

## **ВІДГУК**

офіційного опонента на дисертацію Мельника Андрія Володимировича  
“Статеві особливості метаболізму сірковмісних амінокислот і гідроген  
сульфіду та їх зв‘язок зі станом серцево-судинної системи  
(експериментальне дослідження)” представлену на здобуття наукового  
ступеня доктора медичних наук  
за фахом 03.00.04 – біохімія

### **Актуальність теми**

Серцево-судинні захворювання вже тривалий час продовжують займати перше місце серед причин смертності та інвалідності населення більшості країн, включаючи і Україну. Більшість захворювань серцево-судинної системи рано чи пізно завершуються розвитком серцевої недостатності, яка власне і визначає тривалість життя пацієнта. Проведеними в останні роки мультидисциплінарними дослідженнями встановлено, що інфаркт міокарду, артеріальна гіпертензія і серцева недостатність мають відмінності в механізмах розвитку і клінічного перебігу у осіб різної статі. Механізми статевого диморфізму безумовно пов’язані з впливом статевих гормонів на регуляцію тонусу судин, процеси вільно радикального окислення, апоптозу тощо. Однак молекулярні механізми гендерних відмінностей перебігу більшості кардіологічних захворювань залишаються невивченими.

Відомо, що у осіб жіночої статі в крові підвищений вміст ендотелійрелаксуючого фактора у порівнянні з особами чоловічої статі. Останнє десятиріччя ознаменувалось великою кількістю досліджень присвячених ролі гіперцистеїнемії і гіпергомоцистеїнемії у виникненні і розвитку серцево-судинних захворювань, крім того, все більшу увагу дослідників привертає гідроген сульфід, якому притаманні властивості не

тільки сигнальної молекули, газотрасміттера, цитопротектора, але і фізіологічного вазодилататора.

Що ж до статевих особливостей обміну сірковмісних амінокислот та H<sub>2</sub>S і їх зв'язку з функціонуванням міокарду і судин існуючих досліджень вкрай недостатньо; не з'ясованими також лишаються питання модуляції активності кінетичних параметрів та експресії H<sub>2</sub>S-продукуючих ензимів в серці і судинах в гендерному аспекті, а також можливі напрямки фармакологічної корекції означених метаболічних порушень.

Отже, на думку опонента напрямок рецензованого дослідження є актуальним і таким, що відкриває реальні перспективи розуміння молекулярних механізмів, що формують статеві особливості перебігу серцево-судинних захворювань і сприятиме пошуку і розробці ефективних засобів фармакологічної корекції. Поставлена автором мета і завдання носять фундаментальний характер, відрізняються застосуванням сучасних біохімічних, фізіологічних, фармакологічних і статичних методів дослідження.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Актуальність дисертаційного дослідження підтверджується і тим, що воно виконувалось в рамках планової науково-дослідної роботи кафедри біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова "Вплив екзогенних та ендогенних чинників на обмін гідрогенсульфіду та асоційованих з ним метаболічних процесів в нормі та при патології" (№ держреєстрації -0113U006461), а здобувач є співвиконавцем цієї роботи.

### **Наукова новизна дослідження**

Дисертантом отримані наукові результати, які відрізняються світовою новизною та забезпечують вирішення важливої проблеми біохімії – розкриття молекулярних механізмів стать-асоційованої патології серцево-судинної системи і висвітлення тих сторін патологічного процесу, які

можуть стати об'єктом (мішенню) терапевтичного втручання. Зокрема вперше показаний статъ-асоційований вплив модуляторів обміну гідроген сульфіду на біохімічні і функціональні параметри серцевого м'язу і судин. Виявлено вплив рівню статевих гормонів на характер метаболізму H<sub>2</sub>S в серцево-судинній системі. Встановлено, що статеві гормони більшою мірою впливають на процеси десульфурування цистеїну і меншою – на процеси реметилювання і трансметилювання гомоцистеїну.

Доведено, що різноспрямована дія статевих гормонів на біохімічні і функціональні показники стану кардіоваскулярної системи реалізується через систему H<sub>2</sub>S/цистатіон-γ-ліаза, а збільшення концентрації H<sub>2</sub>S в сироватці крові ефективно перешкоджає ішемічному ушкодженню міокарду у тварин обох статей. Встановлено також, що введення за умов ГГЦ поліфенольної сполуки геністеїну як у самців так і у самок супроводжувалось кардіопротекторним і вазопротекторним ефектами, які реалізувались за разунок позитивного впливу на процеси транссульфування, деградації цистеїна та утворення H<sub>2</sub>S в тканинах.

Підрозділ «Наукова новизна отриманих результатів» повністю відображає основні положення роботи. Рецензент вважає, що автор міг би більш лаконічно і чітко висвітлили свої незаперечні досягнення, адже йому вдалося не тільки показати провідну роль порушень H<sub>2</sub>S-патерну у статъ-асоційованій серцево-судинній патології, але й сформулювати принципи фармакологічної корекції уражень міокарду і судин поліфенольними сполуками.

### **Практична цінність дослідження**

Робота має безсумнівне практичне значення, оскільки автор не тільки дослідив процеси, пов'язані з розвитком кардіо- і вазотоксичності у тварин обох статей при різному гормональному стані, але й окреслив нові метаболічні мішенні для корекції означених порушень за допомогою відомих і нових лікарських засобів, обґрунтував доцільність застосування

фітоестрогенного препарату геністеїн за умов гіпергомоцистейнемії та гіперцистейнемії.

Практичне значення 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, 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.

### **Ступінь обґрутованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.**

Застосовані автором роботи методичні прийоми дослідження дозволяють отримати об'єктивні та достовірні результати, що повністю відповідають цілям і задачам дисертаційної роботи.

Висновки і рекомендації повністю відображають представлений у роботі фактичний матеріал, не суперечать йому й знайшли відображення в представлених до дисертаційної роботи публікаціях.

### **Загальні відомості про роботу**

Дисертація викладена українською мовою на 376 сторінках друкованого тексту. Рукопис дисертації складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, п'яти розділів власних досліджень, аналізу і узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, двох додатків.

## **Характеристика змісту роботи**

У «*Вступі*» автор обґруntовує актуальність дисертаційної роботи і наголошує на тому, що адекватна корекція стану серцево-судинної системи при її порушеннях різної етіології є неможливою без з'ясування молекулярних механізмів, покладених в основу статевих відмінностей формування і перебігу означених патологічних процесів і, зокрема, гендерних особливостей обміну сірковмісних амінокислот та H<sub>2</sub>S.

Зважаючи на це, цілком логічно виглядає мета дослідження – з'ясувати статеві особливості метаболізму сірковмісних амінокислот та гідроген сульфіду у тварин, оцінити їх зв'язок зі станом серцево-судинної системи в нормі та гіпергомоцистейнемії і експериментально обґрунтувати нові підходи до корекції серцево-судинної патології. Задачі дослідження повністю відповідають меті дисертаційної роботи і дозволяють її успішно вирішити. Підрозділ «Наукова новизна» отриманих результатів відображає основні положення роботи. Рецензент вважає, що автор міг би більш чітко і конкретно висвітлити свої незаперечні досягнення, адже йому вдалось не тільки встановити статеві особливості обміну патерну сірковмісних амінокислот як патогенетичних чинників серцево-судинних захворювань, але за допомогою сучасних методів статистичного аналізу асоціювати їх з кількісними функціональними показниками серцево-судинної системи досліджуваних тварин і ізольованих фрагментів судин.

«*Огляд літератури*» присвячений аналізу літературних джерел щодо ролі статевих гормонів у гендерних відмінностях патогенезу серцево-судинних захворювань, а також їх ролі в регуляції метаболізму сірковмісних амінокислот і гідрогенсульфіду. Крім того, дисертант зупинився на ролі природніх поліфенольних сполук в обміні сірковмісних амінокислот. Огляд літератури написаний логічно і лаконічно гарною українською мовою. Автор провів глибокий і критичний аналіз сучасних досліджень в області біохімічних механізмів гіпергомоцистейнемії і

показав як досягнення світової науки останніх років, так і невирішенні проблеми. Останні власне і стали предметом дослідження автора.

**Розділ 2** роботи присвячений матеріалам та методам, використаним в дисертаційному дослідженні. Детально представлена характеристика експериментальних тварин, залучених в експеримент, та розподіл їх за серіями. Детально описані моделювання в організмі дефіциту статевих гормонів, надлишку та дефіциту  $H_2S$  у тварин, ішемії/реперфузії серцевого мязу та непрямої вазоконстрикції ізольованих судин.

Охарактеризовані використані в роботі реактиви, біологічно активні речовини та лікарські засоби. Заслуговує на увагу те, що автор в своїй роботі використав широкий спектр методів досліджень, в першу чергу біохімічних. До роботи залучені також сучасні молекулярно-генетичні, фізіологічні і електрофізіологічні дослідження. Особливу увагу привертає спектр статистичних досліджень, який поряд з традиційними підходами включав абсолютно необхідний при даній постановці мети роботи кореляційний і персентильний аналіз. Отже, такий широкий набір сучасних методів досліджень забезпечує високий науковий рівень і дозволяє автору отримати результати, що мають незаперечне фундаментальне і прикладне значення.

**Розділ 3** присвячений встановленню зв'язку між рівнем статевих гормонів сірковмісних метаболітів в крові і активністю ензимів  $H_2S$ -патерну в печінці тварин. За допомогою проведених досліджень встановлено, що рівень статевих гормонів є чинником, який суттєво впливає на рівень сірковмісних амінокислот і  $H_2S$  в крові, а саме у самців тварин вміст гомоцистеїну та цистеїну вирогідно перевищує такий у самок, в той час як рівень  $H_2S$  у останніх вищий ніж у щурів чоловічої статі. Поряд з цим у самців виявляється менша активність ферментів метилування, транссульфування і обміну цистеїну в печінці у порівнянні з самицями.

Цілком очевидно, що проведення замісної терапії у кастрюваних тварин корегує активність H<sub>2</sub>S -синтезуючих ферментів печінки до рівня інтактних тварин.

**В 4 розділі** роботи автор досліджує зв'язок між рівнем статевих гормонів і вмістом сірковмісних метаболітів крові з показником метаболізму H<sub>2</sub>S в міокарді і судинах експериментальних тварин. Дослідження ензиматичної продукції H<sub>2</sub>S свідчило, що активності ЦГЛ, ЦАТ, та ТСТ в міокарді і судинах самок вирогідно перевищує такі у тварин чоловічої статі. Аналіз тих же показників в процесі старіння свідчив про нівелювання означених гендерних розбіжностей. Припускаючи, що статеві відмінності продукції H<sub>2</sub>S в серці і судинах можуть бути результатами впливу статевих гормонів на експресію гену CSE в міокарді, автор дослідив і довів, що кастрація змінює вектор статевих відмінностей експресії гену CSE у серцевому мязі тварин, крім того показав, як статі і рівень гормонів впливають не лише на продукцію H<sub>2</sub>S, а й на деградацію його в міокарді (так у самців швидкість його утилізації більш ніж на 30 % перевищувала таку у самок). Таким чином автору вдалося довести що різноспрямований вплив статевих гормонів на вміст H<sub>2</sub>S в серцевому мязі і судинах реалізується через їх вплив на активність(експресію ) і кінетичні параметри H<sub>2</sub>S –синтезуючих ферментів та процеси утилізації його в серцево-судинній системі. Цей факт може свідчити не лише про те що, означені процеси лежать в основі статевозалежної резистентності до ураження серцево-судинної системи, але й про необхідність диференційованих підходів фармакологічної корекції наведених порушень.

**Розділ 5** присвячений вивченю біохімічних і функціональних показників серцево-судинної системи за умов ішемії міокарду і їх зв'язку з рівнем H<sub>2</sub>S і рівнем статевих гормонів. В якості додаткових інструментів для аналізу використовували NaHS, D,L-пропаргілгліцин і тіолактон гомоцистеїну.

Проведені експерименти довели, що ішемія міокарда асоціюється із зменшенням рівня  $H_2S$  в сироватці крові, а реперфузія не приводить до повного його відновлення так само, як не відновлюються і функціональні показники серцевого мязу. Матеріал цього розділу також підтверджує, що статеві відмінності у функції серцево-судинної системи в нормі і при патологічних станах можуть бути пов'язані з обміном сірковмісних амінокислот і  $H_2S$  в міокарді і судинах.

Логічним продовженням роботи стало дослідження впливу гіпергомоцистейнії на метаболізм сірковмісних амінокислот і  $H_2S$  у щурів обох статей і пов'язаних з нею змін у функції серцево-судинної системи (*розділ 6*). Проведені дослідження встановили, що тіолактонова гіпергомоцистейнія супроводжується зменшенням швидкості утилізації гомоцистейну, цистеїну та утворення  $H_2S$  в печінці, зменшенням рівня  $H_2S$  та активності  $H_2S$ -синтезуючих ензимів в сироватці крові, міокарді, аорті, зниженням активності сульфітоксидази в міокарді, зміною фракційного розподілу глутатіону і активацією вільнопардикального окиснення ліпідів і протеїнів в серці і судинах. Означені фактори є передумовою цитолізу кардіоміоцитів і зменшення ендотелійрелаксуючої функції  $H_2S$ , причому виразність порушень в міокарді, судинах і печінці самців була вирогідно більшою ніж у тварин жіночої статі.

Значний інтерес викликають ті частини дисертаційної роботи, які присвячені вивченю кардіопротекторної і вазопротекторної дії поліфенольних сполук геністеїну і кверцетину за умов гіпергомоцистенемії у щурів обох статей (*розділ 7*).

Відомо, що рослинні естрогеноподібні речовини досить широко застосовуються у жінок менопаузального періоду для корекції серцево-судинних розладів, але чи пов'язаний їх позитивний вплив на стан серця і судин з метаболізмом сірковмісних амінокислот і  $H_2S$  до цього часу залишилось нез'ясованим. Автору вдалося довести, що геністеїн більш

активно попереджував формування дефіциту H<sub>2</sub>S в сироватці крові самців ніж кверцетин, зниження активності H<sub>2</sub>S-синтезуючих ензимів у міокарді та аорті, та активності його мітохондріального окиснення сульфітоксидазою міокарду, що в свою чергу було запобіжником цитолізу міокардіоцитів і ендотеліальної дисфункції.

В *розділі 8* автор провів ґрунтовний аналіз результатів, узагальнення яких надав у 2-х схематичних зображеннях, що відображають молекулярні механізми реалізації впливу статевих гормонів на резистентність міокарду та аорта до пошкодження та механізми формування стать-асоційованої серцево-судинної патології за умов гінергомоцистейнемії і можливі мішені реалізації дії генестеїну.

**Висновки роботи** повністю відображають представлений в роботі фактичний матеріал, не суперечать йому і знайшли відображення в представлених до дисертаційної роботи публікаціях.

### **Повнота викладення матеріалів у дисертації в опублікованих працях і авторефераті.**

Результати дисертаційної роботи, їх аналіз і узагальнення роботи повністю викладена в 46 опублікованих наукових працях, в тому числі 4 з них – у міжнародних виданнях, 24 – у фахових виданнях, рекомендованих ДАК України, 9 з яких являють собою одноосібні, 17 – включені до міжнародних науковометричних баз, в тому числі 2 – в базу «Scopus», 16 публікацій – в збірках матеріалів симпозіумів, конференцій, з'їздів, 2 патенти України на корисну модель. Автореферат повністю відображає основний зміст дисертаційного дослідження та його положення.

### **Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення**

В авторефераті і самій дисертаційній роботі суттєві недоліки, щодо їх змісту та оформлення відсутні, однак є деякі дрібні помилки технічного і редакційного характеру, а саме: показники клітинного циклу GOG1, S,

G2M, SUB-GOG1 не винесені в скорочення, автор часто використовує вираз «рівень насыщеності організму статевими гормонами» - на думку рецензента більш точним формулюванням є рівень або вміст статевих гормонів у плазмі крові, на сторінці 313 в розділі «Аналіз і узагальнення результатів» знову частково повторюється опис того, що вже прозвучало в «Матеріалах і методах», сам розділ «Матеріали і методи дослідження» дещо перевантажений описом загальновідомих методичних підходів накшталт пробопідготовки, центрифугування, тощо. Дані зауваження не носять принципового характеру і не впливають на інтерпретацію результатів дослідження.

Під час ознайомлення з роботою у рецензента виникли запитання, які могли бстати предметом дискусії під час захисту.

1) При проведенні замісної гормональної терапії після кастрації тварин автор обрав різні шляхи введення для препаратів жіночих (в/шл) і чоловічих (п/ш) статевих гормонів. З огляду на особливості фармакокінетики речовин при різних шляхах введення чи не міг би цей фактор впливати на те, що рівень тестостерону збільшувався в 14 разів в той час як естрадіолу лише у 7.25 разів, а відтоді і на більш виразні зміни показників обміну сірковмісних амінокислот у самців?

2) Яка ланка метаболізму досліджуваних сірковмісних амінокислот є первинною (тригерною) у формуванні сталь-асоційованої патології серцево-судинної системи? Яка може бути мішенню для реалізації первинної фармакологічної реакції геністеїну і кверцетину?

3) Відомо, що структурні аналоги чоловічих статевих гормонів анаболічні стероїди можуть використовуватись в клінічній практиці для покращення анаболічних процесів, зокрема в серцевому мязі при міокардіодистрофії, в тому числі і у жінок. Яким чином це може узгоджуватись з даними, отриманими автором в дисертаційній роботі?

## **Відповідність дисертації встановленими вимогам.**

Дисертаційна робота Мельника А.В. є самостійним завершеним науковим дослідженням. Експериментальний матеріал опрацьований за допомогою сучасних методів статистики, є достовірним і не викликає сумнівів. Дисертація оформлена у відповідності до вимог ДАК України.

### **Висновок**

Дисертаційна робота Мельника Андрія Володимировича на тему «Статеві особливості метаболізму сірковмісних амінокислот і гідроген сульфіду та їх зв'язок зі станом серцево-судинної системи (експериментальне дослідження)» є самостійною, завершеною кваліфікаційною науковою роботою, яка повністю відповідає спеціальності «03.00.04 – біохімія». На основі виявлення статевих особливостей метаболізму сірковмісних амінокислот і гідроген сульфіду і їх зв'язку зі станом серцево-судинної системи дисертаційне дослідження обґрунтовує нові підходи до можливої корекції кардіоваскулярної патології.

За змістом, актуальністю, науковою новизною та практичною значимістю дисертаційна робота відповідає чинним вимогам, викладеним в п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. №567 щодо докторських дисертацій, а її автор - Мельник Андрій Володимирович заслуговує присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія.

Завідувач кафедри фармацевтичної, біологічної та токсикологічної хімії, доктор мед. наук, професор, заслужений діяч науки і техніки України



Підпис

Засвідчує  
ВЧЕНИЙ СЕКРЕТАР УНІВЕРСИТЕТУ

18 12 2012

Ніженковська І.В.

*Мельник Андрій Володимирович*

18 12 2012