3,40±0,10#
6		Самки	2,85±0,06#	4,22±0,11#
7	ГГЦ+Кверцетин	Самці	1,95±0,10*	2,90±0,13*
8		Самки	2,70±0,11*	3,89±0,15*

Примітки: 1. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю;

2. # - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Застосована фармакотерапія з різною ефективністю впливала на активність H_2S-синтезуючих ферментів у печінці щурів обох статей за умов ГГЦ (табл. 7.4). Виявилося, що геністеїн протидіє депримуючому впливу

високих концентрацій тіолактону гомоцистеїну на всі досліджувані H_2S-синтезуючі ферменти печінки з більшою ефективністю у самців, ніж у самок. Так, за умов введення геністеїну активність синтезу H_2S за участю ЦБС, ЦГЛ та ЦАТ була вищою відповідно у самців на 20,9; 27,8 та 23,0% ($p<0,05$), а у самок – на 10,3; 16,2 та 11,8% ($p<0,05$), порівняно з групою «ГГЦ». Використання кверцетину справляло коригуючий вплив лише на активність синтезу H_2S у реакції конденсації гомоцистеїну та цистеїну в печінці за участі ЦБС, причому у самців і самок ефективність була однаковою. Так, в групі тварин «ГГЦ+Кверцетин» активність ЦБС у печінці була вищою у самців на 14,5% ($p<0,05$), а у самок – на 10,0% ($p<0,05$), порівняно з відповідними показниками нелікованих тварин. Активність інших H_2S-синтезуючих ферментів вірогідно не відрізнялася від такої в групі «ГГЦ».

Таблиця 7.4

Вплив геністеїну та кверцетину на активність H_2S-синтезуючих ферментів в печінці щурів обох статей за умов ГГЦ (M±m, n=10)

Групи тварин			Десульфуразна активність ферментів, нмоль H_2S/хв·мг протеїну		
			ЦБС	ЦГЛ	ЦАТ
1	Контроль	Самці	3,17±0,19	2,85±0,24	2,56±0,15
2		Самки	3,94±0,22	3,58±0,27	3,24±0,18
3	ГГЦ	Самці	2,49±0,08*	2,11±0,18*	2,03±0,13*
4		Самки	3,40±0,13*	2,95±0,19*	2,80±0,08*
5	ГГЦ+Геністеїн	Самці	3,01±0,12#	2,70±0,12#	2,50±0,11#
6		Самки	3,75±0,10#	3,43±0,09#	3,13±0,09#
7	ГГЦ+Кверцетин	Самці	2,85±0,07#	2,16±0,14*	2,13±0,11*
8		Самки	3,74±0,06#	2,91±0,17*	2,82±0,10*

Примітки: 1. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю;

2. # - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Проведені дослідження показали, що досліджувані поліфеноли з різною ефективністю коригували індуковані ГГЦ зміни вмісту гомоцистеїну, цистеїну та H_2S у крові, а також розлади метаболізму сірковмісних амінокислот і гідроген сульфіду в печінці щурів обох статей. Виявилося, що геністеїн стримував розвиток гомоцистеїнемії, гіперцистеїнемії, дефіциту H_2S у крові, попереджував падіння активності утилізації гомоцистеїну в реакціях транссульфування, деградації цистеїну в окисному та кон'югаційному шляхах та синтезу H_2S у печінці щурів обох статей. Зауважимо, що його ефективність по ГГЦ була вірогідно вищою у самців. Натомість, кверцетин коригував лише вміст H_2S в крові й активність його синтезу в печінці за участю ЦБС приблизно в однаковій мірі у самців та самок щурів, а його ефективність значно поступалася такій у геністеїну.

7.2 Вплив геністеїну та кверцетину на утворення та утилізацію гідроген сульфіду в серці й аорті у щурів обох статей за умов гіпергомоцистеїнемії

Досліджувані біофлавоноїди в різній мірі коригували дефіцит H_2S у міокарді самців і самок щурів з ГГЦ (рис. 7.4). Встановлено, що геністеїн попереджував індуковане ГГЦ зниження вмісту H_2S у міокарді щурів обох статей, але більш виразна дія відмічається саме у самців. У групі нелікованих тварин медіана вмісту H_2S у міокарді становить 1,53 (95% CI 1,11-1,72) нмоль/мг протеїну (у самців) та 2,35 (95% CI 1,96-2,73) нмоль/мг протеїну (у самок). Натомість, у групі тварин «ГГЦ+Геністеїн» рівень H_2S у міокарді у самців і самок був відповідно на 55,8 та 31,3% більшим ($p<0,05$), ніж у групі «ГГЦ»: медіана вмісту становила 2,39 (95% CI 1,67-2,75) нмоль/мг протеїну (у самців) та 3,20 (95% CI 2,58-3,57) нмоль/мг протеїну (у самок).

Введення кверцетину в однаковій мірі стримувало падіння рівня H_2S у тварин обох статей на тлі ГГЦ, а його ефективність значно поступалась геністеїну. В групі тварин «ГГЦ+Кверцетин» вміст H_2S у крові виявився

більшим відповідно на 32,4 та 28,4% (p<0,05) у самців і самок, порівняно з нелікованими тваринами: медіана вмісту становила 1,96 (95% CI 1,46-2,46) нмоль/мг протеїну (у самців) та 3,07 (95% CI 2,58-3,41) нмоль/мг протеїну (у самок).

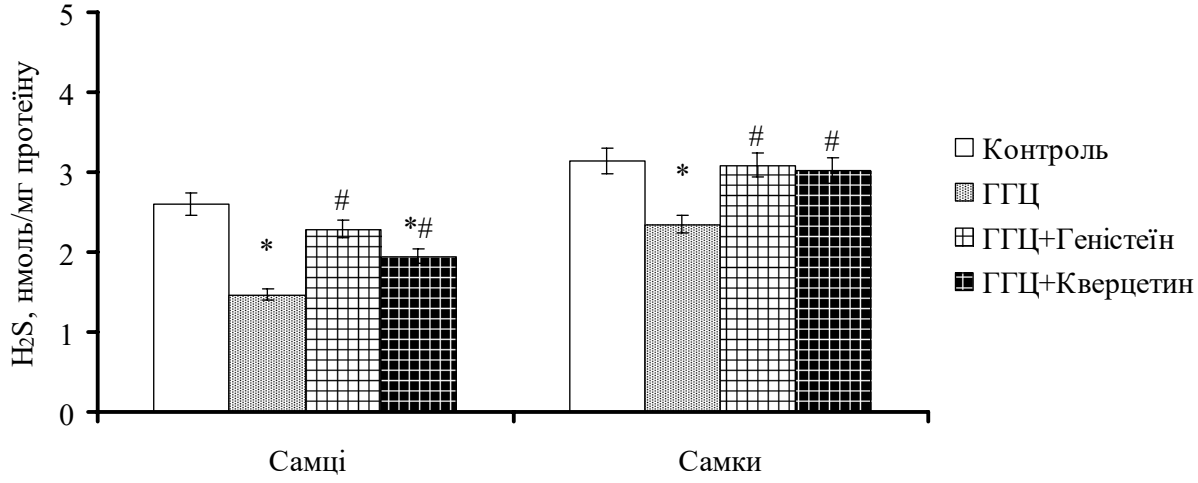


Рис 7.4. Вплив геністеїну та кверцетину на вміст H_2S в міокарді щурів обох статей за умов ГГЦ. Примітки: * - статистично достовірна відмінність (p<0,05) відносно відповідної групи контролю; # - статистично достовірна відмінність (p<0,05) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Застосовані препарати коригували активність сульфітоксидази та швидкість утилізації екзогенного H_2S у міокарді самок і самців тварин, однак їх ефекти були різними (табл. 7.5). Введення кверцетину досить ефективно запобігало зниженню активності сульфітоксидази та зростанню швидкості утилізації екзогенного H_2S у міокарді щурів обох статей, але більш виразна дія відмічалась у самців. Так, у групі тварин з тіолактоновою ГГЦ, яка не отримувала лікування, активність сульфітоксидази в міокарді змінювалася в межах 2,03-4,75 нмоль/хв·мг протеїну (самці) та 3,18-5,04 нмоль/хв·мг протеїну (самки), а швидкість утилізації екзогенного H_2S - 0,78-1,12 нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну (самці) та 0,49-0,86 нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну (самки). Натомість, за умов використання геністеїну активність мітохондріального

окиснення сульфіт-аніону за участю сульфітоксидази була вищою у самців на 37,3% ($p<0,05$), а у самок - на 16,9% ($p<0,05$), тоді як швидкість утилізації екзогенного H_2S виявилася меншою відповідно на 24,2 та 16,9% ($p<0,05$) у самців і самок, порівняно з показниками групи «ГГЦ». За цих умов діапазон коливань активності сульфітоксидази в серці становив 3,36-6,02 нмоль/хв·мг протеїну (у самців) та 3,97-5,58 нмоль/хв·мг протеїну (у самок), а швидкості утилізації H_2S у серці 0,65-0,81 нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну (у самців) та 0,49-0,60 нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну (у самок).

Таблиця 7.5

Вплив геністеїну та кверцетину на активність сульфітоксидази та швидкість утилізації екзогенного H_2S у міокарді щурів обох статей за умов ГГЦ (M±m, n=10)

Групи тварин			Сульфітоксидаза, нмоль/хв·мг протеїну	Швидкість утилізації H_2S, нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну
1	Контроль	Самці	4,92±0,47	0,70±0,03
2		Самки	5,12±0,34	0,54±0,02
3	ГГЦ	Самці	3,37±0,32*	0,95±0,04*
4		Самки	4,20±0,22*	0,66±0,05*
5	ГГЦ+Геністеїн	Самці	4,63±0,31#	0,72±0,02#
6		Самки	4,91±0,20#	0,55±0,01#
7	ГГЦ+Кверцетин	Самці	4,14±0,19#	0,80±0,01*#
8		Самки	4,95±0,22#	0,55±0,02#

Примітки: 1. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю;

2. # - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Використання кверцетину в однаковій мірі стримувало падіння активності мітохондріального окиснення за участю сульфітоксидази та

наростання швидкості утилізації екзогенного H_2S у міокарді самок і самців щурів (табл. 7.5). Встановлено, що в групі тварин «ГГЦ+Кверцетин» активність мітохондріального окиснення за участю сульфітоксидази була вищою у самців на 22,8% ($p<0,05$), а у самок - на 17,9% ($p<0,05$), тоді як швидкість утилізації екзогенного H_2S в серці виявилася меншою відповідно на 15,8 та 16,0% ($p<0,05$) у самців і самок щурів, порівняно з показниками нелікованих тварин. У цій групі тварин інтервал зміни активності сульфітоксидази в міокарді становив 3,31-4,74 нмоль/хв·мг протеїну (у самців) та 4,13-5,97 нмоль/хв·мг протеїну (у самок), а діапазон коливань загальної швидкості утилізації екзогенного H_2S в міокарді становив 0,74-0,86 нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну (у самців) та 0,48-0,64 нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну (у самок).

Фармакотерапія геністеїном стримувала гомоцистеїн-індуковане зменшення ензиматичної продукції H_2S в серці щурів обох статей з більшою ефективністю у самців, тоді як застосування кверцетину не виявляло такого фармакологічного ефекту (табл. 7.6). Встановлено, що в групі тварин, які отримували геністеїн, активність синтезу H_2S в реакції відновлення тіосульфат-аніону за участі ТСТ була вищою відповідно на 29,1 та 16,1% у самців і самок щурів ($p<0,05$), порівняно з показниками нелікованих тварин. Поряд з цим активність синтезу H_2S в реакції десульфурування цистеїну за участю ЦГЛ та в реакції трансамінування цистеїну за участю ЦАТ була відповідно більшою у самців на 64,3 та 42,9% ($p<0,05$), а у самок - на 45,7 та 25,6% ($p<0,05$), порівняно з групою «ГГЦ».

У самців і самок щурів, які на тлі тривалої ГГЦ отримували кверцетин, не відмічалось статистично вірогідних відмінностей активності ТСТ, ЦГЛ та ЦАТ в міокарді, порівняно з відповідними показниками в групі нелікованих тварин.

Таблиця 7.6

Вплив геністеїну та кверцетину на активність H_2S-синтезуючих ензимів в міокарді щурів обох статей за умов ГГЦ (M±m, n=10)

Групи тварин			Десульфуразна активність ферментів, нмоль H_2S/хв·мг протеїну		
			ТСТ	ЦГЛ	ЦАТ
1	Контроль	Самці	1,25±0,05	0,28±0,01	0,71±0,05
2		Самки	1,58±0,08	0,38±0,02	0,85±0,05
3	ГГЦ	Самці	0,86±0,03*	0,14±0,02*	0,42±0,04*
4		Самки	1,20±0,06*	0,24±0,01*	0,64±0,05*
5	ГГЦ+Геністеїн	Самці	1,11±0,04*#	0,23±0,04#	0,60±0,03#
6		Самки	1,39±0,07#	0,35±0,02#	0,80±0,02#
7	ГГЦ+Кверцетин	Самці	0,94±0,06*	0,15±0,02*	0,48±0,05*
8		Самки	1,26±0,08*	0,23±0,02*	0,68±0,06*

Примітки: 1. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю;

2. # - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Використання геністеїну та кверцетину попереджує розвиток дефіциту H_2S в аорті самок і самців щурів за умов тіолактонової ГГЦ, хоча фармакологічна ефективність цих препаратів відрізняється між собою (рис. 7.5). Виявилося, що застосування геністеїну досить ефективно протидіє гомоцистеїн-індукованому зниженню рівня H_2S в аорті щурів обох статей, але особливо самців: за цих умов вміст H_2S в аорті був відповідно більшим на 41,5 та 20,4% у самців і самок щурів ($p<0,05$), порівняно з групою «ГГЦ». В групі «ГГЦ+Геністеїн» рівень H_2S в тканині аорти коливався в межах 1,01-1,47 нмоль/мг протеїну (у самців) та 1,39-1,71 нмоль/мг протеїну (у самок), тоді як в групі «ГГЦ» діапазон коливань цього месенджера в аорті становив

0,72-1,01 нмоль/мг протеїну (у самців) та 0,96-1,52 нмоль/мг протеїну (у самок).

Застосування кверцетину приблизно в однаковій мірі коригувало рівень H_2S в тканині аорти самців і самок щурів за умов тривалої тіолактонової ГГЦ. В групі «ГГЦ+Кверцетин» рівень H_2S в тканині аорти був більшим відповідно на 18,5 та 16,5% у самців і самок щурів ($p<0,05$), порівняно з показниками нелікованих тварин. За цих умов виявилося, що рівень H_2S в тканині аорти коливався в межах 0,91-1,14 нмоль/мг протеїну (у самців) та 1,35-1,66 нмоль/мг протеїну (у самок).

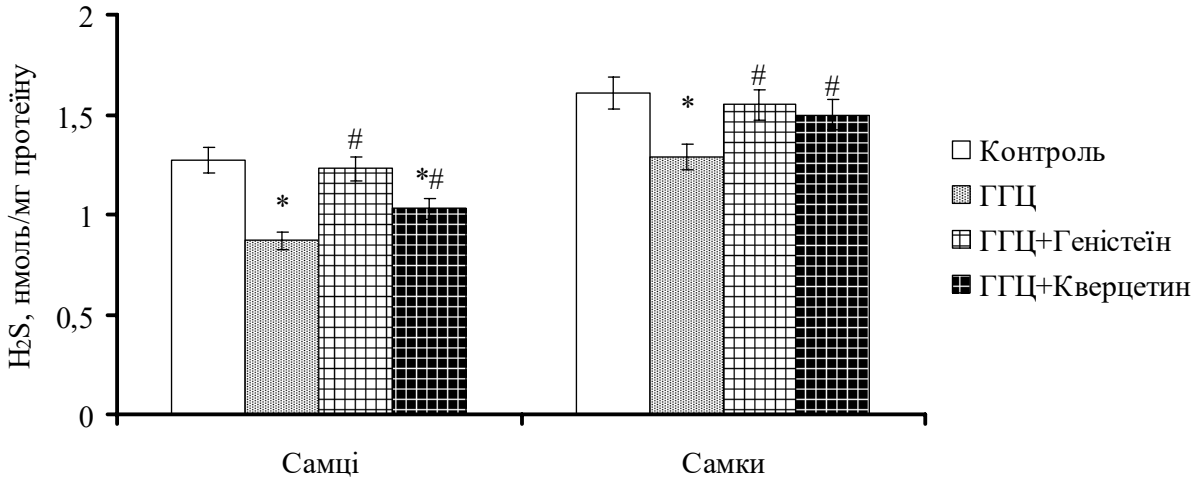


Рис 7.5. Вплив геністеїну та кверцетину на вміст H_2S в аорті щурів обох статей за умов ГГЦ. Примітки: * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю; # - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Серед застосованих поліфенольних сполук лише геністеїн попереджував зміни активності H_2S-синтезуючих ензимів в аорті щурів обох статей на тлі ГГЦ, причому у самців ефективність його дії була достовірно більшою (табл. 7.7). Встановлено, що в групі тварин з ГГЦ, які отримували геністеїн, активність ензимів ТСТ, ЦГЛ та ЦАТ в аорті була більшою у самців відповідно на 30,2; 42,6 та 42,2% ($p<0,05$), а у самок - на 13,7; 20,9 та

19,7% (p<0,05), порівняно з показниками нелікованих тварин, та статистично вона вірогідно не відрізнялася від показників контрольної групи. За умов використання кверцетину, активність ензимів ТСТ, ЦГЛ та ЦАТ в аорті вірогідно не відрізнялася від показників групи «ГГЦ» та була достовірно меншою, порівняно з відповідним контролем.

Таблиця 7.7

Вплив геністеїну та кверцетину на активність H_2S-синтезуючих ензимів в аорті щурів обох статей за умов ГГЦ (M±m, n=10)

Групи тварин			Десульфуразна активність ферментів, нмоль H_2S/хв·мг протеїну		
			ТСТ	ЦГЛ	ЦАТ
1	Контроль	Самці	1,89±0,08	0,69±0,03	0,56±0,04
2		Самки	2,39±0,09	0,91±0,05	0,72±0,06
3	ГГЦ	Самці	1,35±0,05*	0,47±0,02*	0,40±0,03*
4		Самки	1,98±0,10*	0,70±0,04*	0,58±0,03*
5	ГГЦ+Геністеїн	Самці	1,76±0,06#	0,67±0,04#	0,57±0,05#
6		Самки	2,25±0,08#	0,85±0,06#	0,70±0,02#
7	ГГЦ+Кверцетин	Самці	1,41±0,07*	0,45±0,03*	0,44±0,02*
8		Самки	2,04±0,10*	0,72±0,05*	0,60±0,04*

Примітки: 1. * - статистично достовірна відмінність (p<0,05) відносно відповідної групи контролю;

2. # - статистично достовірна відмінність (p<0,05) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Таким чином, застосована фармакотерапія з різною ефективністю коригувала індуковані ГГЦ зміни метаболізму H_2S в серцево-судинній системі щурів обох статей. Застосування геністеїну попереджувало зростання швидкості утилізації H_2S в міокарді, падіння активності мітохондріального окиснення за участі сульфітоксидази в міокарді, зменшення активності H_2S-

синтезуючих ензимів та стримувало розвиток дефіциту H_2S в міокарді та аорті щурів обох статей за умов ГГЦ. Зауважимо, що ефективність геністеїну за впливом на окремі показники була вищою у самців, ніж у самок. Використання кверцетину стримувало зростання швидкості утилізації H_2S, падіння активності сульфітоксидази, формування дефіциту H_2S та не впливало на активність H_2S-синтезуючих ензимів у серцево-судинній системі самців і самок щурів на тлі ГГЦ. За цих умов ефективність кверцетину значно поступалась геністеїну.

7.3 Вплив геністеїну та кверцетину на стан серця й аорти у щурів обох статей за умов гіпергомоцистеїнемії

Фармакотерапія досліджуваними препаратами стримувала формування дисбалансу в тіол-дисульфідній та про- і антиоксидантній стистемах у щурів обох статей за умов ГГЦ, причому найбільша ефективність проявилась у геністеїна (табл. 7.8). Зокрема, в міокарді щурів, які отримували геністеїн, активність відновлення тіоредоксину тіоредоксин-редуктазою достовірно більша відповідно на 43,8 та 28,2% у самців та самок щурів ($p<0,05$), ніж у нелікованих тварин. Поряд з цим активність продукції супероксидного-аніону за участю НАДФН-оксидази вірогідно менша у самців на 31,9% ($p<0,05$), а у самок - на 22,7% ($p<0,05$), тоді як активність інактивації супероксидного-аніону в реакції, каталізованій супероксид-дисмутазою, достовірно більша у самців на 43,8% ($p<0,05$), у самок – на 27,9% ($p<0,05$), порівняно з тваринами групи «ГГЦ». Натомість, у міокарді щурів, які отримували кверцетин, активність тіоредоксинредуктази та супероксиддисмутази була більшою у самців відповідно на 25,3 та 31,9% ($p<0,05$), а у самок на 24,4 та 29,7% ($p<0,05$), тоді як активність НАДФН-оксидази була меншою у самців на 23,9% ($p<0,05$), а у самок – на 24,5% ($p<0,05$), порівняно з нелікованими тваринами. За цих умов активність ферментів тіоредоксинредуктази та НАДФН-оксидази в міокарді самців

щурів мала статистично вірогідні відмінності з показниками в контрольній групі тварин.

Таблиця 7.8

Вплив геністеїну та кверцетину на активність про- і антиоксидантних ензимів в міокарді щурів обох статей за умов ГГЦ (M±m, n=10)

Групи тварин			Тіоредоксин-редуктаза, нмоль/хв·мг протеїну	НАДФН-оксидаза, нмоль/хв·мг протеїну	Супероксид-дисмутаза, ум.од./мг протеїну
1	Контроль	Самці	4,30±0,25	1,23±0,07	3,66±0,14
2		Самки	5,24±0,21	0,82±0,04	4,55±0,16
3	ГГЦ	Самці	2,87±0,21*	1,88±0,09*	2,45±0,10*
4		Самки	3,94±0,19*	1,10±0,11*	3,47±0,12*
5	ГГЦ+Геніс-теїн	Самці	4,13±0,19#	1,28±0,14#	3,52±0,14#
6		Самки	5,05±0,17#	0,85±0,03#	4,44±0,13#
7	ГГЦ+Квер-цетин	Самці	3,60±0,16*#	1,43±0,10#	3,23±0,09*#
8		Самки	4,90±0,18#	0,83±0,01#	4,50±0,15#

Примітки: 1. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю;

2. # - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Застосована фармакотерапія стримувала розвиток оксидативного стресу в міокарді, однак істотно відрізнялася за ефективністю залежно від препарату (табл. 7.9). Найбільша антиоксидантна активність у міокарді за умов модельованої патології характерна для геністеїну, причому його дія була більш виразною у самців щурів. Встановлено, що в міокарді самців, які отримували геністеїн, рівень МДА та КГП був менший відповідно на 45,5 та 45,8% ($p<0,05$), а у самок - на 35,8 та 35,2% ($p<0,05$), порівняно з нелікованими тваринами. Застосування кверцетину мало вірогідно меншу

антиоксидантну дію в міокарді, причому у тварин обох статей вона була практично співставною. Виявилося, що в міокарді самців, які отримували кверцетин, вміст МДА та КГП був менший відповідно на 38,9 та 34,4% ($p<0,05$), а у самок - на 36,1 та 32,8% ($p<0,05$), ніж у нелікованих тварин.

Таблиця 7.9

Вплив геністеїну та кверцетину на вміст продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів в міокарді щурів обох статей за умов ГГЦ (M±m, n=10)

Групи тварин			МДА, мкмоль/г тканини	КГП, нмоль/мг протеїну
1	Контроль	Самці	10,0±0,35	0,95±0,04
2		Самки	7,25±0,27	0,70±0,03
3	ГГЦ	Самці	18,9±0,27*	1,92±0,09*
4		Самки	12,2±0,24*	1,25±0,12*
5	ГГЦ+Геністеїн	Самці	10,3±0,27#	1,04±0,08#
6		Самки	7,84±0,30#	0,81±0,07#
7	ГГЦ+Кверцетин	Самці	11,6±0,26*#	1,26±0,10*#
8		Самки	7,80±0,18#	0,84±0,09#

Примітки: 1. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю;

2. # - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Застосування геністеїну та кверцетину в різній мірі попереджувало розвиток цитолізу кардіоміоцитів у щурів обох статей на тлі ГГЦ (табл. 7.10). За здатністю стабілізувати мембрани кардіоміоцитів геністеїн значно випереджав кверцетин, при чому мембраностабілізуюча дія геністеїну була більш виразною у самців. Встановлено, що в крові самців, які лікувалися геністеїном, активність АСТ та КФК була меншою відповідно на 26,5 та 23,3% ($p<0,05$), а у самок - на 16,6 та 14,5% ($p<0,05$), порівняно з тваринами

групи «ГГЦ». Застосування кверцетину в меншій мірі стримує розвиток цитолізу кардіоміоцитів: активність АСТ та КФК у самців була меншою відповідно на 15,9 та 14,6% ($p<0,05$), а у самок - на 14,0 та 12,4% ($p<0,05$), порівняно з тваринами групи «ГГЦ». За цих умов активність АСТ та КФК у крові була статистично достовірно більшою, порівняно з показниками в контрольній групі тварин.

Таблиця 7.10

Вплив геністеїну та кверцетину на активність маркерних ферментів цитолізу кардіоміоцитів в сироватці крові щурів обох статей за умов ГГЦ (M±m, n=10)

Групи тварин			АСТ, мкмоль/хв·л	КФК, Од./л
1	Контроль	Самці	37,0±0,90	77,2±4,26
2		Самки	36,1±0,71	73,1±3,65
3	ГГЦ	Самці	51,5±0,96*	110±3,67*
4		Самки	45,1±0,65*	96,0±3,83*
5	ГГЦ+Геністеїн	Самці	37,8±0,78#	84,4±3,36#
6		Самки	37,6±0,65#	82,1±3,60#
7	ГГЦ+Кверцетин	Самці	43,3±0,81*#	94,0±2,47*#
8		Самки	38,8±0,61*#	84,1±3,34*#

Примітки: 1. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю;

2. # - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Введення обраних коректорів у різній мірі стримує порушення фракційного розподілу глутатіону в міокарді щурів обох статей, індукованих тривалою ГГЦ (табл. 7.11). Виявилося, що геністеїн значно випереджає кверцетин за здатністю відновлювати нормальне співвідношення між різними формами глутатіону в міокарді. В групі тварин «ГГЦ+Геністеїн»

вміст відновленого глутатіону більший відповідно на 57,1 та 30,5% ($p<0,05$), а рівень окисненої форми глутатіону менший відповідно на 19,8 та 13,1% ($p<0,05$) у самців і самок, ніж у групі «ГГЦ». За цих умов співвідношення між відновленою й окисненою формою глутатіону у самців і самок виявляється більшим відповідно на 100 та 47,5%, порівняно з групою нелікованих тварин.

Таблиця 7.11

Вплив геністеїну та кверцетину на вміст глутатіону та його фракцій у міокарді щурів обох статей за умов ГГЦ (M±m, n=10)

Групи тварин			GSH, нмоль/мг протеїну	GSSG, нмоль/мг протеїну	GSH / GSSG
1	Контроль	Самці	2,97±0,09	0,095±0,003	31,4±1,35
2		Самки	3,56±0,13	0,070±0,004	51,9±2,91
3	ГГЦ	Самці	1,84±0,07*	0,126±0,005*	14,7±0,39*
4		Самки	2,65±0,10*	0,084±0,005*	32,2±1,73*
5	ГГЦ +Геністеїн	Самці	2,89±0,07#	0,101±0,006#	29,3±1,61#
6		Самки	3,46±0,11#	0,073±0,002#	47,5±1,46#
7	ГГЦ +Кверцетин	Самці	2,33±0,08*#	0,108±0,004*#	21,8±0,80*#
8		Самки	3,30±0,12#	0,072±0,001#	45,7±1,71#

Примітки: 1. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю;

2. # - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Застосування кверцетину проявляє менший вплив на фракційний розподіл глутатіону. В групі тварин «ГГЦ+Кверцетин» вміст відновленого глутатіону більший відповідно на 26,6 та 24,5% ($p<0,05$), а рівень його окисненої форми менший відповідно на 14,7 та 14,0% ($p<0,05$) у самців та самок, ніж у групі «ГГЦ». За цих умов співвідношення між відновленою та

окисненою формою глутатіону виявляється більшим відповідно на 48,7 та 42,1% у самців і самок, порівняно з групою нелікованих тварин. Використання кверцетину у самців не спричиняє повного відновлення нормального розподілу окремих фракцій глутатіону, про що доказово свідчить наявність статистично вірогідних відмінностей з показниками системи глутатіону в групі контролю.

Фармакотерапія досліджуваними препаратами стримувала формування дисбалансу між про- і антиоксидантними ензимами в аорті щурів обох статей, причому найбільша ефективність проявилась у геністеїну (табл. 7.12). За умов його введення активність прооксидантного ензиму НАДФН-оксидази в аорті виявилась меншою у самців на 26,8% ($p<0,05$), а у самок – на 17,8% ($p<0,05$), порівняно з групою нелікованих тварин. Поряд з цим активність антиоксидантного ензиму супероксиддисмутази в аорті була більшою у самців на 47,6% ($p<0,05$), а у самок – на 22,8% ($p<0,05$), порівняно з групою нелікованих тварин. В групі тварин «ГГЦ+Геністеїн» активність НАДФН-оксидази та супероксиддисмутази наближалась до показників у контрольній групі тварин ($p>0,05$).

Введення кверцетину в меншій мірі, ніж геністеїн, протидіє розвитку дисбалансу між про- та антиоксидантними ензимами в аорті: активність НАДФН-оксидази виявилась меншою у самців на 17,2% ($p<0,05$), а у самок – на 19,0% ($p<0,05$), тоді як активність супероксиддисмутази була більшою у самців на 24,7% ($p<0,05$), а у самок – на 20,9% ($p<0,05$), порівняно з групою нелікованих тварин. У самців групи «ГГЦ+Кверцетин» активність НАДФН-оксидази була вірогідно більша, а супероксиддисмутази достовірно менша порівняно з показниками контрольної групи тварин ($p<0,05$). Натомість у самок щурів активність НАДФН-оксидази та супероксиддисмутази наближалась до показників контрольної групи тварин ($p>0,05$).

Таблиця 7.12

Вплив геністеїну та кверцетину на активність про- та антиоксидантних ензимів в аорті щурів обох статей за умов ГГЦ (M±m, n=10)

Групи тварин			НАДФН-оксидаза, нмоль/хв·мг протеїну	Супероксиддисмутаза, ум.од./мг протеїна
1	Контроль	Самці	0,85±0,04	2,25±0,09
2		Самки	0,61±0,03	2,71±0,11
3	ГГЦ	Самці	1,24±0,08*	1,48±0,04*
4		Самки	0,80±0,04*	2,15±0,09*
5	ГГЦ+Геніс-	Самці	0,91±0,05#	2,19±0,07#
6	теїн	Самки	0,66±0,02#	2,64±0,08#
7	ГГЦ+Квер-	Самці	1,03±0,04*#	1,85±0,05*#
8	цетин	Самки	0,65±0,03#	2,60±0,06#

Примітки: 1. * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю;

2. # - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Застосування біофлавоноїдів за умов ГГЦ стримує гіперактивацію вільнорадикального окиснення ліпідів і протеїнів в аорті, однак виразність їх ефекту суттєво відрізнялась у самок і самців. За антиоксидантною дією у самців і самок геністеїн випереджав кверцетин (табл. 7.13). Введення геністеїну супроводжується зменшенням активності пероксидації ліпідів та окисної деструкції протеїнів в аорті за умов ГГЦ: вміст МДА та КГП у самців достовірно менший на 43,6 та 45,2% ($p<0,05$), а у самок - на 33,6 та 35,5% ($p<0,05$), порівняно з нелікованими тваринами. За умов введення геністеїну показники МДА та КГП наближалися до таких у контрольній групі тварин. Застосування кверцетину має менш виразну антиоксидантну дію у самців і самок за умов модельованої патології: вміст МДА та КГП у самців достовірно менший на 38,2 та 29,0% ($p<0,05$), а у самок - на 34,8 та 26,6%

(p<0,05), порівняно з нелікованими тваринами. За цих умов показники МДА та КГП у самців були статистично достовірно вищими, ніж у контрольній групі тварин.

Таблиця 7.13

Вплив геністеїну та кверцетину на вміст продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів в аорті щурів обох статей за умов ГГЦ (M±m, n=10)

Групи тварин			МДА, мкмоль/г тканини	КГП, нмоль/мг протеїну
1	Контроль	Самці	6,45±0,21	0,74±0,03
2		Самки	5,08±0,14	0,51±0,02
3	ГГЦ	Самці	11,8±0,34*	1,48±0,06*
4		Самки	8,15±0,22*	0,90±0,03*
5	ГГЦ+Геністеїн	Самці	6,66±0,23#	0,81±0,05#
6		Самки	5,41±0,17#	0,58±0,04#
7	ГГЦ+Кверцетин	Самці	7,30±0,19*#	1,05±0,08*#
8		Самки	5,31±0,13#	0,66±0,07#

Примітки: 1. * - статистично достовірна відмінність (p<0,05) відносно відповідної групи контролю;

2. # - статистично достовірна відмінність (p<0,05) відносно відповідної групи з ГГЦ.

Введення геністеїну та кверцетину супроводжується ендотеліотропною дією за умов ГГЦ, однак виразність їх ефекту суттєво відрізняється у самців і самок (рис. 7.6). Встановлено, що в групі «ГГЦ+Геністеїн» вміст sVCAM-1 у крові самців достовірно менший на 32,2% (p<0,05), а у самок – на 23,0% (p<0,05), порівняно з нелікованими тваринами. Кверцетин за даної патології виявляв вірогідно меншу ендотеліопротекторну дію. В групі «ГГЦ+Кверцетин» вміст sVCAM-1 у крові самців достовірно менший на 20,7% (p<0,05), а у самок – на 19,7% (p<0,05), порівняно з

нелікованими тваринами. Застосування кверцетину у самців щурів не повертає показники вмісту sVCAM-1 в крові до рівня контрольної групи тварин.

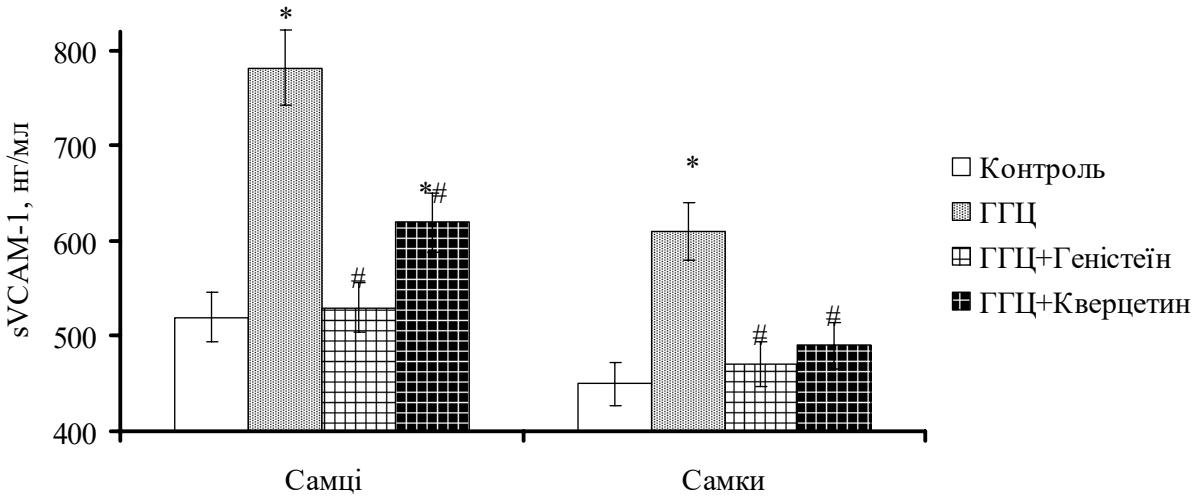


Рис 7.6. Вплив геністеїну та кверцетину на вміст sVCAM-1 в крові щурів обох статей за умов ГГЦ. Примітки: * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно відповідної групи контролю; # - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно групи з ГГЦ.

Застосування геністеїну протидіє гомоцистеїн-індукованому зменшенню H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самців щурів, тоді як введення кверцетину не викликає достовірних змін скоротливості (рис. 7.7). У групі самців з ГГЦ H_2S у концентраціях 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ та 1000 мкМ викликав дозозалежне розслаблення кільцевих фрагментів аорти відповідно на 4,48±0,49%; 7,06±0,36%; 18,7±0,42% та 40,3±1,30%. В той же час у самців групи «ГГЦ+Геністеїн» розслаблення кілець аорти в присутності цих концентрацій H_2S було більшим і становило 5,12±0,21%; 9,68±0,19% ($p<0,05$); 26,5±0,68% ($p<0,05$) та 51,7±0,65% ($p<0,05$), крива «доза-ефект» зміщувалась ліворуч відносно такої в групі «ГГЦ».

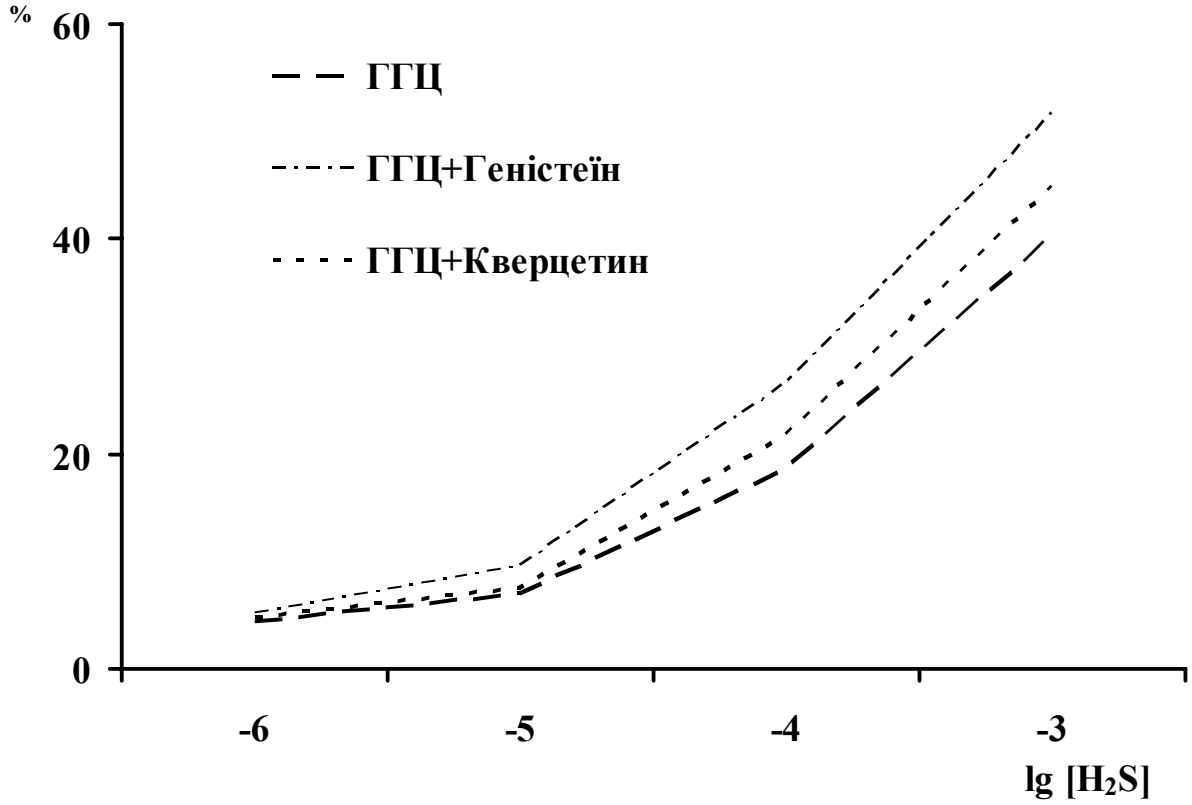


Рис 7.7. Вплив геністеїну та кверцетину на дозозалежність H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти самців щурів за умов ГГЦ. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у перфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій H_2S. За 100% прийнятий рівень H_2S-стимульованого розслаблення фрагментів аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення. На цьому та наступних рисунках наведені усереднені дані 4 дослідів і значення похибок середнього.

Виявилося, що лише геністеїн стримував падіння H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самок щурів за умов ГГЦ (рис. 7.8). У групі самок з ГГЦ H_2S у концентраціях 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ та 1000 мкМ викликав дозозалежне розслаблення кільцевих фрагментів аорти відповідно на 5,57±0,26%; 10,6±0,11%; 29,6±0,18% та 55,7±0,33%. Натомість

в групі «ГГЦ+Геністеїн» у самок розслаблення кілець аорти в присутності цих концентрацій H_2S було більшим і становило 6,13±0,11%; 12,3±0,25% ($p<0,05$); 34,2±0,65% ($p<0,05$) та 61,3±0,13% ($p<0,05$), крива «доза-ефект» зміщувалась ліворуч відносно такої в групі «ГГЦ».

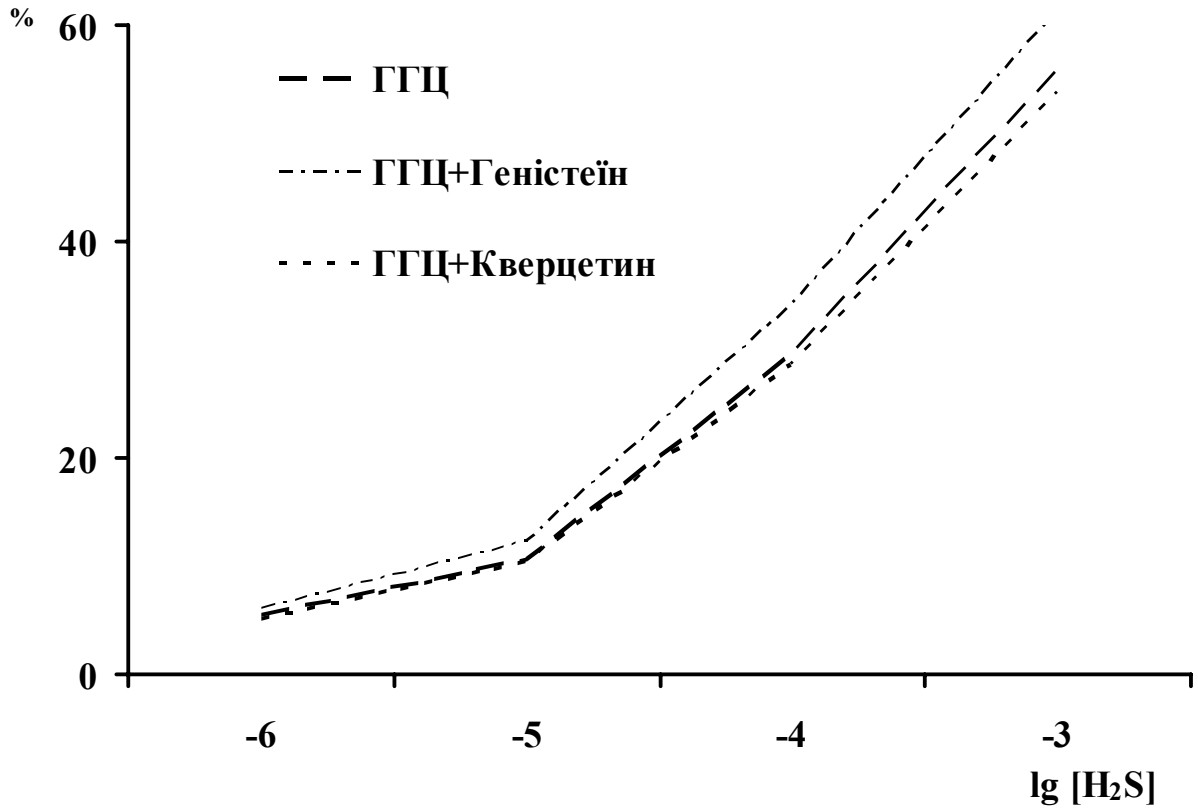


Рис 7.8. Вплив геністеїну та кверцетину на дозозалежність H_2S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти самок щурів за умов ГГЦ. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у перфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій H_2S. За 100% прийнятий рівень H_2S-стимульованого розслаблення фрагментів аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення.

Додаткові докази щодо здатності флавоноїдів коригувати H_2S-стимульоване розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самок і самців

щурів за умов ГГЦ надає порівняльний аналіз середньоефективних концентрацій гідроген сульфіду (рис. 7.9). Так, в групі тварин «ГГЦ» середньоефективні концентрації H_2S в аорті становлять 125±5,26 мкМ у самців та 89,5±4,12 мкМ у самок. Застосування геністеїну протидіє зменшенню чутливості аорти до релаксуючої дії H_2S, індукованої гіпергомоцистеїнемією. За цих умов середньоефективні концентрації H_2S були меншими відповідно на 21,0 та 15,6% у самців та самок щурів, порівняно з групою нелікованих тварин і становили 98,7±4,35 мкМ у самців та 75,5±3,86 мкМ у самок. Натомість, використання кверцетину не супроводжується достовірними змінами середньоефективних концентрацій H_2S в аорті, порівняно з групою «ГГЦ».

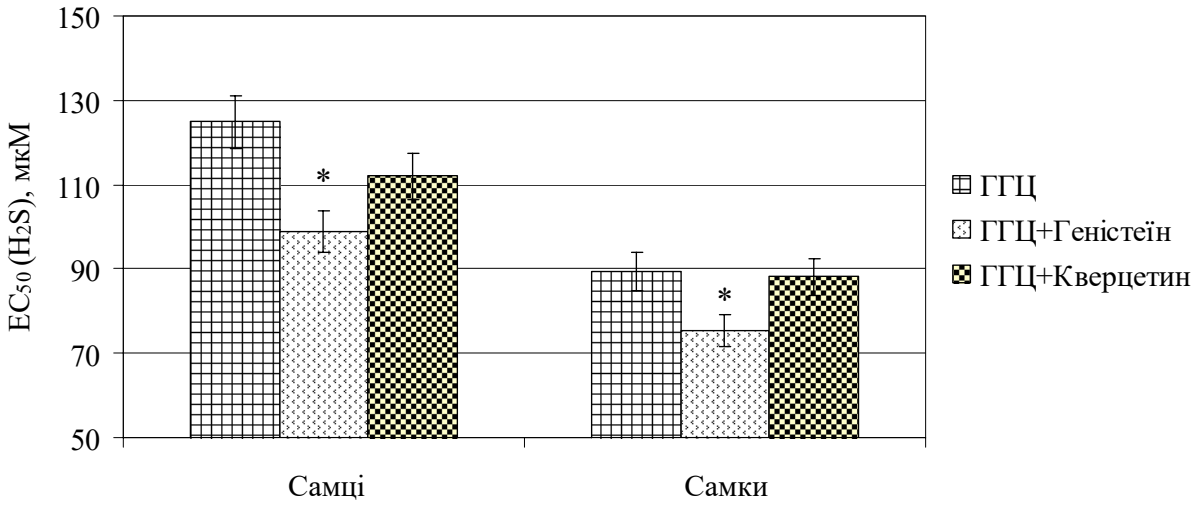


Рис 7.9. Вплив геністеїну та кверцетину на EC_{50} гідроген сульфіду в аорті щурів обох статей за умов ГГЦ. Примітка: * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно групи ГГЦ.

Введення геністеїну стримує падіння цистеїн-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самців щурів з гіпергомоцистеїнемією, тоді як кверцетин не справляв такого ефекту (рис. 7.10). В групі «ГГЦ» у самців цистеїн у концентраціях 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ та 10 мМ викликав дозозалежне розслаблення кілець аорти

відповідно на 4,81±0,68%; 7,60±0,46%; 11,3±0,29%; 16,2±0,35% та 40,5±0,77%. Натомість у групі «ГГЦ + Геністеїн» у самців розслаблення кілець аорти в присутності цих концентрацій цистеїну було більшим і становило 7,60±0,68% ($p<0,05$); 9,61±0,31% ($p<0,05$); 15,0±0,12% ($p<0,05$); 21,6±0,52% ($p<0,05$); 48,9±0,84% ($p<0,05$), крива «доза-ефект» зміщувалася ліворуч відносно такої в групі «ГГЦ».

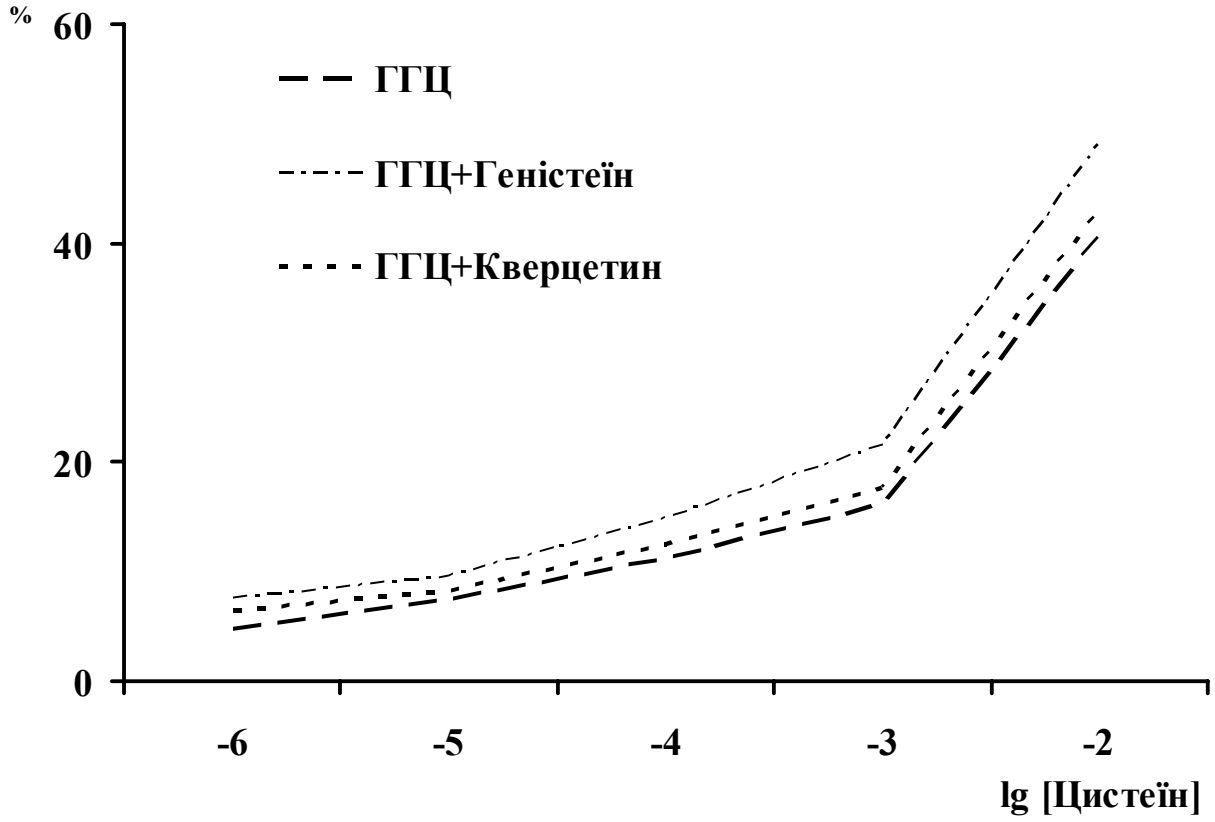


Рис. 7.10. Вплив геністеїну та кверцетину на дозозалежність цистеїн-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти самців щурів за умов ГГЦ. По осі абсцис - десятковий логарифм концентрації цистеїну (М) у перфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кілець аорти під впливом зростаючих концентрацій цистеїну. За 100% прийнятий рівень цистеїн-стимульованого розслаблення фрагментів аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення.

Серед обраних поліфенолів лише геністеїн стримував падіння цистеїн-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти у самок щурів на тлі ГГЦ (рис. 7.11). В групі «ГГЦ» у самок цистеїн у концентраціях 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ та 10 мМ викликав дозозалежне розслаблення кілець аорти відповідно на 8,63±0,28%; 10,8±0,46%; 16,6±0,22%; 23,1±0,94% та 51,1±0,16%. В той же час, у групі «ГГЦ + Геністеїн» у самок розслаблення кілець аорти в присутності цих концентрацій цистеїну було більшим і становило 10,0±0,38% ($p<0,05$); 12,5±0,34% ($p<0,05$); 18,7±0,32% ($p<0,05$); 26,7±0,31% ($p<0,05$); 56,4±0,68% ($p<0,05$), крива «доза-ефект» зміщувалася ліворуч відносно такої у групі «ГГЦ».

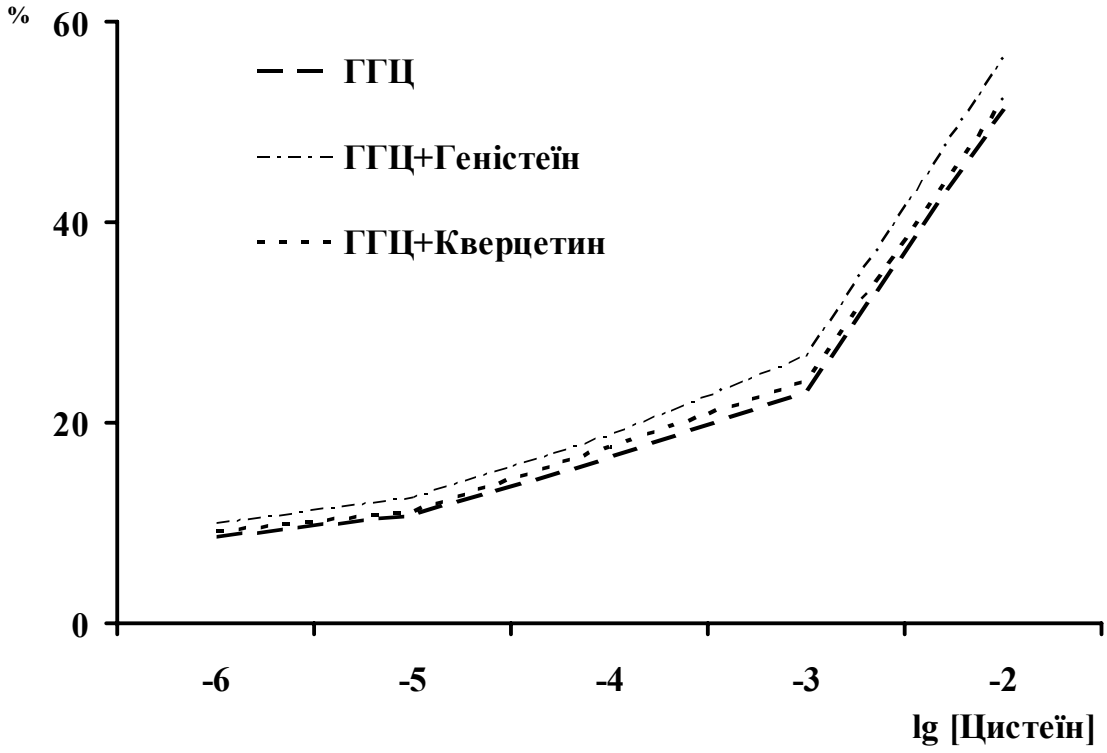


Рис. 7.11. Вплив геністеїну та кверцетину на дозозалежність цистеїн-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти самок щурів за умов ГГЦ. По осі абсцис - десятковий логарифм концентрації цистеїну (М) у перфузійному розчині, по осі ординат - нормована інтенсивність розслаблення кілець аорти під впливом зростаючих концентрацій цистеїну. За 100% прийнятий рівень цистеїн-стимульованого розслаблення фрагментів

аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення.

Порівняльний аналіз середньоефективних концентрацій цистеїну в аорті самок і самців тварин (рис. 7.12) показав, що в групі тварин «ГГЦ» EC_{50} цистеїну в аорті становить 1446±51,1 мкМ у самців та 951±32,6 мкМ у самок. Введення геністеїну стримувало зменшення чутливості аорти до релаксуючої дії цистеїну, індуковане гіпергомоцистеїнемією. За цих умов EC_{50} цистеїну були меншими відповідно на 25,6 та 17,0% у самців і самок щурів, порівняно з групою нелікованих тварин і становили 1073±47,9 мкМ у самців та 789±33,8 мкМ у самок. Використання кверцетину не викликало достовірних змін EC_{50} цистеїну в аорті, порівняно з групою «ГГЦ».

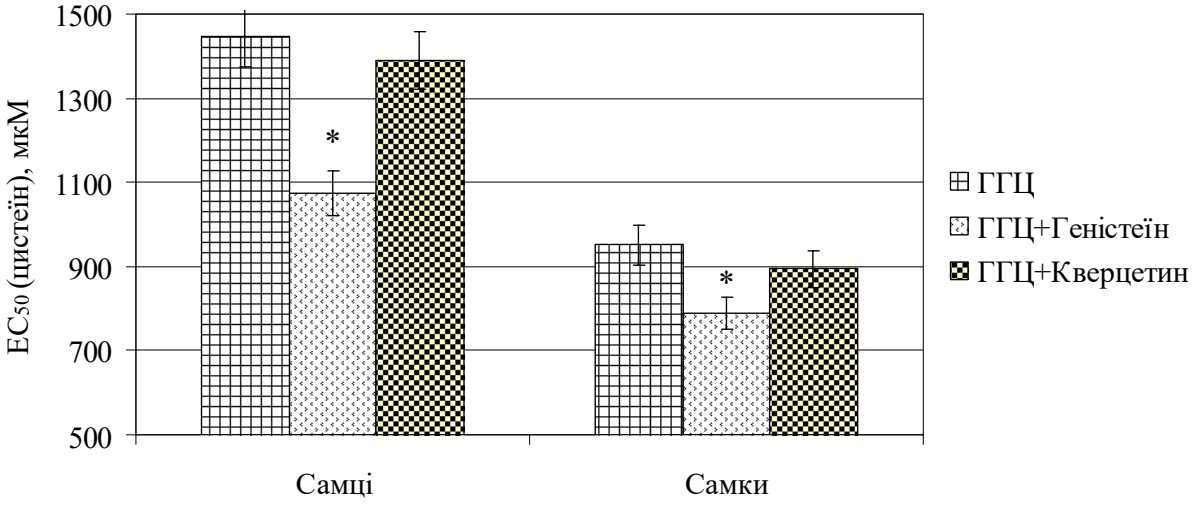


Рис 7.12. Вплив геністеїну та кверцетину на EC_{50} цистеїну в аорті щурів обох статей за умов ГГЦ. Примітка: * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно групи ГГЦ.

Виявилося, що із досліджуваних поліфенольних сполук лише геністеїн попереджує зростання гомоцистеїн-індукованого скорочення кільцевих фрагментів аорти у самців щурів за умов тривалого введення тіолактону гомоцистеїну (рис. 7.13). В групі «ГГЦ» у самців гомоцистеїн у

концентраціях 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ та 10 мМ викликав дозозалежне скорочення кілець аорти відповідно на 4,38±0,94%; 8,54±1,26%; 35,3±1,88%; 52,1±1,13% та 68,7±0,48%. Натомість в групі «ГГЦ+Геністеїн» у самців скорочення кілець аорти в присутності цих концентрацій гомоцистеїну було меншим і становило 2,36±0,18% ($p<0,05$); 4,10±0,74% ($p<0,05$); 27,4±2,71% ($p<0,05$); 40,5±1,62% ($p<0,05$); 58,4±0,75% ($p<0,05$), крива «доза-ефект» зміщувалась праворуч відносно такої у групі «ГГЦ».

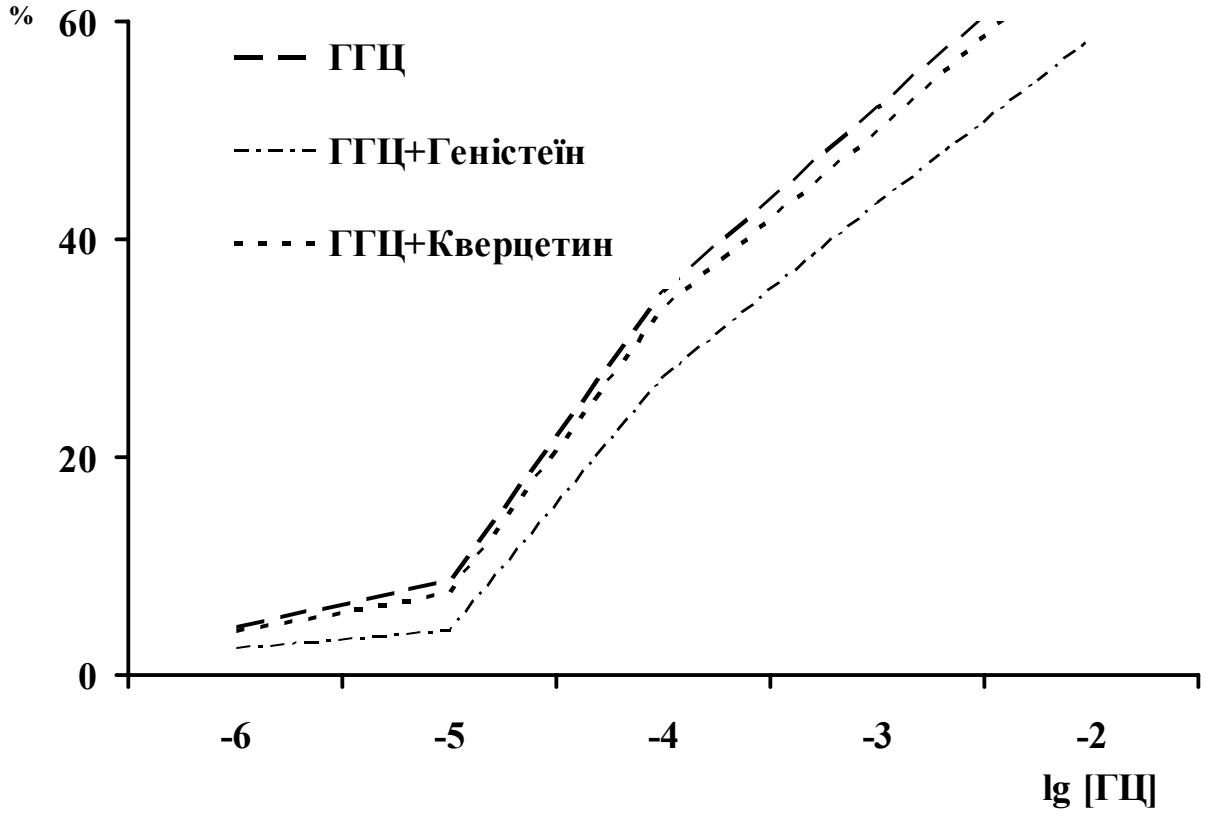


Рис. 7.13. Вплив геністеїну та кверцетину на дозозалежність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти самців щурів під впливом ГЦ за умов ГГЦ. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації ГЦ (М) у суперфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій ГЦ. За 100% прийнято повне інгібування ацетихолін-індукованого розслаблення фрагментів аорти під впливом ГЦ.

Фармакотерапія з використанням лише геністеїну стримує також наростання гомоцистеїн-індукованого скорочення кільцевих фрагментів аорти у самок щурів за умов введення тіолактону гомоцистеїну (рис. 7.14). В групі «ГГЦ» у самок гомоцистеїн у концентраціях 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ та 10 мМ викликав дозозалежне скорочення кілець аорти відповідно на 1,80±0,15%; 3,72±0,33%; 25,2±0,31%; 41,2±0,80% та 54,4±0,61%. В той же час у групі «ГГЦ+Геністеїн» у самок скорочення кілець аорти в присутності цих концентрацій гомоцистеїну було меншим і становило відповідно 1,51±0,10%; 3,43±0,43%; 19,3±1,40% ($p<0,05$); 36,1±1,01% ($p<0,05$); 50,1±1,34% ($p<0,05$), крива «доза-ефект» зміщувалась праворуч відносно такої в групі «ГГЦ».

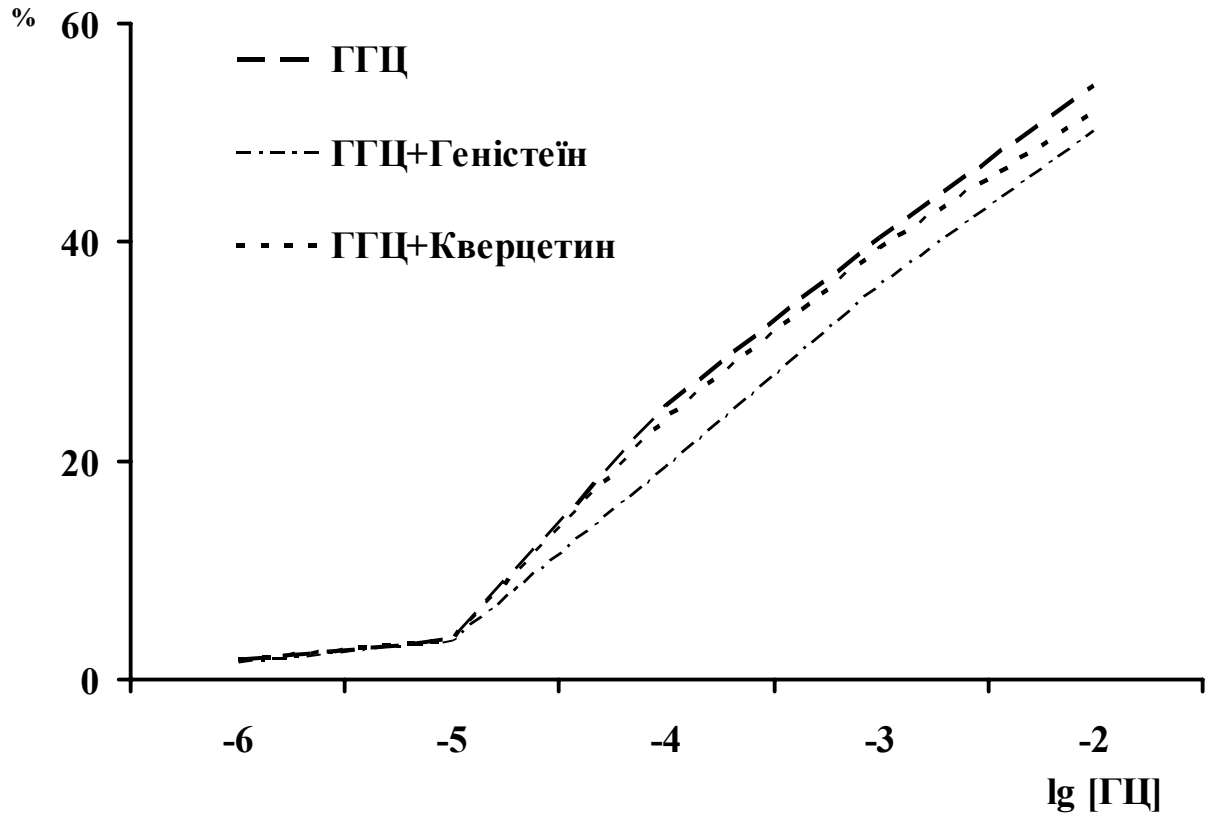


Рис. 7.14. Вплив геністеїну та кверцетину на дозозалежність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти самок щурів під впливом ГЦ за умов ГГЦ. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації ГЦ (М) у суперфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність зменшення ацетилхолін-індукованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій ГЦ. За 100%

прийнято повне інгібування ацетихолін-індукованого розслаблення фрагментів аорти під впливом ГЦ.

Порівняння середньоефективних концентрацій гомоцистеїну в аорті самок і самців тварин (рис. 7.15) показало, що в групі тварин «ГГЦ» $ЕС_{50}$ гомоцистеїну в аорті становлять 84,3±6,25 мкМ у самців та 126±6,78 мкМ у самок. Введення геністеїну стримувало зростання чутливості аорти до констрикторної дії гомоцистеїну, індуковане введенням тіолактону гомоцистеїну. За цих умов $ЕС_{50}$ гомоцистеїну були більшими відповідно на 42,3 та 27,0% у самців і самок щурів, порівняно з групою нелікованих тварин і становили 120±7,46 мкМ у самців та 160±7,29 мкМ у самок. Використання кверцетину не викликало достовірних змін $ЕС_{50}$ гомоцистеїну в аорті самок і самців, порівняно з групою «ГГЦ».

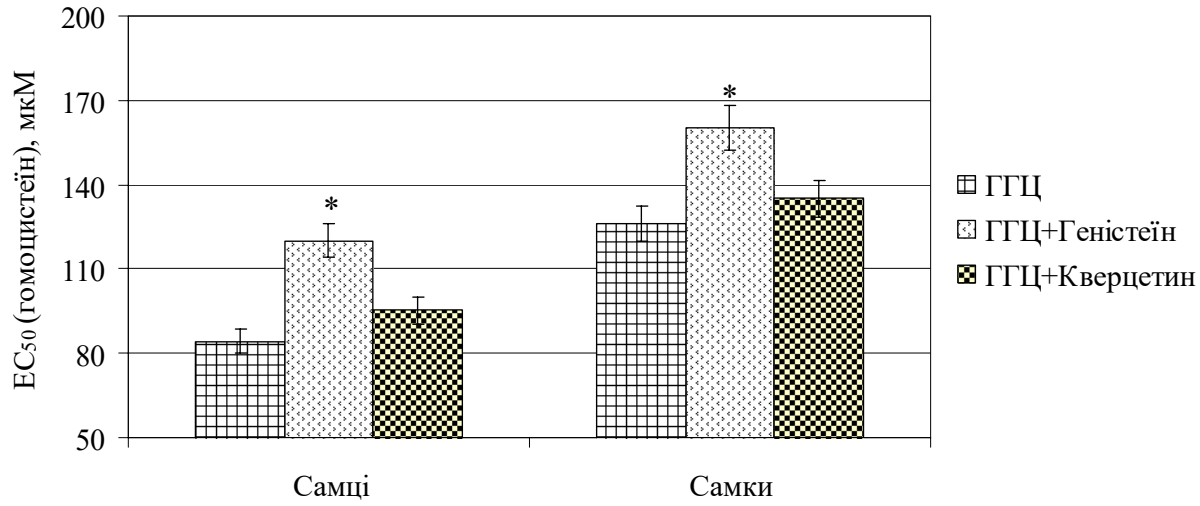


Рис 7.15. Вплив геністеїну та кверцетину на $ЕС_{50}$ гомоцистеїну в аорті щурів обох статей за умов ГГЦ (ГГЦ). Примітка: * - статистично достовірна відмінність ($p<0,05$) відносно групи ГГЦ.

Підсумовуючи результати цього розділу, слід відзначити, що застосована фармакотерапія за умов експериментальної ГГЦ володіла кардіопротекторною, ендотеліотропною дією, а також до певної міри

стримувала порушення метаболізму сірковмісних амінокислот та H_2S, однак істотно відрізнялась за ефективністю залежно від обраної сполуки. Використання геністеїну мало більшу ефективність, порівняно з кверцетином, щодо корекції вказаних порушень у самців і самок щурів. Показано, що висока фармакотерапевтична дія геністеїну за умов ГГЦ у щурів обох статей асоціюється з наступними його ефектами:

1) попереджує падіння швидкості утилізації гомоцистеїну в реакціях транссульфування, деградації цистеїну й утворення H_2S в печінці;
2) протидіє зростанню вмісту гомоцистеїну, цистеїну та зменшенню рівня H_2S в сироватці крові;
3) стримує розвиток дефіциту H_2S, зниження активності H_2S-синтезуючих ензимів у міокарді й аорті, зростання швидкості утилізації екзогенного H_2S та зниження активності його мітохондріального окиснення за участі сульфітоксидази в міокарді;
4) попереджує розвиток дисбалансу в про- та антиоксидантних системах серця й аорти, зміну фракційного розподілу глутатіону та виникнення тіол-дисульфідних порушень у міокарді, гіперактивацію вільнорадикального окиснення ліпідів і протеїнів у серці й аорті;
5) запобігає розвитку цитолізу кардіоміоцитів й ендотеліальної дисфункції;
6) стримує падіння релаксуючої дії H_2S та цистеїну та наростання констрикторної дії гомоцистеїну на кільцеві фрагменти аорти.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях [57, 60, 64, 288, 289].

РОЗДІЛ 8
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

На сьогодні ССЗ залишаються найбільш поширеною патологією в Україні і є основною причиною захворюваності, смертності, втрати працездатності, не зважаючи на значні досягнення у вирішені питань етіології, патогенезу, лікування та профілактики [86, 21]. В останні роки накопичені численні клінічні, експериментальні та епідеміологічні дані, які засвідчують, що вагому роль у розвитку ССЗ відіграє стать [161, 342. 33]. За даними останніх досліджень поширеність артеріальної гіпертензії зростає з віком і до 55 років переважає в чоловічій популяції, а після - в жіночій [86, 342]. Проблеми гендерної кардіології набувають великої значимості, адже відмінності у факторах ризику, клінічних проявах, діагностичних і лікувальних підходах для чоловіків та жінок є найбільш важливими саме при ССЗ [8, 38, 33].

Незважаючи на величезну кількість досліджень, повної ясності в розумінні молекулярних механізмів статевого диморфізму кардіоваскулярної патології ще немає. Вказані гендерні відмінності до певної міри пов'язують з різними біологічними ефектами статевих гормонів [111, 127, 350].

З кожним роком накопичується все більше даних про те, що досить важливим та незалежним фактором ризику ССЗ є порушення обміну сірковмісних амінокислот - гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) та гіперцистеїнемія [295, 324, 104, 278]. Показано, що у здорових дорослих жінок вміст гомоцистеїну та цистеїну в сироватці крові вірогідно менший, ніж у чоловіків того ж віку. В процесі старіння рівень гомоцистеїну зростає у осіб обох статей, однак вектор гендерних відмінностей поступово змінює свою направленість: у жінок в період менопаузи рівень гомоцистеїну стає достовірно вищим, ніж у чоловіків того ж віку. Проте причина цього явища дотепер ще нез'ясована.

Нещодавно було встановлено, що в процесі обміну гомоцистеїну та цистеїну утворюється біологічно активна речовина - H_2S, яка регулює тонус судин, скоротливість міокарду, агрегацію тромбоцитів, виявляє антиоксидантні, цитопротекторні, протизапальні та антиапоптичні властивості [28, 85, 110, 140, 208, 300]. Не виключено, що порушення обміну H_2S є одним із чинників різної поширеності ССЗ серед осіб чоловічої та жіночої статі, однак досліджень в цьому напрямку практично не проводилось.

З'ясування ролі статевих чинників в регуляції обміну сірковмісних амінокислот й асоційованих з ним процесів (зокрема, синтезу гідроген сульфіду), а також дослідження 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 корекції захворювань серцево-судинної системи у осіб різної статі.

Тому метою дослідження було з'ясувати статеві особливості обміну гомоцистеїну, цистеїну і гідроген сульфіду, оцінити їх зв'язок зі станом серцево-судинної системи в нормі та при гіпергомоцистеїнемії, і на цій основі оптимізувати підходи до корекції кардіоваскулярної патології, асоційованої з розладами метаболізму сірковмісних амінокислот.

На першому етапі роботи нами досліджений вплив статі та різного рівня статевих гормонів на вміст гомоцистеїну, цистеїну та гідроген сульфіду в сироватці крові, а також метаболізм сірковмісних амінокислот в печінці. Дефіцит статевих гормонів в організмі щурів створювали кастрацією 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 [100, 319]. Контрольним тваринам виконували розтин передньої черевної стінки з наступним пошаровим зашиванням рани («хибнооперовані»).

Замісну гормонотерапію у самців і самок щурів проводили шляхом введення 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 [136, 252]. Контрольні тварини отримували відповідно еквівалентні кількості розчинників. Ефект замісної терапії у тварин обох статей оцінювали за рівнем статевих гормонів у сироватці крові, а у самок ще й за допомогою вагінальних мазків.

Проведені дослідження показали, 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 (рис. 3.1, 3.4, 3.7). 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 на рівень досліджуваних сірковмісних речовин в крові: вміст гомоцистеїну та цистеїну достовірно зростає (на 16,9-22,7%), а рівень H_2S знижується на 23,4% (рис. 3.2, 3.5, 3.8). За цих умов змінюється вектор статевих відмінностей вмісту досліджуваних сірковмісних речовин в крові, порівняно з контрольними тваринами. Замісна гормонотерапія кастрованих тварин змінює направленість статевих відмінностей вмісту гомоцистеїну, цистеїну та H_2S до рівня контрольних тварин (рис. 3.3, 3.6, 3.9). Проведений кореляційний та персентильний аналізи засвідчили, що рівень статевих гормонів є важливим чинником, який детермінує вміст сірковмісних амінокислот та H_2S в крові (табл. 3.1, 3.2, 3.3). 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 ($r=-0,52$, $p<0,05$).

Високий рівень гомоцистеїну, цистеїну та низький рівень H_2S в сироватці крові є важливими чинниками серцево-судинних захворювань

[290, 251, 362; 180, 247, 206, 303, 242, 176, 165, 240, 132]. Тому, ймовірно, що більший вміст цих сірковмісних амінокислот та нижчий H_2S у самців, ніж у самок, є предикторами гендерасоційованої патології серцево-судинної системи.

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 [73], в подальшому ми оцінили вплив статі та рівня статевих гормонів на активність основних ферментів метаболізму гомоцистеїну, цистеїну та H_2S в печінці (табл. 3.4-3.7). 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. Проведення замісної гормонотерапії повертає вектор статевих відмінностей до рівня контрольних тварин.

Кореляційний та персентильний аналізи надали підтвердження, що метаболізм сірковмісних амінокислот і H_2S в печінці до певної міри регулюється статевими гормонами (табл. 3.8-3.11). 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.

Отримані результати до певної міри узгоджуються з даними літератури. Показано, що у дорослих здорових жінок активність реакцій реметилування та трансметилування є вищою, ніж у чоловіків [345]. Тестостерон викликає пригнічення експресії ЦБС в культурі ракових клітин простати [389]. Оваріектомія самок (дефіцит естрадіолу) супроводжується зменшенням активності та експресії ЦБС в матковій артерії [169]. Поряд з цим кастрація самок викликає зменшення експресії ЦГЛ в міокарді, тоді як замісна гормонотерапія естрадіолом відновлювала показники до рівня контрольної групи [168].

Механізми, через які реалізується регуляторний вплив статевих гормонів на активність ферментів обміну сірковмісних амінокислот та H_2S в печінці, достеменно не з'ясовані. Ймовірно, статеві гормони впливають на експресію відповідних генів, адже в літературі існують поодинокі дані про здатність тестостерону та естрадіолу регулювати експресію окремих ферментів метаболізму гомоцистеїну, цистеїну та H_2S [389; 168; 168]. Ще однією із причин може бути різна активність оксидативного стресу у тварин обох статей, адже ферменти МАТ та ЦБС є редокс-чутливими [248, 332, 353]. Тому, цілком очевидно, що у самців активність МАТ та ЦБС є вірогідно меншою, ніж у самок, оскільки у особин чоловічої статі інтенсивність оксидативного стресу є більшою [170, 189, 151].

В подальшому нами досліджений метаболізм H_2S в міокарді та аорті щурів різної статі та його зв'язок з рівнем в крові статевих гормонів, гомоцистеїну, цистеїну та H_2S. Дослідження ензиматичної продукції H_2S показало, що у самок активність в міокарді та аорті ЦГЛ, ЦАТ та ТСТ на 24,1-34,8% ($p<0,05$) більша, ніж у самців (рис. 4.1, 4.4, 4.7). Кастрація самців викликає вірогідне збільшення активності ЦГЛ, ЦАТ та ТСТ в міокарді та аорті на 21,6-41,4% ($p<0,05$), відносно контролю (табл. 4.2-4.4). Натомість оваріектомія самок викликала зменшення активності вказаних ензимів в

міокарді та аорті на 20,0-35,3% ($p<0,05$), відносно контролю (табл. 4.3-4.5). У кастрованих тварин змінювалась направленість статевих відмінностей активності H_2S-синтезуючих ензимів: у самців вона була вірогідно більша, ніж у самок. Замісна терапія кастрованих тварин відповідно естрадіолом та тестостероном направляє показники активності до рівня контрольної групи тварин (табл. 4.2-4.4). Зауважимо, що фізіологічне зменшення вмісту статевих гормонів в процесі старіння супроводжується зменшенням активності вказаних ферментів як у самців, так і у самок щурів (табл. 4.5). Низьку активність H_2S-синтезуючих ензимів у самців, порівняно з самками, можна пояснити більш високими концентраціями гомоцистеїну, цистеїну у особин чоловічої статі, які є субстратними інгібіторами ЦГЛ, ЦАТ та ТСТ [45]. Правомірність цього твердження доводять результати кореляційного аналізу (табл. 4.12): між рівнем гомоцистеїну, цистеїну в сироватці крові та активність H_2S-синтезуючих ензимів існують вірогідні обернені зв'язки ($r=-(0,44-0,69)$; $p<0,05$).

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. Виявилось, що у самців середній рівень цього показника менший на 46,9% ($p<0,05$), ніж у самок (рис. 4.3). 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 (рис. 4.16). 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. Отримані результати узгоджуються з даними літератури щодо впливу естрадіолу на експресію гену *CSE* в міокарді [168]. Кореляційний аналіз показав (табл. 4.12), 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.

Статеві гормони можуть впливати також і на кінетичні параметри продукції H_2S в міокарді та аорті. Тому, в подальшому 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. 4.8-4.11, 4.17-4.24). 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. 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). Залишаються невідомими механізми, через які реалізується вплив статевих гормонів на кінетичні параметри ЦГЛ. Можливо, такі ефекти статевих гормонів опосередковується через їх різноспрямований вплив на рівень активних форм кисню, адже останні можуть модифікувати контактну та каталітичну ділянку активного центру ферменту, впливати на біодоступність кофактору [111].

Деградація H_2S відбувається переважно за участі мітохондріальних ензимів: спочатку сульфідхіноноксидоредуктазна система (SQR) окиснює H_2S до тіосульфат-аніону та сульфіт-аніону, останній перетворюється в

сульфат-аніон сульфітоксидазою. Також H_2S може безпосередньо реагувати з мітохондріальними гемпротеїнами (цитохромоксидазою та цитохромом с) та активними формами кисню з утворенням сульфану та реакційноздатного тіїльного радикалу (HS•) [256]. В цитозолі H_2S метилується до метантіолу та диметилсульфіду за участі тіол-S-метилтрансферази.

Виникає питання, чи існують статеві відмінності утилізації H_2S в міокарді. Загальну здатність міокарду до утилізації H_2S ми оцінили за допомогою модельної системи (Патент №87884). Як відомо, у водних розчинах при pH 7,4 біля 70-80% H_2S існує у вигляді гідрогенсульфід-аніону ($H_2S \leftrightarrow H^+ + HS^-$; pK_a =6,89) [351], тому в якості його донорів *in vitro* та *in vivo* використовують NaHS або Na_2S. До середовища з відомою концентрацією Na_2S та pH 7,4, ми додавали пост'ядерні супернатанти гомогенатів міокарду, інкубували при 37^{o}C в герметизованих пробірках, і через певні проміжки часу реєстрували зниження вмісту гідрогенсульфід-аніону. До речі, ця модельна система дозволяє оцінити і швидкість окислювальної деградації H_2S, оскільки тіол-S-метилтрансферазний шлях потребує присутності косубстрату S-аденозилметіоніну. Виявилось, що у самців швидкість утилізації H_2S була вищою на 31,5% ($p<0,05$), ніж у самок щурів (рис. 4.12). Кастрація тварин чинить різноспрямований вплив на споживання H_2S міокардом (табл. 4.5): 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. За цих умов змінюється вектор статевих відмінностей питомої швидкості утилізації екзогенного H_2S в міокарді: у кастрованих самок цей показник був більшим на 24,5% ($p<0,05$), а в контрольній групі - меншим на 81,0% ($p<0,05$), відносно відповідної групи самців. 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. За цих умов показники споживання H_2S міокардом наближались до рівня контрольної

групи тварин. Можна припустити, що статеві особливості утилізації H_2S міокардом є наслідком різноспрямованого впливу статевих гормонів на генерацію активних форм кисню [262, 127, 111]. Ще однією можливою причиною більшої швидкості утилізації H_2S у самців є статеві особливості вмісту в крові гомоцистеїну, цистеїну та H_2S, які регулюють процеси генерації та утилізації активних форм кисню [269, 380, 335, 201, 329]. Додаткові підтвердження цьому надає кореляційний аналіз (табл. 4.12): швидкість утилізації H_2S в міокарді тварин обох статей залежить від рівня гомоцистеїну ($r=0,50-0,56$; $p<0,05$), цистеїну ($r=0,48-0,52$; $p<0,05$) та H_2S крові ($r=-(0,50-0,61)$; $p<0,05$).

Далі ми дослідили вміст H_2S у самців та самок щурів залежно від рівня насиченості статевими гормонами (рис. 4.14-4.15, табл. 4.7). 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 контрольної групи тварин. 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 (табл. 4.12).

Отже в міокарді та аорті самців рівень H_2S вірогідно менший, ніж у самок. Відомо, що H_2S відіграє важливу роль у функціонуванні серцево-судинної системи: регулює тонус судин, скоротливість міокарду, агрегацію тромбоцитів, виявляє антиоксидантні, цитопротекторні, протизапальні та антиапоптичні властивості [373, 229, 208, 110, 300, 140]. Враховуючи вищенаведене, можна припустити, що статеві особливості вмісту H_2S в міокарді та аорті є чинником більшої резистентності до пошкоджень серцево-судинної системи у самок, порівняно з самцями.

В наступній частині роботи ми оцінили вплив статі та різного рівня насиченості організму тварин статевими гормонами на біохімічні та функціональні показники стану міокарду та аорти щурів та їх зв'язок з вмістом H_2S в серцево-судинній системі щурів. Спершу оцінено показники про- і антиоксидантної системи в серці та аорті щурів (табл. 5.1-5.6). 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 на 42,6% ($p<0,05$) та достовірно менший вміст відновленого глутатіону 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 направленість гендерних відмінностей показників стану про-антиоксидантної системи 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 [142, 111]. Доказом цього є результати кореляційного аналізу. 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.

Отримані результати знаходять своє підтвердження і в літературі. Нещодавні дослідження показали, що продукція реактивних кисневих інтермедіатів судинною системою у осіб чоловічої статі вірогідно більша, ніж у жінок [344, 151]. У жінок в постменопаузальному віці відмічається зростання продукції активних форм кисню, що пов'язують з розвитком дефіциту естрогенів [344]. Відмінності рівня реакційноздатних кисневих дериватів у чоловіків та жінок є наслідком різної активності про-

антиоксидантних ензимів у серцево-судинній системі. Виявилось, що у особин чоловічої статі активність прооксидантної НАДФН-оксидази є вірогідно більшою, а активність антиоксидантної супероксиддисмутази достовірно меншою, ніж у осіб протилежної статі [170; 189, 150]. Існують дані, що в гомогенаті адипоцитів щурів вміст відновленого глутатіону та активність супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази вірогідно більша, а активність процесів ліпопероксидації менша у самців, ніж у самок. Кастрація самок супроводжується вірогідним зниженням вмісту відновленого глутатіону та активності вказаних антиоксидантних ензимів, а також збільшенням інтенсивності пероксидації ліпідів, тоді як гонадектомія самок має протилежний вплив [148, 333, 296].

Ще однією із можливих причин гендерних відмінностей стану про-антиоксидантних систем є особливості вмісту H_2S в міокарді самців та самок щурів, адже відомо, що H_2S є потужним антиоксидантном [201, 269, 228, 335, 365, 380]. Підтверджують це 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 мікарді та аорті виникали обернені кореляції ($r=-(0,61-0,75)$, $p<0,05$).

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. 5.7, рис. 5.1-5.2). Виявилось, що у самців контрольної групи відносна кількість клітин у фазі синтезу ДНК та фазі G2+M (з вмістом ДНК=4с) відповідно на 30,3 та 25,4% ($p<0,05$) більша, порівняно з самками. Також у самців кількість клітин з фрагментованою ДНК (SUB-G0G1) на 17,2% ($p<0,05$) більша, порівняно з самками. 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. 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 приблизно однакової сили між рівнем H_2S в міокарді та відносною 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 $r=-(0,57-0,63)$, $p<0,05$).

Проведені дослідження свідчать про наявність статевих особливостей фрагментації ДНК та клітинного циклу в міокарді щурів, що ймовірно є одним із визначальних чинників різної толерантності серця самців та самок до пошкодження. Так, у самців резистентність міокарду до патогенних чинників менша, ніж у самок. Доказом цього є наступні особливості фрагментації ДНК та показників клітинного циклу в міокарді самців, порівняно з самками: 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=4c) 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.

Гонадектомія тварин змінює вектор статевих відмінностей показників вмісту ДНК в ядрах клітин серця. Так, у кастрованих самок зростає інтенсивність апоптозу, поліплоїдизації та проліферації, що свідчить про

зменшення резистентності міокарду самок до патогенних чинників. Натомість, орхідектомія самців супроводжується протилежними змінами.

Виникає питання щодо молекулярних механізмів, які інтегровані до формування статевих особливостей перебігу клітинного циклу в міокарді тварин. Основним чинником цих відмінностей є різноспрямована дія статевих гормонів: естрогени володіють антиапоптичними ефектом, натомість тестостерон індукує апоптоз [111]. Однак, остаточні механізми впливу статевих гормонів на процеси апоптозу залишаються невизначеними. Невідомий також вплив естрадіолу та тестостерону на перебіг клітинного циклу в міокарді щурів.

Можливо, статеві відмінності вмісту H_2S в міокарді є ще одним із факторів, які забезпечують особливості перебігу клітинного циклу у самців та самок щурів. Відомо, що H_2S має антиапоптичну дію, яка реалізується через різноманітні механізми: 1) сульфгідрування NF-kβ викликає його транслокацію в ядро, що супроводжується зменшенням синтезу проапоптичного білку Bax, збільшенням синтезу антиапоптичного білку Bcl-2 та інгібіторних білків, які блокують апоптоз, опосередкований через рецептори TNFR 1 і Apo 3 [226, 385]; 2) сульфгідрування K^+АТФ-каналів веде до фосфорилування протеїнкінази С, яка активує Ca^{2+}-АТФ-азу саркоплазматичного ретиулуму, що супроводжується зменшенням цитоплазматичної концентрації Ca^{2+} та стабілізацією мітохондріальної пори [108]. H_2S має здатність зменшувати активність поліплоїдизації кардіоміоцитів через індукцію трансформуючого фактора росту TGF-β, який збільшує експресію циклінзалежних кіназ Cdk-2, 4 [348, 116]. Також показано, що H_2S зменшує активність фіброгенезу, адже збільшує експресію TGF-β, що супроводжується активацією білків родини Smad, які пригнічують проліферацію фібробластів та їх трансформацію в міофібробласти [237, 165].

Таким чином, у самок резистентність міокарду до пошкодження є меншою, ніж у самців, адже естрогени збільшують синтез H_2S в міокарді, що супроводжується зменшенням активності фіброгенезу, поліплоїдизації та

апоптозу. Натомість низька резистентність міокарду самців до патогенних чинників асоціюється з тестостероном, який зменшує продукцію H_2S, що веде до зростання активності фіброгенезу, поліплоїдизації та апоптозу.

Далі ми оцінили показники кардіогемодинаміки у тварин різної статі та з різним рівнем насиченості статевих гормонів (табл. 5.8). Отримані дані засвідчили, 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. 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 $r=0,60$, $p<0,05$).

Причиною відмінностей мікроциркуляції у самців та самок може бути різноспрямований вплив статевих гормонів на тонус судинної стінки – естрогени є вазодилятаторами, тоді як тестостерон викликає вазоконстрикцію [111, 142]. Не виключено, що певну роль в цьому належить різній насиченості організму самців та самок H_2S, який є знаним вазодилятатором [74, 373, 229, 208, 110].

В подальшому проведені стендові дослідження скоротливості аорти під впливом H_2S, цистеїну та гомоцистеїну у тварин різної статі та з різним рівнем статевих гормонів (рис. 5.3-5.15). Встановлено, що 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%, $p<0,05$). 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 показав, що 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 ($r=-0,57$, $p<0,05$). Також виникають обернені асоціативні зв'язки між рівнем H_2S в аорті тварин обох статей та EC_{50} H_2S і цистеїну ($r=-0,54$-$0,62$, $p<0,05$), а прямі кореляції з EC_{50} гомоцистеїну ($r=0,58$-$0,66$; $p<0,05$).

Виникає питання щодо причини появи статевих відмінностей регуляції тонусу судин під впливом сірковмісних сполук. Відомо, що вазодилятуюча дія H_2S реалізується через активацію редокс-чутливих K^+АТР – каналів [265]. В той же час існують статеві відмінності процесів вільнорадикального окиснення, що може бути однією із причин особливостей H_2S-індукованої вазодилятації аорти у самців та самок [148, 333, 296]. Також показано, що релаксація судин під впливом H_2S опосередковується через активацію ендотеліальної NO-синтази [337]. Між тим, відомо, що тестостерон інгібує активність цього ферменту, а естрадіол викликає його активацію [111, 142]. Тому, різноспрямований вплив статевих гормонів на активність ендотеліальної NO-синтази є ще однією із причин статевих відмінностей H_2S-індукованої вазодилятації аорти. Останнім часом показано, що активуючий вплив на ендотеліальну NO-синтазу має H_2S [224, 322, 225]. Тому, цілком

очевидно, що статеві особливості вмісту H_2S в міокарді є важливим чинником різного ступеня релаксації аорти під впливом H_2S у самців та самок.

Вазодилятація аорти під впливом цистеїну реалізується через активацію ЦГЛ [337]. В той же час нами показано, що введенням естрадіолу супроводжується зростанням активності ЦГЛ, а тестостерону – зниженням його активності. Отже, секс специфічна цистеїн-стимульована вазодилятація може бути обумовлена різновекторним впливом статевих гормонів на активність ЦГЛ. З літератури відомо, що активність ЦГЛ інгібується високими концентраціями цистеїну [45]. Між тим, нами зафіксовано, що у самок вміст цистеїну менший, що може бути причиною більш виразної дилятації аорти під впливом цистеїну, ніж у самців.

Констрикторна дія гомоцистеїну на аорту опосередковується через зменшення ендотелій залежної ацетилхолін-індукованої вазодилятації. Більш виразна вазоконстрикторна дія гомоцистеїну у самців обумовлена здатністю тестостерону інгібувати активність ендотеліальної NO-синтази, адже саме через цей фермент опосередковується вазодилятуюча дія ацетилхоліну [111, 142]. В той же час у самок естрадіол проявляє активуючий вплив на ендотеліальну NO-синтазу, тому констрикторна дія гомоцистеїну у особин цієї статі є меншою, ніж у самців [111, 142].

В наступній частині роботи ми оцінили існування відмінності впливу модуляторів обміну H_2S на показники стану міокарда у самців та самок щурів. З цією метою були використані необоротний інгібітор ЦГЛ D,L-пропаргілгліцин та донор H_2S - NaHS. Пропаргілгліцин (50 мг/кг) та NaHS (3 мг/г) вводили упродовж 14 діб інтраперитонеально у дозах, які не викликають загибелі тварин і використовуються у більшості досліджень *in vivo*. Зауважимо, що NaHS вводився в умовно терапевтичній дозі, яка має цитопротекторний, антиоксидантий, протизапальний ефекти [14, 209].

Двотижневе введення пропаргілгліцину викликає депримуючий вплив на продукцію H_2S за участі ЦГЛ в міокарді та аорті, причому більш виразні зміни відмічались у самців (табл. 5.9-5.10). 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. На тлі застосування пропаргілгліцину відмічається поглиблення статевих відмінностей активності ЦГЛ та вмісту H_2S в серцево-судинній системі. 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 його ефект був більш виразним (табл. 5.11-5.16). 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%, $p<0,05$). На тлі його застосування поглиблювались статеві відмінності стану про-антиоксидантних систем. При введенні NaHS спостерігався протилежний ефект - підвищувалась активність антиоксидантної ланки та зменшувались ознаки оксидативного стресу: реєструвалось зростання активності супероксиддисмутази (у самців на 19,0-21,4%, а у самок на 13,1-14,1%, $p<0,05$), тіоредоксинредуктази (у самців на 18,5%, а у самок на 12,1%, $p<0,05$), запасів відновленого глутатіону (у самців на 21,4%, а у самок на 14,6%, $p<0,05$), зменшення активності НАДФН-оксидази (у самців на 25,9-29,9%, а у самок на 18,4-20,1%, $p<0,05$), вмісту МДА та КГП (у самців на 21,1-31,3%, а у самок на 13,1-16,9%, $p<0,05$).

Вищенаведені результати свідчать, що у самців на тлі застосування пропаргілгліцину порушення обміну H_2S є вірогідно більшими, що детермінує істотне посилення генерації активних форм кисню, окисної модифікації

протеїнів та ліпідів, зниження антиоксидантного захисту та порушення тіол-дисульфідного обміну, порівняно з самками.

Цілком очевидно, що молекулярні механізми антиоксидантної дії H_2S не обмежуються його безпосередньою взаємодією з активними формами кисню, сульфгідрильними групами мембранних та цитозольних протеїнів, електрофільними метаболітами, а й реалізуються на рівні регуляції активності певних ензимів [213]. Ця думка підтверджується здатністю модуляторів обміну H_2S (пропаргілгліцину та NaHS) викликати протилежні зміни активності антиоксидантних (тіоредоксинредуктази, СОД) / прооксидантних ензимів (NADPH-оксидази) та наявністю достовірних кореляційних зв'язків між показниками про-антиоксидантної системи та вмістом H_2S в міокарді. Існують дані, що донори H_2S посилюють експресію тіоредоксину-1 в міокарді мишей з серцевою недостатністю [301], стимулюють експресію СОД, тіоредоксиредуктази та зменшують вміст МДА в культурі нейрональних клітин [230]. Існують дані, що NaHS підвищує експресію ЦГЛ і гемоксигенази та зменшує експресію NADPH-оксидази в кардіальних фібробластах, що перешкоджає постінфарктному фіброзуванню міокарду у щурів [244]. В присутності пропаргілгліцину в культурі тканини посилюється H_2O_2-індукована цитотоксичність, аналогічний ефект спостерігається і при пригніченні експресії ЦГЛ, викликаної нокаутом її генів [370].

Здатність NaHS підвищувати, а пропаргілгліцину зменшувати вміст відновленого глутатіону в міокарді підтверджує участь H_2S в регуляції глутатіонового гомеостазу. Єдиної думки щодо механізмів впливу H_2S на систему глутатіону на сьогодні не існує. Встановлено, що NaHS та Na_2S можуть відновлювати глутатіондисульфід та вивільняти глутатіон із змішаних дисульфідів, стимулювати транспорт цистеїну в клітини [263], підвищувати активність глутатіон-S-трансферази [349] та глутатіонсинтетази [230]. Інкубація клітин з екзогенним H_2S викликає зростання вмісту GSH та відношення GSH/GSSG [370].

Застосування пропаргілгліцину супроводжується розвитком цитолізу кардіоміоцитів (табл. 5.17), про що доказово свідчить зростання в крові активності АСТ та КФК у самців відповідно на 36,5 та 32,5% ($p<0,05$), а у самок - на 22,8 та 23,3% ($p<0,05$), відносно контролю. Введення NaHS не супроводжується вірогідним впливом на активність вказаних ферментів. Модулятори обміну H_2S впливають на вміст в крові sVCAM-1, причому більш виразний вплив реєструвався у самців (табл. 5.18). Введення пропаргілгліцину викликає розвиток ендотеліальної дисфункції, доказом чого є зростання рівня цієї молекули адгезії в крові у самців на 44,4% ($p<0,05$), а у самок – на 30,4% ($p<0,05$), відносно контролю. В той же час застосування NaHS викликає 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.

Використання модуляторів обміну H_2S має різнонаправлений вплив на чутливість стінки аорти до дії H_2S, цистеїну та гомоцистеїну (рис. 5.16-5.18, 5.21-5.26). 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.

Нещодавно було показано, що у зв'язку із здатністю впливати на експресію прозапальних цитокінів та молекул адгезії інгібітори ЦГЛ мають ендотеліотоксичний та проатерогенний ефект, в той час як донори H_2S – ендотеліопротекторний та антиатерогенний. Зокрема, в присутності NaHS чи Na_2S пригнічується продукція прозапальних цитокінів (ТНФ-α) та міжклітинних молекул адгезії (ICAM-1) у макрофагах, активованих окисленими ЛПНЩ, що спричиняє зменшення їх адгезивності до ендотеліоцитів, в той же час інгібітори ЦГЛ (пропаргілгілин, β-ціаноаланін) викликали протилежний ефект [144].

Враховуючи той факт, що донори H_2S володіють кардіопротекторним, ендотеліотропним, антиоксидантим та цито-протекторними ефектами у самців та самок, на наступному етапі ми оцінили вплив H_2S на перебіг ішемії / реперфузії серця у самців та самок щурів. Дослідження проведені на двох групах: 1) тварини з ішемією / реперфузією (IP), яким вводили фізіологічний розчин за 15 хв. до ішемії впродовж 1 год після реперфузії; 2) щурі, яким вводили NaHS за 15 хв. до ішемії та впродовж 1 год після реперфузії. Параметри гемодинаміки та вміст H_2S реєстрували тричі у кожній групі: фоновий рівень (вихідні дані) після їх стабілізації, після лігування судини (ішемія) та через 1 год на тлі реперфузії.

За умов ішемії серця відмічається зниження функціональних показників у тварин обох статей, причому у самців вказані зміни були більш виразними (табл. 5.19). 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. Отже, на тлі ішемії між самцями і самками з'являються вірогідні відмінності за показниками SaO_2, ТЛШ та ТПШ і поглиблюються відмінності КМ. 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. За цих умов зберігаються статеві відмінності між досліджуваними показниками. 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 в контрольній групі.

В подальшому була оцінена динаміка вмісту H_2S в сироватці крові на тлі ішемії / реперфузії та за умов застосування NaHS (табл. 5.20). Виявилось, що фоновий рівень H_2S в сироватці крові самців вірогідно менший на 17,8% ($p<0,05$), ніж у самок. 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.

Кореляційний аналіз надав вагомі докази причетності системи H_2S до порушень мікроциркуляції та кардіогемодинаміки у самців та самок щурів на тлі ішемії / реперфузії. Виявилось, що рівень H_2S в сироватці крові виявляє прямі асоціативні зв'язки з КМ, SaO_2, ТЛШ та ТПШ (у самців r=0,54-0,62; у самок r=0,60-0,70, p<0,05), причому у самок вони дещо сильніші.

Таким чином, проведені дослідження засвідчили, що ішемія міокарду на тлі оклюзії лівої коронарної артерії у самців та самок щурів супроводжується зменшенням рівня H_2S в сироватці крові, що асоціюється з пригніченням мікроциркуляції та кисневого забезпечення кардіоміоцитів ЛШ (зменшується КМ та SaO_2), послабленням його скоротливої здатності та порушенням внутрішньошлуночкової гемодинаміки (знижується ТЛШ та ТПШ). Реперфузія вінцевої судини у тварин обох статей не викликала повного відновлення вмісту H_2S в сироватці крові та показників кардіогемодинаміки до фонового рівня, що свідчить про формування синдрому невідновленого вінцевого кровообігу (no-reflow). Отже, пошкодження міокарду на тлі ішемії та наступної реперфузії до певної міри можна пояснити зменшенням вмісту H_2S в сироватці. Отримані дані знаходять своє підтвердження в літературі. Показано, що на тлі ішемії серця в кардіоміоцитах зменшується експресія ЦГЛ та продукція H_2S [336]. В той же час після реперфузії реєструється зростання експресії ЦГЛ та синтезу H_2S в кардіоміоцитах [159]. Кардіотоксична дія дефіциту H_2S на тлі ішемії опосередковується через різноманітні механізми: 1) розвиток оксидативного стресу та запалення; 2) активація апоптозу кардіоміоцитів; 3) спазм коронарних артерій [229, 383].

В роботі показано, що оклюзія лівої коронарної артерії у самців має більш важкий перебіг, а реканалізація інфаркт-залежної судини відбувається менш повноцінно, ніж у самок. Це можна пояснити різноспрямованою дією статевих гормонів: естрадіол володіє кардіопротекторною дією, тоді як ефекти тестостерону є протилежними [111]. 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 міокарду тварин цієї статі до пошкодження, порівняно з самцями.

Превентивне (за 15 хв. до вінцевої оклюзії) в/в інфузійне введення водного розчину NaHS в дозі 3 мг/кг не тільки перешкоджало розвитку ішемії серцевого м'яза, а й сприяло більш повноцінній реканалізації за рахунок покращення ефективної перфузії, що може бути одним із механізмів його коронарогенної кардіопротективної активності. Такий ефект NaHS на тлі ішемії / реперфузії констатується в ряді досліджень [229, 234]. Здатність донора H_2S зменшувати розмір пошкодження міокарда пов'язують з його антиапоптичною активністю, яка реалізується через пригнічення активності каспази-3, кальциневрину та зменшення експресії Fas та FasL [229]. Поряд з цим показано, що NaHS викликає інгібування оксидативного стресу через активацію супероксиддисмутази, індукує експресію eNOS та продукцію нітроген монооксиду, а також через K^+АТФ-катали викликає розслаблення гладеньких м'язів судин і покращує кровопостачання міокарду за умов ішемії / реперфузії [383]. За результатами досліджень з'ясувалось, що кардіопротективний ефект донору H_2S співставний у самців та самок. Це є перспективним напрямком для подальших досліджень щодо використання препаратів, які впливають на систему H_2S, для корекції пошкоджень міокарда при гендерасоційованих патологіях серцево-судинної системи.

Проведені дослідження показали, що різний вміст H_2S в міокарді й аорті самців та самок щурів є важливим чинником, який визначає статеві відмінності різної чутливості серця та судин до дії патогенних факторів. На рис 8.1 показані механізми, через які реалізується різноспрямований вплив статевих гормонів на резистентність міокарду та аорти до пошкодження.

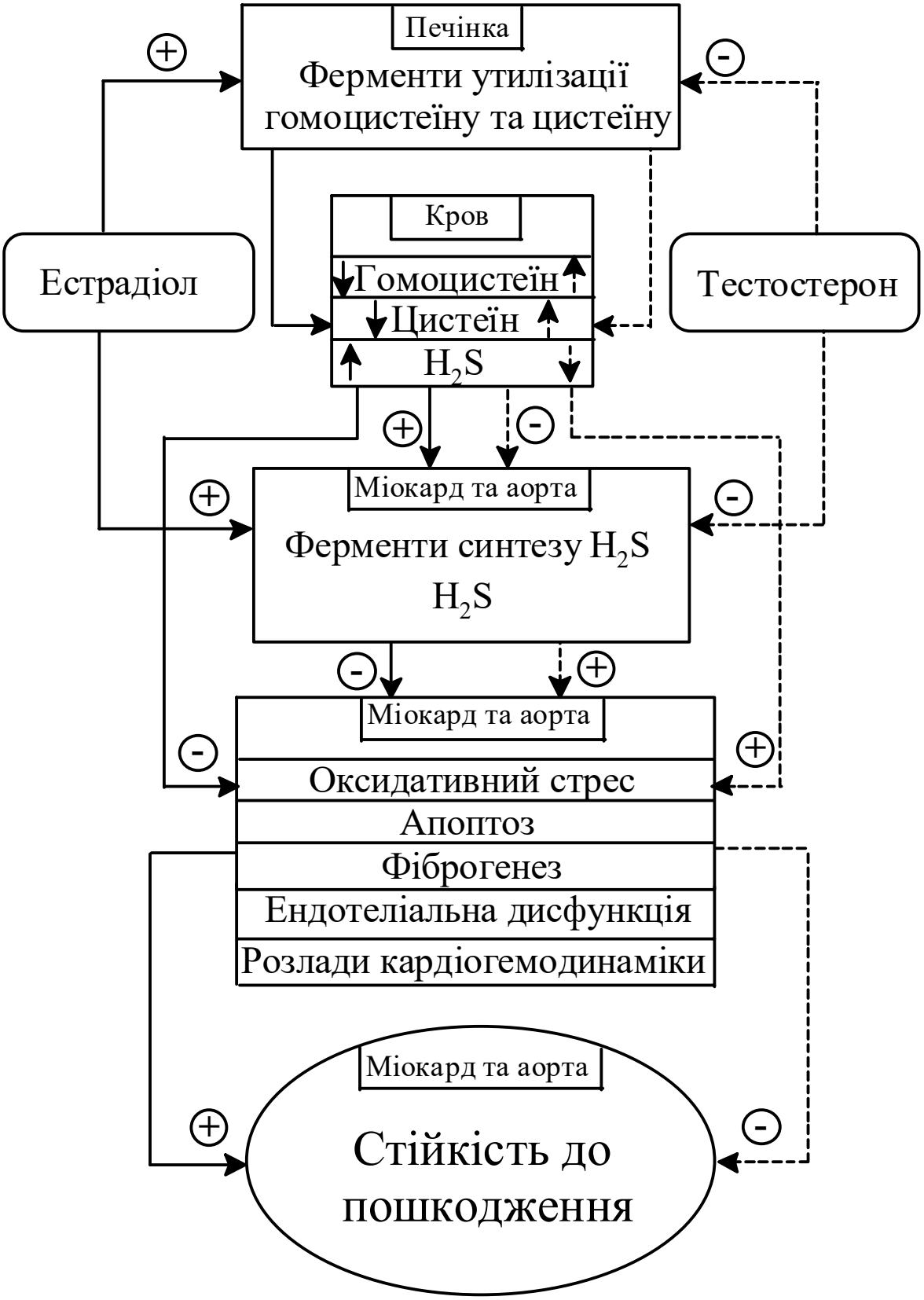


Рис 8.1 Молекулярні механізми реалізації різноспрямованого впливу статевих гормонів на резистентність міокарду та аорти до пошкодження. Примітки: пунктирна стрілка - вплив тестостерону, суцільна стрілка – естрадіолу.

В наступній частині роботи ми оцінили існування статевих особливостей впливу тривалого навантаження щурів тіолактоном гомоцистеїну на метаболізм сірковмісних амінокислот та H_2S, показники стану міокарду та аорти щурів. Тіолактон D,L-гомоцистеїну (Sigma, США) вводили інтрагастрально в дозі 100 мг/кг маси на 1% розчині крохмалю 1 раз на добу протягом 28 діб [204].

Введення тіолактону гомоцистеїну протягом 28 діб супроводжується зростанням 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 зменшенням 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 (рис. 6.1-6.3). За умов тіолактонової ГГЦ поглиблюється статевий диморфізм вмісту вказаних сірковмісних метаболітів в крові.

Тривале введення тіолактону гомоцистеїну супроводжується зменшенням швидкості утилізації гомоцистеїну в реакціях реметилування та транссульфування, а також деградації цистеїну в окисному, кон'югаційному та десульфуразному шляхах (табл. 6.1-6.3). 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%, $p<0,05$, відносно контролю), ніж у самок (на

13,5-17,5%, $p<0,05$, відносно контролю). Статеві відмінності активності ензимів утилізації гомоцистеїну, цистеїну та утворення H_2S в печінці вірогідно посилюються за умов модельованої патології. Очевидно, що вихідні відмінності рівня гомоцистеїну, цистеїну,H_2S в крові та активності ферментів їх метаболізму в печінці у самців та самок є потенційним базисом для поглиблення статевого диморфізму на тлі ГГЦ.

Далі ми оцінили вплив ГГЦ на метаболізм H_2S в міокарді та аорті самців та самок щурів (рис. 6.4, табл. 6.5-6.6). 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. 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 відмічалось 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. Відомо, що визначальними чинниками обміну H_2S є вміст активних форм кисню, гомоцистеїну та цистеїну в крові [45, 332]. Нами показано, що за умов ГГЦ посилюються статеві відмінності обміну гомоцистеїну, цистеїну в печінці та процеси вільнорадикального окиснення, що ймовірно і є причиною більш істотних порушень обміну H_2S в міокарді та аорті самців.

ГГЦ ініціює розвиток дисбалансу про-антиоксидантних ензимів в міокарді та аорті щурів обох статей, який є істотно більшим у самців (табл. 6.8-6.10, 6.12-6.13). 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.

Виникає питання щодо причин, які обумовлюють статеві відмінності перебігу вільнорадикальних процесів в міокарді щурів за умов ГГЦ. Як відомо, високі рівні гомоцистеїну та низький вміст H_2S є важливими ініціаторами розвитку оксидативного стресу [269, 263]. Нами показано, що тривале введення тіолактону гомоцистеїну викликає стать-специфічні зміни рівня цих метаболітів: у самців відмічається більш виразне зростання рівня гомоцистеїну в сироватці крові та зменшення вмісту H_2S в міокарді та аорті, ніж у самок. Результати кореляційного аналізу надали вагомі докази існування зв'язків між рівнем гомоцистеїну, H_2S та показниками оксидативного стресу в міокарді та аорті у самців й самок щурів за умов ГГЦ. Очевидно, статеві відмінності рівнів гомоцистеїну в крові та H_2S в міокарді можуть бути однією із причин різної активності процесів вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів у самців і самок на тлі ГГЦ.

ГГЦ спричиняє розвиток цитолізу кардіоміоцитів у тварин обох статей, але виразність вказаних змін більша у самців (табл. 6.11), про що доказово свідчить зростання в крові активності АСТ (на 39,2% у самців проти 24,9% у самок, p<0,05) та КФК (на 42,5% у самців проти 31,3% у самок, p<0,05), порівняно з відповідним контролем. За цих умов між активністю АСТ і КФК та вмістом гомоцистеїну в крові виникають прямі зв'язки (у самців r=0,66-0,69; у самок r=0,59-0,64; p<0,05), тоді як з вмістом H_2S в міокарді - обернені зв'язки (у самців r=-0,79; -0,76, p<0,05; у самок r=-0,65; -0,66, p<0,05). Кореляційний аналіз підтвердив важливу роль високого рівня ГЦ та низького вмісту H_2S в міокарді у розвитку цитолізу кардіоміоцитів.

Експериментальна ГГЦ ініціює розвиток ендотеліальної дисфункції у тварин обох статей, причому її виразність достовірно вища у самців (рис. 6.6). Тривала ГГЦ супроводжується зростанням в крові вмісту sVCAM-1 у самців на 50,3% ($p<0,05$), а у самок - на 35,6% ($p<0,05$). За цих умов між рівнем sVCAM-1 та вмістом гомоцистеїну в крові виникають прямі зв'язки (у самців $r=0,70$; у самок $r=0,66$; $p<0,05$), тоді як з вмістом H_2S в аорті - обернені (у самців $r=-0,78$, $p<0,05$; у самок $r=-0,69$, $p<0,05$). Ще одним важливим доказом розвитку ендотеліальної дисфункції на тлі ГГЦ є зменшення H_2S- та цистеїн-стимульованого розслаблення та збільшення гомоцистеїн-індукованої вазоконстрикції кілець аорти (рис. 6.7-6.14). За цих умов відмічалось збільшення EC_{50} H_2S та цистеїну в аорті у самців та самок відповідно на 32,8-40% та 21,1-26,8% ($p<0,05$) та зменшення EC_{50} гомоцистеїну у самців на 40,0% ($p<0,05$), а у самок на 34,9% ($p<0,05$), відносно контролю.

Відомо, що ГГЦ та дефіцит H_2S викликає розвиток ендотеліальної дисфункції через різноманітні механізми: активацію оксидативного стресу, запалення, гомоцистеїнування протеїнів, гіпометилування, порушення продукції вазоактивних медіаторів [269, 238 159, 73]. В той же час на тлі тривалого введення тіолактону гомоцистеїну реєструється різний ступінь гомоцистеїнемії та дефіциту H_2S у самців та самок, що може бути однією із причин статевих відмінності ендотеліальної дисфункції за умов тіолактонової ГГЦ.

Проведені дослідження засвідчили, що тривале введення тіолактону гомоцистеїну супроводжується змінами біохімічних та фізіологічних процесів в печінці та серцево-судинній системі у щурів обох статей, причому у самців виразність вказаних порушень є вірогідно більшою. До таких змін відносять наступні: 1) зменшується швидкість утилізації гомоцистеїну, цистеїну та утворення H_2S в печінці; 2) зростає вміст гомоцистеїну, цистеїну та зменшується рівень H_2S в сироватці крові; 3) зменшується рівень H_2S, активність H_2S-синтезуючих ензимів в міокарді та аорті, зростає швидкість

утилізації екзогенного H_2S та знижується активність його мітохондріального окиснення за участі сульфітоксидази в міокарді; 4) виникає дисбаланс в про- та антиоксидантних системах серця та аорти, змінюється фракційний розподіл глутатіону (зростає рівень його окисненої форми та зменшується відновленої форми), формуються тіол-дисульфідні порушення в міокарді, активуються процеси вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів в серці та аорті; 5) розвивається цитоліз кардіоміоцитів та ендотеліальна дисфункція, зменшується релаксуюча дія на кільцеві фрагменти аорти H_2S й цистеїну та зростає констрикторна дія гомоцистеїну.

На сьогодні актуальним залишається пошук ефективних та безпечних шляхів корекції стать-специфічної кардіоваскулярної патології, асоційованої з порушеннями обміну сірковмісних амінокислот. Цьому напрямку був присвячений останній етап нашого дослідження. З метою корекції стать-специфічних розладів, індукованих ГГЦ, нами були обрані поліфенольні сполуки кверцетин та геністеїн, які володіють політропними фармакологічними властивостями. Відомо, що ці препарати виявляють потужні антиоксиданті властивості, мають виразний кардіопротекторний та ендотеліотропний ефекти [326, 125, 323, 404]. До того ж у ізофлавоноїда геністеїна присутня естрогеноподібна дія [309]. Останім часом показано, що геністеїн володіє також гіпогомоцистеїнемічним ефектом у жінок в постменопаузі з метаболічним синдромом [190]. В експериментальних дослідженнях встановлено, що фітоестроген геністеїн збільшує продукцію H_2S в слизовій оболонці шлунка у тварин з диклофенак-індукованою гастротоксичністю [13].

Поліфенольні сполуки геністеїн (Sigma, США) та кверцетин (Sigma, США) застосовували в дозах відповідно 2,5 та 25 мг/кг маси тіла в/шл на 1% розчині крохмалю 1 раз на добу паралельно з веденням тіолактону гомоцистеїну протягом 28 діб. Доза, шляхи та тривалість введення біофлавоноїдів запозичена з літератури при проведенні подібних досліджень і не викликали загибелі тварин [325, 391].

Введення геністеїну попереджує індуковані ГГЦ збільшення рівня гомоцистеїну, цистеїну та зменшення вмісту H_2S в сироватці крові тварин обох статей, причому у самців цей ефект був більш виразним (рис. 7.1-7.3). В групі «ГГЦ+геністеїн» у самців рівні гомоцистеїну та цистеїну були меншими відповідно на 50,3 та 30,7% ($p<0,05$), а у самок - на 37,1 та 13,4% ($p<0,05$), порівняно з групою «ГГЦ». Поряд з цим рівень H_2S в сироватці крові був більшим відповідно в 2,2 та 1,6 рази у самців та самок ($p<0,05$), ніж у нелікованих тварин. Використання кверцетину не впливає на рівень гомоцистеїну та цистеїну, однак протидіє формуванню дефіциту H_2S в сироватці крові за умов ГГЦ. За впливом на рівень H_2S кверцетин значно поступається геністеїну: в групі «ГГЦ+кверцетин» вміст H_2S в крові більший відповідно на 35,0 та 28,0% ($p<0,05$) у самців та самок, порівняно з групою «ГГЦ».

Застосування геністеїну не впливає на активність реакцій реметилування гомоцистеїну, але попереджує індуковане ГГЦ зниження активності ферментів транссульфування гомоцистеїну та деградації цистеїну в окисному та кон'югаційному шляхах (табл. 7.1-7.3). В групі «ГГЦ+геністеїн» активність ензимів ЦБС, ЦДО та γ-ГЦЛ в печінці самців більша відповідно на 24,8; 19,4 та 20,4% ($p<0,05$), а самок - на 15,4; 10,6 та 11,8% ($p<0,05$), порівняно з групою нелікованих тварин. Використання кверцетину вірогідно не впливає на активність вказаних метаболічних шляхів.

Застосована фармакотерапія з різною ефективністю впливала на активність H_2S-синтезуючих ферментів в печінці щурів обох статей за умов ГГЦ (табл. 7.4). Геністеїн протидіє депримуючому впливу ГГЦ на H_2S-синтезуючі ферменти печінки: активність ЦБС, ЦГЛ та ЦАТ у самців була вищою відповідно на 20,9; 27,8 та 23,0% ($p<0,05$), а у самок - на 10,3; 16,2 та 11,8% ($p<0,05$), порівняно з групою «ГГЦ». Використання кверцетину справляло коригуючий вплив лише на активність ЦБС.

Виникає питання щодо молекулярних механізмів впливу геністеїну на основні ензими метаболізму сірковмісних амінокислот в печінці за умов ГГЦ. Як відомо, фермент утилізації гомоцистеїну ЦБС є редокс-чутливими [332]. Між тим показано, що геністеїн зменшує активність процесів вільнорадикального окиснення [404]. Очевидно, наявність у геністеїна антиоксидантних ефектів до певної міри може пояснити його нормалізуючу дію на процеси утилізації гомоцистеїну в реакціях транссульфування.

Виявлено, що високі концентрації гомоцистеїну спричиняють конкурентне інгібування активності цистеїндиоксигенази в культурі гепатоцитів [360], а також субстратне інгібування H_2S-синтезуючих ферментів в нирках щурів [45]. Поряд з цим у геністеїну виявлена виразна гіпогомоцистеїнемічна активність, що може бути одним із пояснень його коригуючого впливу на процеси утилізації цистеїну і утворення H_2S в печінці за умов ГГЦ.

Фармакотерапія досліджуваними препаратами впливала на вміст H_2S в міокарді та аорті самців й самок щурів за умов ГГЦ (рис. 7.4). Введення геністеїну стримує формування дефіциту H_2S в серцево-судинній системі самців та самок щурів за умов ГГЦ. Виявилось, що в групі «ГГЦ+геністеїн» рівень H_2S в міокарді та аорті у самців був вищим на 41,5-55,8% ($p<0,05$), а у самок – на 20,4-31,3% ($p<0,05$), відносно групи нелікованих тварин. Введення кверцетину також протидіяло зменшенню вмісту H_2S, однак його ефективність була значно меншою, ніж у кверцетину.

Далі ми оцінили здатність геністеїну та кверцетину коригувати індуковані ГГЦ зміни активності H_2S-синтезуючих ензимів в міокарді та аорті самців та самок щурів (табл. 7.6). Геністеїн протидіє падінню активності H_2S-синтезуючих ензимів в міокарді та аорті щурів на тлі ГГЦ: активність ЦГЛ, ЦАТ та ТСТ виявилась більшою у самців на 29,1-64,3% ($p<0,05$), а у самок лише- на 13,7-45,7% ($p<0,05$), порівняно з групою «ГГЦ». За цих умов кверцетин вірогідно не впливав на активність H_2S-синтезуючих ензимів в міокарді та аорті щурів.

Застосування геністеїну та кверцетину з різною ефективністю коригували зміни процесів утилізації H_2S в міокарді самців та самок щурів за умов модельованої патології (табл. 7.5). При використанні геністеїну швидкість утилізації екзогенного H_2S виявилась меншою відповідно на 24,2 та 16,9% ($p<0,05$) у самців та самок щурів, порівняно з показниками групи «ГГЦ». Застосування кверцетину мало менш виразний вплив на ці показники,. Очевидно, що коригуючиий вплив геністеїну на продукцію та утилізацію H_2S в аорті та міокарді за ГГЦ до певної міри асоціюється з його антиоксидантною дією та здатність зменшувати рівень гомоцистеїну в крові.

Застосована фармакотерапія з різною ефективністю стримувала дисбаланс про-антиоксидантних ензимів в міокарді та аорті щурів обох статей за ГГЦ (табл. 7.8, 7.12). В групі «ГГЦ+геністеїн» активність НАДФН-оксидази в міокарді вірогідно менша у самців та самок відповідно на 17,2-31,9 та 22,7% ($p<0,05$), тоді як активність супероксиддисмутази більша відповідно на 43,8 та 27,9% ($p<0,05$), порівняно з тваринами групи «ГГЦ». Аналогічні закономірності виявлялись в аорті. Введення кверцетину поступається геністеїну за здатністю відновлювати баланс в про-антиоксидантній системі міокарду та аорти.

Фармакотерапія попереджувала ГГЦ-індукований оксидативний стрес в міокарді та аорті, однак істотно відрізнялась за ефективністю залежно від обраного препарату (табл. 7.9, 7.13). За цих умов найбільша антиоксидантна активність в міокарді та аорті характерна для геністеїну, причому його дія більш виразна у самців щурів. Так, наприклад, в міокарді самців, які отримували геністеїн, рівень МДА та КГП був відповідно на 45,5 та 45,8% менший ($p<0,05$), а у самок - на 35,8 та 35,2% ($p<0,05$), порівняно з нелікованими тваринами. Застосування кверцетину виявляло вірогідно меншу антиоксидантну дію в міокарді, причому у тварин обох статей вона була практично співставною.

Введення обраних коректорів в різній мірі стримує порушення фракційного розподілу глутатіону в міокарді щурів обох статей, індукованих

тривалою ГГЦ (табл. 7.11). В групі тварин «ГГЦ+Геністеїн» вміст відновленого глутатіону більший відповідно на 57,1 та 30,5% ($p<0,05$), а рівень окисненої форми глутатіону менший відповідно на 19,8 та 13,1% ($p<0,05$) у самців та самок, ніж в групі «ГГЦ». В групі тварин «ГГЦ+Кверцетин» вміст відновленого глутатіону відповідно на 26,6 та 24,5% більший ($p<0,05$), а рівень окисненої форми глутатіону відповідно на 14,7 та 14,0% менший ($p<0,05$) у самців та самок, ніж в групі «ГГЦ». Використання кверцетину у самців повністю не відновлює нормальний розподіл окремих фракцій глутатіону.

Висока антиоксидантна активність поліфенольних сполук кверцетину та геністеїну підтверджується даними літератури [404, 323, 326]. Виникає питання, щодо можливих причин більш високої антиоксидантної активності у геністеїну, порівняно з кверцетином. Нами, показано, що із досліджуваних поліфенолів лише геністеїн виявляє гіпогомоцистеїнемічну активність. Між тим, високі концентрації гомоцистеїну викликають розвиток оксидативного стресу [73]. Тому, здатність геністеїну зменшувати рівень гомоцистеїну в крові є однією із причиною більш виразної антиоксидантної дії цього біофлавоноїда, порівняно з кверцетином. Ще однією із можливих причин різної антиоксидантної активності цих біофлавоноїдів є наявність у геністеїну естрогеноподібної дії, адже естрогени є потужними антиоксидантами [8].

Застосування геністеїну та кверцетину в різній мірі попереджувало розвиток цитолізу кардіоміоцитів у щурів обох статей на тлі ГГЦ (табл. 7.10). За цих умов у геністеїну відмічалась більш виразна здатність стабілізувати мембрани кардіоміоцитів, у самців його ефективність була більшою. Встановлено, що у самців, лікованих геністеїном, активність АСТ та КФК в крові була меншою відповідно на 26,5 та 23,3% ($p<0,05$), а у самок - на 16,6 та 14,5% ($p<0,05$), порівняно з тваринами групи «ГГЦ». Застосування кверцетину в меншій мірі стримує розвиток цитолізу кардіоміоцитів: активність

АСТ та КФК у самців була меншою відповідно на 15,9 та 14,6% ($p<0,05$), а у самок - на 14,0 та 12,4% ($p<0,05$), порівняно з тваринами групи «ГГЦ».

Введення геністеїну та кверцетину супроводжується ендотеліотропною дією за умов ГГЦ, однак виразність їх ефекту суттєво відрізняється у самців та самок (рис. 7.6). В групі «ГГЦ+геністеїн» вміст в крові sVCAM-1 у самців достовірно менший на 32,2% ($p<0,05$), а у самок – на 23,0% ($p<0,05$), порівняно з нелікованими тваринами. Геністеїн також 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 індуковане ГГЦ наростання sVCAM-1 в крові.

Таким чином, за умов стать-специфічної кардіоваскулярної патології, асоційованої з ГГЦ, поліфенольна сполука геністеїн за кардіо- та ендотеліопротекторними властивостями, здатністю нормалізувати метаболічні процеси у самців та самок значно випереджає кверцетин. Подальші дослідження в цьому напрямку дозволять оптимізувати підходи до корекції гендерасоційованої патології серцево-судинної системи.

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. 8.2).

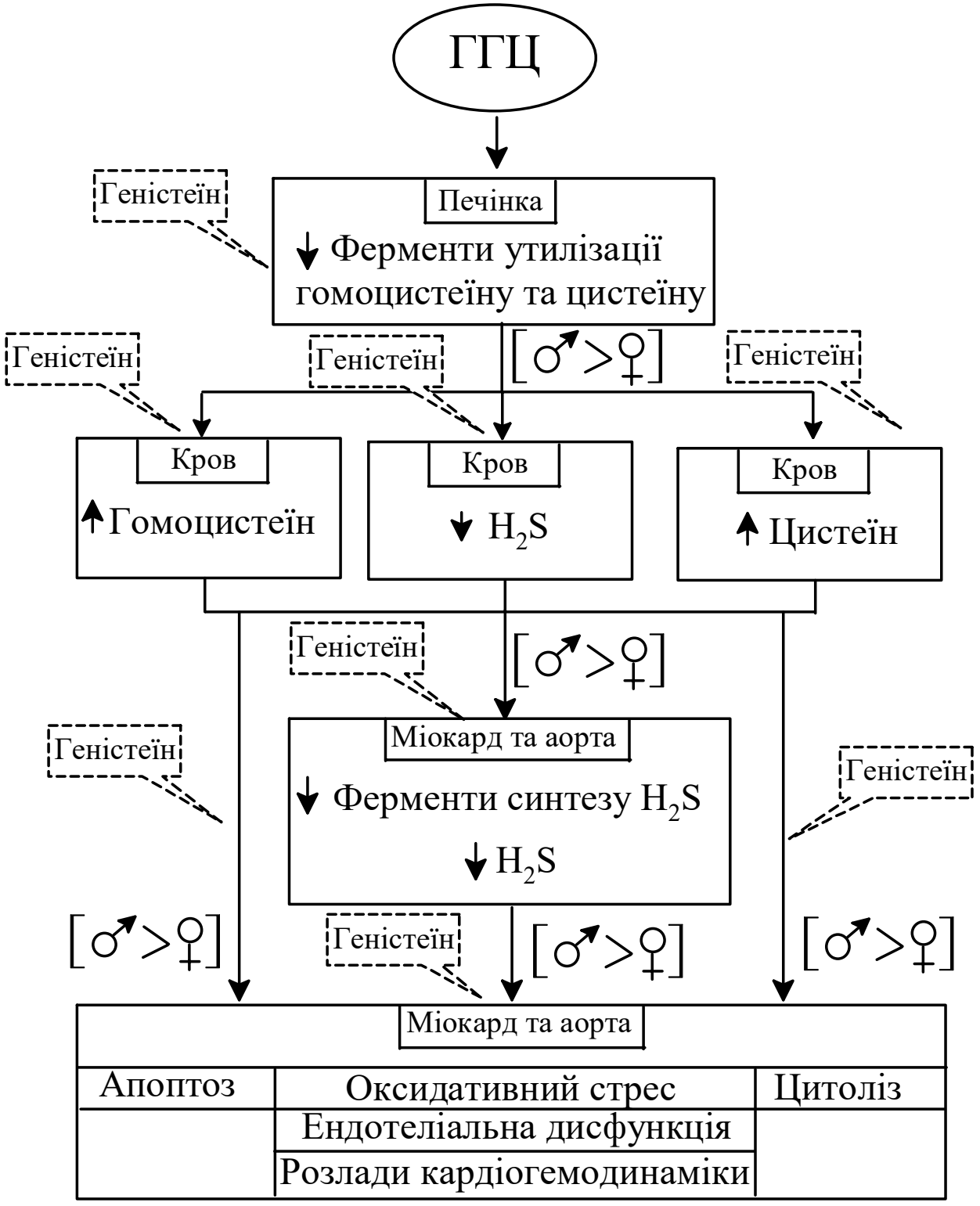


Рис. 8.2 Молекулярні механізми формування стать-асоційованої патології серця та судин за умов ГГЦ та точки прикладання геністеїну

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, тіосульфатдитіол-сульфідтрансферази), 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 ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Андрушко І.І. Співвідношення фосфатидилетаноламін/фосфатидилхолін як маркер індукованого гіпергомоцистеїнемією порушення процесів метилування у хворих гіпертонічною хворобою // Медична хімія. 2003. № 5(2). С. 54-58.
2. Андрушко І.І. Біохімічні механізми кардіо та вазотоксичної дії надлишку цистеїну в крові щурів // Клінічна та експериментальна патологія. 2009. № 8(3). С. 5-9.
3. Андрушко І.І. Вміст цистеїну у практично здорових осіб та пацієнтів з ішемічною хворобою серця // Український кардіологічний журнал. 2007. № 3. С. 43-47.
4. Андрушко І.І. Гіпергомоцистеїнемія як фактор патогенезу атеросклерозу та ішемічної хвороби серця: механізми її проатерогенної дії: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д.мед.н / Нац. акад. мед. наук України, Нац. наук. центр "Ін-т кардіології ім. акад. М. Д. Стражеска", Київ. 2012. 34 с.
5. Андрушко І.І. Рівні гомоцистеїну, цистеїну та аргініну у практично здорових осіб: вікові та статеві особливості // Український кардіологічний журнал. 2008. № 5. С. 89–95
6. Артемчук М.А. Синдром гіпергомоцистеїнемії – принципи лікування та підходи до класифікації гіпогомоцистеїнемічних лікарських препаратів, засновані на аналізі механізму їх дії // Biomedical and biosocial Anthropology. 2007. № 9. С. 297-303.
7. Атеросклероз і серцево-судинна патологія: сучасний стан проблеми / Є. Х. Заремба [та ін.] // Сімейна медицина. 2011. № 2. С. 63-65.
8. Барна О. М. Гендерна кардіологія. Проекція на аритмії у жінок // Медицинские аспекты здоровья Женщины. 2007. № 4(7). С. 14–18.

9. Визначення вмісту гідроген сульфіду в сироватці крові / Н. В.Заічко [та ін.] // Вісник наукових досліджень. 2009. № 1. С. 29-32.
10. Вікові зміни продукції гідроген сульфіду слизовою оболонкою шлунка в реалізації гастротоксичності НПЗЗ у щурів / Н.І. Волощук [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. 2011. № 5. С. 59-60.
11. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. Москва: изд. Наука. 1972. 252 с.
12. Волощук Н.І. Гендерні відмінності в утворенні гідроген сульфіду та реалізації його вазорелаксуючого ефекту за умов введення диклофенаку натрію та геністеїну у щурів // Журнал АМН України. 2010. № 16(1). С. 138-148.
13. 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.
14. Волощук Н.І., Таран І.В. Гостра токсичність гідроген сульфіду та його вплив на протизапальний ефект диклофенаку в експерименті // Медична хімія. 2011. № 13(4). С. 88-90.
15. 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). С. 8-9.
16. Вплив гідроген сульфіду на систему гемостазу щурів / Н. В. Заічко [та ін.] // Медичні перспективи. 2010. № 15(1). С. 15-20.
17. Вплив навантаження цистеїном на ферментні системи метаболізму сірковмісних амінокислот в печінці, нирках та мозку щурів / Н. В. Заічко (3) [та ін.] // Медична хімія. 2010. № 2. С. 43-49.
18. Горбась І.М. Динаміка епідеміологічної ситуації щодо артеріальної гіпертензії // Кровообіг та гемостаз. 2005. № 2. С. 29-33.

19. Гречанина Е.Я., Гусар В.А., Гречанина Ю.Б. Сравнительная характеристика частот алелей С677Т MTHFR, А66С MTRR генов системы фолатного цикла и ВПР ЦНС // Матеріали міжнародної конференції «Плід як частина родини», 16-18 червня 2009 р. Харків-Одеса. Ультразвукова перинатальна діагностика. 2009. № 27-28. С. 4-12.
20. Доклінічні дослідження лікарських засобів: за ред. О. В. Стефанова. Київ. Авіцена. 2001. 528 с.
21. Европейское исследование профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и сахарного диабета EUROASPIRE IV: результаты госпитального этапа в Украине / В.Н. Коваленко [и др.] // Український кардіологічний журнал. 2014. № 4. С. 4-15.
22. Заічко Н.В. Окислювальна модифікація білків сироватки крові як маркер активності ревматоїдного артриту та її зміни під впливом фармакотерапії амізоном, індометацином, німесулідом // Вісник Вінницького державного медичного університету. 2003. № 7. С. 664 - 666.
23. Заічко Н.В., Пентюк О. О., Карбовський В. Л. Вплив гомоцистеїну, цистеїну та їхніх похідних на тромбоцитарну ланку системи гемостазу // Укр. біохім. журнал. 2007. № 79(5). С. 122-132.
24. Заічко Н.В. Вплив тіолактону гомоцистеїну, цистеїну та гідроген сульфіду на систему гемостазу кролів // Медична хімія. 2009. № 11(2). С. 51-56.
25. Заічко Н.В. Луцюк М.Б. Патогенетичні аспекти гіперцистеїнемії, можливості корекції вітамінно-мікроелементним комплексом // Матеріали X Українського біохімічного з'їзду 13-17 вересня 2010 р., Одеса. Український біохімічний журнал. 82(4) (додаток 2). С. 15.
26. Заічко Н. В. Рівні гомоцистеїну, цистеїну та гідрогенсульфіду в плазмі крові пацієнтів з тромбозами глибоких вен нижніх кінцівок: зв'язок з поліморфізмом С677Т в гені метилентетрагідрофолатредуктази // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2010. № 4. С. 35-41.

27. Заічко Н.В. Біохімічні аспекти формування тромбофілії при хронічній гіперцистеїнемії у щурів // Медичні перспективи. - 2010. № 3. С. 12-17.
28. Заічко Н.В. Біохімічні аспекти формування тромбофілій, асоційованих з порушеннями обміну гомоцистеїну та цистеїну: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук / Луган. держ. мед. ун-т., Луганськ. 2011. 39 с.
29. 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.
30. Заічко Н.В., Мельник А.В., Ольховський О.С., Заічко К.О. Спосіб визначення H2S-продукуючої активності міокарда тварин: пат. 75683 Україна. № u2012 06388; заявл. 28.05.2012; опубл. 10.12.2012; Бюл. № 23. 3с.
31. Заічко Н.В., Ольховський О.С., Юрченко П.О., Мельник А.В., Штатько О.І. Спосіб визначення утилізації H2S в органах тварин: пат. 87884 Україна. № u2013 10024; заявл. 12.08.2013; опубл. 25.02.2014; Бюл. № 4. 2с.
32. 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.
33. Зозуля А.І., Зозуля І.С. Проблема цереброваскулярних захворювань в Україні та світі і її перспективи // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. 2014. № 23(1). С. 417-432.

34. Заічко Н.В., Ольховський О.С., Мельник А.В., Юрченко П.О., Григор'єва Г.С., Конахович Н.Ф. Вплив полімікроелементного препарату «Есмін» вміст гідрогенсульфіду та показники про- та антиоксидантної системи в міокарді щурів різного віку // Український біохімічний журнал. 2014. № 86(3). С. 69-76.
35. 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.
36. 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.
37. Йолтухівський М.М. Вплив пропаргілгліцину та натрій гідросульфіду на індуковані цисплатином зміни функціонального стану нирок щурів // Вісник ВНМУ. 2012. № 16(2). С. 257-262.
38. Ковальова О.М., Амбросова Т.М. Гендерні особливості перебігу серцево-судинних захворювань: фокус на гормони // Кровообіг і гемостаз. 2012. № 3. С. 45-50.
39. Корчинський В.С. Кардіореабілітація: сучасний стан та пріоритети розвитку // Вісник Вінницького національного медичного університету. 2015. № 19(1). С. 244-247.
40. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии. 1990. № 36(2). 88-91.
41. Костюченко Б.И. Гипергомоцистеинемия: клиническое значение, возрастные особенности, диагностика и коррекция // Клиническая геронтология. 2007. № 13(4). С. 32-40
42. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. Москва: изд. Высшая школа. 1980. 272 с.

43. Кульчицкий О.К. Система оксиду азоту та вік // Бук. мед. вісник. 2005. № 9(2). С. 143-144.
44. Ліснича В.М. Гендерні особливості захворювань серцево-судинної системи. Загальна захворюваність на серцево-судинні захворювання вибраної когорти населення // Ліки України. 2011. № 2(6). С. 41-44.
45. Мельник А.В., Пентюк О.О. Активність ензимів синтезу гідроген сульфіду в нирках щурів // Укр. біохім. журнал. 2009. № 81(14). С. 12-22.
46. Мельник А.В. Активність ензимів транссульфування та метилування в нирках за умов тривалого навантаження щурів тіолактоном гомоцистеїну, його комбінації з L-NAME та корекції їх порушень вітамінно-мікроелементним комплексом // Biomedical and biosocial anthropology. 2010. № 14. С. 58-62.
47. 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.
48. 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.
49. Мельник А.В., Заічко Н.В., Волощук Н.І. Статеві відмінності метаболізму гомоцистеїну в печінці щурів // Медична хімія. 2013. № 15(1). С. 20-24.
50. Мельник А.В. Вплив тестостерону на продукцію гідроген сульфіду в міокарді щурів // Медична хімія. 2014. № 16(4). С. 22-25.
51. Мельник А.В. Утворення гідроген сульфіду в аорті щурів: зв'язок із рівнем статевих гормонів // Вісник морфології. 2014. № 20(1). С. 158-162.
52. 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.

53. 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.
54. 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.
55. Мельник А.В. Вплив різної насиченості організму самок щурів естрадіолом на утворення гідроген сульфіду в міокарді // Медичні перспективи. 2015. 20(1). С. 21-26.
56. Мельник А.В. Статевий диморфізм регуляції судинного тонусу у щурів // Biomedical and biosocial anthropology. 2016. № 27. С. 95-97.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. 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.

61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. Мельник А.В. Статеві особливості рівня гідроген сульфіду в сироватці крові щурів // Вісник морфології. 2017. № 1(23). С. 7-9.
66. 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.
67. Мельник А.В. Гендерний диморфізм рівня сірковмісних амінокислот в сироватці крові щурів // Biomedical and biosocial anthropology. 2017. № 28. С. 13-17.
68. Мельник А.В. Гендерні особливості біохімічних показників стану аорти щурів за умов гіпергомоцистеїнемії // Медичний форум. 2017. 10(10). № С. 84-87.
69. 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.

70. 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.
71. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: [справочник] / под ред. В. В. Меньшикова – М.: Медицина. 1987. 368 с.
72. Меньшиков В.В. Клиническая лабораторная аналитика. Том 2. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории / под ред. В. В. Меньшикова – М.: Лабинформ-РАМЛД. 1999. 352 с.
73. Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології / О.О. Пентюк [та ін.] // Укр. біохім. журн. 2003. № 75(1). С. 5-17.
74. Мясоедова О.А., Коржов В.И. Роль сероводорода в реализации физиологических функций организма // Журн. НАМН України. 2011. № 17(3). С. 191-200.
75. Нечипорук В.М., Корда М.М. Вплив глюкокортикоїдів на вміст гомоцистеїну в крові // Медична хімія. 2010. № 12(3). С. 35-38.
76. Нечипорук В.М., Корда М.М. Обмін сірковмісних амінокислот та утворення гідроген сульфіду при гіперглюкокортикоїдемії // Медична хімія. 2011. № 13(1). С. 19-24.
77. 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.
78. Нечипорук В.М., Заічко Н.В., Корда М.М. Вплив тиреоїдних гормонів на процеси реметилування та транссульфування сірковмісних амінокислот в органах щурів // Медична та клінічна хімія. 2017. № 19(1). С. 12-18.

79. 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.
80. 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.
81. Основні епідеміологічні закономірності хвороб системи кровообігу і гіпертонічної хвороби в Україні / О.М. Голяченко [та ін.] // Вісник соціальної гігієни та організації охорони здоров'я України. 2010. № 4. С. 9-15.
82. П.А. Галенко-Ярошевский, Гацура В.В. Методы поиска и доклинического исследования специфической активности потенциальных сердечно-сосудистых средств. Краснодар: изд. Просвещение-Юг. 2005. 249 с.
83. Петрик І.О. Моніторинг кардіопротекторних ефектів похідіного 3,2'-спіро-пірроло-2-оксіндолу сполуки R-86 при модельній кардіальній ішемії за різних режимів введення // Вісник Вінницького національного медичного університету. 2014. № 18(2). С. 441-444.
84. Регіональні особливості рівня здоров'я України: аналітично-статистичний посібник: за ред. В.М. Корнацького. Київ. 2011. 165 с.
85. Сагач В.Ф. Шиманська Т.В., Гошовская Ю.В. Вплив стимуляції та блокади синтезу ендогенного сірководню на функцію серця в умовах ішемії-реперфузії // Фізіол. журн. 2013. № 59(4). С. 8-15.
86. Сіренко Ю. М. Гіпертонічна хвороба і артеріальні гіпертензії. Донецьк: Вид. Заславський О. Ю. 2011. 288 с.
87. Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкривання мітохондріальної пори у серці дорослих і старих щурів / Н.А. Струтинська [та ін.] // Фізіол. журн. 2011. № 57(6). С. 3-13.

88. Ткаченко М.М., Сагач В.Ф., Базілюк О.В. Вікові особливості змін скорочувальних судинних реакцій і вміст вільних радикалів кисню та метаболітів оксиду азоту у мишей лінії BALB/c за умов перебування у зоні відчуження // Фізіолог. журн. 2005. № 51(3). С. 32-41.
89. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) / Ю. И. Губский [и др.] // Суч. пробл. токсикол. 2005. № 3. С. 20–27.
90. Утворення гідроген сульфіду в органах щурів / Н. В. Заічко // Медична хімія. 2009. № 11(4). С. 7-13.
91. Харчування та синдром гіпергомоцистеінемії / М.Б. Луцюк [та ін.] // Biomedical and biosocial Anthropology. 2015. № 24. С. 201-205.
92. Ходаківський О.А. Експериментальне дослідження впливу ademолу (сполуки ЮК-1) на коронарну та системну гемодинаміку в умовах наркозу // Biomedical and biosocial anthropology. 2011. № 16. С. 7-9.
93. Шіфріс І.М. Вікові та гендерні особливості кардіоваскулярної смертності пацієнтів, які отримують лікування гемодіалізом // Український журнал нефрології та діалізу. 2013. № 2. С. 16-23.
94. Электрофизиологический анализ возбуждающего действия серотонина на коронарные артерии / А. В. Гурковская [и др.] // Физиологический журнал. 1998. № 34(5). С. 66-72.
95. 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.
96. A nociceptive-intensity-dependent role for hydrogen sulphide in the formalin model of persistent inflammatory pain / A. T. Lee [et al.] // Neuroscience. 2008. № 152(1). P. 89-96.
97. Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels / M.W. Warenycia [et al.] // Biochem. Pharmacol. 1989. № 38(6). P. 973-981.

98. Agrawal N., Banerjee R. Human polycomb 2 protein is a SUMO E3 ligase and alleviates substrate-induced inhibition of cystathionine beta-synthase sumoylation // PLoS One. 2008. № 3(12). doi: 10.1371/journal.pone.0004032.
99. Akagi R. Purification and characterization of cysteine aminotransferase from rat liver cytosol // Acta Med Okayama. 1982. № 36(3). P. 187-197.
100. Aloisi A.M., Ceccarelli I., Fiorenzani P. Gonadectomy affects hormonal and behavioral responses to repetitive nociceptive stimulation in male rats // Ann. N Y. Acad. Sci. 2003. № 1007. P. 232-237.
101. Amlodipine affects endogenous hydrogen sulfide tissue concentrations in different mouse organs / B. Wiliński [et al.] // Folia Med Cracov. 2011. № 51(1-4). P. 29-35.
102. An exogenous hydrogen sulphide donor, NaHS, inhibits the nuclear factor κB inhibitor kinase/nuclear factor κb inhibitor/nuclear factor-κB signaling pathway and exerts cardioprotective effects in a rat hemorrhagic shock model / C. Gao [et al.] // Biol Pharm Bull. 2012. № 35(7). P. 1029-1034.
103. Analgesic, anti-inflammatory, anti-lipoxygenase activity and characterization of three bioactive compounds in the most active fraction of Leptadenia reticulata (retz.) wight & arn. - A valuable medicinal plant / S.K. Mohanty [et al.] // Iran. J. Pharm. Res. 2015. № 14. P. 933–942.
104. Association between serum homocysteine and arterial stiffness in elderly: a community-based study / Zhang S. [et al.] // J Geriatr Cardiol. 2014. № 11. P. 32-38.
105. Association of age and sex with myocardial infarction symptom presentation and in - hospital mortality / J.G. Canto [et al.] // JAMA. 2012. № 307. P. 813–822.
106. Atorvastatin affects the tissue concentration of hydrogen sulfide in mouse kidneys and other organs / B. Wiliński [et al.] // Pharmacol Rep. 2011. № 63(1). P. 184-188.
107. Bale S.I., Ealick S.E. Structural biology of S-adenosylmethionine decarboxylase // Amino Acids. 2010. № 38(2). P. 451-460.

108. Barr L.A., Calvert J.W. Discoveries of hydrogen sulfide as a novel cardiovascular therapeutic // Circ J. 2014. № 78(9). P. 2111–2118.
109. Baszczuk A., Kopczyński Z. Hyperhomocysteinemia in patients with cardiovascular disease // Postepy Hig Med Dosw. 2014. № 68. P. 579-589.
110. Bełtowski J., Jamroz-Wiśniewska A. Hydrogen sulfide and endothelium-dependent vasorelaxation // Molecules. 2014. № 19(12). P. 21183-21199.
111. Bhupathy P., Haines C.D., Leinwand L.A. Influence of sex hormones and phytoestrogens on heart disease in men and women. Womens Health (Lond). 2010. № 6(1). P. 77-95.
112. Blom H.J., Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects // J Inherit Metab Dis. 2011. № 34(1). P. 75-81
113. Brain 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3MST): Cellular Localization and Downregulation after Acute Stroke / H. Zhao [et al.] // PLoS ONE. 2013. № 8(6). doi: 10.1371/journal.pone.0067322.
114. Cardioprotection of H2S by downregulating iNOS and upregulating HO-1 expression in mice with CVB3-induced myocarditis / W. Hua [et al.] // Life Sci. 2013. № 93(24). 949-954.
115. Cardioprotective role of sodium thiosulfate on chronic heart failure by modulating endogenous H2S generation / U. Sen [et al.] // Pharmacology. 2008. № 82(3). P. 201-213.
116. Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo--an analysis based on cardiomyocyte nuclei / S. Walsh [et al.] // Cardiovasc Res. 2010. № 86(3). 365-373.
117. Carvedilol induces endogenous hydrogen sulfide tissue concentration changes in various mouse organs / B. Wiliński [et al.] // Folia Biol (Krakow). 2011. № 59(3-4). P. 151-155.
118. Carter R.N., Morton N.M. Cysteine and hydrogen sulphide in the regulation of metabolism: insights from genetics and pharmacology // J Pathol. 2016. № 238(2). P. 321-332

119. Chemical characterization of the smallest S-nitrosothiol, HSNO; cellular cross-talk of H2S and S-nitrosothiols / M.R. Filipovic [et al.] // J Am Chem Soc. 2012. № 134(29). P. 12016-12027.
120. Chen W., A J.X., Chang P. The effect of taurine on cholesterol metabolism // Mol. Nutr. Food. Res. 2012. № 56. P. 681–690
121. Chen X.M., Tait A.R., Kitts D.D. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities // Food Chem. 2017. № 218. P. 15–21.
122. Chiang P.K., Cantoni G.L. Activation of methionine for transmethylation. Purification of the S-adenosylmethionine synthetase of bakers' yeast and its separation into two forms // J. Biol. Chem. 1977. № 252(13). P. 4506-4513.
123. Chwatko G. The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma // Anal. Biochem. 2005. № 337. P. 271–277.
124. Cohen H.J. Fridovich I. Hepatic sulfite oxidase. Purification and properties // J. Biol. Chem. 1971. № 246(2). P. 359-366.
125. Comparative effect of genistein and daidzein on the expression of MCP-1, eNOS, and cell adhesion molecules in TNF-α-stimulated HUVECs / H.Y. Cho [et al.] // Nutrition Research and Practice. 2011. № 5. P. 381-388.
126. Correlation of serum homocysteine levels with the severity of coronary artery disease / V. Shenov [et al.] // Ind J Clin Biochem. 2014. № 29(3). P. 339-344.
127. Coylewright M., Reckelhoff J.F., Ouyang P. Menopause and hypertension: an age-old debate // Hypertension. 2008. № 51(4). P. 952-959.
128. Cyclosporin A-sensitive mitochondrial pore as a target of cardioprotective action of hydrogen sulfide donor / T.V. Shimanskaia [et al.] // Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova. 2013. № 99(2). P. 261-272.
129. Cysteine dioxygenase: a robust system for regulation of cellular cysteine levels / M. H. Stipanuk [et al.] // Amino. Acids. 2009. № 37(1). P. 55-63.
130. DCCT/EDIC Research Group.15: plasma total homocysteine and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes: a prospective study / A. Basu [et al.] // Atherosclerosis. 2014. № 236. P. 188-195.

131. Decline in Cardiovascular Mortality: Possible Causes and Implications / George A. [et al.] // David Gordon Circulation Research. 2017. № 120(2). P. 366-380.
132. Dietary protein and plasma total homocysteine, cysteine concentrations in coronary angiographic subjects / Y. Xiao [et al.] // Nutr J. 2013. № 12(1). doi: 10.1186/1475-2891-12-144.
133. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease - a molecular perspective / G. Rimbach [et al.] // Food Chem. Toxicol. 2008. № 46(4). P. 1308-1319.
134. Different regulatory effects of hydrogen sulfide and nitric oxide on gastric motility in mice / X. Huang [et al.] // Eur J Pharmacol. 2013. № 720(1-3). P. 276-285.
135. Differential thioredoxin reductase activity from human normal hepatic and hepatoma cell lines / H. I. Jung [et al.] // Yonsei Medical Journal. 2004. № 45(2). P. 263-272.
136. Difference in the susceptibility of rats to gentamicin nephrotoxicity: influence of gonadectomy and hormonal replacement therapy / B. H. Ali [et al.] // Indian Journal of Pharmacology. 2001. № 33. P. 369-373.
137. Digoxin increases hydrogen sulfide concentrations in brain, heart and kidney tissues in mice / B. Wiliński [et al.] // Pharmacol Rep. 2011. № 63(5). P. 1243-1247.
138. Distribution of hydrogen sulfide (H2S)-producing enzymes and the roles of the H2S donor sodium hydrosulfide in diabetic nephropathy / Yamamoto J. [et al.] // Clin Exp Nephrol. 2013. № 17(1). P. 32-40.
139. Diwakar L., Ravindranath V. Inhibition of cystathionine-gamma-lyase leads to loss of glutathione and aggravation of mitochondrial dysfunction mediated by excitatory amino acid in the CNS // Neurochem Int. 2007. № 50(2). P. 418-426.

140. Donnarumma E., Trivedi R.K., Lefer D.J. Protective Actions of H2S in Acute Myocardial Infarction and Heart Failure // Compr Physiol. 2017. № 7(2). P. 583-602
141. Dombkowski R., Russell M., Olson K. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout //Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2004. № 286. P. 678-685.
142. Dosi R., Bhatt N., Patell R. Cardiovascular Disease and Menopause // J. Clin. Diagn. Res. 2014. № 8(2). P. 62-64.
143. Dynamic change of hydrogen sulfide after traumatic brain injury and its effect in mice / M. Zhang [et al.] // Neurochem Res. 2013. № 38(4). P. 714-725.
144. Dysregulation of cystathionine γ-lyase (CSE)/hydrogen sulfide pathway contributes to ox-LDL-induced inflammation in macrophage / X.H. Wang [et al.] // Cell Signal. 2013. № 25(11). P. 2255-2262.
145. Effects of aspirin on the levels of hydrogen sulfide and sulfane sulfur in mouse tissues / A. Bilska [et al.] // Pharmacol Rep. 2010. № 62(2). P. 304-310.
146. Effects of common anti-epileptic drugs on the serum levels of homocysteine and folic acid / Z. Paknahad [et al.] // Int J Prev Med. 2012. № 3. P. 186-190.
147. Effect of cigarette smoking on plasma homocysteine concentrations / D. Haj Mouhamed [et al.] // Clin Chem Lab Med. 2011. № 49. P. 479-483
148. Effect of Cross-Sex Hormonal Replacement on Antioxidant Enzymes in Rat Retroperitoneal Fat Adipocytes / I. Pérez-Torres [et al.] // Oxid Med Cell Longev. 2016. doi: 10.1155/2016/1527873.
149. Effect of endogenous hydrogen sulfide inhibition on structural and functional renal disturbances induced by gentamicin / H.D. Francescato [et al.] // Braz. J. Med. Biol. Res. 2012. № 45(3). P. 244-249.
150. Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation: role of estrogen / A.A. Miller [et al.] // Stroke. 2007. № 38. P. 2142-2149.

151. Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress / A.A. Miller [et al.] // Clin Exp Pharmacol Physiol. 2007. № 34. P. 1037-1043.
152. Effect of hydrogen sulfide donor NaHs on the functional state of the respiratory chain of the rat heart mitochondria / O.M. Semenykhina [et al.] // Fiziol Zh. 2013. № 59(2). P. 9-17.
153. Effect of homocysteine reduction by B-vitamin supplementation on markers of clotting activation / M. Klerk [et al.] // Thromb Haemost. 2002. № 88(2). P. 230–235.
154. Effect of losartan on the glomerular protein expression profile of type 2 diabetic KKAy mice / Q.L. Fan [et al.] // J Nephrol. 2013. № 26(3). P. 517-526.
155. Effects of plasma homocysteine levels on serum HTase/PON activity in patients with type 2 diabetes / G. Weijun [et al.] // Adv Ther. 2008. № 25(9). P. 884-893.
156. Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats / A. T. Nandhini [et al.] // Singapore Med. J. 2005. № 46(2). P. 82-87.
157. Effect of Sclerovit on endothelial dysfunction, hemorheological parameters, platelet aggregation, plasma concentration of homocysteine and progression of atherosclerosis in patients with vascular diseases / B. Horvath [et al.] // Clin. Hemorheol. Microcirc. 2009. № 42(1). P. 19–28.
158. Elevated plasma adiponectin and decreased plasma homocysteine and asymmetric dimethylarginine in children with type 1 diabetes / K. Heilman [et al.] // Scand J Clin Lab Invest. 2009. № 69(1). P. 85-91.
159. Endogenous hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning / QC Yong [et al.] // Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008. № 295(3). P. 1330-1340.
160. Endogenous hydrogen sulfide reduces airway inflammation and remodeling in a rat model of asthma / Y.H. Chen [et al.] // Cytokine. 2009. № 45(2). P. 117-123.

161. Endothelin, sex and hypertension / R.C. Tostes [et al.] // Clin. Sci. (Lond). 2008. № 114(2). P. 85-97.
162. Endothelial function and aminothiol biomarkers of oxidative stress in healthy adults / S. Ashfaq [et al.] // Hypertension. 2008. № 52(1). P. 80-85.
163. Endogenously generated sulfur dioxide and its vasorelaxant effect in rats / S.X. Du [et al.] // Acta Pharmacol Sin. 2008. № 29(8). P. 923-930.
164. Enns G.M., Cowan T.M. Glutathione as a Redox Biomarker in Mitochondrial Disease-Implications for Therapy // J Clin Med. 2017. doi: 10.3390/jcm6050050.
165. Emerging role of hydrogen sulfide in hypertension and related cardiovascular diseases / G. Meng [et al.] // Br J Pharmacol. 2015. № 172(23). P. 5501-5511.
166. Ericson L.E. Betaine-homocysteine methyltransferases. III. The methyl donor specificity of the transferase isolated from pig liver // Acta Chem. Scand. 1960. № 14. P. 2127-2134.
167. Eto K. Kimura H. A novel enhancing mechanism for hydrogen sulfide-producing activity of cystathionine β-synthase // J. Biol. Chem. 2002. № 277. P. 42680-42685.
168. Estrogens increase cystathionine-γ-lyase expression and decrease inflammation and oxidative stress in the myocardium of ovariectomized rats / X. Zhu [et al.] // Menopause. 2013. № 20(10). P. 1084-1091.
169. Estrogen Replacement Therapy in Ovariectomized Nonpregnant Ewes Stimulates Uterine Artery Hydrogen Sulfide Biosynthesis by Selectively Up-Regulating Cystathionine β-Synthase Expression / T.J. Lechuga [et al.] // Endocrinology. 2015. № 156(6). P. 2288-2298.
170. Evaluation of gender-related differences in various oxidative stress enzymes in mice / Y. Chen [et al.] // Chinese J Physiol. 2011. № 54. P. 385–390.
171. Excess methionine suppresses the methylation cycle and inhibits neural tube closure in mouse embryos / L.P. Dunlevy [et al.] // FEBS Lett. 2006. № 580(11). P. 2803-2807.

172. Exogenous Hydrogen Sulfide Protects against Doxorubicin-Induced Inflammation and Cytotoxicity by Inhibiting p38MAPK/NFκB Pathway in H9c2 Cardiac Cells / R. Guo [et al.] // Cell Physiol Biochem. 2013. № 32(6). P. 1668-1680.
173. Exogenous hydrogen sulfide protects H9c2 cardiac cells against high glucose-induced injury by inhibiting the activities of the p38 MAPK and ERK1/2 pathways / W. Xu [et al.] // Int J Mol Med. 2013. № 32(4). P. 917-925.
174. Expression of cystathionine β-synthase and cystathionine γ-lyase in human pregnant myometrium and their roles in the control of uterine contractility / X.J. You [et al.] // PLoS One. 2011. № 6(8). doi: 10.1371/journal.pone.0023788.
175. 2016 European Society of Hypertension guidelines for the management of high blood pressure in children and adolescents / E. Lurbe [et al.] // J Hypertens. 2016. № 34(10). P. 1887-1920.
176. Feng S.J., Li H., Wang S.X. Lower Hydrogen Sulfide Is Associated with Cardiovascular Mortality, Which Involves cPKCβII/Akt Pathway in Chronic Hemodialysis Patients // Blood Purif. 2015. № 40(3). P. 260-269.
177. Ferns G.A. New and emerging risk factors for CVD // Proc Nutr Soc. 2008. № 67(2). P. 223-231.
178. Finkelstein J.D. Methionine metabolism in liver diseases // Am. J. Clin. Nutr. 2003. № 77(5). P. 1094-1095.
179. Flavonoid intake and risk of CVD: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies / X. Wang [et al.] // Br. J. Nutr. 2014. № 111. P. 1–11.
180. Folate Deficiency and Gene Polymorphisms of MTHFR, MTR and MTRR Elevate the Hyperhomocysteinemia Risk / W.X. Li [et al.] // Clin Lab. 2017. № 63(3). P. 523-533.
181. Folic acid effects on s-adenosylmethionine, s-adenosylhomocysteine, and DNA methylation in patients with intermediate hyperhomocysteinemia / F. Pizzolo [et al.] // J Am Coll Nutr. 2011. № 30(1). P. 11-18.

182. Free cysteine is increased in plasma from hemodialysis patients / T. Nakanishi [et al.] // Kidney International. 2003. № 63. P. 1137-1140.
183. Furne J., Saeed A., Levitt M.D. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008. № 295(5). P. 1479-1485.
184. Gadalla M.M., Snyder S.H. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter // J. Neurochem. 2010. № 113. P. 14-26.
185. Gaitonde M.K. A spectrophotometric method for direct determination of cysteine in the presence of other naturally occuring amino acid // Biochem. J. 1967. № 104(2). P. 627-633.
186. Galiuto L., Locorotondo G. Gender differences in cardiovascular disease // J Integr Cardiol. 2015. № 1(1). P. 20-22.
187. Ganguly P., Alam S.F. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease // Nutr J. 2015. № 14. P. 6.
188. Garlick P.J. Toxicity of Methionine in Humans // J. Nutr. 2006. № 136(6). P. 1722-1725.
189. Gender disparity in susceptibility in oxidative stress and autoantibodies specific to RLIP76 in vascular cells / P. Matarrese [et al.] // Antiox Redox Signal. 2011. № 15. P. 2825-2836.
190. Genistein in the metabolic syndrome: results of a randomized clinical trial / F. Squadrito [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. 2013. № 98(8). P. 3366-3374.
191. Glutathione disulfide as an index of oxidative stress during postischemic reperfusion in isolated rat hearts / R.J. Verbunt [et al.] // Mol Cell Biochem. 1995. № 1. P. 85-93.
192. Goldstein J.L., Campbell B.K., Gartler S.M. Cystathionine synthase activity in human lymphocytes: induction by phytohemagglutinin // J. Clin. Invest. 1972. № 51(4). P. 1034-1037.
193. Grassi D., Desideri G., Ferri C. Flavonoids: antioxidants against atherosclerosis // Nutrients. 2010. № 2(8). P. 889-902.

194. Gu X., Zhu Y.Z. Therapeutic applications of organosulfur compounds as novel hydrogen sulfide donors and/or mediators // Expert Rev Clin Pharmacol. 2011. № 4(1). P. 123-133.
195. Guo W., Cheng Z.Y., Zhu Y.Z. Hydrogen sulfide and translational medicine // Acta Pharmacol Sin. 2013. № 34(10). P. 1284-1291.
196. Hannibal L., Blom H. Homocysteine and disease: Causal associations or epiphenomenons? // Mol Aspects Med. 2017. № 53. P. 36-42.
197. Heinonen K. Studies on cystathionase activity in rat liver and brain during development effects of hormones and amino acids in vivo // Biochem. J. 1973. № 136. P. 1011-1015.
198. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease / A. De Bree [et al.] // Pharmacol Rev. 2002. № 54 (4). P. 599–618.
199. Homocysteine, Paraoxonase-1 and Vascular Endothelial Dysfunction: Omnibus viis Romam Pervenitur / E. Eren [et al.] // J Clin Diagn Res. 2014. doi: 10.7860/JCDR/2014/7827.4773.
200. Homocysteine-induced hypermethylation of DDAH2 promoter contributes to apoptosis of endothelial cells / Jia S.J. [et al.] // Pharmazie 2013. № 68. P. 282-286.
201. Homocysteine induces the expression of C-reactive protein via NMDAr-ROS-MAPK-NF-κB signal pathway in rat vascular smooth muscle cells / X. Pang [et al.] // Atherosclerosis. 2014. № 236. P. 73-81.
202. Homocysteine induces endothelial dysfunction via inhibition of arginine transport / L. Jin [et al.] // J Physiol Pharmacol 2007. № 58. P. 191–206.
203. Homocysteine-lowering therapy and risk of recurrent stroke, myocardial infarction and death: the impact of age in the VISP trial / A. Towfighi [et al.] // Cerebrovasc Dis 2014. № 37. P. 263–267.
204. Homocysteine thiolactone-induced hyperhomocysteinemia does not alter concentrations of cholesterol and SREBP-2 target gene mRNAS in rats / G. I. Stangl [et al.] // Exp. Biol. Med. (Maywood). 2007. № 232(1). P. 81-87.

205. Homocysteine metabolism in ZDF (type 2) diabetic rats / E.P. Wijekoon [et al.] // Diabetes. 2005. № 54(11). P. 3245-3251.
206. Homocysteine is a marker for metabolic syndrome and atherosclerosis / B. Sreckovic [et al.] // Diabetes Metab Syndr. 2016. doi: 10.1016/j.dsx.2016.08.026.
207. Hormonal regulation of cystathionine beta-synthase expression in liver / S. Ratnam [et al.] // J. Biol. Chem. 2002. № 277(45). P. 42912-42918.
208. H_2S is an endothelium-derived hyperpolarizing factor / G. Tang [et al.] // Antioxid Redox Signal. 2013. № 19(14). P. 1634-1646.
209. H2S ameliorates oxidative and proteolytic stresses and protects the heart against adverse remodeling in chronic heart failure / P.K. Mishra [et al.] // Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010. № 298(2). P. 451-456.
210. H2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase / G. Yang [et al.] // Science. 2008. № 590(322). P. 587-590.
211. H2S biogenesis by human cystathionine gamma-lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia / T. Chiku [et al.] // J. Biol. Chem. 2009. № 284(17). P. 11601-11612.
212. H2S preconditioning-induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes / T.T. Pan [et al.] // Am J Physiol Cell Physiol. 2008. № 294(1). P. 169-177.
213. H2S signals through protein S-sulfhydration / A.K. Mustafa. [et al.] // Sci Signal. 2009. № 2(96). doi: 10.1126/scisignal.2000464
214. Human cystathionine gamma-lyase: developmental and in vitro expression of two isoforms / A.L. Levonen [et al.] // Biochem J. 2000. № 347(1). P. 291-295.
215. Huxley R.R., Woodward M. Cigarette smoking as a risk factor for coronary heart disease in women compared with men: a systematic review and meta-

analysis of prospective cohort studies // Lancet. 2011. № 378(9799). P. 1297-1305.

216. Hydrogen sulfide attenuates epithelial-mesenchymal transition of human alveolar epithelial cells / L.P. Fang [et al.] // Pharmacol Res. 2010. № 61(4). P. 298-305.
217. Hydrogen Sulfide Attenuates Opioid Dependence by Suppression of Adenylate Cyclase/cAMP Pathway / H.Y. Yang [et al.] // Antioxid Redox Signal. 2014. № 20(1). P. 31-41.
218. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator in mitochondria and mitochondria dysfunction / W. Guo [et al.] // Oxid Med Cell Longev. 2012. doi: 10.1155/2012/878052.
219. Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger / A. Kawabata [et al.] // Pain. 2007. № 132(1-2). P. 74-81.
220. Hydrogen Sulfide Donor GYY4137 Protects against Myocardial Fibrosis / G. Meng [et al.] // Oxid Med Cell Longev. 2015. doi: 10.1155/2015/691070.
221. Hydrogen sulfide is endogenously generated in rat skeletal muscle and exerts a protective effect against oxidative stress / J.T Du. [et al.] // Chin Med J (Engl). 2013. № 126(5). P. 930-936.
222. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats / J.L. Wallace [et al.] // FASEB J. 2007. № 21. P. 4070-4076.
223. Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator / X. Feng [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. 2009. 380(1). P. 153-159.
224. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production with calcium-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells / M. Kida [et al.] // Eur J Pharm Sci. 2013. № 48(1–2). P. 211–215.
225. Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity / M. Bucci, [et al.] // Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010. № 30(10). P. 1998–2004.
226. Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF-κB mediates its antiapoptotic actions / N. Sen [et al.] // Mol Cell. 2012. № 45(1). P. 13-24.

227. Hydrogen sulfide-mediated stimulation of mitochondrial electron transport involves inhibition of the mitochondrial phosphodiesterase 2A, elevation of cAMP and activation of protein kinase A / K. Módis [et al.] // Biochem Pharmacol. 2013. № 86(9). P. 1311-1319.
228. Hydrogen sulfide protects from intestinal ischaemia-reperfusion injury in rats / H. Liu [et al.] // J. Pharm. Pharmacol. 2009. № 61(2). P. 207-212.
229. Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes from myocardial ischemia-reperfusion injury by enhancing phosphorylation of apoptosis repressor with caspase recruitment domain / Yao X. [et al.] // Tohoku J Exp Med. 2012. № 226(4). P. 275-285
230. Hydrogen sulfide protects SH-SY5Y neuronal cells against D-galactose induced cell injury by suppression of advanced glycation end products formation and oxidative stress / Y.Y. Liu [et al.] // Neurochem Int. 2013. № 62(5). P. 603-609.
231. Hydrogen sulfide preconditioning protects rat liver against ischemia/reperfusion injury by activating Akt-GSK-3β signaling and inhibiting mitochondrial permeability transition / Q. Zhang [et al.] // PLoS One. 2013. № 8(9). doi: 10.1371/journal.pone.0074422.
232. Hydrogen sulfide regulates cAMP homeostasis and renin degranulation in As4.1 and rat renin-rich kidney cells / M. Lu [et al.] // Am J Physiol Cell Physiol. 2012. № 302(1). P. 59-66.
233. Hydrogen sulfide regulates cardiac sarcoplasmic reticulum Ca (2+) uptake via K(ATP) channel and PI3K/Akt pathway / Y. Chen [et al.] // Life Sci. 2012. № 91(7-8). P. 271-278.
234. Hydrogen sulfide regulates Na+/H+ exchanger activity via stimulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt and protein kinase G pathways / L.F. Hu [et al.] // J Pharmacol Exp Ther. 2011. № 339(2). P. 726-35.
235. Hydrogen sulphide synthesis in the rat and mouse gastrointestinal tract / G.R. Martin [et al.] // Dig Liver Dis. 2010. № 42(2). P. 103-109.

236. Hydrogen sulfide scavenges the cytotoxic lipid oxidation product 4-HNE / Schreier S.M. [et al.] // Neurotox Res. 2010. № 17(3). P. 249-256.
237. Hydrogen sulfide suppresses transforming growth factor-β1-induced differentiation of human cardiac fibroblasts into myofibroblasts / Y. Zhang [et al.] // J. Sci China Life Sci. 2015. № 58(11). P. 1126-1134.
238. Hydrogen sulfide, the next potent preventive and therapeutic agent in aging and age-associated diseases / Y. Zhang [et al.] // Mol Cell Biol. 2013. № 33(6). P. 1104-1113.
239. Hyperhomocysteinaemia and cardiovascular risk in female ovariectomized rats: role of folic acid and hormone replacement therapy / S.E. El-Swefy [et al.] // J Pharm Pharmacol. 2002. № 54(3). P. 391-397.
240. Hypercysteinemia promotes atherosclerosis by reducing protein S-nitrosylation / Y. Chen [et al.] // Biomed Pharmacother. 2015. № 70. P. 253-259.
241. Identification and tissue distribution of human cystathionine beta-synthase mRNA isoforms / L. Bao [et al.] // Arch Biochem Biophys. 1998. № 350(1). P. 95-103.
242. Increased homocysteine and lipoprotein(a) levels highlight systemic atherosclerotic burden in patients with a history of acute coronary syndromes / G. Cioni [et al.] // J Vasc Surg. 2016. № 64(1). P. 163-170.
243. Inhibition by hydrogen sulfide of rabbit platelet aggregation and calcium mobilization / H. Nishikawa [et al.] // Biol Pharm Bull. 2013. № 36(8). P. 1278-1282.
244. Inhibition of NADPH oxidase 4-related signaling by sodium hydrosulfide attenuates myocardial fibrotic response / L.L. Pan [et al.] // Int J Cardiol. 2013. № 168(4). P. 3770-3778.
245. Influence of folic acid on plasma homocysteine levels & arterial endothelial function in patients with unstable angina / H. Guo [et al.] // Indian J Med Res. 2009. № 129(3). P. 279-284.

246. Influences of gender on cardiovascular disease risk factors in adolescents with and without type 1 diabetes / T.L. Brown [et al.] // Int J Pediatr Endocrinol. 2016. doi: 10.1186/s13633-016-0026-6.
247. Interactions of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms, Folate, and Homocysteine on Blood Pressure in a Chinese Hypertensive Population / W.X. Li [et al.] // Clin Lab. 2017. № 63(4). P. 817-825.
248. Interaction of liver methionine adenosyltransferase with hydroxyl radical / E. Sanchez-Gongora, F. Ruiz, J. Mingorance [et al.] // FASEB. 1997. № 11. P. 1013-1019.
249. Intramitochondrial hydrogen sulfide production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase maintains mitochondrial electron flow and supports cellular bioenergetics / K. Módis [et al.] // FASEB J. 2013. № 27(2). P. 601-611.
250. Investigation of hyperhomocysteinemia / C. Veyrat-Durebex [et al.] // Ann Biol Clin (Paris). 2013. № 71(5). P. 517-525.
251. Investigation of MTHFR gene C677T polymorphism in cardiac syndrome X patients / C. Kandaz [et al.] // J Clin Lab Anal. 2017. doi: 10.1002/jcla.22247
252. Involvement of calcitonin gene-related peptide in elevation of skin temperature in castrated male rats / M. Yuzurihara [et al.] // Urology. 2003. № 62(5). P. 947-951.
253. Isa Y., Tsuge H., Hayakawa T. Effect of vitamin B_6 deficiency on S-adenosylhomocysteine hydrolase activity as a target point for methionine metabolic regulation // J. Nutr. Sci. Vitaminol. 2006. № 52(5). P. 302-306.
254. Ischemia-reperfusion reduces cystathionine-beta-synthase-mediated hydrogen sulfide generation in the kidney / Z. Xu, G. Prathapasinghe, N. Wu [et al.] // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 2009. №1. P. 27-35.
255. Jacobsen D.W. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease //Clinical Chemistry. 1998. № 44. P. 1833–1843.
256. Jackson M.R., Melideo S.L., Jorns M.S. Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and

produces a sulfane sulfur metabolite // Biochemistry. 2012. № 51(34). P. 6804-6815.

257. Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease // J. Phys.Pharm. 2008. № 59(9). P. 155-167.
258. Jakubowski H. Quality control in tRNA charging - editing of homocysteine // Acta Biochim Pol. 2011. № 58 (2). P. 149-163.
259. Jennings M.L. Transport of hydrogen sulfide and hydrosulfide anion across the human red blood cell membrane. Rapid H_2S diffusion and AE1-mediated Cl-/HS- exchange // Am J Physiol Cell Physiol. 2013. № 305(9). P. 941-950.
260. Jung Y.S. Metabolism of Sulfur-Containing Amino Acids in the Liver: A Link between Hepatic Injury and Recovery // Biol Pharm Bull. 2015. № 38(7). P. 971-974.
261. Kander M.C., Cui Y., Liu Z. Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases // J Cell Mol Med. 2017. № 21(5). P. 1024-1032.
262. Kienitz T., Quinkler M. Testosterone and blood pressure regulation // Kidney Blood Press. Res. 2008. № 31(2). P. 71-79.
263. Kimura Y., Goto Y. I., Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria // Antioxidants and Redox Signaling. 2010. № 12(1). P. 1–13.
264. Kimura H. Hydrogen sulfide: its production and functions // Exp Physiol. 2011. № 96(9). P. 833-835.
265. Kimura H., Shibuya N., Kimura Y. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant // Antioxid Redox Signal. 2012. № 17(1). P. 45-57.
266. Kimura H. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system // Neurochem Int. 2013. № 63(5). P. 492-497.
267. Kolluru G.K., Shen X., Kevil C.G. A tale of two gases: NO and H2S, foes or friends for life? Redox Biol. 2013. № 23(1). P. 313-318.

268. Kumthekar A.A., Gidwani H.V., Kumthekar A.B. Metformin associated B12 deficiency // J Assoc Physicians India. 2012. № 60. P. 58-60.
269. Lai W.K., Kan M.Y. Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction // Ann Nutr Metab. 2015. № 67(1). P. 1-12.
270. Lentz S. R., Haynes W. G. Homocysteine: is it a clinically important cardiovascular risk factor? // Cleve. Clin. J. Med. 2004. № 71 (9). P. 729–734.
271. Leichert L.I., Jakob U. Protein thiol modifications visualized in vivo // PLoS. Biol. 2004. № 2(11). P. 1723-1733.
272. Levels of homocysteine and polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease / D. Luo [et al.] // Wei Sheng Yan Jiu. 2009. № 38(1). P. 39-42.
273. Li L. An overview of the biological significance of endogenous gases: new roles for old molecules // Biochem. Soc. Trans. 2007. № 35(5). P. 1138-1141.
274. Li H., Xia N., Förstermann U. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol // Nitric Oxide. 2012. № 26. P. 102–110.
275. Linden J. Adenosine in tissue protection and tissue regeneration // Mol. Pharmacol. 2005. № 67. P. 1385-1387.
276. Long- and short-term effects of tobacco smoking on circulating concentrations of B vitamins / A. Ulvik [et al.] // Clin Chem. 2010. № 56. P. 755-763.
277. Loscalzo J., Handy D.E. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease (2013 Grover Conference Series) // Pulm Circ. 2014. № 4(2). P. 169-174.
278. Low-Dose Creatine Supplementation Lowers Plasma Guanidinoacetate, but Not Plasma Homocysteine, in a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial / B.A. Peters [et al.] // J Nutr. 2015. № 145(10). P. 2245-2252.
279. Lowicka E., Beltowski J. Hydrogen sulfide (H2S) – the third gas of interest for pharmacologists // Pharmacological Reports. 2007. № 59. P. 4-24.
280. Lu S. C. Regulation of glutathione synthesis // Mol. Aspects Med. 2009. № 30 (1-2). P. 42-59.

281. Magrone T., Jirillo E. Polyphenols from red wine are potent modulators of innate and adaptive immune responsiveness // Proc. Nutr. Soc. 2010. № 69. P. 279–285.
282. Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism / M.H. Stipanuk [et al.] // J. Nutr. 2006. № 136(6). P. 1652-1659.
283. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346) / J. L. Wallace [et al.] // Br J Pharmacol. 2010. № 159(6). P. 1236–1246.
284. Maron A.B., Loscalzo J. The Treatment of Hyperhomocysteinemia // Annu. Rev. Med. 2009. № 60. P. 39–54.
285. McCully K.S. Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention // Am. J. Clin. Nutr. 2007. № 86. P. 1563–1568.
286. McCully K.S. Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation // Ann. Clin. Lab. Sci. 2009. № 39 (3). P. 219–232.
287. Mel'nik A., Zaichko N., Palamarchyk I. Gender dimorphism of hydrogen sulfide production and physiological effects in cardiovascular system // The Third International Conference on H2S Biology and Medicine, June 4-6, 2014, Kyoto, Japan. Nitric Oxide. 2014. № 39(1). P. 16.
288. 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.
289. 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.
290. Metabolic and hormonal indices in rats with prolonged model of metabolic syndrome induced by high-carbohydrate and high-fat diet / Derkach K.V. [et al.] // Adv Gerontol. 2017. № 30(1). P. 31-38.

291. Metformin raises hydrogen sulfide tissue concentrations in various mouse organs / B. Wiliński [et al.] // Pharmacol Rep. 2013. № 65(3). P. 737-742.
292. Methionine transamination in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency / A. Tangerman [et al.] // Metabol Clin Exp. 2000. № 49. P. 1071-1077.
293. Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism / J. T. Brosnan [et al.] // Acta. Biochim. Pol. 2004. № 51 (2). P. 405–413.
294. Methylenetetrahydrofolate reductase gene A1298C polymorphism in pediatric stroke–case-control and family-based study / A. Balcerzyk [et al.] // J. Stroke Cerebrovasc. 2015. № 24. P. 61–65.
295. Moat S.J. Plasma total homocysteine: instigator or indicator of cardiovascular disease? // Ann. Clin. Biochem. 2008. № 45. P. 345-348.
296. Modulation of the activities of catalase, Cu-Zn, Mn superoxide dismutase, and glutathione peroxidase in adipocyte from ovariectomised female rats with metabolic syndrome / R.C. Guerra [et al.] // International Journal of Endocrinology. 2014. doi: 10.1155/2014/175080.175080
297. Moll S., Varga E.A. Homocysteine and MTHFR Mutations // Circulation. 2015. № 132(1). P. 6-9.
298. Murphy E., Steenbergen C. Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury // Cardiovasc Res. 2007. № 75. P. 478-486.
299. Musil J., Novakova O., Kunz K. Biochemistry in schematic perspective // Prague: Kunz Avicenum, Czechoslovak medical press. 1977. P. 182.
300. Nagpure B.V., Bian J.S. Interaction of Hydrogen Sulfide with Nitric Oxide in the Cardiovascular System // Oxid Med Cell Longev. 2016. doi: 10.1155/2016/6904327.
301. Nicholson C.K., Calvert J.W. Hydrogen sulfide and ischemia-reperfusion injury // Pharmacol Res. 2010. № 62(4). P. 289-297.

302. No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide / J.C. Mathai [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. 2009. № 106(39). P. 16633–16638.
303. Novel Biomarker of Oxidative Stress Is Associated with Risk of Death in Patients With Coronary Artery Disease / R.S. Patel [et al.] // Circulation. 2016. № 133(4). P. 361-369.
304. Obeid R., Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia // FEBS Lett. 2006. № 580(13). P. 2994-3005.
305. Okamoto M., Yamaoka M., Kimura T. Hydrogen sulfide and its effect on pancreatic beta-cells // Nihon Rinsho. 2013. № 71(1). P. 175-180.
306. Orlowski M., Mrister A. Partial reaction by γ-glutamylcysteine synthetase and evidence for an activated glutamate intermediate // J. Biol. Chem. 1971. № 246(23). P. 7095-7105.
307. Oyadomari S., Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. Cell Death Differ. 2004. № 11. P. 381–389.
308. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases / D.A. Chistiakov [et al.] // Biochimie. 2017. № 132. P. 19-27.
309. Phytoestrogen genistein up-regulates endothelial nitric oxide synthase expression via activation of cAMP response element-binding protein in human aortic endothelial cells / H. Si [et al.] // Endocrinology. 2012. № 153(7). P. 3190-3198.
310. 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
311. Perla-Kajan J., Twardowski T., Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. Amino Acids. 2007. № 32. P. 561–572.

312. Pilot study of homocysteine and cysteine in patients with thrombosis in different vascular sites. Epidemiology and response to folate / P. Casais [et al.] // Thromb Res. 2009. № 123(4). P. 592-596.
313. Plasma homocysteine and cysteine levels in retinal vein occlusion / A. Pinna, [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006. № 47(9). P. 4067-4071.
314. Plasma homocysteine is regulated by phospholipid methylation / A.A. Noga [et al.] // J. Biol. Chem. 2003. № 278(8). P. 5952-5955.
315. Plasma total homocysteine is influenced by prandial status in humans: the Hordaland Homocysteine Study / E. Nurk [et al.] // J. Nutr. 2001. № 131(4). P. 1214–1216.
316. Plasma total cysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project / L. El-Khairy [et al.] // Circulation. 2001. № 103. P. 2544–2549.
317. Polymorphic variants of genes involved in homocysteine metabolism in celiac disease / K.K. Hozyasz [et al.] // Mol. Biol. Rep. 2012. № 39. P. 3123–3130.
318. Polysulfide exerts a protective effect against cytotoxicity caused by t-buthylhydroperoxide through Nrf2 signaling in neuroblastoma cells / S. Koike [et al.] // FEBS Lett. 2013. № 587(21). P. 3548-3555.
319. Postnatal development and testosterone dependence of a rat epididymal protein identified by neonatal tolerization / S.A. Joshi [et al] // Reproduction. 2003. № 125(4). P. 3495-3507.
320. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats / T. Fukui [et al.] // Circ. Res. 1997. № 80(1). P. 45-51.
321. Prediction of reversibly oxidized protein cysteine thiols using protein structure properties / R. Sanchez [et al.] // Protein Sci. 2008. № 17(3). P. 473-481.
322. Predmore B.L., Julian D., Cardounel A.J. Hydrogen sulfide increases nitric oxide production from endothelial cells by an akt-dependent mechanism // Front Physiol. 2011. № 2. P. 104.

323. Protective effects of genistein in homocysteine-induced endothelial cell inflammatory injury / S. Han [et al.] // Mol Cell Biochem. 2015. № 403(1-2). P. 43-49.
324. Prospective study of homocysteine and MTHFR 677TT genotype and risk for venous thrombosis in a general population--results from the HUNT 2 study / I.A. Naess [et al.] // Br J Haematol. 2008. № 141(4). P. 529-535.
325. Quercetin provides greater cardioprotective effect than its glycoside derivative rutin on isoproterenol-induced cardiac fibrosis in the rat / M. Li [et al.] // Can J Physiol Pharmacol. 2013. № 91(11). P. 951-959.
326. Quercetin ameliorates oxidative stress, inflammation and apoptosis in the heart of streptozotocin-nicotinamide-induced adult male diabetic rats / J. Roslan [et al.] // Biomed Pharmacother. 2017. № 86. P. 570-582.
327. Ramipril enhances the endogenous hydrogen sulfide tissue concentration in mouse heart and brain / J. Wiliński [et al.] // Folia Med Cracov. 2008. № 49(3-4). P. 123-130.
328. Rasines-Perea Z., Teissedre PL. Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes // Molecules. 2017. № 22(1). doi: 10.3390/molecules22010068.
329. Ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine as a sensitive indicator of atherosclerosis / H. Zhang [et al.] // Mol. Med. Rep. 2016. № 14. P. 289–300.
330. Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H2S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions / S. Singh [et al.] // J. Biol. Chem. 2009. № 284(33). P. 22457-22466.
331. Response of homocysteine, cystathionine, and methylmalonic acid to vitamin treatment in dialysis patients / R. Obeid [et al.] // Clin. Chem. 2005. № 51(1). P. 196-201.
332. Restoring assembly and activity of cystathionine β-synthase mutants by ligands and chemical chaperones / J. Kopecká [et al.] // J Inherit Metab Dis. 2011. № 34(1). P. 39-48.

333. Ribas V., García-Ruiz C., Fernández-Checa J.C. Glutathione and mitochondria // Frontiers in Pharmacology. 2014. doi: 10.3389/fphar.2014.00151.
334. Role of estrogen in diastolic dysfunction / Z. Zhao [et al.] // Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2014. № 306(5). P. 628-640.
335. Role of Homocysteine in the Ischemic Stroke and Development of Ischemic Tolerance / J. Lehotský [et al.] // Front Neurosci. 2016. № 10. P. 538.
336. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes / JS Bian [et al.] // J Pharmacol Exp Ther. 2006. № 316(2). P. 670-8.
337. Role of Hydrogen Sulfide and Sulfur-Containing Amino Acids in Regulation of Tone of Smooth Muscles of the Vascular Wall in Rats / A.V. Mel'nik [et al.] // Neurophysiology. 2010. № 42(2). P. 126-131
338. Role of hydrogen sulfide in secondary neuronal injury / J.F. Wang [et al.] // Neurochem Int. 2014. № 64. P. 37-47.
339. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, key enzyme of methylation metabolism, regulates phosphatidylcholine synthesis and triacylglycerol homeostasis in yeast: implications for homocysteine as a risk factor of atherosclerosis / N. Malanovic [et al.] // J. Biol. Chem. 2008. № 29. P. 23989-23999.
340. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens / T. Oseni [et al.] // Planta Med. 2008. № 74(13). P. 1656-1665.
341. Sexual dimorphism in rat aortic endothelial function of streptozotocin - induced diabetes: possible involvement of superoxide and nitric oxide production / X. Han [et al.] // Eur J Pharmacol. 2014. № 723. P. 442-450.
342. Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure / V. Regitz-Zagrosek [et al.] // Circ. J. 2010. № 74(7). P. 1265-1273.

343. Sex- and gender-related prevalence, cardiovascular risk and therapeutic approach in metabolic syndrome: a review of the literature / G. Pucci [et al.] // Pharmacol Res. 2017. № 120. P. 34-42.
344. Sex-related differences in association of oxidative stress status with coronary artery disease / C. Vassalle [et al.] // Fertil Steril. 2012. № 97. P. 414-419
345. Sex-related differences in methionine metabolism and plasma homocysteine concentrations / N.K. Fukagawa [et al.] // Am J Clin Nutr. 2000. № 72(1). P. 22-29.
346. Shaw L.J., Butler J. Targeting priority populations to reduce disparities in cardiovascular care: health equity for all //JACC. 2014. № 64. P. 346–348.
347. Shibuya N., Kimura H. Production of hydrogen sulfide from d-cysteine and its therapeutic potential // Front Endocrinol (Lausanne). 2013. doi: 10.3389/fendo.2013.00087.
348. Skeletal muscle-derived progenitors capable of differentiating into cardiomyocytes proliferate through myostatin-independent TGF-beta family signaling / T. Nomura [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. 2008. № 365(4). P. 863-869.
349. Slow regulated release of H2S inhibits oxidative stress induced cell death by influencing certain key signaling molecules / A.S. Majid [et al.] // Neurochem Res. 2013. № 38(7). P. 1375-1393.
350. Smith P.M., Ferguson A.V. Recent advances in central cardiovascular control: sex, ROS, gas and inflammation // F1000Res. 2016. doi: 10.12688/f1000research.7987.1.
351. Solubility and Permeation of Hydrogen Sulfide in Lipid Membranes / E. Cuevasanta //PLoS ONE. 2012. № 7(4). doi: 10.1371/journal.pone.0034562.
352. S-propargyl-cysteine protects both adult rat hearts and neonatal cardiomyocytes from ischemia/hypoxia injury: the contribution of the hydrogen sulfide-mediated pathway / Q. Wang [et al.] // J Cardiovasc Pharmacol. 2009. № 54(2). P. 139-146.

353. Specific interaction of methionine adenosyltransferase with free radicals / M.A. Avila [et al.] // Biofactors. 1998. № 8(1-2). P. 27-32.
354. Sulfur dioxide relaxes rat aorta by endothelium-dependent and -independent mechanisms / Y. K. Wang [et al.] // Physiol. Res. 2009. № 58(4). P. 521-527.
355. S-sulfhydration as a cellular redox regulation / M. Iciek [et al.] // Biosci Rep. 2015. № 36(2). doi: 10.1042/BSR20150147.
356. Stein A., Bailey Sh.M. Redox biology of hydrogen sulfide: Implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology // Redox Biology. 2013. № 1. P. 32–39.
357. Stipanuk M. H., Beck P. W. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat // Biochem. J. 1982. № 206(2). P. 267-277.
358. Stipanuk M.H., Ueki I. Dealing with methionine/homocysteine sulfur: Cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur // J. Inherit. Metab. Dis. 2011. № 34. P. 17-32.
359. Structure and kinetic analysis of H2S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase / P.K. Yadav [et al.] // J Biol Chem. 2013. № 288(27). P. 20002-20013.
360. Structure-Based Insights into the Role of the Cys-Tyr Crosslink and Inhibitor Recognition by Mammalian Cysteine Dioxygenase / C.M. Driggers [et al.] // J Mol Biol. 2016. № 428(20). P. 3999-4012.
361. Structure of the mammalian NOS regulator dimethylarginine dimethylaminohydrolase: a basis for the design of specific inhibitors / D. Frey [et al.] // Structure. 2006. № 14. P. 901-911.
362. Studying the association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 gene polymorphism, cardiovascular risk and lichen planus / L. Rashed [et al.] // J Oral Pathol Med. 2017. doi: 10.1111/jop.12588.
363. Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H2S): development of H2S-releasing drugs as pharmaceuticals / G. Caliendo [et al.] // J Med Chem. 2010. № 53(17). P. 6275-6286.

364. Tang G., Wu L., Wang R. Interaction of hydrogen sulfide with ion channels // Clin Exp Pharmacol Physiol. 2010. № 37(7). P. 753-763.
365. Taniguchi S., Niki I. Significance of hydrogen sulfide production in the pancreatic β-cell // J Pharmacol Sci. 2011. № 116(1). P. 1-5.
366. Tanizawa K. Production of H2S by 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase // J. Biochem. 2011. № 149(4). P. 357-359.
367. Taoka S., Banerjee R. Characterization of NO binding to human cystathionine beta-synthase: possible implications of the effects of CO and NO binding to the human enzyme // J Inorg Biochem. 2001. № 87(4). P. 245-251.
368. Taurine ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia by reducing insulin resistance and leptin level in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) rats with long-term diabetes / K.S. Kim [et al.] // Exp. Mol. Med. 2012. № 44. P. 665–673.
369. Taurine cytoprotection: from cell to system / S. Roysommuti [et al.] // Hai J. Physiol.Scien. 2003. № 16(2). P. 17-27.
370. The cystathionine γ-lyase/hydrogen sulfide system maintains cellular glutathione status / Z.W. Lee [et al.] // Biochem J. 2014. № 460(3). P. 425-435.
371. The associations between serum biomarkers and stenosis of the coronary arteries / L. Feng [et al.] // Oncotarget. 2016. № 7(26). P. 39231-39240.
372. The biological effect of endogenous sulfur dioxide in the cardiovascular system / X.B. Wang [et al.] // Eur J Pharmacol. 2011. № 670(1). P. 1-6.
373. The cardiovascular inhibition functions of hydrogen sulfide within the nucleus tractus solitarii are mediated by the activation of KATP channels and glutamate receptors mechanisms / Qiao W. [et al.] // Pharmazie. 2011. № 66(4). P. 287-292.
374. The effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid on flow-mediated vasodilation in patients with coronary artery disease: a metaanalysis of randomized controlled trials / Y. Liu [et al.] //Atherosclerosis 2014. № 235. P. 31–35

375. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues / P. Patel [et al.] //Reprod Biol Endocrinol. 2009. doi: 10.1186/1477-7827-7-10.
376. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver / S. Fiorucci [et al.] // Gastroenterology. 2006. № 131(1). P. 259-271.
377. The Effects of H2S on the Activities of CYP2B6, CYP2D6, CYP3A4, CYP2C19 and CYP2C9 in Vivo in Rat / X. Wang [et al.] // Int J Mol Sci. 2013. № 14(12). P. 24055–24063.
378. The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease // H. Refsum [et al.] // J. Nutr. 2006. № 136(6). P. 1731-1740.
379. The influence of tobacco smoke on homocysteine level in plasma of healthy males / A. Sobczak [et al.] // Przegl. Lek. 2007. № 64. P. 679–684.
380. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health / H. Škovierová [et al.] // Int J Mol Sci. 2016. № 17(10). doi:10.3390/ijms17101733.
381. The natural products in protection agains the most important pathological changes in human metabolism / M. Votruba [et al.] // Food Sci. 2009. № 27. P. 531–534.
382. The neurovascular dysfunction induced by angiotensin II in the mouse neocortex is sexually dimorphic // H. Girouard [et al.] // Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008. № 294. P. 156-163.
383. The role of gasotransmitters NO, H_2S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning / I. Andreadou [et al.] //Br J Pharmacol. 2015. № 172(6). P. 1587-606.
384. The role of sex in cardiac function and disease / M.P. Czubryt [et al.] // Can J Physiol Pharm. 2006. № 84. P. 93–109.
385. The significance of subnormal serum vitamin B12 concentration in older people: a case control study / J. Metz [et al.] // J. Am. Geriatr. Soc. 1996. № 44. P. 1355–1361.

386. The Sulfur Metabolite Lanthionine: Evidence for a Role as a Novel Uremic Toxin / A.F. Perna [et al.] // Toxins (Basel). 2017. № 9(1). doi: 10.3390/toxins9010026.
387. Thioredoxin Reductase were Nitrated in the Aging Heart after Myocardial Ischemia/Reperfusion / K. Wang [et al.] // Rejuvenation Res. 2013. № 16(5). P. 377-385.
388. Temporal trends in treatment of ST-elevation myocardial infarction among men and women in Switzerland between 1997 and 2011 / D. Radovanovic [et al.] // Eur Heart J Acute Cardiovasc Care. 2012. № 1. P. 183–191.
389. Testosterone regulation of homocysteine metabolism modulates redox status in human prostate cancer cells / A. Prudova [et al.] // Antioxid Redox Signal. 2007. № 9(11). P. 1875-1881.
390. Testosterone regulation of renal cystathionine beta-synthase: implications for sex-dependent differences in plasma homocysteine levels / V. Vitvitsky [et al.] // Am J Physiol Renal Physiol. 2007. № 293(2). P. 594-600.
391. Tian H., Zhou G., Zhu Z. Evaluation of Cardioprotective Effects of Genistein against Diabetes-induced Cardiac Dysfunction in Rats // Trop J Pharm Res. 2015. № 14(11). P. 2015-2022.
392. Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis / N. Nagahara [et al.] // Histochem Cell Biol. 1998. № 110(3). P. 243-250.
393. Toxic effects of mildly elevated homocysteine concentrations in neuronal-like cells / M. Curro [et al.] // Neurochem Res. 2014. № 39. P. 1485-1495.
394. Trends in acute myocardial infarction in young patients and differences by sex and race, 2001 to 2010 / A. Gupta [et al.] // JACC. 2014. № 64. P. 337–345.
395. Varfolomeev E. Roles of c-IAP proteins in TNF receptor family activation of NF-κB signaling // Methods Mol Biol. 2015. № 1280. P. 269-282.
396. Vascular effects of flavonoids / B. Almeida Rezende [et al.] // Curr Med Chem. 2016. № 23(1). P. 87-102

397. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide / N. Shibuya [et al.] // J. Biochem. 2009. № 146(5). P. 623-626.
398. Veeranki S., Tyagi S.C. Defective homocysteine metabolism: potential implications for skeletal muscle malfunction // Int J Mol Sci. 2013. № 14(7). P. 15074-15091.
399. 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.
400. 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.
401. Walter P., Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. Science 2011. № 334. P. 1081–1086.
402. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? // FASEB J. 2002. № 16. P. 1792-1798
403. Wang R. Hydrogen sulfide: the third gasotransmitter in biology and medicine // Antioxid Redox Signal. 2010. № 12(9). P. 1061-1064.
404. Wenzel U., Fuchs D., Daniel H. Protective effects of soy-isoflavones in cardiovascular disease: identification of molecular targets // Hamostaseologie. 2008. № 28(1-2). P. 85-88.
405. What do we know about homocysteine and exercise? A review from the literature / B. Maroto-Sánchez [et al.] // Clin Chem Lab Med. 2016. № 54(10). P. 1561-1577.
406. Wightman J.D., Heuberger R.A. Effect of grape and other berries on cardiovascular health // J. Sci. Food Agric. 2015. № 95. P. 1584–1597.
407. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention / I. Fernandes [et al.] // Molecules. 2017. № 22(2). doi: 10.3390/molecules22020292.

408. Wine consumption reduced postprandial platelet sensitivity against platelet activating factor in healthy men / M.N. Xanthopoulou [et al.] // Eur. J. Nutr. 2016. doi: 10.1007/s00394-016-1194-0
409. Yang F., Tan H.V., Wang H. Hyperhomocysteinemia and atherosclerosis // Acta Physiol. Sin. 2005. № 57(2). P. 103-114.
410. Zaichko N.V., Olhovskiy A.S., Yurchenko P.A. Microelements complex esmin protects the age-related changes of hydrogen sulfide tissues formation in rats // Materials of 7th Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinic Biochemistry. Lviv. Ukraine. 2013. P. 191.
411. 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.
412. 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 H2S Biology and Medicine, June 4-6, 2014, Kyoto, Japan. Nitric Oxide. 2014. № 39(1). P. 18.
413. 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.
414. Zhang Q. Meng Z. The vasodilator mechanism of sulfur dioxide on isolated aortic rings of rats: Involvement of the K+ and Ca2+ channels // Eur. J. Pharmacol. 2009. № 602(1). P. 117-123.

ДОДАТОК А
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

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).

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ А

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.

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ А

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).

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ А

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.

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ А

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.

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ А

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.

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ А

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 ІІ 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.

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ А

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). С. 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.

ДОДАТОК Б
АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

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

1. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Біохімічні основи патогенезу ураження внутрішніх органів різної етіології та способи їх фармакологічної корекції» (Тернопіль, 3-4 листопада 2011 р., форма участі - усна доповідь).
2. Перший Українсько-Йорданський медичний конгрес та дні йорданської культури (Вінниця, 12-14 вересня 2011 р., форма участі - постерна доповідь).
3. IV Національний з'їзд фармакологів України (Київ, 10-12 жовтня 2011 р., форма участі - постерна доповідь).
4. III міжнародна науково-практична конференція молодих вчених (Вінниця, 17-18 квітня 2012 р., форма участі - постерна доповідь).
5. II міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2013 р., форма участі - усна доповідь).
6. 7th Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinic Biochemistry (Lviv, May 23-24, 2013, форма участі - постерна доповідь).
7. Conference "Actual opinions in biology, ecology, medicine and pharmacology" (Kharkiv, September 26-27, 2013, форма участі - публікація тез).
8. XI Український біохімічний конгрес (Київ, 6-10 жовтня 2014 р., форма участі - усна доповідь, отримав диплом за найкращу доповідь в конкурсі серед молодих вчених в секції - медична біохімія).
9. Науково-практична конференція «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб» (Вінниця, 17-18 квітня 2014 р., форма участі - постерна доповідь).

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ Б

10. The Third International Conference on H_2S Biology and Medicine (Kyoto, Japan, June 4-6, 2014, форма участі - публікація тез).
11. Науково-практична конференція «Актуальні питання експериментальної і клінічної біохімії та фармакології» (Тернопіль, 9-10 жовтня 2014 р., форма участі - усна доповідь).
12. XIV Міжнародна наукова конференція «Перший крок в науку-2017» (Вінниця, 26-28 квітня, 2017, форма участі - публікація тез).
13. LX науково-практична конференція “Здобутки клінічної та експериментальної медицини” (Тернопіль, 14 червня 2017, форма участі - постерна доповідь).