

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ М.І. ПИРОГОВА**

ЮРЧЕНКО ПЕТРО ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК: 546.221.1: 616.83: 616.153

**РОЛЬ СИСТЕМИ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В МЕХАНІЗМАХ УРАЖЕННЯ
МОЗКУ ЗА УМОВ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ**

14.01.32 – медична біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Вінниця – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Вінницькому національному медичному університеті імені М.І. Пирогова МОЗ України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, доцент **ЗАІЧКО Наталія Валентинівна**, Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, завідувач кафедри біологічної та загальної хімії

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор, **НАКОНЕЧНА Оксана Анатоліївна**, Харківський національний медичний університет МОЗ України, м. Харків, завідувач кафедри біологічної хімії

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

Захист відбудеться 04 березня 2016 р. о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 05.600.05 при Вінницькому національному медичному університеті імені М.І.Пирогова (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Вінницького національного медичного університету імені М.І.Пирогова (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56).

Автореферат розісланий 27 січня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради К 05.600.05
кандидат медичних наук

О.А. Назарчук

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Синдром гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ) розглядають як фактор ризику нейроваскулярних та нейродегенеративних захворювань. Частота аберантних рівнів гомоцистеїну серед пацієнтів з ішемічними інсультами (Kwon H.M. et al., 2014; Wang C.Y. et al., 2014), хворобою Альцгеймера (Zheng Z. et al., 2014), шизофренією (Song X. et al., 2014), депресією (Narayan S.K. et al., 2014), хворобою Паркінсона (Sarkota S. et al., 2014) є достовірно вищою, ніж в загальній популяції. Встановлені достовірні асоціації ГГЦ із німими інфарктами мозку (Seshadri S. et al., 2008), лейкоареозами (Стопінчук А.В., 2013; Seshadri S. et al., 2008), церебральними мікро- і макроангіопатіями (Jeon S.B. et al., 2014). Між тим, питання щодо патогенетичної значимості ГГЦ і досі залишається дискутабельним.

В Україні високі рівні гомоцистеїну виявляються у 10% здорових дорослих осіб (Андрušко І.І., 2008), 13-43% хворих з артеріальною гіпертензією та ішемічною хворобою серця (Коваленко В.М., Андрušко І.І., 2011), у 55% хворих з ішемічними інсультами (Безсмертна Г.В., 2005).

Метаболізм сірковмісних амінокислот в головному мозку має певні особливості, які детермінують його чутливість до негативного впливу гомоцистеїну. Зокрема, в нейронах гомоцистеїн може перетворюватись до потужних ексайтотоксинів - гомоцистеїнової кислоти та гомоцистеїнсульфінату (Boldyrev A., 2013). Нейротоксичний ефект ГГЦ може реалізуватись через оксидативний та нітрозативний стрес, гіпометилування, хімічну модифікацію нейроспецифічних протеїнів (Fujiki Y. et al., 2012; Khodadadi S. et al., 2012; Suszyńska-Zajczyk J. et al., 2014).

В мозку метаболізм сірковмісних амінокислот пов'язаний з утворенням гідроген сульфїду (H_2S) - нейротрансміттера, цитопротектора та антиоксиданта (Kimura H., 2011; 2013). Синтез H_2S з гомоцистеїну та цистеїну відбувається за участі V_6 -залежних ензимів (цистатіонін- β -синтази, цистеїнамінотрансферази) та V_6 -незалежних ензимів (3-меркаптопіруватсульфуртрансферази) в корі, гіпокампі, мозочку, стовбурі мозку, церебральних судинах (Abe K., Kimura H., 1996; Shibuya N. et al., 2009; Zaichko N.V. et al., 2014). У фізіологічних умовах H_2S збільшує чутливість NMDA-рецепторів нейронів до глутамату, стимулює надходження Ca^{2+} в астроцити, збільшує синаптичну активність (Kimura H., 2013). В умовах патології H_2S проявляє нейропротекторні властивості - запобігає розвитку глутамат-індукованого оксидативного стресу, стабілізує мітохондрії та зменшує пошкодження нейронів при експериментальній ішемії-реперфузії, гіпоксії, травмі головного мозку (Kimura H., 2013). H_2S залучений до регуляції відкриття мітохондріальної пори (Shimanskaia T.V., 2013).

Роль системи H_2S в механізмах реалізації токсичної дії ГГЦ залишається не визначеною. В літературі відсутня інформація стосовно змін вмісту H_2S в мозку за умов ГГЦ, не визначений вплив модуляторів обміну H_2S на нейротоксичність гомоцистеїну. Вивчення цих питань поглибить розуміння молекулярних механізмів формування ГГЦ-асоційованої патології центральної нервової системи, дозволить окреслити нові підходи до корекції таких станів і вирішити актуальне завдання медичної біохімії.

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 гідроген сульфїду та асоційованих з ним метаболїчних процесїв в нормї та при патологїї”, № держреєстрацїї - 0113U006461 (автор - спїввиконавець).

Мета дослідження - встановити роль системи гідроген сульфїду в механїзмах ураження мозку за умов експериментальної гїпергомоцистеїнемїї та обґрунтувати пїдходи до її корекцїї.

Завдання дослідження:

1. Вивчити вміст H_2S , активнїсть H_2S -синтезуючих ензимїв (цистатїонїн- β -синтази, цистеїнамїнотрансферази / 3-меркаптопїруватсульфуртрансферази, тїосульфатдїтіолсульфїдтрансферази), показники утилізацїї H_2S в мозку щурїв за умов їзольованої (їндукованої тїолактоном гомоцистеїну) та комбїнованої (гїповїтамінозно-метїонїнової) ГГЦ.

2. Дослїдити вміст нейронспецифїчної енлази та нейротрофїчного фактору в сироватцї кровї та оцїнити зв'язок з сироватковим рївнем гомоцистеїну, показниками обмїну H_2S та метаболїчними змїнами в мозку щурїв за умов їзольованої ГГЦ.

3. Вивчити вплив модуляторїв обмїну H_2S ($NaHS$, амінооксиацетату) на стан прооксидантої та антиоксидантної системи, метаболїчні змїни в мозку, показники нейродегенерацїї та поведїнковї реакцїї (в тестї «вїдкрите поле») у щурїв за умов їзольованої ГГЦ.

4. Дослїдити вплив гїпогомоцистеїнемїчних засобїв (композицїї вїтамїнїв B_6 , B_9 , B_{12} , полїмїкроелементного комплексу есміну) на стан системи H_2S та метаболїчні змїни в мозку щурїв за умов їзольованої ГГЦ.

5. Оцїнити вплив вїтамїнїв B_6 , B_9 , B_{12} , есміну та бетаїну на вміст нейронспецифїчної енлази, нейротрофїчного фактору в сироватцї кровї та морфологїчні змїни в мозку щурїв за умов комбїнованої ГГЦ.

Об'єкт дослідження: стан системи H_2S в мозку за гїпергомоцистеїнемїї.

Предмет дослідження: активнїсть ензимїв синтезу та утилізацїї H_2S , вміст H_2S в мозку, маркери нейротоксичностї та нейродегенерацїї (сироватковий вміст нейронспецифїчної енлази, мозкового нейротрофїчного фактору), метаболїчні та мїкроскопїчні змїни в мозку, вплив гїпогомоцистеїнемїчних засобїв на обмін H_2S в мозку.

Методи дослідження: бїохїмїчні, їмуноферментнї, патофїзіологїчні, фармакологїчні, морфологїчні, статистичнї.

Наукова новизна одержаних результатїв. Визначена роль системи H_2S в механїзмах формування несприятливого метаболїчного патерну в мозку щурїв за умов їзольованої та комбїнованої ГГЦ та експериментально обґрунтованї пїдходи до корекцїї нейродегенеративних процесїв при порушеннї обмїну гомоцистеїну за допомогою донорїв H_2S , вїтамїнних та полїмїкроелементних засобїв.

Вперше показано, що ГГЦ (як їзольована, так ї комбїнована з дефїцитом вїтамїнїв B_6 , B_9 , B_{12}) викликає зниження вмісту H_2S в мозку, що асоцїюється зї зниженням активностї ПАЛФ-залежних H_2S -синтезуючих ензимїв (цистатїонїн- β -

синтази, цистеїнамінотрансферази) та ПАЛФ-незалежної тіосульфатдитіолсульфід-трансферази, збільшенням загальної швидкості утилізації H_2S зі зниженням активності сульфітоксидази в тканинах мозку.

Доведено, що дефіцит H_2S є незалежним чинником, який потенціює розвиток оксидативного стресу та пригнічення синтезу глутатіону, поглиблює дисбаланс в обміні аденілових нуклеотидів та енергодефіцит в мозку за ГГЦ.

Вперше показано, що інгібітор синтезу H_2S амінооксиацетат підвищує нейротоксичний ефект ГГЦ, а неорганічний донор H_2S ($NaHS$) прискорює елімінацію надлишку гомоцистеїну, сприяє нормалізації метаболічного патерну в мозку, зменшує депримуєчий ефект ГГЦ на орієнтовно-дослідницьку активність та емоційно-мотиваційну сферу тварин.

Механізми нейротоксичної дії гомоцистеїну та протекторної дії H_2S можуть опосередковуватись через модуляцію рівня мозкового нейротрофічного фактору та нейронспецифічної енолази.

Практичне значення одержаних результатів. Проведені дослідження поглиблюють сучасні уявлення про біохімічні механізми нейротоксичної дії ГГЦ, асоційованої з порушеннями обміну H_2S , та окреслюють новий метаболічний патерн для корекції нейродегенеративних процесів.

Обґрунтовано доцільність застосування полімікроелементного препарату есміну у комплексі із вітамінами B_6 , B_9 , B_{12} для корекції стану системи H_2S та нормалізації метаболічних порушень (енергодефіциту, антиоксидантної системи, нуклеотидного обміну) в мозку при ГГЦ. Показана перспективність використання донорів H_2S для зменшення нейродегенеративних порушень, індукованих ГГЦ. Практичне значення результатів даного дослідження підтверджується 2 Патентами України на корисні моделі (№ 87884; 87885).

Результати дослідження впроваджено в наукову роботу науково-дослідної клініко-діагностичної лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова (протокол №1 від 13.01.2015); відділу клінічної ревматології НДІ реабілітації інвалідів (протокол №6 від 21.09.2015). Результати дослідження впроваджені в науково-педагогічну роботу кафедр біологічної та загальної хімії (протокол № 22 від 26.06.2015), патологічної фізіології (протокол №2 від 2.10.2015), фармакології (протокол № 3 від 5.10.2015) ВНМУ ім. М.І. Пирогова; кафедри медичної, біоорганічної та біологічної хімії ДВНЗ «Українська медична стоматологічна академія» (протокол № 1 від 31.08.2015); кафедр фармакології з клінічною фармакологією (протокол № 2 від 22.09.2015), фармації ННІ ПО (протокол № 2 від 22.09.2015) ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського», біологічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (протокол № 2 від 22.09.2015).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною науковою працею автора. Дисертантом особисто визначено тему, мету та завдання роботи, зроблено пошук та аналіз даних літератури, статистично оброблені результати дослідження, оформлено дисертацію. Основні положення роботи та висновки обговорені з науковим керівником і сформульовані автором самостійно. Всі результати отримано автором особисто або за безпосередньої участі. Автором самостійно проведено моделювання ГГЦ та виконані всі біохімічні дослідження на

базі кафедри біологічної та загальної хімії та науково-дослідної клініко-діагностичної лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідоцтво про переатестацію №002/10 від 11 січня 2010 р.; №049/15 від 02.03.2015 р.). Морфологічні дослідження виконані за допомогою доцента кафедри гістології Короля А.П. та співробітників науково-дослідної лабораторії функціональної морфології та генетики розвитку ВНМУ ім. М.І. Пирогова (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №003/10 від 11 січня 2010 р.; №050/15 від 02.03.2015 р.). Оформлення наукових публікацій, патентів, впроваджень виконано дисертантом особисто. Автор висловлює глибоку вдячність колегам за допомогу, їх співучасть відмічена у спільних публікаціях. Автор не запозичував ідеї та розробки співавторів.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались на: другій міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 2013); 7-th Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry (Lviv, 2013); VII Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю з клінічної фармакології (Вінниця, 2013), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014), науково-практичній конференції «Актуальні питання експериментальної і клінічної біохімії та фармакології» (Тернопіль, 2014); III Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 2015).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 19 наукових праць, з них 8 статей (1 односібна) у наукових фахових виданнях ДАК України та 1 стаття у науковому періодичному виданні іншої держави (4 статті в журналах, включених до міжнародних наукометричних баз), 8 тез в матеріалах з'їздів та конференцій, 2 патенти України на корисну модель.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 174 сторінках друкованого тексту (основна текстова частина - 134 сторінки) і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, розділу, присвяченого аналізу і узагальненню одержаних результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних літературних джерел, що включає 238 найменувань (49 кирилицею, 189 латиницею). Робота містить 25 рисунків, 48 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

В огляді літератури наведені сучасні уявлення про особливості обміну гомоцистеїну та H_2S в мозку, механізми нейротоксичності та шляхи корекції ГГЦ.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проведені на 194 білих лабораторних щурах-самцях (*Rattus norvegicus*) масою 200-280 г, отриманих з науково-експериментальної клініки ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Досліди виконані 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) та вимог комісії з біоетики ВНМУ (протокол № 6 від 14.05.2015). Всі тварини були розподілені на 4 серії дослідів, по

8-10 особин в групі. Через визначені умовами експерименту проміжки часу тварин знеживлювали методом декапітації під пропофоловим наркозом (60 мг/кг в/о). Всі маніпуляції проводили в стандартних умовах. Моделі ГГЦ відтворювали згідно рекомендацій ДФЦ МОЗ України (2007 р.).

Модель ізольованої ГГЦ створювали шляхом введення тіолактону D,L-гомоцистеїну (Sigma, США) в/шл в дозі 200 мг/кг маси протягом 14 діб або в дозі 100 мг/кг маси протягом 28 діб.

З метою інгібування синтезу H_2S в мозку щурам з ізольованою ГГЦ вводили амінооксиацетат (АОА) 15 мг/кг 1 раз на добу в/оч; для збільшення концентрації H_2S в мозку вводили натрій гідросульфід (NaHS) 3 мг/кг в/оч 1 раз на добу з 10 по 14 добу. Дози модуляторів запозичені з літератури і не викликали загибелі тварин (Волощук Н.І. та ін., 2011; Kurozumi Y. et al., 1999).

На моделі ізольованої ГГЦ оцінювали профілактичний ефект 28-добового введення вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} (714; 143; 14,3 мкг/кг маси на добу), полімікроелементного засобу есміну (35 мг/кг) та їх поєднання за критеріями впливу на систему H_2S та біохімічні зміни в мозку щурів. Такі добові дози вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} виявляють максимальний гіпогомоцистеїнемічний ефект, але не мають токсичної дії, не стимулюють ріст тварин (Артемчук М.А., 2008). Есмін (АТ «Київський вітамінний завод») створений на основі поліядерних комплексів мікроелементів (Fe, Cu, Zn, Co, Mn, Cr) із N-2,3-диметилфенілантраніловою кислотою та кисеньвмісних солей V, Mo, Se. Ці мікроелементи є компонентами антиоксидантних ензимів та кофакторів обміну сірковмісних амінокислот (Ferrer J.L., 2004; Пентюк Н.О. та ін., 2012).

Модель комбінованої гіповітамінно-метіонінової ГГЦ створювали шляхом годування тварин напівсинтетичною крохмально-казеїновою дієтою, що містила 1% L-метіоніну і була повністю позбавлена вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} . Модель комбінованої ГГЦ характеризується підвищенням вмісту гомоцистеїну в сироватці крові тварин в 10-13 раз і поєднується з субклінічною недостатністю вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} через 14 діб. На моделі комбінованої ГГЦ оцінювали лікувальний ефект 7-добового введення вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} , есміну та бетаїну (450 мг/кг маси в/шл) за критеріями впливу на стан системи H_2S в мозку, біохімічні та морфологічні маркери нейротоксичності у щурів.

Через 24 години після останнього введення речовин тварин піддавали евтаназії, сироватку крові, головний мозок тварин використовували для подальших досліджень. Визначали рівень гомоцистеїну, показники обміну H_2S , про- та антиоксидантної систем, тіол-дисульфідного та енергетичного обміну, маркери нейротоксичності. Поведінкові реакції тварин оцінювали за допомогою нейроетологічного тесту «відкрите поле» (Кальян В.В., 2007; Непорада К.С., 2011). Для гістологічних досліджень (світлова мікроскопія, гематоксилін-еозин) використовували фронтальні зрізи сенсомоторної кори великих півкуль головного мозку, яка відіграє важливу роль у моторно-руховій та умовно рефлексорній діяльності, процесах навчання та адаптації.

Біохімічні дослідження. Вміст H_2S в мозку визначали як описано (Wiliński V., 2011). Мозок 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., в супернатанті визначали вміст H_2S спектрофотометричним методом за реакцією з N,N -диметил-пара-фенілендіаміном в присутності $FeCl_3$. Всі маніпуляції проводили у стерильних герметизованих пластикових пробірках (для попередження втрат H_2S).

Для інших досліджень наважку головного мозку гомогенізували протягом 1-2 хв. в охолодженному середовищі 1,15% калію хлориду у співвідношенні 1:4 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло). Центрифугували 30 хв при 600 g при температурі 4°C, відбирали аліквоти постядерного супернатанту в мікропробірки Eppendorf і до проведення досліджень зберігали при -20°C. Активність H_2S -синтезуючих ензимів – ЦБС (КФ 4.2.1.22), ЦАТ (КФ 2.6.1.3), ТСТ (КФ 2.8.1.5) в постядерному супернатанті міокарду оцінювали за приростом сульфід-аніону (Заїчко Н.В. та ін., 2009). Вміст H_2S в середовищі визначали за реакцією з N,N -диметил-пара-фенілендіаміном в присутності $FeCl_3$ (Dombkowski R., 2004). Здатність мозку до утилізації екзогенного H_2S визначали в модельній системі за швидкістю зниження концентрації сульфід-аніону (Патент України №87884). Активність NADPH-оксидази (КФ 1.6.3.1) визначали за поглинанням NADPH при 340 нм (Fukui T. et al., 1997), тіоредоксинредуктази (КФ 1.8.1.9) - за швидкістю NADPH-залежного відновлення 5,5'-дітіобіс(2-нітробензоату) (Jung H.I. et al., 2004), супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) - за здатністю гальмувати окиснення кверцетину (Костюк В.А. та співав., 1990). Активність сульфітоксидази (КФ 1.8.3.1) визначали за швидкістю окиснення сульфід-аніону в присутності гексоціаноферрату калію (Cohen H. J. et al., 1971).

Активність S-аденозилгомоцистеїнгідролази (КФ 3.3.1.1) визначали за зниженням вмісту гоцистеїну в реакції конденсації з аденозином (Isa Y. et al., 2006). Активність метіонаденозилтрансферази (КФ 2.5.1.6) та активність глутаматцистеїнлігази (КФ 6.3.2.2) визначали спектрофотометричними методами за швидкістю накопичення неорганічного фосфату (Chiang P. K. et al., 1977; Orłowski M. et al., 1971). Активність 5'-нуклеотидази (КФ 3.1.3.5) та нуклеозидтрифосфатдифосфогідролази (NTPD-ази, КФ 3.6.1.5) визначали за кількістю неорганічного фосфату, який утворився при гідролізі АМФ та АДФ (Рыбальченко В. К., Коганов М. М., 1988; Frassetto S. et al., 2000). Вміст аденілових нуклеотидів визначали в безбілковому трихлороцтовому екстракті тканин мозку (1:10) хроматографічним методом (Прохорова М.И. 1982).

Вміст ТБК-активних продуктів визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (Владимиров Ю.В., 1972), карбонільних груп - за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразиним (Заїчко Н. В., 2003). Вміст відновленого глутатіону визначали у депротейнізованому фільтраті мозку за реакцією з 5,5'-дітіобіс(2-нітробензоатом) (Ellman G.L., 1956). Вміст протеїну визначали мікробіуретовим методом (Кочетов Г.А., 1980). В сироватці крові визначали вміст гоцистеїну, нейронспецифічної енолази (NSE) та нейротрофічного фактору (BDNF) методом ІФА за стандартними наборами «Homocysteine EIA» (Axis-Shield, Англія); «NSE EIA KIT» (DAI, США); «BDNF Quantikine ELISA» (R&D Systems, США) на аналізаторі STAT FAX 303/PLUS.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою стандартних методів із застосуванням пакету прикладних програм «MS Excel» та «STATISTICA 5,5» (ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний № АХХR910A374605FA). Оцінювали середнє значення, стандартні помилки, достовірність відмінностей. Для оцінки міжгрупової різниці застосовували параметричний t-критерій Ст'юдента, непараметричний критерій U Мана-Уїтні, для визначення зв'язків між показниками – кореляційний аналіз за Пірсоном. Вірогідними вважали дані при $p < 0,05$. Результати наведено як $M \pm m$.

Результати дослідження та їх обговорення. Встановлено, що вміст H_2S в мозку інтактних щурів-самців ($n=18$) складав $2,70 \pm 0,12$ ($Me=2,55$; $CI\ 95\% 2,11-3,47$) нмоль/мг протеїну. Такі рівні H_2S в мозку виявлялись за умов фізіологічного базального рівня гомоцистеїну в сироватці крові ($6,57 \pm 0,23$ мкмоль/л). Співвідношення між вмістом H_2S та гомоцистеїну у інтактних тварин становило $0,43 \pm 0,03$ ($Me=0,39$; $CI\ 95\% 0,27-0,67$).

Введення тіолактону гомоцистеїну 200 мг/кг 14 діб та 100 мг/кг 28 діб викликало дозозалежне підвищення вмісту гомоцистеїну в сироватці крові (в 3,25 та 2,54 рази), що супроводжувалось зниженням вмісту H_2S в мозку (в 2,0-2,1 рази) та істотним падінням відношення H_2S / гомоцистеїн (в 6,14 та 5,13 рази) (табл. 1). Вміст H_2S в мозку достовірно обернено корелював з рівнем гомоцистеїну в сироватці крові ($r=-0,51$; $p < 0,05$). Зниження вмісту H_2S в мозку за умов ізольованої ГГЦ асоціювалось із дисбалансом у шляхах синтезу / деградації цієї біологічно-активної молекули. Спостерігалось достовірне зниження каталітичної активності всіх H_2S -синтезуючих ензимів в мозку щурів з ізольованою ГГЦ, при цьому найбільш суттєво знизилась активність ЦБС (1,52-1,89 рази) порівняно з ЦАТ/3-МТС (в 1,29-1,45 рази) та ТСТ (1,46-1,71 рази). За умов ізольованої ГГЦ підвищувалась загальна швидкість утилізації H_2S (в 1,70-1,77 рази) з одночасним зниженням активності сульфітоксидази (в 1,83-1,90 рази) в мозку щурів.

Оцінка стану системи H_2S за умов комбінованої гіповітамінозно-метіонінової ГГЦ засвідчила, що саме зростання рівня гомоцистеїну є пріоритетним чинником формування дефіциту H_2S в мозку. Аліментарне навантаження тварин метіоніном за умов недостатності вітамінів B_9 , B_{12} , B_6 викликало важку ГГЦ (рівень гомоцистеїну підвищився у 12,0 разів), що асоціювалось зі зниженням вмісту H_2S в мозку в 2,6 рази та багаторазовим зниженням відношення H_2S / гомоцистеїн. В умовах комбінованої ГГЦ істотно знижувалась активність як ПАЛФ-залежних ензимів (ЦБС, ЦАТ), так і ензимів, які не містять вітамінних кофакторів (ТСТ та сульфітоксидази), а також підвищувалась швидкість деградації H_2S . Зміни показників обміну H_2S в мозку щурів з комбінованою ГГЦ були аналогічним за спрямованістю, однак більшим за виразністю, ніж у щурів з ізольованою ГГЦ (рис. 1). Як і у випадку ізольованої ГГЦ, за умов комбінованої ГГЦ більш суттєво знизилась активність ЦБС (в 2,25 рази), ніж ЦАТ (в 1,48 рази) та ТСТ (в 1,92 рази).

Таким чином, за чутливістю до депримуючого впливу ГГЦ (як ізольованої, так і комбінованої) H_2S -синтезуючі ензими мозку можна розташувати таким чином ЦАТ < ТСТ < ЦБС.

Таблиця 1

Вміст гомоцистеїну в сироватці крові та показники системи H_2S в мозку щурів за умов ізольованої ГГЦ ($M \pm m$)

Показники	Тіолактон гомоцистеїну, 200 мг/кг 14 діб		Тіолактон гомоцистеїну, 100 мг/кг 28 діб	
	Контроль, n=9	ГГЦ, n=9	Контроль, n=10	ГГЦ, n=10
	1	2	3	4
Гомоцистеїн, мкмоль/л	6,58±0,40	21,4±1,42*	6,62±0,23	16,8±0,92*#
Біохімічні показники мозку				
H_2S , нмоль/мг протеїну	2,72±0,19	1,33±0,15*	2,64±0,15	1,24±0,12*
ЦБС, нмоль H_2S /хв·мг протеїну	0,472±0,044	0,249±0,025*	0,451±0,023	0,297±0,018*
ЦАТ/3-МСТ, нмоль H_2S /хв·мг протеїну	0,385±0,025	0,265±0,020*	0,393±0,021	0,305±0,026*
ТСТ, нмоль H_2S /хв·мг протеїну	1,83±0,08	1,07±0,06*	1,96±0,05	1,34±0,09*#
Сульфітоксидаза, нмоль / хв·мг протеїну	4,47±0,29	2,36±0,20*	4,10±0,29	2,24±0,39*
Швидкість утилізації H_2S , нмоль S^{2-} /хв·мг протеїну	0,184±0,012	0,326±0,028*	0,187±0,017	0,318±0,014*

Примітки:

- * - $p < 0,05$ відносно контролю;
- # - $p < 0,05$ між групами 2 та 4.

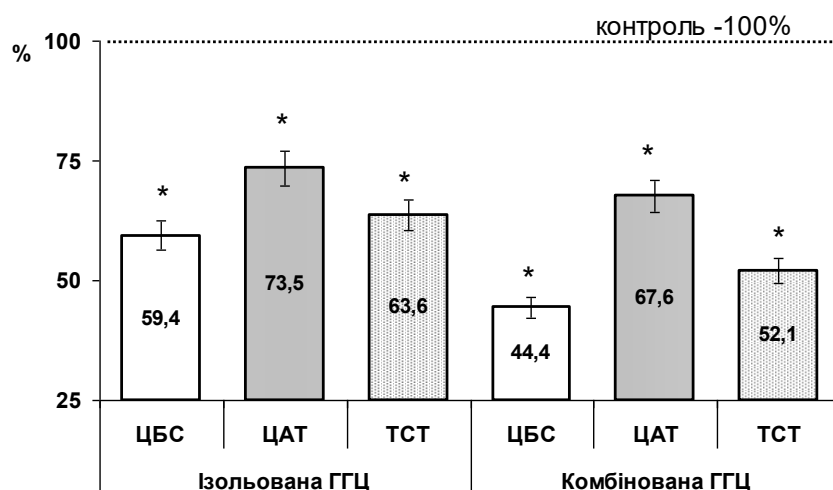


Рис. 1. Спрямованість змін активності H_2S -синтезуючих ензимів в мозку щурів за умов ізольованої та комбінованої ГГЦ.

Примітка. * - $p < 0,05$ відносно контролю; контроль прийнято за 100%.

ГГЦ індукувала розвиток оксидативного стресу в мозку щурів, про що свідчить зростання активності прооксиданту NADPH-оксидази, вмісту ТБК-

активних продуктів та карбонільованих протеїнів (на 92,9; 85,2 та 64,8%; $p < 0,05$), зниження активності антиоксидантних ензимів - СОД, тіоредоксинредуктази, глутаматцистеїнлігази та вмісту відновленого глутатіону (на 57,1; 40,8; 50,3; 48,2%; $p < 0,05$). Між вмістом H_2S та показниками про- / антиоксидантної системи в мозку тварин виявлялись достовірні зв'язки: прямі з активністю тіоредоксинредуктази, глутаматцистеїнлігази, вмістом глутатіону ($r = 0,68; 0,67; 0,45; p < 0,05$), обернені - з активністю NADPH-оксидази, рівнем ТБК-активних продуктів, карбонільних груп протеїнів ($r = -0,49; -0,56; -0,47; p < 0,05$).

За умов ГГЦ та дефіциту H_2S в мозку реєструвались порушення енергетичного обміну - зниження вмісту АТФ та енергетичного заряду; дисбаланс в обміні аденілових нуклеотидів та аденозину у зв'язку із зниженням активності 5'-нуклеотидази та NTPD-ази; зниження активності метіонінаденозилтрансферази та S-аденозилгомоцистеїнгідролази. Ці зміни створюють передумови для порушення аденозинового сигналіngu, пригнічення синтезу H_2S та гіпометилування, оскільки S-аденозилметіонін є алостеричним активатором ЦБС (Kimura H., 2013), а S-аденозилгомоцистеїн є потужним інгібітором метилтрансфераз (Isa Y. et al., 2006). Шлях ЦАТ /3-МТС \rightarrow меркаптопіруват $\rightarrow H_2S$ може підвищувати активність циклу Кребса та постачати електрони для дихального ланцюга (Módos K., 2013), тому його пригнічення може бути чинником формування енергодефіциту в клітинах мозку.

Біохімічними маркерами ушкодження мозку та нейродегенеративних процесів слугують зміни вмісту мозкового нейротрофічного фактору (BDNF) та нейронспецифічної енолази (NSE) в сироватці крові. Введення тіолактону гомоцистеїну індукувало дозозалежне підвищення (на 47,9-72,8%; $p < 0,05$) вмісту NSE та зниження (на 34,4-43,5%; $p < 0,05$) вмісту BDNF в сироватці крові. Між сироватковим рівнем гомоцистеїну та вмістом NSE виявлявся достовірний прямий кореляційний зв'язок середньої сили та обернений зв'язок - з рівнем BDNF ($r = 0,52; -0,46; p < 0,05$). Між вмістом H_2S в мозку та сироватковими рівнями NSE та BDNF виявлялись більш сильні асоціації, спрямовані протилежно (рис. 2).

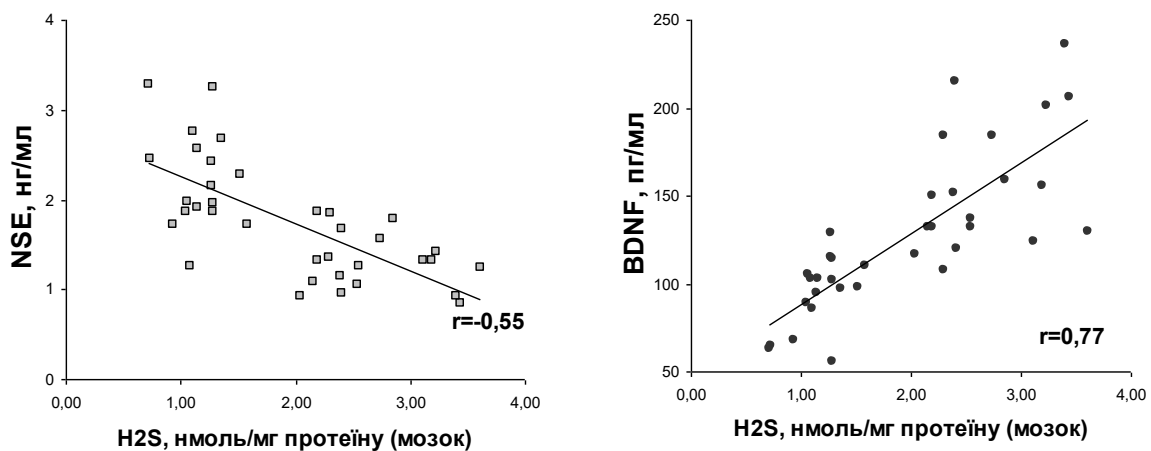


Рис. 2. Кореляційні залежності між вмістом H_2S (мозок) та сироватковими нейроспецифічними маркерами (BDNF, NSE). $r > 0,45$ є достовірним ($p < 0,05$).

Виникає питання, в якій мірі порушення обміну H_2S інтегровані в метаболічний патерн, що створюється в мозку за умов ГГЦ. Тому на наступному етапі ми оцінили вплив модуляторів обміну H_2S на біохімічні показники стану мозку у щурів з ізольованою підгострою ГГЦ (табл. 2). Введення АОА підвищувало важкість ГГЦ (на 54,7%) та поглиблювало дефіцит H_2S в мозку (на 28,5%), поглиблювало ГГЦ-індукований дисбаланс у шляхах синтезу та утилізації H_2S в мозку із більш сильним депримуєчим ефектом щодо ЦБС та сульфітоксидази. Введення NaHS справляло протилежний ефект – зменшувало виразність ГГЦ, підвищувало H_2S в мозку (на 34,6%), сприяло відновленню нормальних співвідношень у шляхах синтезу та утилізації H_2S в мозку за умов ГГЦ. Модулятори обміну H_2S модифікували ГГЦ-асоційований метаболічний патерн в мозку і ефект АОА та NaHS був протилежним.

Таблиця 2

Вплив модуляторів обміну H_2S на біохімічні показники сироватки крові та мозку щурів з ізольованою ГГЦ ($M \pm m$)

Показники	Групи щурів			
	Контроль, n=9	ГГЦ, n=9	ГГЦ + АОА, n=10	ГГЦ + NaHS n=10
	1	2	3	4
Гомоцистеїн, мкмоль/л	6,58±0,40	21,4±1,42*	33,1±2,51*#	15,4±0,86*#§
BDNF, пг/мл (сироватка)	154±13,0	101±6,01*	84,5±4,69*#	122±7,44*#§
NSE, нг/мл (сироватка)	1,25±0,11	2,16±0,17*	3,02±0,26*#	1,62±0,13*#§
Біохімічні показники мозку				
H_2S , нмоль/мг протеїну	2,72±0,19	1,33±0,15*	0,95±0,06*#	1,79±0,08*#§
GSH, мкмоль/мг протеїну	6,33±0,41	3,28±0,39*	2,30±0,25*#	4,41±0,27*#§
АТФ, мкмоль / г тканини	3,12±0,17	1,94±0,14*	1,78±0,09*	2,35±0,07*#§
АДФ, мкмоль / г тканини	0,97±0,04	1,72±0,07*	1,94±0,05*#	1,35±0,06*#§
АМФ, мкмоль / г тканини	0,65±0,03	0,97±0,04*	1,07±0,04*	0,80±0,02*#§
NADPH-оксидаза	1,70±0,08	3,28±0,26*	4,55±0,22*#	2,46±0,13*#§
Тіоредоксинредуктаза	6,03±0,46	3,57±0,32*	2,58±0,31*#	4,51±0,28*#§
СОД (ум од /хв·мг протеїну)	5,22±0,44	2,24±0,13*	1,60±0,14*#	3,55±0,15*#§
Глутаматцистеїнлігаза	3,98±0,52	1,95±0,31*	1,09±0,23*#	2,76±0,21*#§
5'-Нуклеотидаза	7,24±0,48	3,35±0,32*	2,73±0,41*	5,27±0,53*#§
NTPD-аза (апіраза)	6,94±0,23	3,36±0,50*	2,67±0,42*	4,15±0,16*§
Метіонінаденозилтрансфераза	2,05±0,17	1,18±0,30*	1,15±0,15*	1,46±0,10*
S-аденозилгомоцистеїн-гідролаза	4,18±0,24	2,64±0,48*	2,51±0,23*	2,73±0,41*

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно групи 1;
2. # - $p < 0,05$ відносно групи 2;
3. § - $p < 0,05$ відносно групи 3;
4. активність ензимів – у нмоль/хв·мг протеїну.

Введення АОА поглиблювало порушення про- / антиоксидантної рівноваги, зниження вмісту АТФ та енергетичного заряду. Введення NaHS зменшило (на 18-22%) приріст активності NADPH-оксидази, вмісту ТБК-активних продуктів та карбонільних груп протеїнів, підвищило (на 25-50%) активність тіоредоксинредуктази, СОД, глутаматцистеїнлігази та вміст GSH, зменшувало диспропорцію між вмістом аденілових нуклеотидів в мозку щурів з ГГЦ. Введення АОА посилювало, а NaHS зменшувало депримуєчий вплив ГГЦ на активність NTPD-ази та 5'-нуклеотидази, метіонінаденозилтрансферази та S-аденозил-гомоцистеїнгідролази в мозку щурів з ГГЦ. Введення АОА потенціювало ГГЦ-індуковане зниження вмісту BDNF (на 16,2%) та зростання вмісту NSE (на 39,8%). Натомість, NaHS викликало підвищення вмісту BDNF (на 44,3%) та зниження вмісту NSE (на 25,0%) в сироватці крові у щурів з ГГЦ.

Таким чином, стан системи H_2S в мозку є вагомим чинником, що детермінує зміни про- / антиоксидантної системи, зниження вмісту GSH, впливає на енергозабезпечення клітин та нуклеотидний обмін, модифікує нейротоксичний ефект ГГЦ. Нещодавно підтверджено, що донори H_2S стимулюють експресію СОД, тіоредоксинредуктази в культурі нейрональних клітин (Liu Y.Y., 2013).

Ізольована ГГЦ викликала зміни поведінкових реакцій щурів в тесті «відкрите поле» (рис. 3), які свідчать про пригнічення орієнтовно-дослідницької діяльності та емоційно-мотиваційних реакцій (скорочення амбуляції, рерингу, часу обнюхування; збільшення латентного періоду першого переміщення), підвищення тривожності та вегетативний дисбаланс (підвищення кількості уринацій та дефекацій, грумінгу). Інгібування синтезу H_2S потенціювало пригнічення рухової та дослідницької активності, погіршувало показники емоційно-мотиваційної сфери та вегетативного балансу у тварин, а введення NaHS мало протилежний ефект. Ці дані узгоджуються із здатністю NaHS покращувати процеси пам'яті та навчання, підвищувати експресію BDNF в гіпокампі у мишей при гіпоксії (Wang Z., 2013).

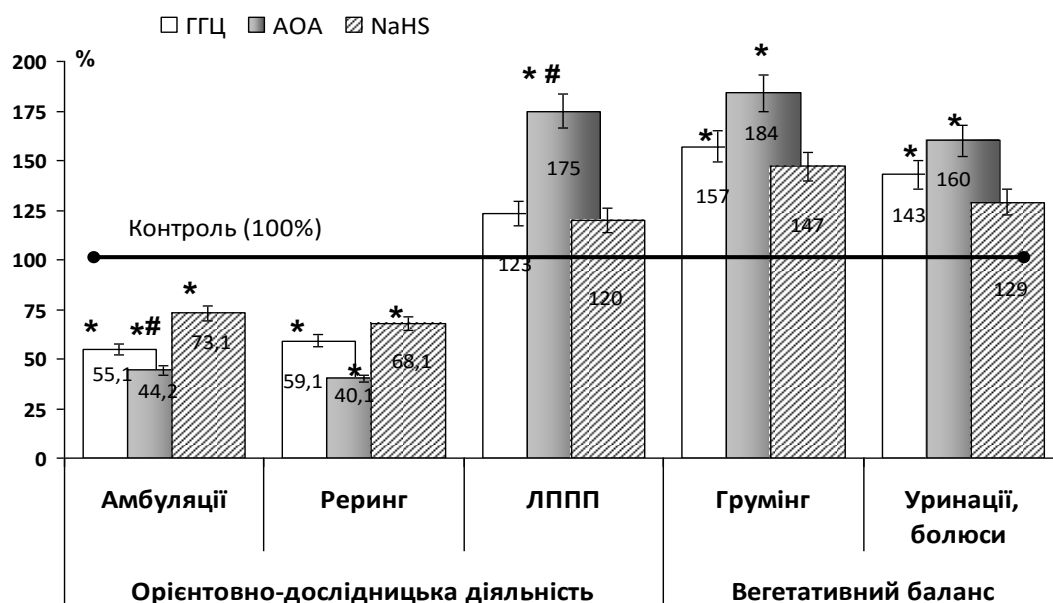


Рис. 3. Вплив амінооксицетату та NaHS на поведінку щурів з ізольованою ГГЦ в тесті «відкрите поле». (* - $p < 0,05$ відносно контролю; # - $p < 0,05$ відносно групи ГГЦ; ЛППП - латентний період першого переміщення).

Виникає питання, в якій мірі засоби з гіпогомостеїнемичним ефектом впливають на стан системи H_2S в мозку при ГГЦ. Встановлено, що застосування композиції вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} у поєднанні з есміном викликає найбільший гіпогомостеїнемичний ефект, запобігає зниженню активності H_2S -синтезуючих ензимів, порушенню процесів утилізації H_2S та формуванню дефіциту H_2S в мозку щурів за умов ГГЦ (табл. 3). Цей ефект асоціювався з покращенням енергетичного обміну, стану антиоксидантної системи, синтезу глутатіону та активності ензимів циклу метилювання.

На моделі комбінованої ГГЦ було підтверджено, що нормалізація обміну H_2S та відновлення його вмісту в мозку сприяє регресу нейродегенеративних змін. Застосування вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} у комплексі з есміном упродовж 7 діб викликало підвищення вмісту BDNF та зниження вмісту NSE в сироватці крові (на 27-30%, $p < 0,05$) у щурів з комбінованою ГГЦ. Бетаїн виявляв меншу лікувальну ефективність за критеріями впливу на вміст H_2S в мозку та вміст BDNF та NSE в сироватці крові.

Таблиця 3

Вміст гомостеїну в сироватці крові та біохімічні показники мозку щурів з ізольованою ГГЦ за умов корекції вітамінами B_6 , B_9 , B_{12} та есміном ($M \pm m$)

Показники	Групи щурів				
	Контроль, n=10	ГГЦ, n=10	ГГЦ + віт. B_6 , B_9 , B_{12} , n=10	ГГЦ + есмін, n=10	ГГЦ + віт. B_6 , B_9 , B_{12} + есмін, n=10
	1	2	3	4	5
Гомостеїн, мкмоль/л	6,62±0,23	16,8±0,92*	12,2±0,88*#	14,7±0,76*§	9,82±0,09*#§£
Біохімічні показники мозку					
H_2S , нмоль/мг протеїну	2,64±0,15	1,24±0,12*	1,78±0,11*#	1,46±0,08*§	2,42±0,13*#§£
ЦБС	0,45±0,02	0,29±0,01*	0,37±0,02*#	0,34±0,04*	0,43±0,01*#§£
ЦАТ/3-МСТ	0,39±0,02	0,30±0,02*	0,36±0,01	0,33±0,01*	0,38±0,02*#
ТСТ	1,96±0,05	1,34±0,09*	1,59±0,07*#	1,44±0,09*	1,87±0,15*#£
Швидкість утилізації H_2S	0,18±0,02	0,32±0,01*	0,26±0,03*#	0,26±0,03*	0,20±0,012*#£

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно групи 1;
2. # - $p < 0,05$ відносно групи 2;
3. § - $p < 0,05$ відносно групи 3;
4. £ - $p < 0,05$ відносно групи 4;
5. активність ензимів – нмоль (H_2S) /хв·мг протеїну.

Морфологічні дослідження засвідчили, що нормалізація метаболічного патерну в мозку зменшує ГГЦ-індуковані нейродегенеративні, нейрозапальні, нейроваскулярні зміни в мозку тварин (рис. 4). У щурів з ГГЦ в сенсомоторних

ділянках кори великих півкуль виявлялись атрофічні та деструктивні зміни в нейронах, вакуолярна дистрофія астроцитів, порушення структури нейропілю, зміни в судинах мікроциркуляторного русла із розширенням просвітів, повнокрів'ям, порушенням цілісності стінки кровоносних капілярів, вакуолярною дистрофією і некрозом ендотеліальної вистилки, пристінковими тромбами.

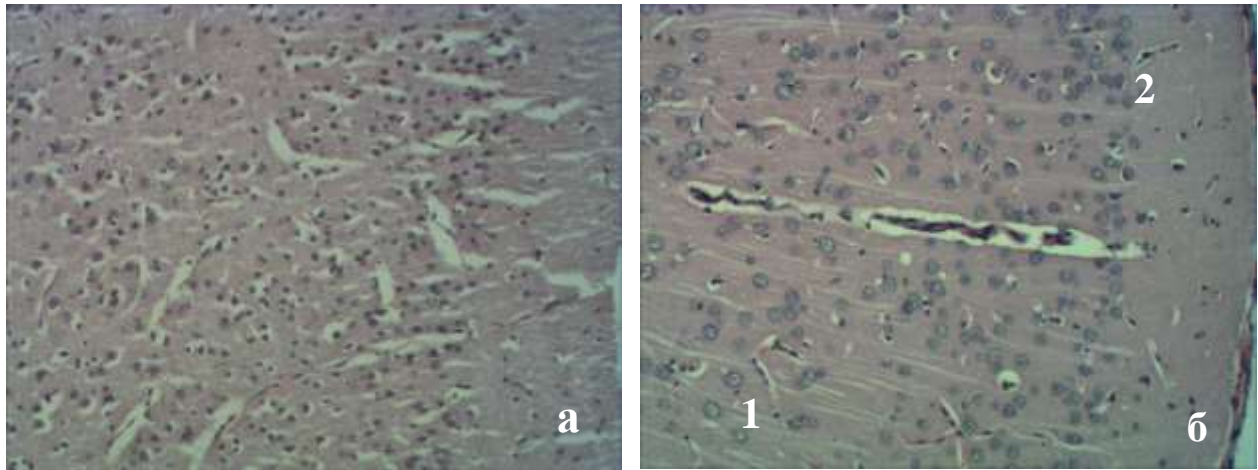


Рис. 4. Фрагменти сенсомоторної ділянки кори великих півкуль головного мозку щурів з комбінованою ГГЦ. Гематоксилін-еозин. Ок. х 10. Об. х 10.

а) Комбінована ГГЦ (14-а доба). Гіперхромія нейронів; перичелюлярний набряк; вогнища розрідження нейронів в пірамідному шарі.

б) Комбінована ГГЦ + віт. В₆, В₉, В₁₂ + есмін (21-а доба). Відновлена цитоархітектоніка; нормохромні нейрони (1); гіперхромні нейрони (2).

У тварин з ГГЦ, що отримували комплекс вітамінів В₆, В₉, В₁₂ у поєднанні з есміном, в сенсомоторних ділянках кори великих півкуль переважали нейрони нормохромного типу, значно меншим був перичелюлярний набряк, нейропіль мав дрібнозернисту структуру, вогнища клітинних розріджень мали менші розміри і зустрічались значно рідше, виявлялись судини нормального кровонаповнення, з цілісною ендотеліальною вистилкою, меншим периваскулярним набряком.

Бетаїн також зменшував порушення структурних компонентів сенсомоторної ділянки кори великих півкуль головного мозку, однак характерні для ГГЦ зміни залишались досить виразними. Так, у щурів з ГГЦ, що отримували бетаїн, виявляли більше нормохромних нейронів, вогнища клітинних розріджень мали менші розміри і були не такими чисельними, нейропіль мав дрібнозернисту структуру, але виявлявся периваскулярний набряк, в просвітах окремих артеріол були наявні тромби та ділянки десквамації та дегенерації ендотеліоцитів.

Таким чином, в механізми нейротоксичної дії гомоцистеїну інтегровані порушення в системі Н₂С, а їх корекція за допомогою донорів Н₂С, вітамінів та мікроелементів може стримувати розвиток нейрозапальних та нейродегенеративних процесів при патологічних станах, асоційованих з ГГЦ.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та досягнуто вирішення наукової задачі - на основі встановлення ролі системи гідроген сульфід (H_2S) в механізмах нейротоксичної дії гомоцистеїну експериментально обґрунтовані підходи до корекції нейродегенеративних процесів при гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ) за допомогою донору H_2S , вітамінних та полімікроелементних засобів.

1. Ізольована тіолактонова ГГЦ викликає зменшення (в 2,0 рази) вмісту H_2S , зниження (в 1,26-1,89 рази) активності H_2S -синтезуючих ензимів (цистатіонін- β -синтази, цистеїнамінотрансферази, тіосульфатдитіолсульфідтрансферази), дисбаланс у шляхах утилізації H_2S зі зниженням активності (в 1,83-1,90 рази) сульфітоксидази в мозку щурів. Аналогічні за спрямованістю, але більші за виразністю зміни в системі H_2S в мозку щурів виявляються за умов комбінованої гіповітаміннозно-метіонінової ГГЦ. Вміст гомоцистеїну в крові обернено корелює з вмістом H_2S та активністю цистатіонін- β -синтази в мозку ($r=-0,51$; $-0,71$; $p<0,05$).

2. ГГЦ індукує формування несприятливого метаболічного патерну в мозку, який включає дефіцит H_2S ; оксидативний стрес (збільшення активності NADPH-оксидази, вмісту ТБК-активних продуктів), зниження активності антиоксидантних ензимів (тіоредоксинредуктази, супероксиддисмутази) та вмісту відновленого глутатіону; гіпоенергетичний стан (зниження вмісту АТФ), розлади нуклеотидного обміну та гіпометилування. Маркери оксидативного стресу, антиоксидантної системи, енергетичного обміну достовірно корелюють з вмістом H_2S в мозку та вмістом гомоцистеїну в сироватці крові і зв'язки є протилежно спрямованими.

3. За умов ГГЦ несприятливий метаболічний патерн в мозку асоціюється з підвищенням (на 48-73%) вмісту нейронспецифічної енолази та зниженням (на 34-44%) вмісту мозкового нейротрофічного фактору в сироватці крові. Нейроспецифічні маркери достовірно корелюють з вмістом H_2S в мозку ($r = -0,55$; $0,77$; $p<0,05$) та вмістом гомоцистеїну в сироватці крові ($r = 0,52$; $-0,46$; $p<0,05$).

4. Введення інгібітору цистатіонін- β -синтази амінооксиацетату (15 мг/кг) підвищує сироватковий рівень гомоцистеїну (на 54,7%), поглиблює дефіцит H_2S (на 28,5%) та збільшує оксидативні та метаболічні порушення в мозку щурів за умов ГГЦ. Введення NaHS (3 мг/кг) зменшує виразність ГГЦ (на 28,0%), підвищує вміст H_2S в мозку (на 34,6%), що супроводжується регресом оксидативного стресу, енергодефіциту, тіол-дисульфідних розладів в мозку, збільшенням вмісту мозкового нейротрофічного фактору (на 44,3%) та зниженням вмісту нейронспецифічної енолази (на 25,0%) в сироватці крові.

5. Модулятори обміну H_2S достовірно впливають на поведінковий патерн тварин з ГГЦ: інгібітор синтезу H_2S (амінооксиацетат) потенціює депримууючий вплив високих рівнів гомоцистеїну на орієнтовно-дослідницьку активність (зменшення амбуляції та рерингу на 55,8 та 59,8%) та поглиблює вегетативний дисбаланс у щурів в тесті «відкрите поле», а донор H_2S (NaHS) проявляє протилежний ефект.

6. За умов ізольованої тіолактонової ГГЦ введення композиції вітамінів B_6 , B_9 , B_{12} у поєднанні з полімікроелементним засобом есміном більш ефективно знижує рівень гомоцистеїну (на 41,5%) в сироватці крові, підвищує вміст H_2S (на

95,2%) та нормалізує метаболічний патерн в мозку щурів, ніж роздільне застосування вказаних засобів.

7. За умов комбінованої ГГЦ застосування композиції вітамінів В₆, В₉, В₁₂ у поєднанні з есміном забезпечує зниження вмісту нейронспецифічної енолази та підвищення вмісту мозкового нейротрофічного фактору (на 27-30%) в сироватці крові; зменшення морфологічних ознак нейродегенеративних процесів в мозку щурів. Бетаїн менш ефективно коригує дефіцит Н₂S та нейродегенеративні зміни в мозку щурів за умов комбінованої ГГЦ.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Особливості обміну гомоцистеїну та гідроген сульфїду в центральній нервовій системі / П.О. Юрченко, А.В. Мельник, Н.В. Заїчко, М.М. Йолтухівський // Медична хімія. – 2014. - Т. 16, № 3 (60). - С.90-96. (Особисто провів збір та аналіз літератури, приймав участь в узагальненні матеріалу та написанні статті).

2. Біохімічні аспекти нейротоксичної дії гіпергомоцистеїнемії / Н.В. Заїчко, П.О. Юрченко, А.В. Мельник, О.І. Штатко // Вісник морфології. – 2014. – Т. 20, № 2. - С. 520-524. (Особисто провів збір та аналіз літератури, приймав участь в узагальненні матеріалу та написанні статті).

3. Юрченко П.О. Вплив вітамінів В₆, В₉, В₁₂ та есміну на систему гідрогенсульфїду в мозку щурів з ізольованою гіпергомоцистеїнемією / П.О. Юрченко, Н.В. Заїчко // Вісник Вінницького національного медичного університету. - 2015. – Т. 19, № 1. – С. 26-30. (Особисто виконав експериментальні дослідження, провів статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання статті).

4. Юрченко П.О. Вплив ізольованої гіпергомоцистеїнемії на систему гідрогенсульфїду в головному мозку щурів / П.О. Юрченко // Вісник проблем біології та медицини. - 2015. - Т. 3 (120), № 2. – С. 252-256.

5. Юрченко П.О. Біохімічні зміни в мозку щурів з ізольованою гіпергомоцистеїнемією за умов модуляції обміну гідрогенсульфїду / П.О. Юрченко, Н.В. Заїчко // Медична хімія. – 2015. – Т. 17, № 1 (62). - С. 17-21. (Особисто виконав експериментальні дослідження, провів статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання статті).

6. Юрченко П.О. Біохімічні зміни в мозку та поведінкові реакції в тесті «відкрите поле» у щурів з тіолактоновою гіпергомоцистеїнемією / П.О. Юрченко, Н.В. Заїчко // Вісник Вінницького національного медичного університету. - 2015. – Т. 19, № 2. – С. 330-333. (Особисто провів експериментальні дослідження, дослідив поведінкові реакції щурів, провів статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання статті).

7. Біохімічні та морфологічні маркери нейродегенерації у щурів при комбінованій гіпергомоцистеїнемії та її корекції вітамінами, есміном та бетаїном / П.О. Юрченко, А.П. Король, Н.В. Заїчко, Н.А. Камінська // Вісник морфології. – 2015. - Т. 21, № 1. – С. 41-44. (Особисто створив експериментальну модель, виконав біохімічні дослідження, провів статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання статті).

8. Zaichko Natalia V. State of hydrogen sulfide in the rats brain under combined

hyperhomocysteinemia and its correction / Natalia V.Zaichko, Peter O. Yurchenko, Denis A. Filchukov // Journal of Education, Health and Sport. – 2015. - № 5(3). - P. 183-188. (Особисто створив експериментальну модель, виконав біохімічні дослідження, провів статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання статті).

9. Юрченко П.О. Рівень гідроген сульфїду та стан антиоксидантної системи в мозку щурів за тіолактонової гіпергомоцистеїнемїї та її корекції / П.О. Юрченко, Н.В. Заїчко, Д.О. Фїльчуков // Вісник морфологїї. – 2015. - Т. 21, № 2. – С. 292-294. (Особисто створив експериментальну модель, виконав біохімічні дослідження, провів статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання статті).

10. Пат. України на корисну модель №87884 UA МПК (2013) G01N 30/22 Спосїб визначення утилізації H_2S в органах тварин / Заїчко Н.В., Ольховський О.С., Юрченко П.О., Мельник А.В., Штатко О.І.; заявник та патентовласник НДІ реабїлітації інвалїдів ВНМУ ім. М.І.Пирогова. - № u2013 10024; заявл. 12.08.2013; опубл. 25.02.2014; Бюл. № 4. (Виконав біохімічні дослідження в тканинах мозку, провів статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання патенту).

11. Пат. України на корисну модель №87885 UA МПК (2014) A61K 31/00 Спосїб корекції вікових змін обміну H_2S в тканинах препаратом «Есмін» / Заїчко Н.В., Ольховський О.С., Юрченко П.О., Мельник А.В., Штатко О.І.; заявник та патентовласник НДІ реабїлітації інвалїдів ВНМУ ім. М.І.Пирогова. - № u2013 10025; заявл. 12.08.2013; опубл. 25.02.2014; Бюл. № 4. (Виконав біохімічні дослідження в тканинах мозку, провів статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання патенту).

12. Продукція гідрогенсульфїду в мозку щурів за умов хронїчної гіпергомоцистеїнемїї та її корекції вітамїнними та мікроелементними комплексами / Н.В. Заїчко, О.І. Штатко, П.О. Юрченко, О.М. Колошко, А.В. Мельник // Актуальні проблеми сучасної біохїмії та клітинної біологїї : II міжнар. наук. конф., 24-25 вересня, 2013 р. – Дніпропетровськ, 2013. - С. 28. (Особисто створив експериментальну модель, виконав біохімічні дослідження в тканинах мозку, провів статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

13. Zaichko N.V. / Microelement complex esmin protects the age-related changes of hydrogen sulfide tissues formation in rats / N.V. Zaichko, A.S. Olhovskiy, P.O. Yurchenko // 7-th Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry, May 23-24, 2013. – Lviv, 2013. - P. 191. (виконав біохімічні дослідження в тканинах мозку, провів статистичний аналіз та узагальнення матеріалу).

14. Вплив вітамїнів B_6 , B_9 , B_{12} та есміну на вміст гідрогенсульфїду та показники про-антиоксидантної системи в мозку щурів з гіпергомоцистеїнемією / Н.В. Заїчко, П.О. Юрченко, О.І. Штатко // Матерїали VII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю з клінічної фармакологїї, 25-26 листопада 2013 р. - Вінниця: ВНМУ, 2013. – С. 226-227. (Виконав біохімічні дослідження в тканинах мозку, провів статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

15. Age related changes of hydrogen sulphide metabolism in rats / N.V. Zaichko, O.S. Olhovskiy, I.V. Palamarchuk, P.A. Yurchenko // Матерїали XI Українського біохімічного конгресу, 6-10 жовтня 2014 р. – Київ, 2014. - С. 15. (Дослідив вміст

гідроген сульфїду в тканинах мозку, провів статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

16. Юрченко П.О. Рівень нейронспецифічної енолази та гідроген сульфїду в сироватці крові щурів за умов гіпергомоцистеїнемії / П.О. Юрченко // Актуальні питання експериментальної і клінічної біохімії та фармакології : мат. наук.-практ. конф. 9-10 жовтня 2014 р. – Тернопіль, 2014. - С. 90-96.

17. Юрченко П.О. Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на поведінкові реакції щурів з гіпергомоцистеїнемією в тесті «відкрите поле» / П.О. Юрченко, Н.В. Заїчко, О.І. Штатько // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології : мат. III Міжнар. наук. конф., 24-25 вересня 2015 р. - Дніпропетровськ. 2015. - С. 148. (Виконав експериментальні дослідження, провів статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

18. Заїчко Н.В. Вплив модуляторів обміну H_2S на рівень мозкового нейротрофічного фактору у щурів з гіпергомоцистеїнемією / Н.В. Заїчко, П.О. Юрченко // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології : мат. III Міжнар. наук. конф., 24-25 вересня 2015 р. – Дніпропетровськ, 2015. - С. 70. (Виконав експериментальні дослідження, провів статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

19. Юрченко П.О. Вплив бетаїну на стан системи гідроген сульфїду в мозку щурів з гіпергомоцистеїнемією/ П.О. Юрченко, Н.В. Заїчко, О.І. Штатько // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології : мат. III Міжнар. наук. конф., 24-25 вересня 2015 р. – Дніпропетровськ, 2015. - С. 88. (Виконав експериментальні дослідження, провів статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

АНОТАЦІЯ

Юрченко П.О. Роль системи гідроген сульфїду в механізмах ураження мозку за умов гіпергомоцистеїнемії. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.32 - медична біохімія. - Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2016.

Дисертаційна робота присвячена встановленню ролі системи гідроген сульфїду в механізмах ураження мозку за умов експериментальної гіпергомоцистеїнемії та обґрунтуванню підходів до її корекції.

Встановлено, що за умов експериментальної гіпергомоцистеїнемії (ізолюваної та комбінованої з недостатністю вітамінів B_6 , B_9 , B_{12}) зменшується вміст H_2S в тканинах мозку, що асоціюється зі зниженням активності H_2S -синтезуючих ензимів – цистатіонін- β -синтази, цистеїнамінотрансферази, тіосульфатдитіолсульфідтрансферази, дисбалансом у шляхах утилізації H_2S . ГГЦ-індуковані зміни в системі H_2S в мозку корелюють з розвитком оксидативного стресу, зниженням активності антиоксидантних ензимів, пригніченням синтезу глутатіону, енергодефіцитом, зниженням вмісту мозкового нейротрофічного фактору та підвищенням вмісту нейронспецифічної енолази в сироватці крові.

Поглиблення дефіциту H_2S в мозку під впливом амінооксиацетату асоціюється з більш глибокими змінами метаболічного патерну та потенціюванням

нейротоксичної дії ГГЦ. Донор H_2S - $NaHS$ зменшує дефіцит H_2S , покращує метаболічний стан мозку, зменшує нейротоксичність ГГЦ.

Вітаміни B_6 , B_9 , B_{12} у поєднанні з полімікролементним препаратом есміном справляють максимальну гіпогомоцистеїнемічну дію, ефективно коригують порушення в системі H_2S , сприяють нормалізації метаболічного патерну в мозку, зменшують ознаки нейродегенерації за умов ГГЦ. Бетаїн менш ефективно коригує дефіцит H_2S та ГГЦ-асоційовані зміни в мозку щурів.

Ключові слова: гомоцистеїн, гідроген сульфід, мозок, нейродегенерація, есмін, вітаміни, бетаїн.

АННОТАЦИЯ

Юрченко П.А. Роль системы гидроген сульфида в механизмах повреждения мозга при гипергомоцистеинемии. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.32 - медицинская биохимия. - Винницкий национальный медицинский университет имени М.И. Пирогова МЗ Украины, Винница, 2015.

Установлено, что при экспериментальной гипергомоцистеинемии (изолированной и комбинированной с недостаточностью витаминов B_6 , B_9 , B_{12}) снижается уровень H_2S в тканях мозга, что ассоциируется со снижением активности H_2S -синтезирующих ферментов – цистатионин- β -синтазы, цистеинамино-трансферазы, тиосульфатдитиолсульфидтрансферазы, дисбалансом в путях утилизации H_2S . ГГЦ-индуцированные изменения в системе H_2S в мозге коррелируют с развитием оксидативного стресса, снижением активности антиоксидантных ферментов, снижением синтеза глутатиона, энергодефицитом, снижением уровня мозгового нейротрофического фактора и повышением уровня нейронспецифической энolahзы в сыворотке крови.

Увеличение дефицита H_2S в мозге под влиянием аминоксиацетата ассоциируется с более глубокими изменениями метаболіческого паттерна и потенцированием нейротоксического действия ГГЦ. Донор H_2S - $NaHS$ снижает дефіцит H_2S , улучшает метаболіческое состояние мозга, снижает нейротоксичность ГГЦ.

Витамины B_6 , B_9 , B_{12} в комплексе с полимікролементным препаратом есміном проявляют максимальное гипогомоцистеїнемическое действие, эффективно корригируют нарушения в системе H_2S , способствуют нормализации метаболіческого паттерна в мозге, уменьшают проявления нейродегенерации при ГГЦ. Бетаин менее эффективно корригирует дефіцит H_2S та ГГЦ-асоційованые изменения в мозге крыс.

Ключевые слова: гомоцистеин, гидрогенсульфид, мозок, нейродегенерация, эсмин, витамины, бетаин.

ANNOTATION

Yurchenko P.O. Role of hydrogen sulfide in the mechanisms of brain damage in hyperhomocysteinemia. – Manuscript.

The dissertation for obtaining of scientific degree of the candidate of medical sciences, speciality 14.01.32 – medical biochemistry. – Vinnytsya National Pirogov

Memorial Medical University Ministry of Health of Ukraine, Vinnytsya, 2016.

Dissertation work dedicated to determination of the role hydrogen sulfide system in the mechanisms of brain damage under the experimental hyperhomocysteinemia and substantiation of approaches to its correction.

It was established that under experimental hyperhomocysteinemia (HHC) deficit H₂S formed in the brain tissues is associated with decreased activity of H₂S-synthesizing enzymes and with imbalance in ways of H₂S utilization. Isolated HHC causes a decrease (in 2.0-2.1 times) H₂S content in the brain, decrease (in 1.26-1.89 times) activity H₂S-synthesizing enzymes (cystationin- β -synthase, cysteine aminotransferase, thiosulfate-dithiol sulfurtransferase), increase H₂S degradation and reduce sulfite oxides activity in the rats brain. Similar by direction, but more expressive changes in H₂S in the rat brain are in conditions of severe HHC, combined with insufficiency of vitamins B₆, B₉, B₁₂. Serum homocysteine level is inversely correlated with the content of H₂S and activity cystationin- β -synthase ($r = -0.51$; -0.71 , $p < 0.05$) in the brain.

HHC induce the formation of the unfavorable metabolic pattern in the brain which include: deficiency of H₂S; oxidative stress; a decrease in the antioxidants activity (thioredoxin reductase, SOD, glutamate cysteine ligase, glutathione); energy deficit; hypomethylation and reduced of adenosine synthesis (decrease in the activity of S-adenosylhomocysteine hydrolase, methionine adenosyltransferase, 5'-nucleotidase). Indicators of oxidative stress, antioxidant system, and energy exchange reliably correlate with H₂S content in the brain and homocysteine content in the blood serum, connections are oppositely directed.

HHC-induced metabolic changes in the brain associate with the increase (on 48-73%) of neuron-specific enolase, decrease (on 34-44%) of brain neurotrophic factor in the blood serum. Neuronspecific markers reliably correlate with H₂S content in the brain ($r = -0.55$; 0.77 , $p < 0.05$) and homocysteine content in the blood serum ($r = 0.52$; -0.46 , $p < 0.05$).

Deepening the deficiency of H₂S in the brain associate with more intensive changes of metabolic pattern and potentiating neurotoxic effect of HHC. The addition of aminoxyacetate (15 mg/kg) inhibitor for cystationin- β -synthase reduce efficiency of H₂S, oxidative and metabolic disorders in the brains of rats under conditions of isolated HHC. Addition of NaHS (3 mg/kg) decrease the expression of HHC, increase H₂S content in the brain, which is associated with the regression of oxidative stress, thiol disulfide and nucleotide disbalance in brain, by the increasing of the brain neurotrophic factor content and decreasing neuron-specific enolase in blood serum.

Modulators of H₂S exchange (aminoxyacetate, NaHS) reliably affect the behavioral pattern in animals with HHC: inhibitors of H₂S synthesis potentiate the inhibitory effect of high levels of homocysteine on estimated research activity and vegetative balance in rats during "open field" test and donors of H₂S demonstrate opposite effect.

Vitamins B₆, B₉, B₁₂ and trace element complex esmin make a maximal hypohomocysteinemic action, actively adjust disorders in H₂S system; conduce normalization metabolic pattern in brain, reduce the neurodegeneration features under condition of isolated and combined HHC. Betaine detected less curative effectiveness by criterion of the impact on H₂S content in brain and brain neurotrophic factor and neuron-

specific enolase in blood serum.

Morphologic research confirmed that normalization of metabolic pattern reduce HHC induced neurodegenerative, neuroinflammatory, neurovascular changes in rats by using vitamins, esmine, betaine.

Thereby, neurotoxic actions of homocysteine are integrated disorders in H₂S system. Correction of these disorders with H₂S donors, vitamins and trace element complex can decrease activity of inflammatory and degenerative processes in CNS in association with HHC.

Key words: homocysteine, hydrogen sulfide, brain, neurodegeneration, esmin, vitamins, betaine.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АОА	- амінооксиацетат
в/шл	- внутрішньошлунково
в/оч	- внутрішньоочеревинно
ГГЦ	- гіпергомоцистеїнемія
3-МСТ	- 3-меркаптопіруватсульфурттрансфераза
ПАЛФ	- піридоксальфосфат
ТСТ	- тіосульфатдитіолсульфідтрансфераза
ТБК	- тіобарбітурова кислота
ЦАТ	- цистеїнаміноттрансфераза
ЦБС	- цистатіон-β-синтаза
GSH	- відновлений глутатіон
DTNB	- 5,5'-дітіобіс(2-нітробензоат)
H ₂ S	- гідроген сульфід
NADPH	- нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
NaHS	- натрій гідрогенсульфід
NSE	- нейронспецифічна енолаза
BDNF	- нейротрофічний фактор