

ВІДЗИВ

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

Дисертаційне дослідження А.В. Мельника присвячене експериментальному обґрунтуванню нових підходів корекції статево-асоційованої патології серця та судин на підставі вивчення статевих особливостей обміну сірковмісних амінокислот і H_2S в нормі та при гіпергомоцистейнемії.

Актуальність теми

На сьогодні численні клінічні, епідеміологічні та експериментальні дослідження підтверджують важому роль статі у розвитку захворювань серцево-судинної системи. Проблеми гендерної кардіології привертають все більше уваги, адже відмінності у факторах ризику, клінічних проявах, діагностичних і лікувальних підходах для чоловіків та жінок є найбільш значими саме при серцево-судинних захворюваннях.

Молекулярні механізми статевого диморфізму кардіоваскулярної патології переважно пов’язують з різними біологічними ефектами статевих гормонів: естрадіол посилює утворення вазодилататорів, зменшує активність процесів вільнорадикального окиснення, володіє антиапоптичними та протизапальними ефектами, тоді як тестостерон індукує вазоконстирикцію, активує процеси пероксидації ліпідів та протеїнів, має проапоптичу дію.

За останнє десятиріччя були ідентифіковані нові незалежні фактори ризику серцево-судинної патології такі як гіпергомоцистейнемія та

гіперцистеїнємія. В той же час 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. Також відсутні данні щодо впливу статевих чинників на активність основних шляхів синтезу та катаболізму гомоцистеїну й 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), яка регулює тонус судин, скоротливість міокарду, агрегацію тромбоцитів, виявляє протиішемічні, антиоксидантні, протизапальні та антиапоптичні властивості. На сьогодні інформація щодо особливостей обміну H_2S у осіб різної статі та за різної насыщеності 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 й судин у осіб різної статі та за різного рівня насыщеності організму статевими гормонами. Між тим, порушення обміну H_2S можуть виявитись одним із модифікованих чинників, що залучений у формування гендерних відмінностей розвитку серцево-судинної патології.

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 окреслити нові мішені та напрямки фармакологічної корекції захворювань серцево-судинної системи у осіб різної статі. Саме

тому тему дисертації Мельника А.В, яка присвячена цій проблемі, слід вважати доцільною та актуальною.

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).

Наукова новизна дослідження

Здобувачем, по суті, вперше проведені системні порівняльні дослідження статевих особливостей біохімічних та функціональних параметрів стану міокарда та аорти щурів, які детермінуються не лише типом та рівнем статевих гормонів, але й відмінностями метаболізму H₂S в серцево-судинній системі. Так, виявлені статеві особливості метаболізму гомоцистеїну, цистеїну і гідроген сульфіду в печінці, міокарді та аорті дозволили автору оцінити їх внесок у формування стать-специфічної патології серцево-судинної системи і на цій основі обґрунтувати нові підходи до корекції захворювань серця та судин у осіб різної статі.

Також вперше виявлено, що рівень статевих гормонів, концентрація гомоцистеїну, цистеїну й H₂S в крові є чинниками, які впливають на характер метаболізму H₂S в серцево-судинній системі як самців, так і самок щурів. Кастрація самок викликає зменшення ензиматичної продукції H₂S, збільшення швидкості утилізації H₂S, зменшення експресії гену CSE, рівня H₂S в міокарді та аорті, тоді як гонадектомія самців має протилежний вплив на вказані показники. Різноспрямована дія статевих гормонів на біохімічні та функціональні параметри стану серцево-судинної системи щурів реалізується через систему H₂S / цистатіонін-γ-ліаза.

Автор експериментально обґрунтовує 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 вазодилатуючого ефекту H_2S та цистеїну, натомість введення NaHS викликає протилежні зміни.

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. За експериментальної гіпергомоцистеїнемії введення поліфенольних речовин супроводжувалось кардіо- та вазопротективним ефектами.

Фармакотерапевтична дія геністеїну проявлялась в його здатності попереджувати порушення процесів транссульфування, деградації цистеїну та утворення H_2S в тканинах, стримувати формування гіпергомоцистеїнемії 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.

Практична цінність дослідження

Дисертантом проведено комплексне систематизоване експериментальне дослідження, суть якого полягає в поглибленні уявлень щодо ролі статі та статевих гормонів в регуляції метаболізму сірковмісних амінокислот, H_2S в нормі та при патології, а також у розкритті нових аспектів молекулярних механізмів формування стать-специфічної патології серця та судин. Експериментально обґрунтовано, що за умов

гіпергомоцистеїнemii з метою корекції стать-специфічних змін метаболічного та функціонального стану серцево-судинної системи доцільно використовувати геністейн - 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.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Як здобувач наукового ступеня доктора медичних наук, Андрій Володимирович Мельник в своїй роботі спирається на чіткі критерії щодо відтворення окремих патологічних моделей та використання надійних методичних підходів визначення статевих особливостей метаболізму сірковмісних амінокіслот і гідроген сульфіду та їх зв'язок зі станом серцево-судинної системи. Наукові положення та висновки дисертаційної роботи наводяться на підставі вичерпного аналізу результатів біохімічних, імуноферментних, молекулярно-генетичних, електрофізіологічних, функціональних, патофізіологічних та фармакологічних досліджень, що базуються на адекватних методах та достатній статистичній і математичній

обробці отриманого цифрового матеріалу. Весь комплекс застосованих методичних прийомів повністю відповідає цілям та задачам досліджень, кількість яких достатня для отримання достовірних результатів.

Загальні відомості про роботу

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.

Характеристика змісту роботи

Вступ до роботи написано лаконічно із залученням основних посилань на узагальнюючі літературні джерела. Він є достатнім як з позиції актуальності обраної теми, так і сформульованої мети та завдань дослідження. У вступі охарактеризовано наукову новизну дослідження та її науково-практичну цінність. Наведено дані щодо публікацій та апробації основних, базових результатів дослідження.

Перший розділ роботи «*Огляд літератури*» вміщує основні положення, що стосуються аналізу особливостей сучасних уявлень про тендерні аспекти епідеміології, факторів ризику та патогенетичних чинників ССЗ. Автором прискіпливо аналізуються загальні властивості метаболізму сірковмісних амінокислот й гідроген сульфіду в серцево-судинній системі та роль статевих чинників в його регуляції. Розглянуті патогенетичні механізми кардіо- та вазотоксичної дії порушень обміну гомоцистеїну, цистеїну й H₂S, а також висвітлені основні принципи їх лікування.

Другий розділ «*Матеріали та методи дослідження*» детально розкриває базові етапи експериментальної роботи: наводиться загальна логічно збудована блок-схема дослідження. Дисертант зрозуміло описує процес моделювання змін гормонального статусу, надлишку та дефіциту H₂S, ішемії/реперфузії серця, тіолактонової гіпергомоцистейнемії. Крім цього використані методичні підходи, які дозволили оцінити нові біохімічні механізми формування гендераційованої патології серцево-судинної системи: з'ясувати статеві особливості процесів метилування, транссульфування, обміну цистеїну та H₂S в печінці, міокарді й аорті в нормі та при гіпергомоцистейнемії.

Експерименти проведені на достатній кількості білих щурів, отриманих з науково-експериментальної клініки Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. Всі етапи досліджень виконані згідно «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та затверджені комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (протокол № 6 від 15 червня 2017 року).

В цілому, матеріали, які викладені дисертантом у другому розділі, характеризуються високим рівнем методичних підходів для виконання дисертаційної роботи.

Викладення власних результатів зроблено згідно загальної мети та поставлених завдань. Так, спочатку (*розділ 3*) досліжується метаболізм сірковмісних амінокислот, H₂S в печінці, вміст гомоцистейну, цистеїну та H₂S в сироватці крові самців й самок щурів залежно від рівня насиченості організму статевими гормонами. Автором доведено, що рівень статевих гормонів є важливим чинником, який детермінує вміст сірковмісних амінокислот та H₂S в крові. При цьому встановлена вірогідно менша активність ферментів метилування, транссульфування, обміну цистеїну в

печінці самців порівняно із самками, що до певної міри визначає стать-специфічні співвідношення рівнів гомоцистеїну, цистеїну та H₂S в крові. Проведення замісної гормонотерапії кастрованих тварин повертає показники активності H₂S-синтезуючих ферментів в міокарді та аорті до рівня контрольної групи тварин.

В *розділі 4* приводяться результати вивчення стану міокарду та аорти у самців й самок щурів залежно від рівня статевих гормонів та вмісту H₂S в серцево-судинній системі. Здобувачем були виявлені та наведені в роботі статистично вірогідні результати, які вказують на статеві відмінності активності про-антиоксидантних ензимів, стану системи глутатіону та активності вільнорадикального окиснення ліпідів і протеїнів. Це обумовлено різноспрямованим впливом статевих гормонів на вказані процеси.

При проведенні дослідження біохімічного та функціонального стану серця й аорти щурів обох статей (*розділ 5*) залежно від рівня статевих гормонів був проаналізований зв'язок цих показників з рівнем гідроген сульфіду в міокарді та аорті. Проведені дослідження засвідчили існування статевих відмінностей біохімічних і функціональних показників стану міокарда й аорти щурів. Виявилось, 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. Оклюзія лівої коронарної артерії у самців і самок щурів супроводжується зменшенням рівня H₂S у сироватці крові та супроводжується пригніченням мікроциркуляції та кисневого забезпечення кардіоміоцитів. Реперфузія вінцевої судини у тварин обох статей не викликала повного відновлення вмісту H₂S 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, що підтверджують результати даного дослідження.

У *розділі 6* дисертантом наведені дані щодо впливу гіпергомоцистеїнемії на метаболізм сірковмісних амінокислот і гідрогенсульфіду та аналізується зв'язок зі станом серцево-судинної системи. Проведені дослідження засвідчили, що тривале введення тіолактону гомоцистеїну викликає стать-специфічні порушення метаболізму H_2S в міокарді та аорті щурів. Експериментальна гіпергомоцистеїнемія супроводжується зменшенням вмісту H_2S в міокарді та аорті на тлі зниження активності H_2S -синтезуючих ферментів, мітохондріального окиснення H_2S за участі сульфіт оксидази, збільшенням загальної швидкості утилізації екзогенного H_2S в міокарді та аорті щурів обох статей, а також ініціює розвиток ендотеліальної дисфункції у тварин обох статей, причому її виразність достовірно вища у самців, ніж у самок. Як зазначається автором, 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.

У *розділі 7* дисертантом наведені дані щодо аналізу впливу поліфенольних сполук геністеїну та кверцитину на обмін сірковмісних амінокислот і гідроген сульфіду, а також оцінюється стан серця та аорти щурів за умов гіпергомоцистеїнемії. 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 цих умов. Автор підкреслює, що ефективність геністеїну за впливом на окремі показники була вищою у самців, ніж у самок. Використання кверцитину

стримувало зростання швидкості утилізації H₂S, падіння активності сульфітоксидази, формування дефіциту H₂S та не впливало на активність H₂S-синтезуючих ензимів у серцево-судинній системі самців і самок щурів на тлі експериментальної гіпергомоцистейнемії. За цих умов ефективність кверцетину значно поступалась геністеїну.

Аналіз та узагальнення результатів (*розділ 8*) викладено у відповідності до послідовності завдань роботи та окремих розділів власних досліджень. Ознайомлення з цим розділом дало відчуття цілісності виконаної роботи, високого наукового рівня. Автор володіє знанням сучасної наукової літератури, вміло описує та аналізує отримані результати.

Висновки узагальнюють результати досліджень, є обґрунтованими та відображають основні напрями в цій галузі. Вони викладені послідовно, що свідчить про відповідні досягнення при розв'язанні поставлених завдань та мети роботи.

Список використаних джерел складено згідно існуючих вимог, із чітким дотриманням діючих правил щодо бібліографічних посилань.

Повнота викладання матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті

Фактичні дані, а також теоретичні узагальнення повною мірою висвітлені в 46 наукових працях, в тому числі 4 статтях у міжнародних виданнях, 24 статтях у фахових виданнях, рекомендованих ДАК України (9 одноосібних; 17 включено до міжнародних наукометричних баз, серед яких 2 - до бази «Scopus»), а також 16 - в збірках, матеріалах з'їздів та конференцій, 2 патентах України на корисні моделі. Автореферат за змістом відповідає суті дисертаційної роботи, і в ньому відображені головні її положення.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення

Суттєвих недоліків у дисертаційній роботі та авторефераті не виявлено. І дисертація, і автореферат написані логічно з дотриманням існуючих вимог щодо структури, змісту і технічного оформлення, хоч і не позбавлені деяких помилок непринципового характеру: відповідно до ДСТУ 3651.1-97, знак % пишеться окремо від цифри.

Під час офіційного захисту, на нашу думку, варто обговорити наступні питання:

1. В роботі показано, що естрогени збільшують спорідненість цистатіонін-γ-ліази до цистеїну та максимальну каталітичну активність, тоді як тестостерон виявляє протилежну дію. Які, на вашу думку, молекулярні механізми лежать в основі цього?
2. В стендових дослідженнях Вами розкриті нові механізми, через які реалізується вплив естрогенів на тонус судин. Виявлено, що естрогени збільшують чутливість аорти до вазодилатуючої дії гідроген сульфіду та зменшують чутливість до вазоконстрикторної дії гомоцистеїну. Чим ви можете пояснити такі ефекти естрогенів?
3. За умов гіпергомоцистеїнемії у самців та самок найбільш ефективним виявився геністеїн - біофлавоноїд з естрогеноподібними властивостями. Між тим відомо, що застосування естрогенів асоціюється зі зростанням ризику раку молочної залози, тромбозом глибоких вен та ін. Враховуючи вищеперечислене, чи доцільним буде використання геністеїну для профілактики серцево-судинних захворювань?

Відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертаційна робота Мельника А.В. є самостійно виконаною, завершеною роботою, в якій отримано нові науково обґрунтовані результати, які у сукупності є суттєвими для медичної науки і практики. Вона відповідає вимогам ДАК України за новизною отриманих

результатів, їх теоретичною та практичною значимістю, високим рівнем узагальнень і висновків, а також технічним оформленням роботи.

Висновок

Дисертаційна робота Андрія Володимировича Мельника за темою: “Статеві особливості метаболізму сірковмісних амінокислот і гідроген сульфіду та їх зв’язок зі станом серцево-судинної системи (експериментальне дослідження)” є завершеною, самостійно виконаною кваліфікаційною науковою роботою, яка обґруntовує нові підходи до корекції гендераційованої патології серцево-судинної системи на підставі вивчення статевих особливостей процесів метилування, транссульфування, обміну цистеїну та гідроген сульфіду (H_2S) в печінці, міокарді й аорті в нормі та при гіпергомоцистеїнії.

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.

Заступник директора з наукової роботи,
завідувач лабораторією цитогенетики

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної
медицини НАМН України»

доктор мед. наук, старший наук. співр.

Новікова С.М.

