

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПАЛАМАРЧУК ІРИНА ВІТАЛІЇВНА

УДК: 546.221.1: 616.127:616.379-008.64:612.08

ДИСЕРТАЦІЯ
РОЛЬ СИСТЕМИ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В МЕХАНІЗМАХ
УШКОДЖЕННЯ МІОКАРДУ ТА КАРДІОПРОТЕКЦІЇ ЗА
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

222 – Медицина
(22 – Охорона здоров'я)

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають

посилання на відповідне джерело  Паламарчук І.В.

Науковий керівник:

Заїчко Наталія Валентинівна,

доктор медичних наук, професор

Вінниця – 2021

АНОТАЦІЯ

Паламарчук І.В. Роль системи гідроген сульфїду в механїзмах ушкодження мїокарду та кардіопротекції за експериментального цукрового діабету. – Квалїфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 – «Медицина». – Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2021.

Дисертація присвячена вирішенню актуального завдання сучасної медицини та медичної біохїмії – на основі встановлення ролі системи гідроген сульфїду (H_2S) в механїзмах ушкодження мїокарду за умов експериментального цукрового діабету обґрунтувати нові підходи до підвищення ефективності метаболїчної кардіопротекції.

Дослїди проведені на 184 білих статевозрілих лабораторних щурасамцях. Всі етапи експериментів виконані відповідно до загальних етичних принципів (Страсбург, 1986), що засвідчено комітетом з біоетики ВНМУ ім. М.І. Пирогова (протокол №10 від 27.10.2016; №4 від 13.05.2021). Згідно мети та завдань дослідження тварини були розподілені на 3 серії дослідів ($n=8-10$ в групі). Цукровий діабет у щурів викликали шляхом одноразового внутрішньочеревинного введення (в/оч) стрептозотоцину (40 мг/кг) на 0,1 М цитратному буфері (рН 4,5). Після ініціації діабету з 3 по 28 добу дослїду проводили введення модуляторів обміну H_2S та антидіабетичного препарату. Для модуляції стану системи H_2S були застосовані необоротний інгібітор цистатіонін- γ -ліази пропаргілглїцин (50 мг/кг в/оч) та неорганічний донор H_2S – NaHS (3 мг/кг в/оч). Метаболїчну корекцію проводили метформїном (500 мг/кг інтрагастрально) та його поєднанням з NaHS. Через визначені умовами експерименту проміжки часу тварин знеживлювали шляхом декапітації під тїопенталовим наркозом.

Розвиток стрептозотоцин-індукованого діабету у щурів супроводжується змінами обміну H_2S в серцево-судинній системі: в міокарді та аорті знижується рівень H_2S (на 37,6 та 36,5 %, $p < 0,01$); зменшується (на 55,9%, 31,6% та 39,5 %; $p < 0,01$) активність H_2S -синтезуючих ензимів - цистатіонін- γ -ліази (ЦГЛ), цистеїнамінотрансферази (ЦАТ), тіосульфатдитіолсульфідтрансферази (ТСТ); знижується активність мітохондріального етапу утилізації H_2S за участі сульфітоксидази (на 37,6 %, $p < 0,01$) на тлі підвищення загальної швидкості споживання H_2S ; пригнічується експресія гена *CSE* (зниження відносного рівня мРНК ЦГЛ/ β -актин в 2,52 рази, $p < 0,01$); зменшується чутливість аорти до вазорелаксуючої дії H_2S (EC_{50} H_2S зростає з $95,0 \pm 3,82$ до $156 \pm 6,22$ мкМ, $p < 0,01$).

Уперше показано, що формування дефіциту H_2S в міокарді асоціюється не лише зі зниженням активності H_2S -синтезуючих ензимів, а й з порушенням активності мітохондріальних етапів обміну H_2S за участі сульфітоксидази та тіоредоксинредуктази. Введення інгібітору ЦГЛ пропаргілгліцину (50 мг/кг) щурам із стрептозотоцин-індукованим діабетом викликає поглиблення дефіциту H_2S в міокарді та аорті (на 29,4 та 55,9 %, $p < 0,05$), що асоціюється з додатковим посиленням (в 1,2-1,3 рази, $p < 0,05$) процесів вільно-радикального окиснення із підвищенням активності NADPH-редуктази, збільшенням рівня МДА та карбонільних груп протеїнів; зниженням антиоксидантного захисту (із зниженням активності СОД); порушеннями тіол-дисульфідного обміну (із зменшенням активності тіоредоксинредуктази, зниженням тіол-дисульфідного коефіцієнту); зниженням мітохондріальних етапів утилізації H_2S (за участі сульфітоксидази). Введення NaHS (3 мг/кг) запобігає зниженню рівня H_2S в міокарді та аорті; зменшує діабет-асоційовані порушення обміну H_2S - підвищує активність ЦГЛ (на 105 %, $p < 0,01$) та сульфітоксидази (на 29,6 %, $p < 0,05$), збільшує експресію гена *CSE* (в 1,35 рази, $p < 0,05$); зменшує прояви тіол-дисульфідних порушень та оксидативного стресу; підвищує вазорелаксацію у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом.

Розвиток стрептозотоцин-індукованого діабету супроводжується зростанням рівня галектину-3 (профіброгенного медіатора, предиктора ремоделювання серця та серцевої недостатності) в сироватці крові в 3,54 рази ($10,7 \pm 0,56$ проти $3,02 \pm 0,28$ нг/мл, $p < 0,001$) та міокарді в 4,98 рази ($p < 0,001$). Уперше показано, що модуляція обміну H_2S викликала статистично значущі зміни експресії галектину-3 в міокарді та сироватці крові щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом. Так, введення пропаргілгліцину посилювало діабет-асоційоване зростання рівня галектину-3 в міокарді та сироватці крові (в 1,78 та 1,55 рази, $p < 0,01$), у той час як введення NaHS справляло протективний ефект і зменшувало експресію цього медіатора (в 2,76 та 2,39 рази, $p < 0,01$). Рівень галектину-3 в міокарді обернено корелював з рівнем H_2S ($r = -0,80$, $p < 0,01$), у той час як сироватковий рівень галектину-3 прямо корелював з рівнем глюкози в крові ($r = 0,67$, $p < 0,05$).

За стрептозотоцин-індукованого діабету реєструвалось підвищення проліферативної активності клітин міокарду (збільшення клітин у фазах S та G2+M на 30-32%, $p < 0,05$), підвищення рівня фрагментації ДНК (на 11,5%, $p < 0,05$). Введення пропаргілгліцину посилювало цитометричні ознаки апоптозу (збільшення частки клітин в інтервалі SUB-G0G1 на 27,4 %, $p < 0,05$) та проліферативної активності клітин міокарду (збільшення частки клітин в фазі S на 88,7 %, $p < 0,05$), а введення NaHS справляло протилежний ефект. Між рівнем H_2S в міокарді та кількістю клітин у фазі S та інтервалі SUB-G0G1 виявлялись статистично значущі обернені зв'язки ($r = -0,54$ та $-0,55$, $p < 0,05$). Вказані цитометричні маркери прямо корелювали з рівнем галектину-3 в міокарді ($r = 0,58$ та $0,62$, $p < 0,05$). Введення пропаргілгліцину викликало збільшення відносної маси серця та маси лівого шлуночка (на 18,7 та 30,0 %, $p < 0,05$), а введення NaHS не спричиняло такого ефекту у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом. Введення NaHS (3 мг/кг) не викликало додаткового підвищення рівня глікемії і стримувало зростання рівня глікозильованого гемоглобіну за стрептозотоцин-індукованого діабету, у той час як введення пропаргілгліцину справляло протилежний ефект.

Уперше встановлено вплив метформіну на активність ензимів синтезу та утилізації H_2S в міокарді, експресію гена *CSE* в міокарді та аорті, експресію галектину-3 за стрептозотоцин-індукованого діабету. Введення метформіну (500 мг/кг) за стрептозотоцин-індукованого діабету забезпечувало корекцію показників обміну H_2S в серцево-судинній системі, зменшувало ознаки оксидативного стресу, стримувало зростання експресії галектину-3 в міокарді, сприяло збереженню судинної експресії *CSE* та чутливості аорти до вазодилатуючої дії H_2S .

Уперше показано, що при застосуванні метформіну у поєднанні з NaHS забезпечується більш ефективна корекція порушень обміну H_2S в серцево-судинній системі, посилюються антиоксидантний, антифіброгенний та вазопротекторний ефекти. При застосуванні метформіну у поєднанні з NaHS збільшувалась активність цистатіонін- γ -ліази, цистеїнамінотрасферази, сульфітоксидази (в 1,3-1,4 рази, $p < 0,01$); збільшувалась активність тіоредоксинредуктази (в 1,5 рази, $p < 0,01$), зменшувався рівень галектину-3 в міокарді та сироватці крові (в 1,6 та 1,4 рази, $p < 0,01$), посилювався вазопротекторний ефект.

Таким чином, поглиблені теоретичні уявлення про роль системи H_2S в механізмах розвитку діабет-асоційованого ушкодження міокарду, встановлені нові біохімічні предиктори кардіоваскулярної дисфункції за умов стрептозотоцин-індукованого діабету, з'ясована ефективність антидіабетичного засобу метформіну за умов введення донору H_2S . Результати роботи є експериментальним обґрунтуванням доцільності корекції рівня H_2S в серцево-судинній системі на тлі антидіабетичної фармакотерапії з метою профілактики кардіоваскулярної дисфункції та кардіоміопатії.

Ключові слова: цукровий діабет, гідроген сульфід, галектин-3, міокард, метформін.

ANNOTATION

Palamarchuk I.V. The role of the hydrogen sulfide system in the mechanisms of myocardial damage and cardioprotection in experimental diabetes mellitus. - Qualified scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in 22 “Health care” in the specialty 222 “Medicine”. – National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya Ministry of Health of Ukraine, Vinnytsia, 2021.

The thesis is devoted to the solution of an urgent problem of modern medicine and medical biochemistry - to substantiate new approaches to increasing the efficiency of metabolic cardioprotection on the basis of establishing the role of hydrogen sulfide (H₂S) system in the mechanisms of myocardial damage in experimental diabetes mellitus.

The experiments were performed on 184 male white mature laboratory rats. All phases of the experiments were performed in accordance with the general ethical principles (Strasbourg, 1986), as confirmed by the Bioethics Committee of the National Pirogov Memorial Medical University (protocol No 10 27.10.2016; No 4 13.05.2021). According to the aim and objectives of the study, the animals were divided into 3 series of experiments (n=8-10 per group). Diabetes mellitus in rats was induced by a single intraperitoneal injection (i/p) of streptozotocin (40 mg/kg) on 0.1 M citrate buffer (pH 4.5). After diabetes initiation, H₂S metabolism modulators and antidiabetic drug were administered from day 3 to day 28 of the experiment. The irreversible cystathionine γ -lyase inhibitor propargylglycine (50 mg/kg i/p) and the inorganic H₂S donor NaHS (3 mg/kg i/p) were used to modulate status of H₂S system. Metabolic correction was carried out with metformin (500 mg/kg intragastric) and its combination with NaHS. At intervals determined by the experimental conditions, the animals were decapitated under thiopental anaesthesia.

The development of streptozotocin-induced diabetes in rats was found to be accompanied by changes in H₂S metabolism in the cardiovascular system: H₂S levels

in the myocardium and aorta are decreased (by 37.6 and 36.5%, $p < 0.01$); activity of H₂S-synthesizing enzymes – cystathionine γ -lyase (CSE), cysteine aminotransferase (CAT), thiosulfate dithiol sulfide transferase (TST) are decreased (by 55.9%, 31.6% and 39.5%; $p < 0.01$); activity of mitochondrial H₂S utilization step with sulfite oxidase (by 37.6%, $p < 0.01$) is decreased while total H₂S consumption rate increases; *CSE* gene expression is suppressed (relative *CSE*/ β -actin mRNA level decreased 2.52-fold, $p < 0.01$); aortic sensitivity to vasorelaxant H₂S action decreased (EC₅₀ H₂S increased from 95.0 ± 3.82 to 156 ± 6.22 μ M, $p < 0.01$).

For the first time, it is shown that the formation of H₂S deficiency in myocardium is associated not only with reduced activity of H₂S-synthesizing enzymes, but also with impaired activity of mitochondrial stages of H₂S exchange involving sulfite oxidase and thioredoxin reductase. Administration of CSE inhibitor propargylglycine (50 mg/kg) to rats with streptozotocin-induced diabetes caused aggravation of H₂S deficiency in myocardium and aorta (by 29.4 and 55.9%, $p < 0.05$), which is associated with additional intensification (1.2-1.3 times, $p < 0.05$) of free-radical oxidation processes with increase of NADPH reductase activity, increase of MDA level and protein carbonyl groups; decrease of antioxidant protection (with decreased activity of SOD) thiol-disulfide metabolism disorders (with decreased activity of thioredoxin reductase, reduced thiol-disulfide ratio); reduction of mitochondrial stages of H₂S utilization (with sulfite oxidase participation). NaHS administration (3 mg/kg) prevents H₂S reduction in myocardium and aorta; reduces diabetes-associated H₂S metabolism disorders - increases activity of CSE (by 105%, $p < 0.01$) and sulfite oxidase (by 29.6%, $p < 0.05$); increases *CSE* gene expression (by 1.35 times, $p < 0.05$); reduces thiol-disulfide disruption and oxidative stress; increases vasorelaxation in rats with streptozotocin-induced diabetes.

The development of streptozotocin-induced diabetes was accompanied by a 3.54-fold increase of galectin-3 serum level (10.7 ± 0.56 vs 3.02 ± 0.28 ng/ml, $p < 0.001$) and 4.98-fold ($p < 0.001$) increase of this profibrogenic mediator (predictor of cardiac remodelling and heart failure) in myocardium. For the first time it was shown that modulation of H₂S metabolism caused statistically significant changes in

galectin-3 expression in the myocardium and serum of streptozotocin-induced diabetic rats. Thus, administration of propargylglycine increased the diabetes-associated increase of galectin-3 level in myocardium and serum (1.78 and 1.55 times, $p < 0.01$), while administration of NaHS had a protective effect and decreased the expression of this mediator (2.76 and 2.39 times, $p < 0.01$). Myocardial galectin-3 level inversely correlates with H_2S levels ($r = -0.80$, $p < 0.01$), whereas serum galectin-3 directly correlates with blood glucose levels ($r = 0.67$, $p < 0.05$).

In rats with streptozotocin-induced diabetes, increased myocardial cell proliferative activity (30-32% increase in cells in S and G2+M phases, $p < 0.05$), increased DNA fragmentation (by 11.5%, $p < 0.05$) were recorded. Propargylglycine administration increased cytometric signs of apoptosis (27.4% increase in SUB-G0G1 cell fraction, $p < 0.05$) and myocardial cell proliferative activity (88.7% increase in S phase cell fraction, $p < 0.05$), while NaHS administration had the opposite effect. There was a statistically significant inverse relationship ($r = -0.54$ and -0.55 , $p < 0.05$) between myocardial H_2S level and the number of cells in S phase and SUB-G0G1 interval. These cytometric markers were directly correlated with galectin-3 levels in the myocardium ($r = 0.58$ and 0.62 , $p < 0.05$). Administration of propargylglycine caused an increase in relative heart mass and left ventricular mass (by 18.7 and 30.0%, $p < 0.05$), while NaHS administration did not cause this effect in rats with streptozotocin-induced diabetes. Administration of NaHS (3 mg/kg) did not cause an additional increase in glycemia and inhibited the increase in glycosylated hemoglobin in streptozotocin-induced diabetes, whereas administration of propargylglycine had the opposite effect.

The effect of metformin on the activity of enzymes of H_2S synthesis and utilization in myocardium, *CSE* gene expression in myocardium and aorta, expression of galectin-3 in streptozotocin-induced diabetic rats was established for the first time. Administration of metformin (500 mg/kg) on streptozotocin-induced diabetes provided correction of H_2S metabolism in the cardiovascular system, reduced signs of oxidative stress, inhibited the increase of galectin-3 expression in the myocardium,

promoted preservation of vascular *CSE* expression and aortic sensitivity to vasodilatory H₂S action.

For the first time it was shown that metformin in combination with NaHS provides a more effective correction of H₂S metabolism disorders in the cardiovascular system, enhanced antioxidant, antifibrogenic and vasoprotective effects. Administration of metformin in combination with NaHS provided in myocardium and aorta the increase of activity of cystathionine γ -lyase, cysteine aminotransferase, sulfite oxidase increased (by 1.3-1.4 times, $p < 0.01$), the increase of thioredoxin reductase activity (by 1.5 times, $p < 0.01$), the decrease of myocardium and serum level of galectin-3 (by 1.6 and 1.4 times, $p < 0.01$) and the increase of vasoprotective effects increased.

In conclusion, theoretical ideas about the role of H₂S system in the mechanisms of diabetes-associated myocardial damage were deepened and new biochemical predictors of cardiovascular dysfunction in streptozotocin-induced diabetes were established, the effectiveness of antidiabetic drugs metformin in conditions of H₂S administration to donor was clarified. The results of the work are an experimental feasibility of H₂S level correction in the cardiovascular system on the basis of antidiabetic pharmacotherapy to prevent cardiovascular dysfunction and cardiomyopathy.

Keywords: diabetes mellitus, hydrogen sulfide, galectin-3, myocardium, metformin.

Список публікацій здобувача

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Вікові особливості впливу пропаргілгліцину та натрій гідрогенсульфіду на показники обміну H₂S в міокарді щурів / Н.В. Заїчко, М.М. Йолтухівський, О.С. Ольховський, І.В. Паламарчук // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – № 2 (105). – С. 105 – 110. *(Дисертант особисто виконала дослідження показників обміну H₂S у міокарді дорослих щурів, написання та*

оформлення статті виконано у співавторстві).

2. Hydrogen sulfide: modern aspects of metabolism, biological and medical role / N.V. Zaichko, A.V. Melnik, M.M. Yoltukhivskyy, A.S. Olhovskiy, I.V. Palamarchuk // Ukr. Biochem. J. – 2014. – № 86 (5). – P. 5–25. *(Видання включено до бази даних Scopus. Дисертантом особисто проведено збір та узагальнення частини наукової інформації з медичної ролі модуляторів обміну H₂S, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
3. Мельник, А.В. Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на біохімічні показники та тонус аорти щурів різних вікових груп / А.В. Мельник, Н.В. Заїчко, І.В. Паламарчук // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2014. – № 18 (2). – С. 397 – 400. *(Дисертант особисто брала участь у дослідженні впливу модуляторів обміну H₂S на показники стану аорти статевозрілих щурів, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
4. Вплив метформіну та його поєднання з натрій гідрогенсульфідом на стан системи H₂S та асоційовані біохімічні порушення в міокарді та нирках щурів за стрептозоточин-індукованого діабету/ І.В. Паламарчук, О.Б. Струтинська, А.В Мельник, Н.В. Заїчко // Вісник проблем біології і медицини. – 2020. – № 3 (157). – С. 133-137. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-3-157-133-137 *(Видання включене до міжнародних наукометричних баз. Дисертант особисто брала участь у моделюванні діабету та провела біохімічні дослідження міокарду щурів, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
5. Effect of H₂S metabolism modulators on the level of galectin-3 in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus / A.V. Melnyk, N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk, O.B. Strutynska // The European Journal of Biomedical and Life Sciences. – 2020. – No 4. – P.29-36. DOI: <https://doi.org/10.29013/ELBLS-20-4-29-36> *(Фахове видання Австрії. Видання включене до міжнародних наукометричних баз. Дисертант особисто брала участь у моделюванні діабету, проводила біохімічні дослідження у міокарді щурів, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*

6. Cardiomyocyte DNA content and its link to CSE/H₂S system in the heart of experimental diabetic rats / I.V. Palamarchuk, N.V. Zaichko, A.V. Mel'nik, V.M. Nechyporuk, P.O. Yurchenko // Georgian Medical News. – 2020. – Vol. 4, No 301. – P. 147 – 152. (*Фахове видання Грузії. Видання включено до бази даних Scopus. Дисертант особисто провела всі експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).
7. Патент на корисну модель №107766, Україна, МПК (2016.01) А61К 33/00 А61Р 3/10 (2006.01). Спосіб профілактики діабетичної кардіоміопатії в експерименті / Паламарчук І.В., Заїчко Н.В.; Науково-дослідний інститут реабілітації інвалідів (навчально-науково-лікувальний комплекс) Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. - № u201511677; заявл. 26.11.2015; опубл. 24.06.2016; Бюл. № 12. (*Дисертантом особисто проведено експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез*).
8. Патент на корисну модель №107767, Україна, МПК А61К 31/10 (2006.01) А61Р 3/10 (2006.01). Застосування натрієвої солі гідрогенсульфіду для потенціювання вазопротективного ефекту антидіабетичних засобів / Заїчко Н.В., Паламарчук І.В., Струтинська О.Б.; заявник та патентовласник Науково-дослідний інститут реабілітації інвалідів (навчально-науково-лікувальний комплекс) Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. – № u201511678; заявл. 26.11.2015; опубл. 24.06.2016; Бюл. № 12. (*Дисертантом особисто проведено експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання та оформлення патенту виконано у співавторстві*)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

9. Zaichko, N. V. Disturbances in hydrogen sulfide synthesis and degradation in rats' myocardium in aging / N.V. Zaichko, A.V. Mel'nik, A. S. Olhovskiy, I.V. Palamarchuk // The Third International Conference on H₂S Biology and Medicine (June 4-6, 2014, Kyoto, Japan). – Nitric Oxide. – 2014. – № 39(1). –

- P.18. *(Дисертант брала участь в експериментальних дослідженнях, статистичному аналізі матеріалу, написання тез виконано у співавторстві).*
10. Mel'nik, A.V. Gender dimorphism of hydrogen sulfide production and physiological effects in cardiovascular system / A.V. Mel'nik, N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk // The Third International Conference on H₂S Biology and Medicine (June 4-6, 2014, Kyoto, Japan). – Nitric Oxide. – 2014. – № 39(1). – P.16. *(Дисертант брала участь в експериментальних дослідженнях, статистичному аналізі матеріалу, написання тез виконано у співавторстві).*
11. Паламарчук, І.В. Вплив гідроген сульфїду на маркери оксидативного стресу в міокарді щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом / І.В. Паламарчук, Н.В. Заїчко // III міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (24-25 вересня 2015 р., Дніпропетровськ). – Дніпропетровськ, 2015. – С. 138. *(Дисертантом особисто проведено всі експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).*
12. Паламарчук, І.В. Продукція гідроген сульфїду в аорті щурів за умов стрептозотоцинового діабету та його корекції метформіном / І.В. Паламарчук, Н.В. Заїчко // Мат. VIII науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини» (10 листопада 2015 р., Вінниця). – Вінниця, 2015. – С.198-199. *(Дисертантом особисто проведено всі експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).*
13. Паламарчук, І.В. Вміст галектину-3 в сироватці крові щурів за стрептозотоцинового діабету та його корекції / І.В. Паламарчук // Мат. XIII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2016» (7-8 квітня 2016 р. Вінниця). – Вінниця, 2016. – С.157.
14. Паламарчук, І.В. Вплив гідроген сульфїду та метформіну на біохімічні

- зміни в міокарді щурів за стрептозотоцинового діабету / І.В Паламарчук, Н.В. Заїчко // Мат. Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодення» (24 лютого 2016 р., Вінниця). – Вінниця, 2016. – С. 76 – 78. *(Дисертантом особисто проведено всі експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).*
15. Струтинська, О.Б. Вплив гідроген сульфїду на антидіабетичний ефект метформїну за стрептозотоцинового діабету у щурів // О.Б. Струтинська, І.В Паламарчук, Н.В Заїчко // Мат. Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодення» (24 лютого 2016 р., Вінниця). - Вінниця, 2016. – С. 91 – 93. *(Дисертантом особисто проведено біохімічні дослідження маркерів оксидативного стресу, статистичний аналіз матеріалу, написання тез виконано у співавторстві).*
16. Zaichko, N.V. Propargylglycin and hydrogen sulfide effects on plasma galectin-3 in streptozotocin-induced diabetic rats / N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk, O.B. Strutynska // Programme and book of abstracts, «VIII Lviv - Lublin conference of experimental and clinical biochemistry» (18th – 20th September 2017, Lublin, Poland). – Lublin, Medical University, 2017. – P. 56.
17. Заїчко, Н.В. Вплив антидіабетичних засобів на вміст гідроген сульфїду та активність H₂S-синтезуючих ензимів в органах щурів із стрептозотоциновим діабетом / Н.В. Заїчко, І.В. Паламарчук, О.Б. Струтинська // Мат. LX науково-практичної конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (присвячена 60-річчю ТДМУ, 14 червня 2017 р., Тернопіль). – Тернопіль, 2017. – С.290 – 292. *(Дисертантом особисто проведено біохімічні дослідження міокарду щурів, статистичний аналіз матеріалу, написання тез виконано у співавторстві).*
18. Паламарчук, І.В. Вплив екзогенного гідроген сульфїду на експресію та активність цистатіонїн-гама-ліази в міокарді щурів за стрептозотоцинового

- діабету / І.В Паламарчук // Мат. XIV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2017» (26 - 28 квітня 2017 р., Вінниця). – Вінниця, 2017. – С. 220 – 221.
19. Вплив антидіабетичних засобів на систему цистатіонін-гама-ліази/ гідроген сульфїду в міокарді та нирках щурів / Н.В. Заїчко, О.Б. Струтинська, І.В. Паламарчук, О.І. Штатко // Матеріали V Національного з'їзду фармакологів України (18-20 жовтня 2017 р., Запоріжжя). – Запоріжжя, 2017. - С. 46. *(Дисертантом особисто проведено біохімічні дослідження міокарду щурів, статистичний аналіз матеріалу, написання тез виконано у співавторстві).*
20. Palamarchuk I.V. Modulators of hydrogen sulfide metabolism influence antioxidant/prooxidant system in streptozotocin-induced diabetic rat heart / I.V. Palamarchuk // Мат. XV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2018» (18 - 20 квітня 2018 р., Вінниця). – Вінниця, 2018. – С. 122.
21. The hydrogen sulfide system disturbances: ethiology and pathogenetic effects / N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk, V.V. Blazhchenko, R.S Ostrenyuk. // Abstracts book. SMARTLION2018 2nd Symposium Innovation in Medicine (October 11-13, 2018, Lviv, Ukraine). – Львів, 2017. - С. 46 - 47. *(Дисертант брала участь в аналізі та узагальненні матеріалу, написанні та оформленні тез).*
22. Palamarchuk, I.V. Metformin and its combination with sodium hydrosulfide influence thiol/disulphide status and antioxidant/prooxydant system in streptozotocin-induced diabetic rat heart / I.V. Palamarchuk, N.V. Zaichko, R.S. Ostrenyuk // Abstracts book. SMARTLION2018 2nd Symposium Innovation in Medicine (October 11-13, 2018, Lviv, Ukraine). – Львів, 2017. - С.73. *(Дисертантом особисто проведено біохімічні дослідження міокарду щурів, статистичний аналіз матеріалу, написання тез виконано у співавторстві).*
23. Palamarchuk, I.V. Metformin and its combination with sodium hydrosulfide influences plasma galectin-3 and CSE/H₂S system in diabetic rat's heart / I.V.

- Palamarchuk, N.V. Zaichko // ICHSBM 2018: 20th International Conference on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine (September 10-11, 2018, Japan World Academy of Science, Engineering and Technology, Tokyo, Japan). - International Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences. - 2018. – Vol. 12, No 9. – P.4. [dai.waset.org /1307-6892/86069](http://dai.waset.org/1307-6892/86069). *(Дисертантом особисто проведено всі експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання та оформлення тез).*
24. Palamarchuk, I.V. Hydrogen sulfide metabolism modulators influence thiol/disulphide status in streptozotocin-induced diabetic rat's heart / I.V. Palamarchuk, N.V. Zaichko // FEBS3+meeting - XI Parnas Conference – Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (3-5-September 2018, Kyiv, Ukraine). – Ukr. Biochem. J. – 2018. – Vol. 90, Special Issue. – P.126. *(Дисертантом особисто проведено біохімічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання та оформлення тез).*
25. Palamarchuk, I.V. Changes in hydrogen sulphide system in myocardium of rats with experimental diabetes / I.V. Palamarchuk, N.V. Zaichko // Abstr. 27th International Conference on “Diabetes and Endocrinology” (16 - 17 May, 2019, Prague, Czech Republic). – Journal of Diabetology. – 3. – P. 24. *(Дисертантом особисто проведено експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).*
26. Age related changes in hydrogen sulfide metabolism in rats organs : connection with mediators of angiogenesis / N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk, V.V. Blazhchenko, R.S Ostrenyuk // Матеріали XII Українського біохімічного конгресу (30 вересня - 4 жовтня 2019 р., Тернопіль). - Медична та клінічна хімія. – 2019. – Т.21, №3 (додаток). – С.187-188. *(Дисертант брала участь у експериментальних дослідженнях, аналізі та узагальненні матеріалу, написанні та оформленні тез).*
27. Palamarchuk, I.V. Metformin and its combination with sodium hydrosulfide influences CSE/H₂S system in aorta of diabetic rats / I.V. Palamarchuk, N.V.

Zaichko // Матеріали XII Українського біохімічного конгресу (30 вересня - 4 жовтня 2019 р., Тернопіль). - Медична та клінічна хімія. – 2019. – Т.21, №3 (додаток). – С.230-231. *(Дисертантом особисто проведено біохімічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання та оформлення тез).*

ЗМІСТ

| | |
|---|----|
| АНОТАЦІЯ | 2 |
| ВСТУП | 21 |
| РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ УШКОДЖЕННЯ СЕРЦЯ ЗА ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ (огляд літератури) | 28 |
| 1.1 Біохімічні механізми ушкодження серця за цукрового діабету | 29 |
| 1.2 Особливості обміну та фізіологічна роль гідроген сульфіду | 37 |
| 1.3 Патогенетичне значення гідроген сульфід у при цукровому діабеті | 43 |
| 1.4 Роль метформіну в профілактиці та лікуванні діабетичної кардіоміопатії | 46 |
| РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ, МОДЕЛІ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ | 49 |
| 2.1 Характеристика експериментальних тварин та моделей | 49 |
| 2.1.1 Моделювання стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету у щурів | 51 |
| 2.1.2 Модуляція стану системи гідроген сульфід у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом | 52 |
| 2.1.3 Експериментальна корекція біохімічних порушень у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом | 53 |
| 2.2 Біохімічні методи дослідження | 54 |
| 2.3 Дослідження вмісту ДНК в ядрах клітин міокарду | 60 |
| 2.4 Дослідження експресії гену цистатіонін- γ -ліази <i>CSE</i> в тканинах | 61 |
| 2.5 Реєстрація скоротливості ізольованих фрагментів грудної аорти щурів в модельній системі <i>in vitro</i> | 62 |
| 2.6 Методи статистичної обробки цифрового матеріалу | 64 |

| | | |
|----------|--|-----|
| РОЗДІЛ 3 | СТАН СИСТЕМИ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В МІОКАРДІ ТА АОРТІ ЩУРІВ ЗА СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНОГО ДІАБЕТУ | 65 |
| 3.1 | Динаміка показників вуглеводного обміну та рівня гідроген сульфід у сироватці крові у щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету | 65 |
| 3.2 | Показники обміну H_2S та експресія гену <i>CSE</i> в міокарді щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету | 71 |
| 3.3 | Стан системи H_2S та функціональний стан аорти щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом | 79 |
| РОЗДІЛ 4 | ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ ОБМІНУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА БІОХІМІЧНІ ТА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ В СЕРЦЕВО-СУДИННІЙ СИСТЕМІ ЩУРІВ ІЗ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНИМ ДІАБЕТОМ | 85 |
| 4.1 | Вплив пропаргілгліцину та $NaHS$ на обмін гідроген сульфід та біохімічні показники стану міокарду щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом | 86 |
| 4.2 | Вплив пропаргілгліцину та $NaHS$ на рівень галектину-3 в сироватці крові та міокарді у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом | 94 |
| 4.3 | Вплив пропаргілгліцину та $NaHS$ на показники клітинного циклу та відносну масу міокарду щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом | 98 |
| 4.4 | Вплив пропаргілгліцину та $NaHS$ на стан системи H_2S та скоротливість аорти у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом | 105 |
| РОЗДІЛ 5 | ВПЛИВ МЕТФОРМІНУ ТА ЙОГО ПОЄДНАННЯ З НАТРІЙ ГІДРОГЕНСУЛЬФІДОМ НА РІВЕНЬ H_2S ТА АСОЦІЙОВАНІ БІОХІМІЧНІ ПОРУШЕННЯ В СЕРЦЕВО- | 109 |

СУДИННІЙ СИСТЕМІ ЩУРІВ ІЗ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНИМ ДІАБЕТОМ

| | | |
|--|--|-----|
| 5.1 | Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на обмін гідроген сульфїду та біохімічні показники стану міокарду щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом | 110 |
| 5.2 | Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на рівень галектину-3 в сироватці крові та міокарді у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом | 117 |
| 5.3 | Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на стан системи H ₂ S в аорті щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом | 119 |
| РОЗДІЛ 6 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ | | 127 |
| ВИСНОВКИ | | 136 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ | | 139 |
| ДОДАТОК А | | 170 |
| ДОДАТОК Б | | 177 |
| ДОДАТОК В | | 179 |

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

| | |
|------------------|--|
| АФК | - активні форми кисню |
| АМРК | - АМФ-активована протеїніназа |
| в/шл | - внутрішньошлунково |
| в/оч | - внутрішньоочеревинно |
| Гліко-Нб | - глікозильований гемоглобін |
| 3-МСТ | - 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза |
| ПАЛФ | - піридоксальфосфат |
| ТСТ | - тіосульфатдитіолсульфідтрансфераза |
| ТДК | - тіол-дисульфідний коефіцієнт |
| ЦГЛ | - цистатіонін- γ -ліаза |
| ЦАТ | - цистеїнамінотрансфераза |
| CSE | - ген цистатіонін- γ -ліази |
| DTNB | - 5,5'-дітіобіс(2-нітробензоат) або реактив Елмана |
| H ₂ S | - гідрогенсульфід |
| NADPH | - нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений |
| NaHS | - натрій гідрогенсульфід |
| STZ | - стрептозотоцин |

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Цукровий діабет становить одну із складних проблем сучасної медицини і визнаний Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) як неінфекційна епідемія у зв'язку з високою поширеністю, ранньою інвалідизацією та високою смертністю хворих. За даними ВООЗ, поширеність цукрового діабету у різних країнах світу складає 4-8% [6]. Кожні 13–15 років кількість хворих на цукровий діабет подвоюється і у 2030 році може досягнути близько 500 млн [2]. Епідеміологічні дослідження в Україні свідчать про постійне збільшення числа хворих серед населення на 5-7% щорічно. Станом на 2016 рік в Україні зареєстровано близько 1,2 млн хворих на цукровий діабет, серед них понад 200 тис є інсулінозалежними [44].

За даними ВООЗ, цукровий діабет незалежно від типу є визнаним чинником серцево-судинної патології та хронічної серцевої недостатності [234]. Стійке підвищення рівня глікозильованого гемоглобіну ($HbA1c > 7\%$) понад 1 рік у пацієнтів з цукровим діабетом підвищує ризик інфаркту міокарду на 67% та інсульту на 51% [4]. Патогенез ушкодження серця при цукровому діабеті є досить складним, оскільки реалізується через судинні (коронарогенні), метаболічні (некоронарогенні) та нейрогенні механізми [9]. Біохімічними тригерами діабет-асоційованої кардіоваскулярної дисфункції та кардіоміопатії вважають активацію вільно-радикальних процесів, глікозилювання кардіальних протеїнів, порушення енергопродукції, електролітний дисбаланс, гіперпродукцію прозапальних та профіброгенних медіаторів, дисбаланс в системі вазодилататорів та вазоконстрикторів тощо [9; 50; 174; 214].

За останні роки з'явилися експериментальні докази, що у механізмах розвитку діабетичної кардіоміопатії важливу роль відіграє газотрансміттер гідроген сульфід (H_2S) [133; 144; 248; 267]. Провідними біологічним ефектами H_2S (у фізіологічному діапазоні концентрацій) вважають наступні: регуляція судинного тонуусу, нейромедіаторна активність, інгібування вільнорадикальних

процесів, пряма та опосередкована антиоксидантна дія, регуляція роботи мітохондрій, антиангрегантний та антикоагулянтний ефекти, інгібування процесів апоптозу та запалення [258; 267]. H_2S причетний до регуляції секреції інсуліну та обміну глюкози в печінці [98], у зв'язку з чим його роль в патогенезі цукрового діабету різних типів залишається дискусійною. Вивчаються можливості застосування донорів H_2S з метою цитопротекції та органопротекції при різних патологічних станах [5; 133; 188; 229]. Однак, потребують подальших досліджень питання щодо внеску окремих шляхів метаболізму H_2S у формування діабет-асоційованої кардіоваскулярної дисфункції; встановлення впливу антидіабетичних засобів на стан системи H_2S в серці та судинах за умов цукрового діабету; встановлення ефективності фармакотерапії цукрового діабету в умовах модуляції обміну H_2S . Вирішення цих питань може доповнити уявлення про патогенетичні механізми цукрового діабету та обґрунтувати нові підходи до профілактики та лікування його ускладнень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках планових НДР кафедри біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова «Вплив екзогенних та ендогенних чинників на обмін гідроген сульфідів та асоційованих з ним метаболічних процесів в нормі та при патології» (№ держреєстрації 0113U006461, 2014-2018 рр.), «Роль екзогенних та ендогенних сірковмісних сполук в механізмах ураження внутрішніх органів та цитопротекції за різних патологічних станів» (№ держреєстрації 0119U001142, 2019-2023 рр.). Автор є співвиконавцем вказаних тем.

Мета дослідження – встановити роль системи гідроген сульфідів в біохімічних механізмах ушкодження міокарду та обґрунтувати нові підходи до метаболічної кардіопротекції за експериментального стрептозотоцин-індукованого діабету.

Завдання дослідження

1. Дослідити вміст H_2S , активність ензимів синтезу та утилізації H_2S (цистатіонін- γ -ліази, цистеїнамінотрансферази / 3-меркаптопіруватсульфур-трансферази, тіосульфатдитіолсульфідтрансферази, сульфітоксидази), рівень експресії цистатіонін- γ -ліази в серцево-судинній системі щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету.

2. Вивчити вплив модуляторів системи H_2S (NaHS, пропаргілгліцину) на активність тіоредоксинредуктази та показники тіол-дисульфідного обміну, активність вільно-радикальних процесів та стан антиоксидантної системи в міокарді щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету.

3. Вивчити вплив модуляторів системи H_2S (NaHS, пропаргілгліцину) на вміст профібrogenного медіатору галектину-3 в сироватці крові та міокарді, оцінити можливий зв'язок із рівнем H_2S в міокарді щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету.

4. Дослідити вплив модуляторів системи H_2S (NaHS, пропаргілгліцину) на показники клітинного циклу та рівень фрагментації ДНК в міокарді щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету.

5. Оцінити вплив метформіну та його поєднання з натрій гідрогенсульфідом на рівень H_2S та асоційовані біохімічні зміни в серцево-судинній системі щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету і експериментально обґрунтувати нові підходи до профілактики діабетичної кардіоміопатії.

Об'єкт дослідження: біохімічні механізми ушкодження міокарду за стрептозотоцин-індукованого діабету.

Предмет дослідження: активність ензимів синтезу та утилізації H_2S , вміст H_2S , експресія цистатіонін- γ -ліази, маркери оксидативного стресу, показники клітинного циклу та фрагментації ДНК в міокарді, експресія профібrogenного медіатору галектину-3, вплив метформіну на систему H_2S в міокарді та аорті.

Методи дослідження: біохімічні (визначення активності ензимів, концентрації гідроген сульфїду, метаболїтів), їмуоферментні (визначення вмісту галектину-3), молекулярно-генетичні (визначення експресї гена *CSE*), цитометричні (визначення показників клітинного циклу), фармакологічні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Доповнено наукові данї про роль системи H_2S в патогенезї ушкодження серцево-судинної системи за експериментального цукрового діабету. Показано, що формування дефіциту H_2S в міокарді асоціюється не лише зі зниженням активності H_2S -синтезуючих ензимів (цистатїонїн- γ -ліази, цистеїнамїнотрансферази, тїосульфатдїтіол-сульфїдтрансферази), а й з порушенням активності мїтохондрїальних етапів обміну H_2S за участї сульфїтооксидази та тїоредоксинредуктази.

Вперше встановлено, що введення їнгїбітору цистатїонїн- γ -ліази пропаргїлгліцину підвищувало сироваткову та мїокардїальну експресїю профїброгенного медїатору галектину-3, посилювало цитометричні ознаки проліферативної активності клітин та фрагментації ДНК в мїокарді у щурів із стрептозотоцин-їндукованим діабетом, у той час як введення NaHS запобїгало розвитку вказаних порушень. Введення NaHS підвищувало експресїю гена *CSE* в мїокарді та аортї, зменшувало розлади H_2S -залежної вазодїлятації у щурів із стрептозотоцин-їндукованим діабетом.

Вперше встановлено вплив метформїну на активність ензимів синтезу та утилізації H_2S в мїокарді, експресїю цистїонїн- γ -ліази в мїокарді та аортї, сироватковий та мїокардїальний рївнї галектину-3 за стрептозотоцин-їндукованого діабету. Показано, що при застосуванні метформїну у поєднанні з NaHS забезпечується бїльш ефективна корекція порушень обміну H_2S в серцево-судинній системї, посилюються антиоксидантний, антифїброгенний та вазопротекторний ефекти.

Практичне значення одержаних результатів. Поглибленї теоретичнї уявлення про роль системи H_2S в механїзмах розвитку діабет-асоційованого ушкодження мїокарду, встановленї новї біохїмічні предиктори

кардіоваскулярної дисфункції за умов стрептозтоцин-індукованого діабету, з'ясована ефективність антидіабетичного засобу метформіну за умов введення донору H_2S . Результати роботи є експериментальним обґрунтуванням доцільності корекції рівня H_2S в серцево-судинній системі на тлі антидіабетичної фармакотерапії з метою профілактики кардіоваскулярної дисфункції та кардіоміопатії. Практичне значення результатів дослідження підтверджується 2 патентами України на корисні моделі (№107766; №107767).

Результати дослідження використовуються в науковій роботі та навчальному процесі кафедр біологічної та загальної хімії, фармакології, внутрішньої медицини №2 Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова; кафедри клінічної медицини навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету ім. Т.Г. Шевченко; кафедри медичної біології, паразитології та генетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, кафедри біологічної та біоорганічної хімії Полтавського державного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною науковою працею автора. Дисертантом особисто обрано тему, сформульовано мету та завдання дисертації, зроблено пошук та аналіз даних літератури, статистично оброблені результати дослідження, оформлено дисертацію. Основні положення роботи, висновки, практичні рекомендації обговорені з науковим керівником, д.мед.н. професором Заїчко Н.В., і сформульовані автором самостійно. Всі результати отримано здобувачем особисто або за безпосередньої участі. Автором самостійно проведено моделювання цукрового діабету та порушень обміну H_2S , виконані всі біохімічні дослідження. Оформлення наукових публікацій, патентів, впроваджень виконано автором особисто. Біохімічні та електрофізіологічні дослідження виконані у науково-дослідній клініко-діагностичній лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова за допомогою д.мед.н., професора Мельника А.В. Цитометричні дослідження виконані за допомогою д.мед.н., професора Ходаківського О.А. Молекулярно-

генетичні дослідження виконані у навчально-науковій клініко-діагностичній лабораторії ПЛР ВНМУ ім. М.І. Пирогова за допомогою н.с. Людкевич Г.П. Автор висловлює глибоку вдячність колегам за допомогу в проведенні досліджень, співучасть яких у виконанні роботи відмічена у спільних публікаціях. Автор не запозичував ідеї та розробки співавторів публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались на: The Third International Conference on H₂S Biology and Medicine (Kyoto, Japan, 2014); III міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 2015); VIII науково-практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини» (Вінниця, 2015); XIII Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2016» (Вінниця, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодні» (Вінниця, 2016); XIV Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2017» (Вінниця, 2017); VIII Lviv - Lublin conference of experimental and clinical biochemistry (Lublin, Poland, 2017); LX науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», присвячена 60-річчю ТДМУ (Тернопіль, 2017); V Національному з'їзді фармакологів України (Запоріжжя, 2017); SMARTLION2018 2nd Symposium Innovation in Medicine (Львів, 2018); ICHSBM 2018: 20th International Conference on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine (Tokyo, Japan, 2018); FEBS3+meeting - XI Parnas Conference – Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (Київ, 2018); XV Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2018» (Вінниця, 2018); 5th World Congress On Hydrogen Sulfide In Biology & Medicine (Toronto, Canada, 2018); XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 2019); 27th International Conference on “Diabetes and Endocrinology” (Prague, Czech Republic, 2019); засіданнях кафедри біологічної

та загальної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (2014-2020 рр.).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 27 наукових праць, з них 4 статті у наукових фахових виданнях МОН України, 1 стаття – у фаховому періодичному іноземному виданні (Грузія), що цитується у Scopus, 1 стаття – у фаховому періодичному іноземному виданні (Австрія), 19 тез - в матеріалах конгресів та конференцій, 2 патенти України.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 184 сторінках друкованого тексту і складається з анотації, 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 274 найменування (44 кирилицею, 230 латиницею), додатків. Робота містить 41 рисунок, 16 таблиць.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ УШКОДЖЕННЯ СЕРЦЯ ЗА ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Цукровий діабет є важливою медико-соціальною проблемою, адже є основною причиною інвалідизації та смертності хворих і серйозним бар'єром економічного розвитку людства. За останні роки значно зросла захворюваність на цукровий діабет в Україні та світі і за даними ВООЗ вона набуває масштабів світової епідемії. За період 1990-2010 рр. у світі кількість хворих на цукровий діабет зросла майже втричі і за прогнозами експертів у 2035 році їх чисельність може сягнути 592 млн [3]. Аналогічна тенденція відмічається в Україні – якщо у 2009 році поширеність цукрового діабету становила 1,8 %, то у 2013 році цей показник збільшився до 3,04 % і має неухильну тенденцію до зростання [8].

Одним із поширених та важких ускладнень цукрового діабету є ураження серцево-судинної системи. У 12-19 % хворих на цукровий діабет реєструється розвиток хронічної серцевої недостатності [40]. Частота розвитку інфаркту міокарду та артеріальної гіпертензії у хворих на цукровий діабет вдвічі більша, ніж в загальній популяції [40]. Виникнення кардіоваскулярних ускладнень на тлі цукрового діабету значно погіршує якість життя хворих, супроводжуються значним зростанням показників інвалідизації та смертності [26; 27; 173].

Патогенез діабетичної кардіоміопатії реалізується через різноманітні патофізіологічні та біохімічні механізми – глікозилювання білків, оксидативний стрес, запалення, ендотеліальну дисфункцію та ін. [40]. Хоча на сьогодні існує велика кількість даних щодо можливих механізмів розвитку діабетичної кардіоміопатії, однак повного розуміння цієї проблеми все ще не має. Тому залишається актуальним вивчення нових молекулярних мішеней, через які реалізується ураження міокарду за цукрового діабету. В останні роки встановлено, що в серці та судинах у процесі обміну сірковмісних амінокислот утворюється важливий газотрансміттер H_2S , роль якого при цукровому діабеті

1 та 2 типу привертає все більше уваги [248; 267]. Висвітленню сучасних уявлень про біохімічні механізми ушкодження серця та роль H_2S за цукрового діабету присвячений огляд літератури.

1.1 Біохімічні механізми ушкодження серця за цукрового діабету

Цукровий діабет є важливим модифікованим фактором ризику розвитку серцево-судинних ускладнень. Структурно-функціональні зміни, які виникають в серці за цукрового діабету об'єднуються терміном «діабетична кардіоміопатія». Під цим поняттям розуміють розвиток дисфункції лівого шлуночка, яка розвивається у хворих на цукровий діабет, незалежно від ішемічної хвороби серця, уражень клапанного апарату серця та артеріальної гіпертензії [23; 26]. Незалежними факторами ризику діабетичної кардіоміопатії є інсулінорезистентність, гіперінсулінемія та гіперглікемія [23; 74]. Серед механізмів розвитку уражень міокарду за цукрового діабету виділяють наступні: порушення інсулінового метаболічного сигналіngu, гіперглікемія та глюкозна токсичність, ліпотоксичність, мітохондріальна дисфункція та оксидативний стрес, ендоплазматичний ретикулярний стрес та порушення кальцієвого гомеостазу, гіперактивація ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС), дисрегуляція мікроРНК, імунозапальні та профіброгенні порушення, ендотеліальна дисфункція та апоптоз (рис. 1.1). Вказані біохімічні та патофізіологічні механізми спричиняють фіброз міокарду, гіпертрофію лівого шлуночка, ригідність міокарду з розвитком спочатку діастолічної, а далі і систолічної дисфункції [74; 87; 101; 120].

Порушення інсулінового метаболічного сигналіngu. Тригерним чинником діабетичної кардіоміопатії є порушення метаболічного сигналіngu інсуліну в серці. За фізіологічних умов існує два шляхи передачі інсулінового сигналу. Перший шлях полягає в тому, що інсулін зв'язується з відповідними рецепторами (IR), активує субстрати (IRS1 та 2), що супроводжується активацією фосфоінозитид-3-кінази(PI3K)-протеїнкінази В (Akt) - PI3K-Akt

шляху. Активація Akt стимулює транслокацію GLUT4 через клітинну мембрану та поглинання глюкози в кардіоміоцитах, скелетних м'язах, печінці, жировій тканині для підтримки гомеостазу глюкози [119]. Зменшення поглинання глюкози внаслідок порушення PI3K/Akt шляху за цукрового діабету зменшує активність Ca^{2+} -АТФ-ази, що супроводжується зростанням внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} і веде до ригідності серця та порушення діастолічної релаксації. Поряд з цим PI3K -Akt шлях також може активувати eNOS шляхом прямого фосфорилування серину в активному центрі, що супряжено зі збільшення активності eNOS та продукції NO. Порушення цього інсулінового сигналіngu в серці у хворих на цукровий діабет супроводжується розвитком вазоконстрикції, обумовленої дефіцитом NO [87; 128].

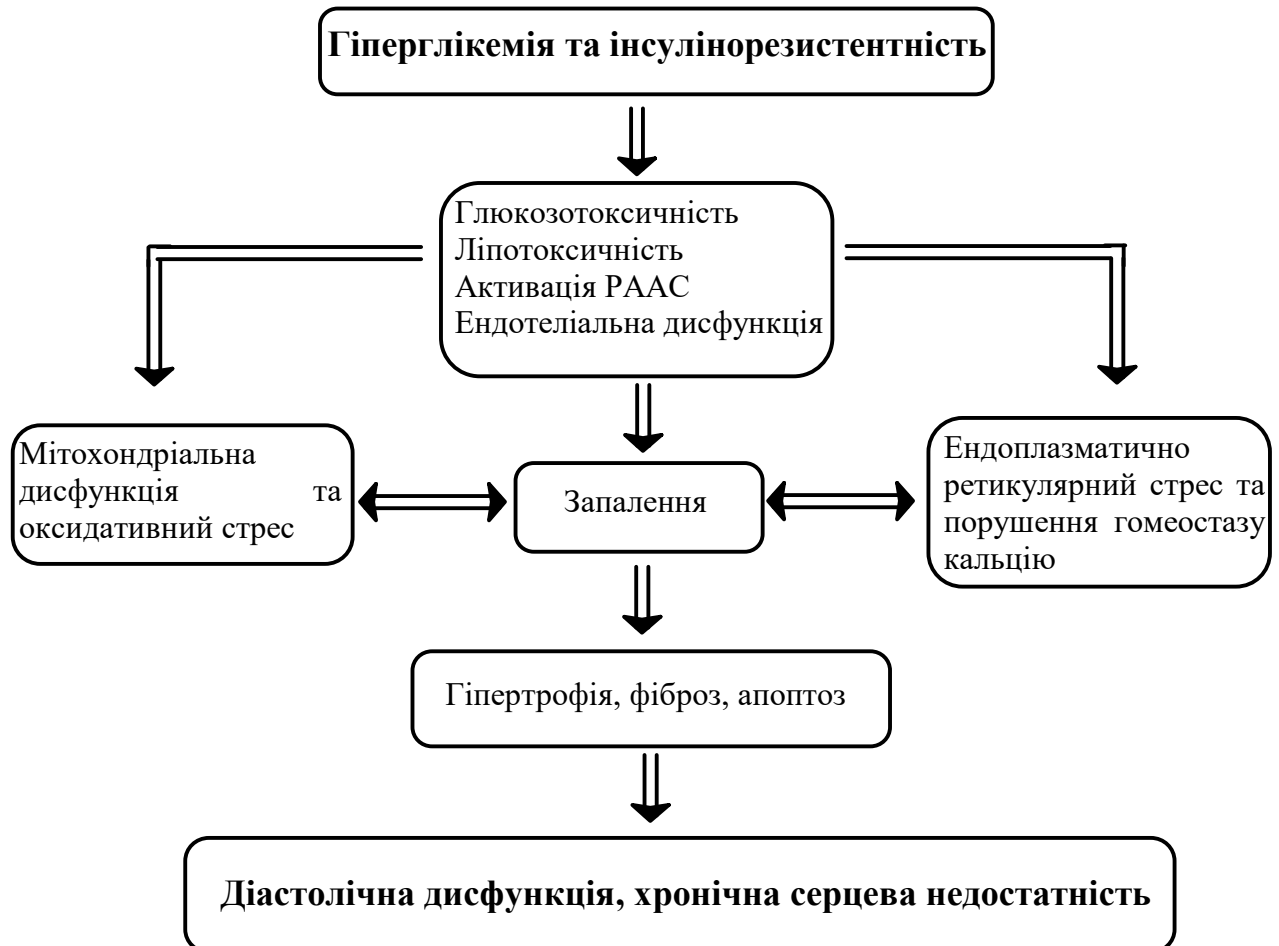


Рис. 1.1 Біохімічні та патофізіологічні механізми розвитку діабетичної кардіоміопатії [120]

Другий шлях включає трансдукцію сигналу через активовану мітогенами протеїнкіназу (МАРК), яка регулює функцію судин за рахунок стимуляції експресії на ендотелії молекули адгезії судинних клітин (VCAM)-1 та E-селектину [87, 119]. Порушення МАРК-сигналіngu за цукрового діабету веде до розвитку ендотеліальної дисфункції.

Гіперглікемія та глюкозна токсичність [119; 150]. Хронічна гіперглікемія активує реакції неферментативного глікозилювання ліпідів, ліпопротеїнів та амінокислот з утворенням кінцевих продуктів. Накопичення продуктів глікозилювання за цукрового діабету веде до зміни механічних властивостей позаклітинного матриксу: зростає стійкість до ферментативного протеолізу сполучної тканини, збільшується кількість зшивок між колагеном та ламініном, що веде до розвитку фіброзу, ригідності серця та порушення діастолічної релаксації. Продукти глікозилювання можуть взаємодіяти з відповідними рецепторами і активувати в тканинах серця МАРК-шлях та Янус-кіназу (JAK-шлях), що викликає гіперекспресію прозапальних цитокінів та профіброгенних медіаторів [119]. Введення антагоністів рецепторів до продуктів глікозилювання тваринам з експериментальним цукровим діабетом запобігало розвитку фіброзу та жорсткості міокарду [150]. Отже, гіперглікемія та глюкозна токсичність є важливими факторами у розвитку фіброзу та запалення міокарду.

Серцева ліпотоксичність. На тлі інсулінорезистентності та дефіциту інсуліну в жировій тканині зростає активність ліполізу, що супроводжується збільшенням в крові вільних жирних кислот (ВЖК). Поряд з цим на тлі цукрового діабету збільшується експресія транспортерів жирних кислот CD36, які забезпечують надмірне поглинання ВЖК в кардіоміоцити, активується їх β -окиснення, знижується використання глюкози як джерела енергії, що супрЯжено з накопиченням активних форм кисню та розвитком мітохондріальної дисфункції [87; 135]. Також за цукрового діабету зростає експресія рецептора- α (PPAR- α), активованого проліфератором пероксисоми, що веде до накопичення в кардіоміоцитах ВЖК та їх метаболітів - ди- та тригліцеридів, церамідів [51; 120; 274]. Ліпідні метаболіти погіршують

метаболическую сигнализацию инсулина, что углубляет развитие диабетической кардиомиопатии. Так, высокий уровень диacyлеридов через активацию изоформ протеинкиназы С уменьшают метаболическую сигнализацию инсулина и продукцию NO. Церамиды ингибируют метаболическую передачу сигнала через Akt-путь, пригнечают транслокацию GLUT4 и стимульоване инсулином поглощения глюкозы. Тому надлишковое накопичення в миокарде ВЖК и липидных метаболитов сприяет развитию миокардиальной инсулинорезистентности, снижению биодоступности NO, воспалению, фиброзу и диастолической дисфункции.

Митохондриальная дисфункция и окислительный стресс. Основными факторами развития митохондриальной дисфункции являются гипергликемия, накопичення в кардиомиоцитах продуктов гликозилирования, ВЖК и их метаболитов [101]. Указанные метаболические факторы вызывают ингибирование АМФ-активированной протеинкиназы (АМПК), что приводит к снижению активности коактиватора-1 α рецептора- γ (PPAR- γ), активированного пролифератором пероксисом и ассоциируется с нарушением биогенеза митохондрий и тканевого дыхания [55; 119; 120]. Митохондриальная дисфункция сопровождается развитием окислительного стресса, гипоенергетического состояния, воспаления, фиброза и индукцией апоптоза.

Накопичення активных форм кислорода (АФК) и развитие окислительного стресса при сахарном диабете являются следствием многих факторов [49; 68; 101; 162; 205; 219]. Важную роль играют нарушения работы электронно-транспортной цепи вследствие митохондриальной дисфункции, активация проокислительных ферментов NADPH-оксидазы и ксантиноксидазы, моноаминоксидазы, расщепления NO-синтазы, усиления метаболизма арахидоновой кислоты липоксигеназным путем (активируется 14/15 липоксигеназа). Кроме того при сахарном диабете уменьшаются запасы восстановленного глутатиона, тиоредоксина, снижается активность антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и тиоредоксинредуктазы. Окислительный стресс при сахарном диабете углубляет митохондриальную дисфункцию, способствует развитию воспаления и фиброза миокарда.

Ендоплазматичний ретикулярний стрес та порушення кальцієвого гомеостазу. Ендоплазматичний ретикулум – це центральна органела, яка забезпечує синтез ліпідів, фолдінг та посттрансляційну модифікацію протеїнів, регулює гомеостаз кальцію [66]. За цукрового діабету розвивається стрес ендоплазматичного ретикулуму, що асоціюється з тривалою гіперглікемією, гіперліпідемією та гіпергомоцистеїнемією [244]. Наслідком ендоплазматичного ретикулярного стресу є збільшення цитоплазматичної концентрації кальцію внаслідок зменшення активності Ca^{2+} -АТФ-ази, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, які забезпечують його зворотне захоплення ендоплазматичним ретикулумом. Високий вміст кальцію в цитоплазмі збільшує тривалість потенціалу дії, сповільнює діастолічну релаксацію, активує апоптоз кардіоміоцитів [86; 119].

Гіперактивація ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС). Важливу роль в патогенезі діабетичної кардіоміопатії відіграє активація системної та серцевої РААС [120]. Відомо, що високі концентрації ангіотензину-II та альдостерону супроводжуються зростанням артеріального тиску, викликають оксидативний стрес через активацію NADPH-оксидази [199]. Поряд з цим ангіотензин-2 посилює експресію прозапальних та профіброгенних чинників [118]. Активація РААС також індукує системну та серцеву інсулінорезистентність через сигнальний шлях mTOR – S6K1 [128].

Дисрегуляція мікроРНК. Останнім часом показано наявність окремого виду РНК – мікроРНК, які відіграють важливу роль в регуляції експресії генів на посттранскрипційному рівні. Показано, що мікроРНК в міокарді залучені до регуляції мітохондріальної функції, продукції АФК, метаболізму Ca^{2+} , апоптозу та аутофагії [145; 161]. Встановлено, що гіперекспресія мікроРНК-221 та мікроРНК-212 за цукрового діабету тісно корелювало з гіпертрофією та аутофагічною реакцією в міокарді. Зростання експресії мікроРНК-34а, мікроРНК-195, мікроРНК-1/206, мікроРНК-320, мікроРНК-378 та мікроРНК-451 корелювало з апоптозом кардіоміоцитів за цукрового діабету [57; 69; 204]. В той же час зниження рівня мікроРНК-1, мікроРНК-373, мікроРНК-378 та

мікроРНК-133а супряжені з розвитком гіпертрофії та оксидативним стресом в міокарді [127; 231].

Імунозапальні та профіброгенні порушення. Запалення відіграє важливу роль у патофізіології діабетичної кардіоміопатії [70; 71; 87; 94; 147; 187]. Глюкозна- та ліпотоксичність на тлі цукрового діабету сприяє накопиченню АФК, які активують ядерний фактор NFκB, Останній збільшує експресію молекул адгезії (ICAM-1 та VCAM-1), прозапальних цитокінів (IL-1β, IL-6, IL-18, TNF-α та TGF-β1), посилює інфільтрацію макрофагів та лейкоцитів. Поряд з цим оксидативний стрес супроводжується стимуляцією різних серин/треонінкіназ - c-Jun NH₂-термінальної кінази (JNK), ПКС та комплексу кінази ІκВ β (IKK β). Їх активація призводить до фосфорилування серину IRS-1, зниження активності кінази PI-3 та Akt, що веде до зменшення транслокації GLUT4 та транспорту глюкози. Таким чином, прозапальні цитокіни можуть сприяти інсулінорезистентності шляхом модуляції інсулінової сигналізації та транскрипції.

Ключова роль в патогенезі діабетичної кардіоміопатії належить посиленню процесів фіброгенезу в міокарді [137]. Тригерним чинником, який запускає каскад профіброгенних змін в міокарді за цукрового діабету є гіперглікемія та глюкозна токсичність. Високі концентрації глюкози викликають патологічне ремоделювання екстрацелюлярного матриксу міокарду через різноманітні шляхи: 1) активація міокардіальної РААС, збільшення рівня ангіотензину-II та рецепторів до нього (AT-1), що супроводжується збільшенням продукції колагену [201]; 2) посилення експресії трансформуючого фактору росту TGF-β1, який через активацію білків Smad3 стимулює трансформацію фібробластів у міофібробласти та їх проліферацію [106; 212]; 3) активація специфічних кіназ – p38, АМФ-активованої протеїнкінази (AMPK), кінази, яка активується екстрацелюлярними сигналами (ERK ½), протеїнкінази В (Akt), які стимулюють продукцію профіброгенних медіаторів [64; 106; 197; 238]; 4) накопичення кінцевих продуктів глікозилування, які порушують адгезію клітин до компонентів

екстрацелюлярного матриксу, викликають утворення поперечних зшивок між білками міжклітинного матриксу, а також стимулюють продукцію колагену через активацію кіназ p38 та ERK [109; 190; 215; 247]; 5) цитокіновий дисбаланс, а саме збільшення кількості інтерлейкінів – IL-1 β , 6, 17, активності матриксних металопротеїназ – MMP-2, 9, а також зниження рівня IL-33, стимулює продукцію профібротичних медіаторів та колагеногенез [61; 195; 217; 265; 266]; б) оксидативний стрес стимулює фіброгенез через активацію MMP-9 та протеїнкінази p38 [141].

В останні роки активно вивчається патогенетичне та клініко-діагностичне значення галектинів (*galectin*) – глікопротеїнів із родини β -галактозидзв'язуючих лектинів, особливо галектину-3. Галектин-3 залучений до регуляції багатьох процесів, зокрема клітинної адгезії, проліферації та диференціації клітин, апоптозу, запалення, імунного гомеостазу, туморогенезу [111]. Галектин-3 стимулює синтез профіброгенних та прозапальних медіаторів [62]; стимулює проліферацію та трансформацію фібробластів та міофібробластів [108], активує колагеногенез та фіброгенез в різних органах – міокарді, печінці, нирках та легнях [139], бере участь в процесах ангіогенезу та імунозапальної активації ендотелію [96]. Підвищення рівня галектину-3 в крові асоціюється з високим ризиком ішемічної хвороби серця у хворих на цукровий діабет 1 типу [192].

Родина галектинів також залучена до регуляції активності тромбоцитів, факторів коагуляційного гемостазу та розвитку тромбозів [63, 73]. Зокрема, DeRoos E.P. та ін. (2015) було показано, що галектин-3 (gal3) та галектин-3-зв'язуючий протеїн (gal3bp) локалізуються на стінках вен, еритроцитах та тромбоцитах [73]. Експресія галектину-3 суттєво зростає на ранній стадії венозного тромбозу, а рекомбінантний галектин-3 промотує розвиток венозного тромбозу через активацію експресію IL-6 в стінках венозних судин [73]. Нещодавно було показано, що у пацієнтів з цукровим діабетом підвищенням експресії галектину-3 в тромбоцитах та зростання рівня галектину-3 в плазмі крові асоціювалось з оклюзією артеріо-венозних шунтів [63]. Таким чином,

дослідження ролі галектину-3 в патогенезі тромбофілії та васкулопатії, асоційованої з цукровим діабетом залишається актуальною.

Ендотеліальна дисфункція. Несприятливий метаболічний патерн за цукрового діабету спричиняє розвиток ендотеліальної дисфункції, яка інтегрується в механізми ураження міокарду. На тлі цукрового діабету розвивається дисбаланс між вазоактивними молекулами – зростає рівень вазоконтрикторів ендотеліну-1 та ангіотензину-2, а також зменшується продукція вазодилататору NO за участі ендотеліальної ізоформи NO-синтази та його біодоступність, знижується рівень простагландину (I₂) та ендотелійзалежного фактору гіперполяризації (EDHF). Ендотеліальна дисфункція промотує розвиток ішемії, фіброзу міокарду та діастолічної дисфункції [40; 93; 119; 179].

Апоптоз. Діабетична кардіоміопатія супроводжується активацією апоптозу кардіоміоцитів, що реалізується через різноманітні молекулярні механізми [59; 72, 113; 186]: 1) надмірне накопичення АФК спричиняє активацію апоптозу рецептор-незалежним шляхом; 2) мітохондріальна дисфункція супроводжується відкриттям мітохондріальної пори, виходом цитохрому c та каскадною активацією каспаз; 3) прозапальні цитокіни через відповідні рецептори «смерті» активують рецептор-залежний апоптоз; 4) збільшення активності полі (АДФ-рибозо) полімерази-1 (PARP-1) викликає ядерну транслокацію апоптоз-індукуючого фактору (AIF), що індукує каспазозалежний апоптоз; 5) ендоплазматичний ретикулярний стрес викликає стимуляцію білків IRE-1, ATF-6 та PERK, які є індукторами апоптозу.

Таким чином, на сьогодні вже багато відомо про біохімічні та патофізіологічні механізми розвитку діабетичної кардіоміопатії. Однак, останнім часом активно досліджуються нові сигнальні системи в серці, які мають важливе значення в нормі та при патології. Зокрема, в останні роки було встановлено, що в серці та судинах в процесі обміну сірковмісних амінокислот утворюється газотрансмітер гідроген сульфід (H₂S), роль якого в патогенезі цукрового діабету та його ускладнень все ще залишається дискусійною.

1.2 Особливості обміну та фізіологічна роль гідроген сульфїду

Фїзико-хімічні властивості [112; 117; 160]. H_2S безбарвний, займистий, токсичний газ із запахом тухлих яєць. В рідких середовищах організму H_2S представляє собою слабку двохосновну сульфїдну кислоту ($\text{pK}_{\text{a}1} = 6,8$ та $\text{pK}_{\text{a}2} > 12$ при 37°C), яка дисоціює з утворенням протонів (H^+), гідрогенсульфїд аніону (HS^-) та невеликої кількості сульфїд аніону (S^{2-}). Розподіл іонів та недисоційованих молекул залежить від активної кислотності середовища: при $\text{pH}=7,4$ (кров) та $\text{pH}=8$ (матрикс мітохондрій) переважає форма HS^- (відповідно ~ 80 та 90%), тоді як при $\text{pH}=5$ (лізосоми) переважає недисоційована форма H_2S (більше 90%). Ліпофільна властивість забезпечує швидку дифузїю H_2S через біліпідний шар клітинних мембран. В той же час, HS^- не дифундує самостійно через мембрани і потребує транспортерів.

Синтез [60; 123; 160; 191; 194; 246]. H_2S утворюється в організмах ссавців неферментативним та ферментативним шляхом. В кишечнику колонізуються бактерії, які здатні відновлювати сульфат-іони за участі донора електронів з утворенням H_2S . Еритроцити також здатні перетворювати елементарну сірку в HS^- шляхом неферментативного відновлення. Основним шляхом утворення H_2S в тканинах організму є ферментативний (рис. 1.2). Субстратами для синтезу H_2S є сірковмісні речовини - цистеїн, гомоцистеїн, тіосульфати та персульфїди. Утворення H_2S каталізують піридоксальфосфат-залежні ферменти - цистатіонін- β -синтаза (ЦБС), цистатіонін- γ -ліаза (ЦГЛ), цистеїнамінотрансфераза (ЦАТ) та ферменти незалежні від вітаміну В6 - 3-меркаптопіруватсульфутрансфераза (3-МСТ) та тіосульфатдитіолсульфїд-трансфераза (ТСТ). Розглянемо реакції синтезу H_2S за участі цих ензимів. ЦБС (КФ 4.2.1.22) каталізує три реакції в ході яких вивільняється H_2S : 1) взаємодія гомоцистеїну з серином з утворенням цистатіонїну. Альтернативним субстратом в цій реакції замість серину може виступати цистеїн. Однак, серин вважається основним субстратом для конденсації гомоцистеїну, що пояснюється вищою концентрацією його в клітинах та меншою константу

Міхаеліса ЦБС для серину (2,76 мМ), ніж для цистеїну (6,8 мМ); 2) реакція гідролізу цистеїну з вивільненням серину; 3) конденсація двох молекул цистеїну з утворенням лантіоніну. Наступним важливим ферментом є ЦГЛ (КФ 4.4.1.1), який забезпечує утворення H_2S в реакціях: 1) гідроліз цистеїну до пірувату та амоніаку; 2) гідроліз гомоцистеїну з утворенням гомосерину; 3) взаємодія двох молекул цистеїну з утворенням лантіоніну. Важливу роль в утворенні H_2S належить супряженій дії двох ферментів ЦАТ (КФ 2.6.1.3) та МСТ (КФ 2.8.1.2): спершу ЦАТ каталізує реакцію трансамінування цистеїну з α -кетоглутаратом з утворенням 3-меркаптопірувату, який далі за участі МСТ перетворюється на персульфіди та H_2S . Ще одним із шляхів утворення H_2S є реакція взаємодія тіосульфатів з тіолами за участі ТСТ (КФ 2.8.1.5), однак її внесок в продукцію H_2S у тканинах залишається до кінця невивченою.

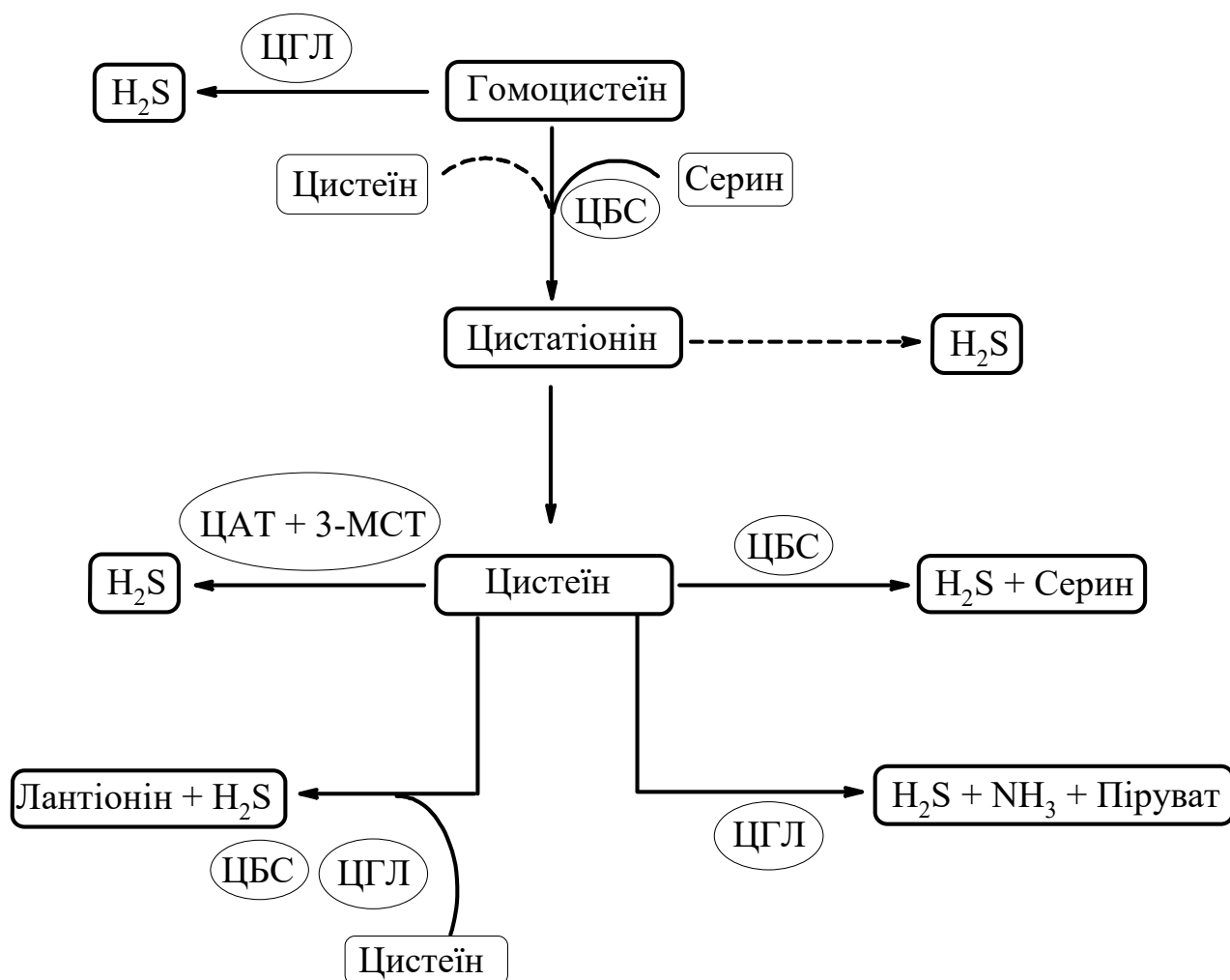


Рис. 1.2 Шляхи утворення H_2S [160].

Внутрішньоклітинна та тканинна локалізація H_2S -продукуючих ферментів [115; 160; 218; 258; 262]. ЦБС є основним ферментом, що генерує H_2S у мозку, тоді як ЦГЛ превалює в серцево-судинній системі. Активність ЦАТ+3-МСТ найвища в корі надниркових залоз, міокарді, судинах та нирках. Усі ферменти експресуються в легенях, печінці, нирках та шлунково-кишковому тракті. Вказані ферменти відрізняються субклітинним розподілом: ЦБС та ЦГЛ є цитозольними ферментами, тоді як 3-МСТ присутній переважно у мітохондріях, хоча за певних умов можлива їх транслокація між внутрішньоклітинними компартментами.

Утилізація H_2S [58; 76; 123; 160; 227; 258; 262]. За даними літератури внутрішньоклітинні рівні H_2S , коливаються від невизначуваних до > 100 мкМ, а стаціонарна концентрація H_2S у більшості тканин оцінюється в низькому наномолярному діапазоні (90), що свідчить про його швидку утилізацію. Елімінація H_2S відбувається шляхом ферментативного окиснення в мітохондріях і асоціюється з мітохондріальним транспортним ланцюгом електронів на рівні III комплексу. Спершу H_2S окислюється в матриксі мітохондрій сульфідхіноноксидоредуктазою (КФ 1.8.5.4) з утворенням персульфіду, а електрони, які вивільняються при цьому переходять на убіхінон, а далі на III комплекс дихального ланцюга, що може супроводжуватись збільшенням продукції АТФ. Далі персульфіди додатково окиснюються персульфіддіоксигеназою (КФ 1.13.11.18) до сульфіту, який за участі сульфітоксидази (КФ 1.8.3.1) перетворюється в сульфат, або під впливом роданези (КФ 2.8.1.1) – в тіосульфат. Ще одним механізмом елімінації H_2S є метилування. Цей механізм вважається менш важливим, ніж окиснення, і відбувається переважно в цитоплазмі клітини. При цьому H_2S перетворюється в метантиол та диметилсульфід за участі S-метилтрансферази. Диметилсульфід під впливом роданези окиснюється до тіоцианату і сульфатів. Також H_2S може вступати в реакції гемпротеїнами – цитохромоксидазою та цитохромом *c* з утворенням сульфану (S^0) та реакційноздатного тійльного радикалу (HS^\bullet)

H₂S-сигналінг [160; 258]. В живих організмах H₂S виконує роль сигнальної молекули, яка не має специфічних рецепторів. Його дія реалізується трьома основними шляхами: 1) прямий антиоксидантний ефект; 2) відновлення заліза та / або безпосередня взаємодія з ним у складі гемопротеїнів; 3) посттрансляційна модифікація цистеїнових залишків протеїнів – персульфідація.

Прямий антиоксидантний ефект H₂S [90; 91; 160; 232]. Чисельні досліджень показали, що H₂S є скавенджером активних форм кисню та азоту. Встановлено, що H₂S інактивує супероксидний аніон-радикал, причому з швидкістю більшою, ніж класичні антиоксиданти - цистеїн та глутатіон (97). Деякі вчені вважають сумнівним твердження щодо здатності H₂S бути потужним фізіологічним антиоксидантом, адже його концентрація в тканинах є низькою і набагато меншою, ніж глутатіону. В той же час інші науковці схиляються до думки, що H₂S є більш ефективним антиоксидантом, ніж молекула глутатіону, враховуючи його малі розміри та високу швидкість дифузії через клітинні мембрани (98).

Відновлення заліза та / або безпосередня взаємодія з ним у складі гемопротеїнів [100; 160; 228]. Показано, що за великих концентрацій H₂S може утворювати комплекс з залізом в активному центрі цитохромоксидази, що призводить до зменшення її активності і пригнічення тканинного дихання. За низьких концентрацій H₂S може відновлювати залізо у складі цитохрому с і тим самим збільшувати активність тканинного дихання та синтез АТФ.

Персульфідація [46; 158; 160; 177; 258; 262]. Цей процес є основним в забезпеченні біологічних ефектів H₂S. В основі персульфідації лежить здатність H₂S викликати посттрансляційну модифікацію цистеїнових залишків у складі протеїнів шляхом перетворення їх на персульфідні групи, що супроводжується зміною редокс-статусу та активності багатьох білків та ферментів. Так, наприклад персульфідація збільшує активність N-метил-D-аспартатних рецепторів мозку, K_{АТФ}-каналів гладеньких м'язів, ендотеліальної ізоформи NO-синтази, гемоксигенази, H⁺-АТФ-синтази та інші.

Біологічні ефекти H₂S. За даними літератури H₂S відіграє важливу роль в регуляції біохімічних та фізіологічних процесів. Серед основних ефектів H₂S слід виділити наступні: антиоксидантні, антиапоптотичні, протизапальні, антитромботичні, ендотеліотропні та нейротрансмітерні [124; 160; 258; 262].

Антиоксидантні властивості [90; 91; 154; 160; 175; 232; 241]. H₂S є сильним відновником, тому виявляє прямі антиоксидантні ефекти – інактивує активні форми кисню та нітрогену. Поряд з цим для нього характерна непряма антиоксидантна дія, яка по більшій мірі асоціюється з його здатністю викликати персульфідацію еритроїд-похідного ядерного фактору транскрипції Nrf2 [241], його транслокацію в ядро, що супроводжується збільшенням продукції тіоредоксину, глутатіону, активності тіоредоксинредуктази [154; 175]. H₂S збільшує активність антиоксидантних ензимів – супероксиддисмутази та каталази та знижує активність прооксидантного ензиму NADPH-оксидази.

Антиапоптотичні властивості [41; 160; 196; 258]. Вплив H₂S на апоптоз частково реалізується через персульфідацію ядерного фактору NF-κB, що веде до зменшення експресії проапоптотичних факторів каспази-8, Fas, FasL та TNFα, клітинного інгібітору апоптозу (с-IAP). Також антиапоптотична дія H₂S реалізується через вплив на мітохондрії: він стабілізує мембрану мітохондрій, адже володіє антиоксидантними властивостями, та регулює відкриття пори мітохондрії через вплив на K_{ATP}-канали.

Протизапальні властивості [160; 196; 258]. Вплив на запалення супряжено з його здатністю сульфгідрувати ядерний фактор NF-κB, що супроводжується зменшенням його активності та зниженням експресії прозапальних цитокінів IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, активності мієлопероксидази. Також H₂S зменшує вміст лейкоцитів та нейтрофілів, пригнічує хемотаксис нейтрофілів та адгезію лейкоцитів до ендотелію. Частково протизапальні властивості H₂S асоціюються з його потужною антиоксидантною дією.

Антитромботичні властивості [14; 15]. Встановлено здатність модуляторів обміну H₂S впливати на стан системи гемостазу. Так, в дослідях *in vitro* донор H₂S (Na₂S) викликав інгібування агрегації тромбоцитів, індукованої

АДФ, зменшував активність тромбіну та інгібував процес активації протромбіну, що свідчить про антикоагулянтну дію H_2S . При введенні пропаргілгліцину у піддослідних щурів спостерігалось посилення АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів та виявлялись ознаки гіперкоагуляції, зокрема скорочувався протромбіновий час.

Ендотеліотропні властивості [124; 160; 252; 258]. H_2S викликає персульфідацію K_{ATP} -каналів гладеньких м'язів, що супроводжується вазодилатацією. Також H_2S активує ендотеліальну ізоформу NO-синтази через її сульфгідрування, що веде до збільшення продукції потужного вазодилатора NO. Поряд з цим він має депримууючий вплив на активність РААС: зменшує секрецію реніну, активність ангіотензинперетворюючого ферменту та знижує продукцію вазоконстриктора ангіотензину-II. H_2S виявляє проангіогенну дію через активацію ендотеліального фактору росту VEGF та інгібування гомологів фосфатази і тензину (PTEN).

Нейротрансміттерні властивості [178; 262]. Показано, що H_2S в мікромольних концентраціях здатний посилювати довготривалу потенціацію в гіпокампі, що асоціюється з активацією N-метил-D-аспартатних рецепторів та збільшенням концентрації іонів кальцію в нейроні. В літературі повідомляється про зниження рівня H_2S при нейродегенеративних розладах, включаючи хворобу Альцгеймера та хворобу Паркінсона, порівняно зі здоровими людьми, що свідчить про важливу роль H_2S у функціонуванні нервової системи.

В ряді експериментальних досліджень продемонстровано кардіопротективні властивості H_2S . Зокрема, донори H_2S зменшували розмір інфаркту міокарда, попереджували патологічне ремоделювання міокарду за умов серцевої недостатності [82; 182], стримували розвиток кардіального фіброзу через інгібування проліферації та трансформації фібробластів у міофібробласти, індукованої трансформуючим фактором росту- $\beta 1$ [126]. Введення NaHS зменшувало розвиток мікроциркуляторних та гемодинамічних зрушень у шлуночках серця на момент експериментальної коронарооклюзії та сприяло більш повноцінній реканалізації на тлі реперфузії [30; 207; 237]. В той

же час інгібування продукції H_2S за умов введення пропаргілгліцину збільшувало розмір інфаркту міокарду та посилювало міокардіальне запалення у щурів [142; 254].

1.3 Патогенетичне значення гідроген сульфїду при цукровому діабеті

За даними літератури H_2S має важливу роль в регуляції секреції інсуліну, бере участь в підтриманні гомеостазу глюкози, а також залучений в патогенез розвитку цукрового діабету та його ускладнень.

Роль H_2S в регуляції секреції інсуліну. В дослідженнях *in vitro* продемонстрована здатність H_2S впливати на секрецію інсуліну [99; 211; 216] та модулювати рівень циркулюючої в крові глюкози [176]. Натрій гідрогенсульфід ($NaHS$) в діапазоні концентрацій 10 мкМ - 1 мМ зменшував секрецію інсуліну окремими лініями бета-клітин, ізольованими острівцями підшлункової залози мишей, індуковану глюкозою у високих концентраціях (10 мМ) і не впливав на інсулінову секрецію за низьких концентрацій глюкози (3 мМ) [125]. В клітинах інсуломи (INS-1E), у яких відмічалась гіперекспресія ЦГЛ, практично повністю припинялась секреція інсуліну, стимульована глюкозою (16 мМ), а базальна секреція не змінювалась [253]. У мишей з нокаутованим геном ЦГЛ глюкозо-стимульована секреція інсуліну була у 3 рази вищою, ніж у мишей дикого типу [216]. Також показано, що збільшення позаклітинного рівня глюкози зменшує внутрішньоклітинну продукцію H_2S і супроводжується збільшенням секреції інсуліну [99]. Отже проведені дослідження показали, що H_2S зменшує стимульовану глюкозою секрецію інсуліну і не впливає на базальну продукцію цього гормону.

Вплив H_2S на секрецію інсуліну реалізується через два основні механізми: 1) активацію K_{ATP} -каналів через їх S-сульфгідрування, що веде до гіперполяризації мембрани бета-клітин. Роль цього механізму підтверджується в експерименті з використанням толбутаміду (інгібітору K_{ATP} -каналів): за цих умов реєструвалось зменшення інгібуючого впливу H_2S на глюкозо-

стимульовану секрецію інсуліну [125]; 2) блокування потенціал-залежних Ca^{2+} -каналів L-типу. Так, у мишей з нокаутованим геном ЦГЛ, а також у мишей дикого типу на тлі застосування пропаргілгліцину відмічалось зростання активності потенціал-залежних Ca^{2+} -каналів L-типу в β -клітинах підшлункової залози [216].

Роль H_2S в регуляції гомеостазу глюкози. H_2S впливає на метаболізм глюкози в скелетних м'язах, жировій тканині та печінці. Так, в скелетних м'язах та жировій тканині H_2S підвищує чутливість рецепторів до інсуліну, що веде до збільшення поглинання глюкози цими клітинами [151; 153]. У тварин з нокаутованим геном ЦГЛ зменшується поглинання глюкози скелетними м'язами, тоді як використання NaHS справляло протилежний вплив [245]. Стимулюючий вплив H_2S на чутливість скелетних м'язів до інсуліну реалізується через активацію Wnt/ β -катенінового сигнального шляху, Akt- та AMPK шляхів, а також інгібування MAPK-шляху [45; 153]. В культурі жирових клітин L-цистеїн та натрій сульфід викликали активацію PI3K-шляху, що супроводжувалось транслокацією GLUT-4 в адипоцити та посиленням транспорту глюкози [151]. В клітинах печінки H_2S сприяло зменшенню захоплення глюкози з міжклітинного простору, а також активувало два основні шляхи внутрішньоклітинного синтезу глюкози – глюконеогенез та глікогеноліз [264]. Вплив H_2S на глюконеогенез пояснюється його здатністю збільшувати активність регуляторних ферментів – піруваткарбоксилази, глюкозо-6-фосфатази та фруктозо-1,6-дифосфатази шляхом їх S-сульфгідрування, а також посилювати чутливість рецепторів до глюкокортикоїдів [122; 222; 252].

Роль H_2S в патогенезі цукрового діабету та діабетичної кардіоміопатії. За даними літератури, у хворих на цукровий діабет II типу, а також у щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом реєструється дефіцит H_2S в сироватці крові, який корелює з важкістю діабету та наявністю серцево-судинних ускладнень [99; 116; 209]. Показано, що гіперглікемія є причиною дефіциту H_2S в ендотеліальних клітинах і використання донорів H_2S є перспективним напрямком ендотеліопротекції [208]. Високі концентрації глюкози інгібують

ЦГЛ в підшлунковій залозі шляхом фосфорилювання білка SP-1 [263]. На тлі гіперглікемії та високих рівнів АФК зменшується експресія ЦГЛ в печінці та зростає деградація H_2S , що супроводжується зменшенням рівня H_2S в сироватці крові [152; 208]. Поряд з цим за результатами інших досліджень експериментальний цукровий діабет супроводжується зростанням експресії ЦГЛ та ЦБС, а також продукції H_2S в печінці та підшлунковій залозі [239; 256]. Існує думка, що гіперпродукція H_2S виникає лише на початкових стадіях цукрового діабету як протективний механізм у відповідь на оксидативно-нітрозативний стрес [210].

H_2S відіграє важливу роль в розвитку ускладнень цукрового діабету, в тому числі діабетичної кардіоміопатії [269]. За різних експериментальних моделей цукрового діабету реєструються порушення метаболізму H_2S в міокарді: високофруктозна та високожирова дієти, а також введення стрептозотоцину супроводжуються зниженням експресії ЦГЛ та зменшенням вмісту H_2S [53; 84; 121]. Залишається невивченим вплив експериментального цукрового діабету на активність інших H_2S -синтезуючих ферментів (ЦАТ / 3-МСТ, ТСТ), а також на швидкість утилізації H_2S в серцево-судинній системі. Також не досліджено вплив різних модуляторів обміну H_2S на морфофункціональні параметри серця та судин за діабетичної кардіоміопатії. Саме цим проблемним питанням будуть присвячені окремі розділи власних досліджень, що дозволить оцінити внесок ендogenous H_2S у формування ураження міокарду за експериментального цукрового діабету.

Застосування NaHS на тлі стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету покращувало скоротливість шлуночків, зменшувало виразність гіпертрофії серця та міокардіального фіброзу [269]. Поряд з цим NaHS зменшував інтенсивність запалення, оксидативного стресу та апоптозу у серцевій тканині, що асоціювалось з активацією Nrf2, PI3K/Akt-шляху, а також блокадою c-Jun N-кінцевої кінази (JNK) та p38 MAPK-шляху [269]. На тлі експериментального цукрового діабету введення NaHS нормалізувало сироватковий рівень H_2S , зменшувало виразність атеросклерозу, запобігало

утворення пінистих клітин та покращувало ендотелій-залежну вазодилатацію аорти [79; 241]. Таким чином, у екзогенного донору H_2S виявлені кардіо- та ендотеліопротекторні властивості за діабетичної кардіоміопатії. Подальші дослідження в цьому напрямку дозволять поглибити існуючі уявлення щодо ролі H_2S в розвитку діабетичної кардіоміопатії та її корекції.

1.4 Роль метформіну в профілактиці та лікуванні діабетичної кардіоміопатії

З метою профілактики та лікування діабетичної кардіоміопатії необхідно застосовувати заходи, які зменшують інсулінорезистентність, забезпечують адекватний глікемічний контроль, здатні коригувати дисліпідемії, метаболічні порушення в міокарді, виявляють антиоксидантні та ендотеліотропні ефекти. Такі властивості притаманні метформіну – препарату першого ряду в лікуванні цукрового діабету II типу [3]. В даний час метформін (1,1-диметилбігуанід), інсуліновий сенситайзер, рекомендований на всіх етапах терапії цукрового діабету II типу, у монотерапії або у комбінації з іншими пероральними антигіперглікемічними препаратами та інсуліном [52; 189; 268]. Похідні бігуаніду застосовувались для лікування цукрового діабету ще з 1950 -х років [77]. Перші похідні бігуанідів фенформін та буформін були вилучені з обігу у 1970-х роках у зв'язку з тим, що їх застосування часто супроводжувалось лактатацидозом [48; 184; 233]. В той же час, метформін, як більш безпечне та менш ліпофільне похідне, залишився на ринку і на сьогодні є єдиним бігуанідом, який рекомендований Американською та Європейською групами з розробки тактики ведення цукрового діабету 2-го типу для його лікування та профілактики [236].

Найбільше рандомізоване багатоцентрове клінічне дослідження «The United Kingdom Prospective Diabetes Study» було першим, яке продемонструвало здатність метформіну зменшувати ризик макроангіопатії у пацієнтів із вперше діагностованим діабетом та ожирінням або надмірною вагою, більше, ніж

похідні сульфонілсечовини або інсулін. У порівнянні зі звичайною дієтотерапією, метформін на 32% зменшував ризик будь-яких ускладнень, пов'язаних з діабетом, на 42% - ризик смерті від діабету та на 39% - ризик інфаркту міокарда. Ризик гіпоглікемії був нижчим при лікуванні метформіном, ніж за умов застосування похідних сульфонілсечовини або інсуліну [221].

Метформін ефективно знижує рівень глюкози натще та після прийому їжі, а також зменшує рівень HbA1c більш ніж на 1% [225]. Внутрішньоклітинно метформін інгібує I комплекс дихального ланцюга, що супроводжується зменшенням синтезу АТФ і накопиченням АМФ. Останній активує протеїнкіназу АМПК, що спричиняє зниження активності процесів, в яких затрачається АТФ, а саме глюконеогенез, глікогеногенез, синтез жирних кислот і холестеролу. Одночасно активуються окиснення глюкози та жирних кислот, які забезпечують синтез АТФ [77; 184; 226]. Зменшення активності глюконеогенезу в печінці, індуковане метформіном, пояснюється не лише енергодефіцитом [268], а й блокуванням транспорту лактату в гепатоцити, інгібуванням основних ферментів глюконеогенезу - піруваткарбоксілази, фосфоенолпіруваткарбоксікінази та глюкозо-6-фосфатази [67; 114]. Завдяки активації другого субстрату рецептора інсуліну (IRS-2) метформін посилює транспорт глюкози у гепатоцити, опосередкований транспортером GLUT-1 [81]. У печінці метформін також впливає на синтез і катаболізм ліпідів [81]. Активація АМПК, індукована метформіном, супроводжується наступними змінами: 1) знижується експресія гена SREBP-1 (стероловий регуляторний елемент, який зв'язує білок 1), що веде до пригнічення транскрипції генів синтази жирних кислот; 2) зменшується активність ацетил-КоА-карбоксілази, що веде до зниження продукції жирних кислот і тригліцеридів та збільшення активності β -окиснення жирних кислот; 3) знижується активність β -гідрокси- β -метилглутарил-КоА-редуктази і зменшується синтез холестеролу.

У клітинах скелетних м'язів метформін посилює інсулінозалежний транспорт глюкози та збільшує активність анаеробного гліколізу [132; 183]. В адипоцитах цей препарат активує ліполіз та β -окиснення жирних кислот, і тому

зменшується їх вивільнення з жирової тканини в кров [81; 159]. У кишечнику метформін пригнічує всмоктування глюкози та інших простих вуглеводів [103]. Він збільшує секрецію ентероцитами глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1), а також інгібує дипептидилпептидазу-4 і збільшує активність інкретинів [155].

Кардіопротекторні властивості метформіну реалізується через його вплив на основні молекулярні механізми ураження міокарду за цукрового діабету [81]. Метформін виявляє протизапальний, антиоксидантний та антиапоптотичний ефекти, які частково опосередковується через його здатність активувати АМПК, інгібувати NF-κB [81; 89; 104; 107; 249]. Поряд з цим він виявляє антифіброгенну дія, яка обумовлена інгібуванням TGF-β1/Smad3 сигнального шляху [107]. Також метформін виявляє антиатерогенні властивості, адже здатний зменшувати синтез холестеролу в печінці, знижувати рівень ЛПНЩ та підвищувати вміст ЛПВЩ [3; 81; 149; 243]. Ще одним важливим його ефектом є ендотеліотропна дія, а саме метформін зменшує активність запалення в судинах, виявляє антитромботичну дію, збільшує активність ендотеліальної ізоформи NO-синтази та зменшує продукцію ангіотензину II [31; 81; 134].

Останнім часом важлива роль в кардіопротекції відводиться H₂S-сигнальному шляху, однак залишається невизначеним, чи впливає метформін на обмін H₂S в серцево-судинній системі на тлі цукрового діабету. На сьогодні існують лише поодинокі дослідження щодо впливу метформіну на рівень H₂S. Показано, що введення метформіну підвищувало вміст ендogenous H₂S в органах здорових мишей [235]. В іншій роботі засвідчено, що введення низьких доз метформіну (10 мг/кг маси тіла) не впливало на рівень H₂S в плазмі крові у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом [80].

Таким чином, наведені вище дані свідчать про відсутність однозначного уявлення щодо ролі системи H₂S в механізмах ураження міокарду та кардіоцитопротекції за цукрового діабету, що диктує необхідність спеціального вивчення цього питання в подальших розділах дисертаційної роботи.

Основні результати розділу висвітлені в наступних публікаціях: [156; 257; 258; 260; 261].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ, МОДЕЛІ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика експериментальних тварин та моделей

Досліди проведені на 184 білих статевозрілих лабораторних щурамсамцях з початковою масою тіла 180-250 г, що були отримані з віварію ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Всі етапи експериментів виконувались відповідно до загальних етичних принципів, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Директив Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження», що засвідчено комітетом з біоетики ВНМУ ім. М.І.Пирогова (протокол №10 від 27 жовтня 2016 року; протокол № 4 від 13 травня 2021 року).

Лабораторні тварини утримувались в стандартних умовах віварію, з 12-годинним світловим режимом день/ніч, при температурі 22 ± 2 °С та відносній вологості повітря 50 ± 5 %, воду і повнораціонний гранульований корм отримували *ad libitum* згідно нормативів. До початку експериментів всіх тварин витримували на карантині у відокремлених приміщеннях віварію упродовж 7 діб. При загибелі більше двох тварин у цей період, партія вважалась непридатною і не використовувалась у дослідях. Рандомізацію тварин у групи здійснювали за принципом мінімізації відмінностей за масою тіла. Через визначені умовами експерименту проміжки часу тварин знеживлювали шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом (тіопентал натрію 100 мг/кг в/оч). Всі маніпуляції проводили в стандартних умовах з 9⁰⁰ до 11⁰⁰. З експерименту тварин виводили через 24 години після введення модуляторів біохімічних процесів та фармакологічних засобів. Під час експериментів щоденно контролювали загальний стан тварин, вживання їжі та води, кожні 7 діб

визначали масу тіла та рівень глюкози в крові. Згідно мети та завдань дослідження тварин розподілили на 3 серії дослідів (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Розподіл щурів за серіями експериментів

| №№ серій | Напрямки дослідження по серіям | Кількість тварин |
|----------------------|---|------------------|
| 1 | Дослідження динаміки рівнів глюкози, глікозильованого гемоглобіну та H ₂ S в крові у щурів на етапах моделювання стрептозотоцин-індукованого діабету. | 64 |
| 2 | Дослідження впливу модуляторів обміну гідроген сульфідіду - NaHS (донор H ₂ S) та D,L-пропаргілгліцину (необоротний інгібітор H ₂ S-синтезуючого ензиму ЦГЛ) на біохімічні показники стану міокарду (показники обміну H ₂ S, про- та антиоксидантної системи, тіол-дисульфідного обміну), рівень галектину-3, стан системи H ₂ S/ЦГЛ в аорті, показники вуглеводного обміну у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом | 40 |
| | Дослідження впливу модуляторів обміну H ₂ S (NaHS та D,L-пропаргілгліцину) на показники клітинного циклу та експресію гена <i>CSE</i> в міокарді та скоротливість аорти у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом | 20 |
| 3 | Дослідження впливу метформіну та його поєднання з введенням NaHS на показники обміну H ₂ S, біохімічні показники, експресію гена <i>CSE</i> , показники клітинного циклу в міокарді, стан системи H ₂ S/ЦГЛ та скоротливість аорти у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом | 60 |
| Всього тварин | | 184 |

2.1.1 Моделювання експериментального цукрового діабету у щурів

У дисертаційному дослідженні була використана модель стрептозотоцин-індукованого діабету у щурів. Стрептозотоцин ($C_8H_{15}N_3O_7$, похідне глюкозаміну та нітрозилсечовини) є антибіотиком з цитостатичним ефектом, який викликає необоротне ушкодження бета-ендокриноцитів острівців Лангерганса і при цьому практично не впливає на панкреатоцити [7; 28]. Стрептозотоцин надходить у бета-клітини через глюкозні транспортери GLUT-2 і спричиняє цитотоксичний ефект внаслідок алкілування нуклеїнових кислот (ДНК, РНК), падіння клітинного пулу НАД⁺ та АТФ, неферментативне підвищення рівня NO та пероксинітриту в клітинах [28]. Застосування стрептозотоцину дозволяє змоделювати у експериментальних тварин різні варіанти порушень вуглеводного обміну, які відповідають певним клінічним типам цукрового діабету, що залежить від дози, шляху та режиму введення цитостатика (внутрішньовенно або внутрішньоочеревинно, одноразово чи багаторазово), попереднього режиму харчування (збалансована чи високожирова дієта), введення нікотинаміду та інших передумов [7; 25; 102; 131]. Відмічено, що після введення високих доз стрептозотоцину (70 мг/кг внутрішньоочеревинно) реєструються трьохфазні зміни рівня глюкози в крові – через 2 години настає рання гіперглікемія, яка наростає протягом 10 годин; у наступні 10 годин спостерігається зниження рівня глюкози і у подальші 14 діб виникає помірна гіперглікемія, яка свідчить про початковий етап розвитку діабету [28]. Доза стрептозотоцину 70 мг/кг внутрішньовенно (в/в) є летальною для щурів, а доза 50-60 мг/кг викликає гіперглікемію понад 20 ммоль/л [97]. Існують дані, що доза стрептозотоцину 40 мг/кг є достатньою для моделювання діабету у щурів, але на відміну від більш високих доз (50-60 мг/кг) не викликає гіпоальбумінемії, діабетичного кетоацидозу, діабетичної протеїнурії [163]. Зазвичай високі дози стрептозотоцину (від 50-60 мг/кг і вище) використовують для моделювання діабету 1 типу, у той час як введення менших доз цитостатика дозволяє викликати експериментальний цукровий діабет, наближений до 2 типу.

У дисертаційному дослідженні цукровий діабет моделювали шляхом одноразового внутрішньочеревинного (в/оч) введення стрептозотоцину (Sigma, США) у вигляді свіжо виготовленого розчину на 0,1 М цитратному буфері (рН 4,5) в дозі 40 мг/кг маси щура. Щурам контрольної групи в/оч вводили еквівалентні об'єми 0,1 М цитратного буферу (0,1 мл/ 100 г маси). Речовини вводили після попередньої 24-годинної депривації їжі. Перед початком експерименту, а також на 3, 7, 14, 21, 28 та 35 добу (залежно від серії дослідів) у тварин визначали рівень глюкози в периферійній крові за допомогою електронного глюкометра Accu-Chek Active (Rouche Group, Німеччина). Тварин, у яких станом на 3 добу рівень глюкози в крові залишався нижчим 10 ммоль/л, з подальших експериментів виключали. В цілому, модель стрептозотоцин-індукованого діабету (STZ-діабету) вдалось відтворити у 138 тварин (середній рівень глюкози в крові становив $17,8 \pm 0,29$ ммоль/л), 12 тварин з рівнем глюкози нижчим 10 ммоль/л на 3 добу після введення стрептозотоцину були виключені з досліджень, 9 тварин з рівнем глюкози в крові вищим 20 ммоль/л загинули упродовж перших 14 діб. Отже, ефективність моделювання стрептозотоцин-індукованого діабету становила 86,7%.

2.1.2 Модуляція стану системи гідроген сульфід у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом.

Для модуляції стану системи H_2S в серцево-судинній системі щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету були застосовані пропаргілгліцин (необоротний інгібітор цистатіонін- γ -ліази - ключового H_2S -синтезуючого ензиму в серці та судинах) та NaHS (неорганічний донор H_2S). Досліди проведені на 60 щурах, для біохімічних досліджень був використаний біологічний матеріал 40 особин (n=10), для інших досліджень – біологічний матеріал 20 особин (n=5). Стрептозотоцин-індукований діабет моделювали у трьох груп тварин (n=15) як описано вище, контрольну групу склали 15 щурів (1-ша група). Двом групам тварин (3-тя та 4-та групи) з 3-ої по 28-му добу після

введення стрептозотоцину вводили модулятори стану системи H_2S в/оч 1 раз на добу у вигляді свіжовиготовлених водних розчинів із розрахунку 0,1 мл на 100 г маси щура. D,L-пропаргілгліцин (Sigma, США) вводили в дозі 50 мг/кг маси, а $NaHS \cdot H_2O$ (Sigma, США) – в дозі 3 мг/кг маси тіла. Дози, шляхи та тривалість введення модуляторів обміну H_2S були запозичені з літератури і не викликали загибелі тварин [5; 15]. Застосована доза донору H_2S ($NaHS \cdot H_2O$) в середньому відповідала $1/20 LD_{50}$ при парентеральному введенні за даними [5]. Щурам 1-ої групи (контроль) та щурам 2-ої групи після ініціації стрептозотин-індукованого діабету 1 раз на добу в/оч вводили 0,15 М розчин NaCl (0,1 мл на 100 г маси щура).

2.1.3 Експериментальна корекція біохімічних порушень у щурів з стрептозотин-індукованим діабетом.

При виборі антидіабетичної терапії перевагу надають засобам, які поряд з гіпоглікемічною дією мають антиоксидантний ефект та здатність зберігати чи поліпшувати секреторну функцію β -клітин підшлункової залози. Такі властивості притаманні метформіну (1,1-диметилбігуанідгідрохлориду) – препарату першого ряду в лікуванні цукрового діабету 2 типу [92]. Крім того, у метформіну відзначається власний кардіопротекторний ефект, незалежний від його гіпоглікемічної дії [78; 105; 148], але роль системи H_2S в його реалізації поки не визначена. При експериментальному діабеті у щурів застосовують різні дози метформіну (10-750 мг/кг) та різні терміни введення (від 1 доби до двох місяців) [24; 80]. Показано, що метформін у дозі 500 мг/кг на добу найбільш ефективно зменшує рівень глікемії та глікозильованого гемоглобіну у щурів з стрептозотин-індукованим діабетом [24], тому ми вибрали саме цю дозу.

Досліди проведені на 60 щурах, для біохімічних досліджень використаний біологічний матеріал 40 тварин ($n=10$ в групі), для інших досліджень – біологічний матеріал 20 тварин ($n=5$). STZ-діабет моделювали у трьох груп тварин ($n=15$) як описано вище, контрольну групу склали 15 щурів. З 3-ої по 28-

му добу щурам двох груп (3-тя та 4-та групи) вводили метформін (Берлін-Хемі, Німеччина) в дозі 500 мг/кг в/шл 1 раз на добу на 1% крохмальному гелі (1 мл на 100 г маси тіла). Щурам 4-ої групи поряд з метформіном вводили донор H_2S - $\text{NaHS}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, США) у дозі 3 мг/кг 1 раз на добу в/оч. Щурам контрольної групи (1-ша група) та щурам 2-ої групи після ініціації стрептозотоцин-індукованого діабету в/оч вводили 0,15 М розчин NaCl (0,1 мл на 100 г маси щура) та в/шл вводили 1% крохмальний гель (1 мл на 100 г маси тіла).

2.2 Біохімічні методи дослідження

Біохімічні дослідження виконані на базі кафедри біологічної та загальної хімії та науково-дослідної клініко-діагностичної лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідоцтво про переатестацію №049/15 від 02.03.2015) за безпосередньої участі автора.

Цільну венозну кров під час декапітації тварин збирали у стерильні пластикові пробірки Vacuette (Greiner Bio-One, Австрія) без антикоагулянта та з ЕДТА (для окремих досліджень). Сироватку крові отримували шляхом центрифугування цільної крові при 1500 г упродовж 25 хвилин при 18-22°C. Для визначення вмісту H_2S аліквоту сироватки крові одразу додавали до 1% розчину ацетату цинку у співвідношенні 1:5 (на цьому етапі проби можна зберігати до 3 годин при 18-22°C) [11]. Для інших досліджень аліквоти сироватки відбирали в стерильні пластикові мікропробірки Епендорф і зберігали при -20°C до проведення досліджень.

Забір біологічного матеріалу здійснювали одразу після евтаназії тварин. Органи (серце, аорту) зважували на аналітичних вагах та визначали відносну масу за формулою (маса органа, мг / маса тіла, г)·100. Окремо виділяли лівий шлуночок, зважували та визначали його відносну масу (мг /100 г маси тіла).

Дослідження показників вуглеводного обміну. Для контролю рівня глюкози на етапах моделювання діабету отримували периферійну кров шляхом нанесення поверхневих насічок на кінчик хвоста за допомогою стерильного

скарифікатору. Вміст глюкози у периферійній крові визначали за допомогою електронного глюкометра Accu-Chek Active (Rouche Group, Німеччина).

В цільній крові визначали вміст глікозильованого гемоглобіну спектрофотометричним методом за реакцією з тіобарбітуровою кислотою за стандартним набором реактивів «Гемоглобін глікозильований» (ПрАТ «Реагент», Україна). Стійка форма глікозильованого гемоглобіну містить 1-дезоксиглюкозильовану фруктозу, що при нагріванні з фосфорною кислотою гідролізується до 5-оксиметил-2-фуральдегіду, який при взаємодії з 2-тіобарбітуратом дає інтенсивне забарвлення. Спочатку готували гемолізат: 1) 1,0 мл цільної крові, змішаної з ЕДТА, центрифугували 10 хвилин при 1000 об/хв, видаляли верхній шар; 2) до осаду еритроцитів додавали 4,5 мл фізіологічного 0,15 М розчину NaCl, ретельно перемішували скляною паличкою і знов центрифугували; 3) видаляли центрифугат, до осаду еритроцитів додавали 6,0 мл дистильованої води, інтенсивно струшували і залишали на 10 хвилин при температурі 20-22 °С, відбирали надосадову рідину (гемолізат). Далі 2 мл гемолізату змішували з 0,35 мл 85% розчину H_3PO_4 , перемішували, інкубували при 100°C упродовж 30 хвилин (10 хвилин у закоркованому стані та 20 хвилин без корку) на водяній бані, охолоджували на льоду, додавали 0,70 мл 40% розчину ТХО, перемішували, центрифугували 30 хвилин при 1000 об/хв. Відбирали 2,0 мл центрифугату, додавали 1,0 мл розчину тіобарбітурової кислоти, інкубували 40 хвилин при 37 °С. Вимірювали оптичну щільність при 440 нм проти дистильованої води. Вміст фруктози розраховували за формулою: $C_d = (E_d / E_k) \times C_k$ мкмоль/л, де C_d – концентрація фруктози, E_d – оптична щільність дослідної проби, E_k – оптична щільність калібрувальної проби, C_k – концентрація фруктози в калібрувальній пробі (250 мкмоль/л). Вміст гемоглобіну в гемолізаті визначали ціанідним методом за стандартним набором «Гемоглобін» (ПрАТ «Реагент», Україна). Вміст глікозильованого гемоглобіну (гліко-Нв) розраховували за формулою $C_{\text{гліко-Нв}} = C_{\text{фруктози}} / C_{\text{Нв}}$ мкмоль фруктози / г Нв.

Дослідження вмісту галектину-3 в сироватці крові та гомогенаті

міокарду. Галектин-3 розглядають як прозапальний, профіброгенний медіатор, предиктор дисфункції лівого шлуночка та серцевої недостатності [47]. Рівень галектину-3 визначали імуноферментним методом за набором “Rat Galectin 3 (GAL-3) ELISA Kit” (MyBiosource, Cat№ MBS2600708) згідно інструкції фірми-виробника. Концентрації стандартних розчинів для побудови калібрувальної кривої – 0,0; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 нг/мл. Чутливість методу $\leq 0,05$ нг/мл, діапазон детекції – 0,156 - 10 нг/мл, коефіцієнт варіації $\leq 8\%$. Детекцію проводили на аналізаторі STAT-FAX 303+ (США) при довжині хвилі 450 нм (диференційний фільтр – 630 нм).

Дослідження показників системи H_2S . Вміст H_2S в сироватці крові визначали спектрофотометричним методом за реакцією з N,N-фенілендіаміном [80]. В пробірку з 0,5 мл 1% розчину ацетату цинку додавали 0,1 мл свіжо отриманої сироватки крові та 2,5 мл дистильованої води, перемішували, додавали 0,5 мл 20 мМ розчину N,N-диметил-пара-фенілендіаміну в 7,2 М HCl, 0,4 мл 30 мМ розчину $FeCl_3$ в 1,2М HCl. Інкубували 5 хв при 18-25°C, додавали 1 мл 20% трихлортової кислоти, центрифугували 10 хв при 1500 g. Вимірювали оптичну щільність супернатанту при 670 нм проти контрольної проби, в яку замість сироватки крові додавали 0,1 мл розчину альбуміну (75 г/л). Вміст H_2S розраховували за формулою: $C_d = (E_d / E_{ст}) \times C_{ст}$ мкМ, де C_d – концентрація H_2S в сироватці крові, E_d – оптична щільність дослідної проби, $E_{ст}$ – оптична щільність стандартної проби, $C_{ст}$ – концентрація HS^- в стандартній пробі. Стандартом слугували водні розчини $Na_2S \times 9H_2O$ з концентрацією 31,2-3120 мкМ, які обробляли як дослідні проби.

Вміст H_2S в міокарді та грудній аорті визначали за методикою [235]. Міокард та грудну аорту промивали холодним 1,15% розчином KCl, подрібнювали ножицями, гомогенізували в середовищі 0,01 М NaOH у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло). До 1 мл гомогенату додавали 250 мкл 50% ТХО, центрифугували при 1200 g 15 хвилин, 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). Вміст сульфід-аніону в пробі розраховували за калібрувальним графіком. Стандартом слугували водні розчини $Na_2S \cdot 9H_2O$ з концентрацією 31,2-3120 мкМ.

Для інших біохімічних досліджень використовували постядерні гомогенати міокарду та аорти, які отримували наступним чином. Наважки тканин гомогенізували в середовищі 0,25 М сахарози, 0,01 М Трис (рН 7,4) у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло), центрифугували 30 хвилин при 600 g при 4°C, аліквоти центрифугату відбирали в мікропробірки Епандорф і до проведення досліджень зберігали при -20°C.

Активність H_2S -синтезуючих ензимів - цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1), цистеїнамінотрансферази (ЦАТ, КФ 2.6.1.3) разом із 3-меркаптопіруватсульфуртрансферазою (3-МСТ, КФ 2.8.1.2), тіосульфатдитіолсульфід-трансферази (ТСТ, КФ 2.8.1.5) оцінювали за приростом сульфід-аніону як описано в роботі [203] і адаптовано щодо концентрації субстратів та кофакторів, значення рН та тривалості інкубації для визначення активності ензимів в постядерному супернатанті гомогенатів міокарду та аорти щурів [11; 16].

1) Активність ЦГЛ в реакції десульфурування цистеїну у міокарді визначали у інкубаційному середовищі, що містило в кінцевих концентраціях піридоксальфосфат 1,34 мМ, L-цистеїн 6,0 мМ, Трис- HCl буфер 0,08 М (рН 8,5); в аорті - у середовищі, що містило в кінцевих концентраціях піридоксальфосфат 0,67 мМ, L-цистеїн 3,3 мМ, Трис- HCl буфер 0,083 М (рН 8,5).

2) H_2S -синтезуючу активність ЦАТ (+ 3-МСТ) в реакціях трансамінування цистеїну до 3-меркаптопірувату з наступним десульфуруванням у міокарді визначали у інкубаційному середовищі, що містило в кінцевих концентраціях піридоксальфосфат 1,34 мМ, L-цистеїн 6,0 мМ, α-кетоглутарат 1,6 мМ, Трис- HCl буфер 0,08 М (рН 8,5). Використання цього середовища спочатку дозволяє оцінити загальну десульфуразну активність міокарду по L-цистеїну, а питома активність ЦАТ визначається як різниця між сумарною десульфуразною активністю та активністю ЦГЛ.

3) Активність ТСТ у реакції відновлення тіосульфат-аніону у міокарді визначали у інкубаційному середовищі, що містило тіосульфат натрію 0,2 мМ, дітіотреїтол 2,3 мМ, Тріс- HCl буфер 0,09 М (рН 8,5).

До 0,5 мл інкубаційного середовища додавали 0,2 мл (2 мг протеїну) постядерного супернатанту міокарду. Проби інкубували при 37°C 60 хвилин у стерильних герметизованих пластикових пробірках Епендорф (для попередження втрат H₂S). Реакцію зупиняли охолодженням пробірок на льоду, додавали 0,5 мл 1% розчину ацетату цинку для зв'язування утвореного H₂S. Контрольні проби обробляли як дослідні за винятком того, що досліджуваний матеріал вносили в середовище після інкубації та охолодження. Кількість H₂S оцінювали за утворення метиленового синього відомим методом [75]. В дослідні та контрольні проби додавали 0,5 мл 20 мМ розчину N,N-диметил-пара-фенілендіаміну в 7,2 М HCl, 0,4 мл 30 мМ розчину FeCl₃ в 1,2 М HCl, інкубували 20 хвилин при 18-22°C, додавали 1 мл 20% ТХО, центрифугували 10 хвилин при 3000 об/хв. Оптичну щільність надосадової рідини вимірювали при довжині хвилі 670 нм в кюветі з довжиною оптичного шляху 1,0 см. Вміст сульфід-аніону в пробі розраховували за калібрувальним графіком.

Здатність міокарду до утилізації екзогенного H₂S визначали за швидкістю зниження концентрації сульфід-аніону в інкубаційному середовищі [18]. До 1,0 мл інкубаційного середовища, що містило 312 мкМ Na₂S, 0,47 мМ Тріс-HCl буферу (рН 7,4) в кінцевих концентраціях додавали 0,1 мл постядерного супернатанту гомогенату міокарду (кількість протеїну 1-2 мг), інкубували 30 хв. при 37°C в стерильних герметизованих пластикових пробірках Епендорф. Контрольні проби інкубували без гомогенату, який додавали після зупинки реакції. Реакцію зупиняли охолодженням пробірок на льоду, після чого додавали 0,5 мл 1% розчину ацетату цинку для зв'язування сульфід-аніону і визначали його кількість за утворення метиленового синього як описано раніше. Пробірки витримували 20 хв. при 18-22°C, додавали 1 мл 20% ТХО, центрифугували 10 хвилин при 1500 г. Вимірювали абсорбцію надосадової рідини на фотометричному обладнанні при довжині хвилі 670 нм. Стандартом

служували водні розчини $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ з концентраціями 31,2-3120 мкМ, які обробляли як дослідні проби.

Одним із етапів утилізації H_2S є мітохондріальне окиснення сульфід-аніону за участі сульфідоксидази. Активність сульфідоксидази (КФ 1.8.3.1) в міокарді визначали за швидкістю відновлення гексоціаноферрату калію в присутності сульфід-аніону [270]. В кювету вносили 2,5 мл інкубаційного середовища, що містило 0,4 мМ Na_2SO_4 , 0,4 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0,1 мМ ЕДТА, Тріс-НСІ буфер 0,10 М (рН 8,5), додавали 50 мкл постядерного гомогенату міокарду і реєстрували швидкість відновлення гексоціаноферрату за зниженням абсорбції упродовж 5 хвилин при температурі 25°C на фотометричному обладнанні при довжині хвилі 420 нм (коефіцієнт молярної екстинції $1,02 \cdot 10^{-3}$).

Дослідження показників прооксидантної / антиоксидантної систем та тіол-дисульфідного обміну в міокарді щурів. NADPH-оксидаза (КФ 1.6.3.1) є потужним прооксидантним ферментом, що здійснює конвертацію молекулярного кисню у супероксид-аніон за рахунок окиснення NADPH до NADP^+ . Активність NADPH-оксидази визначали за поглинанням NADPH при 340 нм (коефіцієнт молярної екстинції $6,22 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) [271]. Активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) визначали за здатністю гальмувати окиснення кверцетину при 400 нм за методом Костюка В.А. [Вопр. мед. химии, 1990. 36 (2): 88-91]. Активність перекисного окиснення ліпідів та протеїнів в міокарді оцінювали за рівнем малонового діальдегіду (МДА) та карбонільних груп. Вміст МДА визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [1], карбонільних груп (КГ) - за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином [10].

Важливим ферментом, що залучений до регуляції редокс-статусу, тіол-дисульфідного обміну та обміну H_2S є тіоредоксиндисульфідредуктаза (тіоредоксинредуктаза, КФ 1.8.1.9). Активність тіоредоксинредуктази в міокарді визначали за швидкістю NADPH-залежного відновлення 5,5'-дітіобіс(2-нітробензоату) - DTNB [272]. Інкубаційне середовище містило 0,2 М фосфатний буфер (рН 7,6), 1 мМ ЕДТА, 1 мМ DTNB, 0,25 мМ NADPH, в присутності гомогенату міокарду реєстрували підвищення абсорбції через 15 хв

при 25°C та довжині хвилі 412 нм. Редокс-статус міокарду оцінювали за рівнем сульфгідрильних (SH-) та дисульфідних (SS-) груп, які визначали колориметричним методом за реакцією з 5,5'-дітіобіс(2-нітробензоатом) [39]. Тіол-дисульфідний коефіцієнт (ТДК) розраховували як відношення кількості SH-груп до кількості S-S-груп [39]. Вміст протеїну визначали за відомим методом Lowry O. H. (1951).

2.3 Дослідження вмісту ДНК в ядрах клітин міокарду

Цитометричні дослідження виконані на базі науково-дослідної лабораторії функціональної морфології та генетики розвитку ВНМУ ім. М.І. Пирогова (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №050/15 від 02.03.2015 р.) за допомогою д.мед.н., професора Ходаківського О.А., за що автор висловлює глибоку вдячність.

Вміст ДНК в ядрах клітин міокарду визначали методом проточної ДНК-цитометрії. Суспензії ядер з клітин міокарду щурів отримували за допомогою комерційного розчину CyStain DNA Step 1 (Partec, Німеччина), що дозволяє екстрагувати ядра та маркувати ядерну ДНК флюорохромом - діамідинофеніліндолом (DAPI) відповідно до інструкції виробника. При виготовленні ядерних суспензій використовувались одноразові фільтри CellTrics 50 мкм (Partec, Німеччина). Цитометричне дослідження виконано на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі "Partec PAS" (Partec, Німеччина) із застосуванням УФ-випромінювання для збудження флуоресценції DAPI та аналізом кожного зразка ядерної суспензії у кількості 10 тис. подій. Циклічний аналіз клітин здійснювали за допомогою програмного забезпечення FloMax (Partec, Німеччина) згідно цифрової математичної моделі оцінки наступних параметрів: G0G1 (G1%) - відсоткове співвідношення клітин фази G0G1 до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК = 2с); S (S%) - відсоткове співвідношення клітин у фазі синтезу ДНК до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК > 2с та < 4с); G2 + M (G2M%) - відсоткове співвідношення

клітин у фазі G2 + M до всіх клітин клітинного циклу (ДНК = 4с), або клітини з вмістом ДНК=4с (поліплоїдія). Визначення фрагментації ДНК (апоптоз) виконано шляхом виділення SUB-G0G1 ділянки на ДНК-гістограмах - RN2 перед піком G0G1, яка вказує на ядра клітин з вмістом ДНК < 2с.

2.4 Дослідження експресії гену цистатіонін- γ -ліази *CSE* в тканинах

Молекулярно-генетичні дослідження виконані в навчально-науковій клініко-діагностичній лабораторії ПЛР ВНМУ ім. М.І. Пирогова (свідоцтво МОЗ України про атестацію №051/15 від 02.03.2015 р.) за допомогою завідувачки лабораторії Людкевич Г.П. Консультативна допомога щодо методики дослідження була надана к.мед.н. Шликовою О. А., старшим науковим співробітником НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» (з 2021 р. Полтавський державний медичний університет), за що автор висловлює глибоку вдячність. Принцип методу та праймери для визначення експресії гену *CSE* в міокарді щурів запозичено з роботи [273].

Серце та аорту, що виділяли одразу після евтаназії, поміщали у стерильні герметичні пластикові контейнери, і до проведення дослідження зберігали при -20°C . Рівень експресії гену *CSE* в тканинах визначали методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реального часу. Загальну РНК виділяли з тканини серця за допомогою комплексу реагентів «РИБО-золь-В» (AmpliSens). Для отримання кДНК використовували набір реагентів для проведення реакції оберненої транскрипції (СИНТОЛ), що складався з 2,5 х реакційної суміші, 15 ОЕ/мл праймера оліго(dT)₁₅, 50 од/мкл оберненої транскриптази MMLV-RT, 5 од/мкл інгібітора РНКаз та деіонізуючої води, вільної від РНКаз. До суміші додавали 1-2 мкг загальної РНК. Визначення експресії гену *CSE* проводили в присутності барвника SYBR Green I в режимі реального часу (Real-Time PCR) на ампліфікаторі iCycler IQ5 BioRad (США) в реакційній суміші: 10 х буфер для ампліфікації з барвником SYBR Green I; 25

мМ хлорид магнію; 2,5 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів; специфічні праймери гену *CSE* 5'-GCTGAGAGCCTGGGAGGATA-3'; 5'-TCACTGATCCCGAGGGTAGCT-3' та 5 Од/мкл SynTag ДНК-полімерази. До суміші додавали 5 мкл зразку ДНК. В якості референтного гену використовували праймери гену β -актину: 5'-ACCCGCGAGTACAACСТТСТТ-3'; 5'-TATCGTCATCCATGGCGAACT-3'. Режим ампліфікації: 94°C, 3 хв; 40 циклів: – 94°C, 15 сек.; – 64°C, 40 сек. Для аналізу даних застосовували Ct метод: відносний рівень мРНК *CSE* / β -актину (у.о.) оцінювали за формулою $2^{-\Delta Ct}$, $\Delta Ct = Ct_{CSE} - Ct_{\beta\text{-актин}}$, де Ct_{CSE} - величина порогового циклу ампліфікації кДНК цільового гену *CSE*; $Ct_{\beta\text{-актин}}$ - величина порогового циклу ампліфікації кДНК референтного гену β -актину.

2.5 Реєстрація скоротливості ізольованих фрагментів грудної аорти щурів в модельній системі *in vitro*

Дослідження виконані в науково-дослідній клініко-діагностичній лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідоцтво про переатестацію №049/15 від 02 березня 2015 р.), за допомогою д.мед.н., професора Мельника А.В., за що автор висловлює глибоку вдячність.

Реєстрація скоротливості кільцевих фрагментів грудної аорти проводилась в модельній системі *in vitro*. Після виділення грудну аорту щурів одразу поміщали у стандартний буферний розчин Кребса (склад в кінцевих концентраціях, мМ: 132 натрію хлориду, 4,7 калію хлориду, 1,4 натрію дигідрофосфату, 1,0 кальцію хлориду, 12,5 натрію гідрокарбонату та 5,6 глюкози), рН 7,4, при температурі 18-20°C. рН розчину Кребса доводили до 7,4 шляхом продування сумішшю газів - 95% кисню та 5% карбону діоксиду. За допомогою препарувальних голок аорту фіксували на парафіновому дні препарувальної чашки, заповненої розчином Кребса. Під бінокуляром аорту звільняли від сполучної тканини та згустків крові. Відпрепаровані ділянки аорти розрізали на кільцеві сегменти завширшки 2-3 мм під кутом близько 45°,

отримані ізольовані кільцеві сегменти судин залишали у розчині Кребса при температурі 18-20°C на 45 хв. Гладком'язові препарати аорти поміщали у робочу перфузійну камеру (об'єм - 0,5 мл) між гачком і датчиком напруження та розтягували під постійним навантаженням 0,015-0,02 Н, що дозволяє отримати оптимальну силу скорочення ізольованих кільцевих сегментів.

Реєстрацію скоротливої активності ізольованих препаратів аорти проводили в режимі, що наближався до ізометричного за допомогою тензометричної установки, створеної в ДУ «Інститут фізіології АМН України ім. О.О. Богомольця», за відомим методом [43]. Сегменти аорти в камері суперфузували буферним розчином Кребса із сталою швидкістю 1,5 мл/хв за допомогою перистальтичного насосу. Суперфузійний буферний розчин Кребса термостатували із постійною температурою 37°C за допомогою системи підігріву розчину. До початку експерименту сегменти аорти витримували у перфузійній камері протягом 40-60 хвилин. Після цього починали періодичну стимуляцію гладком'язевих клітин за допомогою гіперкалієвого буферного розчину (концентрація іонів K^+ 80 мМ) до отримання стабільних скоротливих відповідей з метою досягнення оптимального режиму роботи гладеньких м'язів судин. Після цього м'язові смужки промивались стандартним розчином Кребса 3 рази по 30 хв. Цілісність ендотелію контролювали за ступенем ізометричного розслаблення досліджуваних фрагментів судин під впливом ацетилхоліну (10^{-6} М), попередньо скорочених розчином α_1 -агоніста адренорецепторів фенілефрином (10^{-6} М). Для оцінки H_2S -стимульованого розслаблення ізольовані фрагменти аорти, передскороченої фенілефрином (10^{-6} М), перфузували розчинами, що містили одночасно фенілефрин (10^{-6} М) та H_2S в різних концентраціях (10^{-2} - 10^{-6} М), протягом 15 хв кожний з наступною реєстрацією змін ізометричного напруження. На основі отриманих даних будували графік у якому по осі абсцис зазначали десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у перфузійному розчині, а по осі ординат – нормовану інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом різних концентрацій $NaHS$. Показник H_2S -стимульованого розслаблення фрагментів

аорти, що за амплітудою відповідав максимальному показнику фенілефрин-індукованого передскорочення, прийнято за 100%.

Кваліфікація використаних в роботі реактивів та препаратів: L-цистеїн, $\text{NAHS}\cdot\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, дітіотреїтол, D,L-пропаргілгілцин, реактив Елмана (DTNB), NADPH (Sigma, США), α -кетоглутарат, піридоксальфосфат, N,N-диметил-пара-фенілендіамін сульфат (Fluka, Німеччина); набори «Гемоглобін глікозильований» та «Гемоглобін» (ПрАТ «Реагент», Україна); «Rat Galectin 3 (GAL-3) ELISA Kit» (MyBiosource, Cat№ MBS2600708), фармакопейні препарати - тіопентал натрію (Київмедпрепарат, Україна), метформін (Сіофор, Берлін-Хемі, Німеччина). Інші реактиви були вітчизняного виробництва категорії х.ч.

2.6 Методи статистичної обробки цифрового матеріалу

Обробку первинного матеріалу проводили за допомогою універсальних статистичних програм MS Excel, SPSS22 for Windows, «STATISTICA 6,0» (ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний № AXXR910A374605FA). Оцінювали середнє значення, стандартні помилки, достовірність відмінностей. Для оцінки міжгрупової різниці застосовували параметричний t-критерій Ст'юдента, при відхиленні від нормального розподілу - непараметричний критерій U Мана-Уїтні, нормальність розподілу визначали за критерієм Шапіро-Уїлка (W). Зв'язок між показниками визначали за допомогою кореляційного аналізу за Пірсоном або Спірманом. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$. Результати наведено як $M \pm m$.

Резюме. Використані моделі та методи дослідження дозволяють об'єктивно та комплексно розкрити особливості обміну H_2S в серцево-судинній системі, визначити зв'язок зі змінами інших біохімічних процесів та розробити нові підходи до кардіопротекції на тлі антидіабетичної терапії за експериментального цукрового діабету за допомогою модуляторів обміну H_2S .

Основні результати розділу висвітлені в наступних публікаціях: [17; 29].

РОЗДІЛ 3

СТАН СИСТЕМИ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В МІОКАРДІ ТА АОРТІ ЩУРІВ ЗА СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНОГО ДІАБЕТУ

Як відомо, утворення H_2S в серці та судинах відбувається в реакціях десульфурування сірковмісних амінокислот за участі ПАЛФ-залежних ензимів – ЦГЛ та ЦАТ у асоціації з ПАЛФ-незалежними ензимами 3-МСТ та тіоредоксинредуктазою [54; 129; 246; 258]. Додатковим джерелом ендogenous H_2S може виступати реакція відновлення тіосульфат-аніону за участі відновленого глутатіону (GSH) та ензиму ТСТ [136; 258]. Деградація H_2S в тканинах відбувається спонтанно та ензиматичним шляхом, одним з етапів якого є окиснення сульфід-аніону за участі сульфітоксидази [115; 258]. Насьогодні бракує цілісної інформації щодо змін активності ПАЛФ-залежних і ПАЛФ-незалежних шляхів синтезу та деградації H_2S в серцево-судинній системі у різні терміни цукрового діабету.

Метою цього розділу було вивчення змін показників системи H_2S (активності H_2S -синтезуючих ензимів, показників утилізації H_2S , концентрації H_2S , експресії гену *CSE*) в міокарді, рівня H_2S в аорті та показників H_2S -залежної вазодилатації у щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету.

3.1 Динаміка показників вуглеводного обміну та рівня гідроген сульфід у сироватці крові у щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету

Спочатку була вивчена динаміка змін рівня глюкози, глікозильованого гемоглобіну та рівня H_2S в сироватці крові у щурів за умов моделювання стрептозотоцин-індукованого діабету. Досліди проведені на 64 білих лабораторних щурах-самцях масою 180-220 г. У 48 тварин (6 груп, $n=8$) ініціювали цукровий діабет шляхом одноразового в/оч введення стрептозотину (40 мг/кг маси на 0,1 М цитратному буфері рН 4,5) після

попередньої 24-годинної депривації їжі. Контролем слугували 16 тварин, яким ввели в/оч еквівалентний об'єм 0,1 М цитратного буферу (0,1 мл/ 100 г маси). Перед початком експерименту (0 доба) у всіх щурів визначали рівень глюкози в периферійній крові за допомогою електронного глюкометра Ассі-Сhek Аctive (Rouche Group, Німеччина). В подальшому у тварин дослідних груп визначали рівень глюкози, глікозильованого гемоглобіну та H_2S в крові на 7-у, 14-у, 21-у, 28-у та 35-у добу після введення стрептозотоцину, в контролі ці показники визначали на 0-у та 28-у добу дослідю.

Результати наших досліджень засвідчили, що всі групи щурів були репрезентативними за вихідним рівнем глюкози в крові (після 24-годинної депривації їжі). Так, у щурів контрольної групи вихідний рівень глюкози натще коливався від 3,23 до 5,34 ммоль/л (95% ДІ) і в середньому становив $4,24 \pm 0,27$ ммоль/л (рис. 3.1).

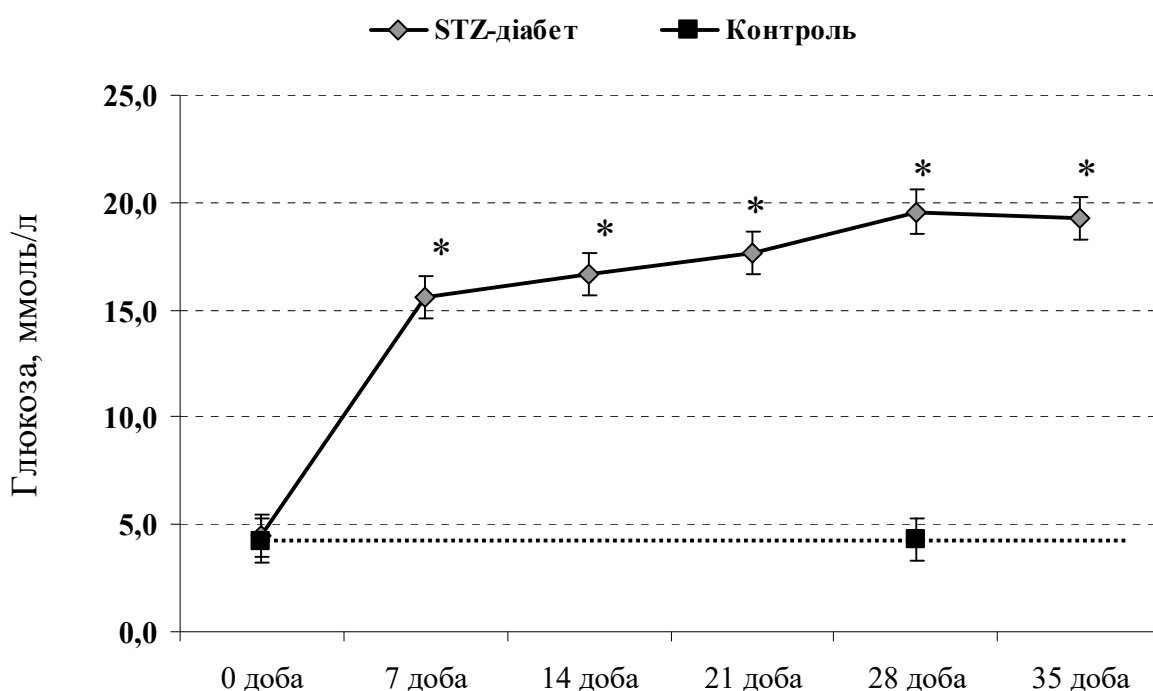


Рис. 3.1 Динаміка вмісту глюкози в крові у щурів після введення стрептозотоцину ($M \pm m$; $n=8$). * - $p < 0,001$ відносно контролю.

У щурів дослідних груп рівень глікемії до введення стрептозотоцину коливався від 3,25 до 5,46 ммоль/л (95% ДІ) і в середньому становив $4,45 \pm 0,27$ ммоль/л ($p > 0,5$). Після введення стрептозотоцину у щурів спостерігався

розвиток гіперглікемії: рівень глюкози в крові голодних тварин станом на 7-му, 14-ту, 21-шу, 28-му та 35-ту добу був достовірно вищим в 3,51; 3,74; 3,97; 4,40 та 4,33 рази ($p < 0,001$), ніж за станом на 0-у добу. Приріст рівня глюкози в крові у щурів після ініціації стрептозотоцин-індукованого діабету був найбільш виразним за 1-й тиждень (на 251%, $p < 0,001$), в подальшому рівень глікемії зростав більш повільно - на 6,6-10,8% за тиждень ($p < 0,05$) із стабілізацією показника станом на 28-му добу.

Далі ми оцінили динаміку рівня глікозильованого гемоглобіну (гліко-Нб) у щурів дослідних груп після введення стрептозотоцину. Результати наших досліджень засвідчили, що вихідний рівень гліко-Нб у нормоглікемічних щурів коливався від 3,04 до 4,28 мкмоль фруктози /г Нб (95% ДІ) і в середньому становив $3,65 \pm 0,18$ мкмоль фруктози /г Нб (рис. 3.2).

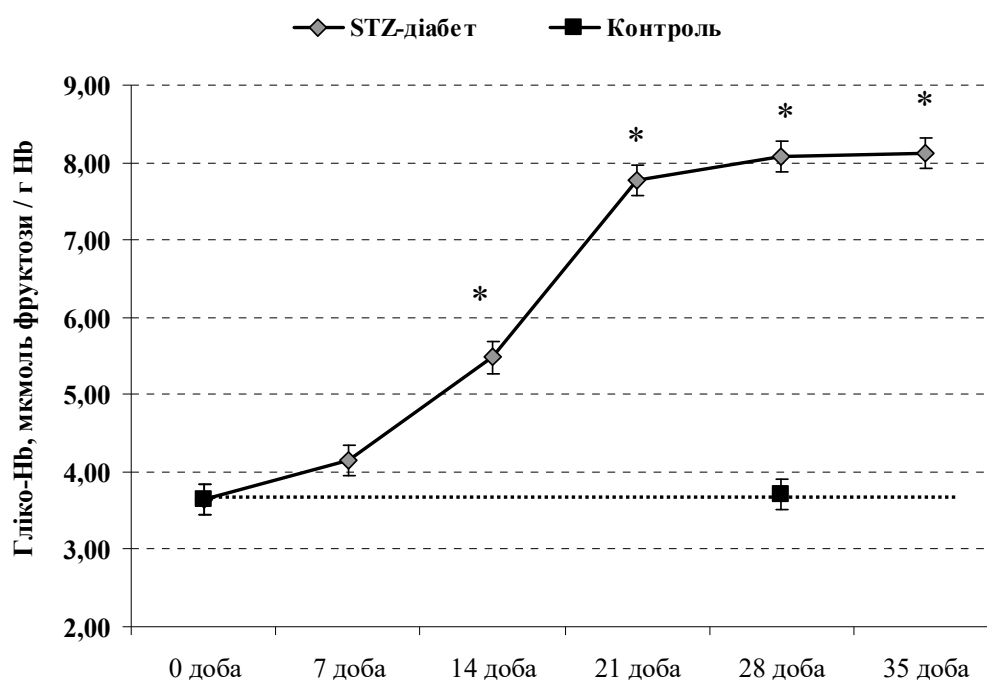


Рис. 3.2 Динаміка вмісту глікозильованого гемоглобіну (гліко-Нб) в крові щурів після введення стрептозотоцину ($M \pm m$; $n=8$). * - $p < 0,001$ відносно контролю.

Через тиждень після ініціації стрептозотоцин-індукованого діабету у щурів достовірних змін рівня гліко-Нб в крові не виявлялось – цей показник в середньому становив $4,15 \pm 0,19$ мкмоль фруктози /г Нб. У щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом з 14-ої доби реєструвалось достовірне

зростання рівня гліко-Нб в 1,50 рази (до $5,48 \pm 0,16$ мкмоль фруктози /г Нб), а на 21-шу, 28-му та 35-ту доби цей показник був достовірно вищим в 2,11; 2,21 та 2,26 рази порівняно з контролем і складав 7,78-8,13 мкмоль фруктози /г Нб.

Слід відзначити, що приріст рівня гліко-Нб в крові у щурів після ініціації стрептозотонин-індукованого діабету був найбільш виразним на 2-му та 3-му тижні - на 31,9 та 42%, $p < 0,001$ відносно рівня показника на попередньому тижні, а після 4-го тижня суттєвого приросту рівня гліко-Нб не спостерігалось.

На наступному етапі ми вивчили динаміку рівня H_2S в сироватці крові на етапах розвитку стрептозотонин-індукованого діабету. Як свідчать результати наших досліджень, рівень H_2S в сироватці крові нормоглікемічних щурів контрольної групи коливався від 56,2 до 85,6 мкмоль/л (95% ДІ) і в середньому становив $74,1 \pm 3,60$ мкмоль/л (рис. 3.2). Через тиждень після ініціації стрептозотонин-індукованого діабету у щурів не спостерігалось статистично значущих змін рівня H_2S в сироватці крові: на 7-у добу цей показник становив $69,5 \pm 3,00$ мкмоль/л ($p > 0,5$ порівняно зі станом на 0-у добу).

У щурів з стрептозотонин-індукованим діабетом з 14-ої доби реєструвалось достовірне зниження рівня H_2S в сироватці крові на 24,5% (до $55,9 \pm 2,11$ мкмоль/л) порівняно з контролем. Розвиток стрептозотонин-індукованого діабету супроводжувався подальшим зниженням вмісту H_2S в сироватці крові: на 21-шу, 28-му та 35-ту доби цей показник був нижчим на 39,8; 47,7 та 46,2% порівняно з контролем, і становив $44,7 \pm 1,99$; $38,8 \pm 1,33$ та $39,8 \pm 1,47$ мкмоль/л, відповідно. Зниження рівня H_2S в сироватці крові у щурів після ініціації стрептозотонин-індукованого діабету був найбільш виразним з 2-го по 4-й тиждень (на 19,5; 20,2 та 13,2%, $p < 0,001$ відносно рівня показника на попередньому тижні), з 4-го тижня подальшого зниження рівня H_2S не спостерігалось.

Кореляційний аналіз засвідчив між рівнем глюкози та рівнем H_2S в крові щурів з стрептозотонин-індукованим діабетом наявність достовірного оберненого зв'язку - $r = -0,73$, $p < 0,01$ (рис. 3.4).

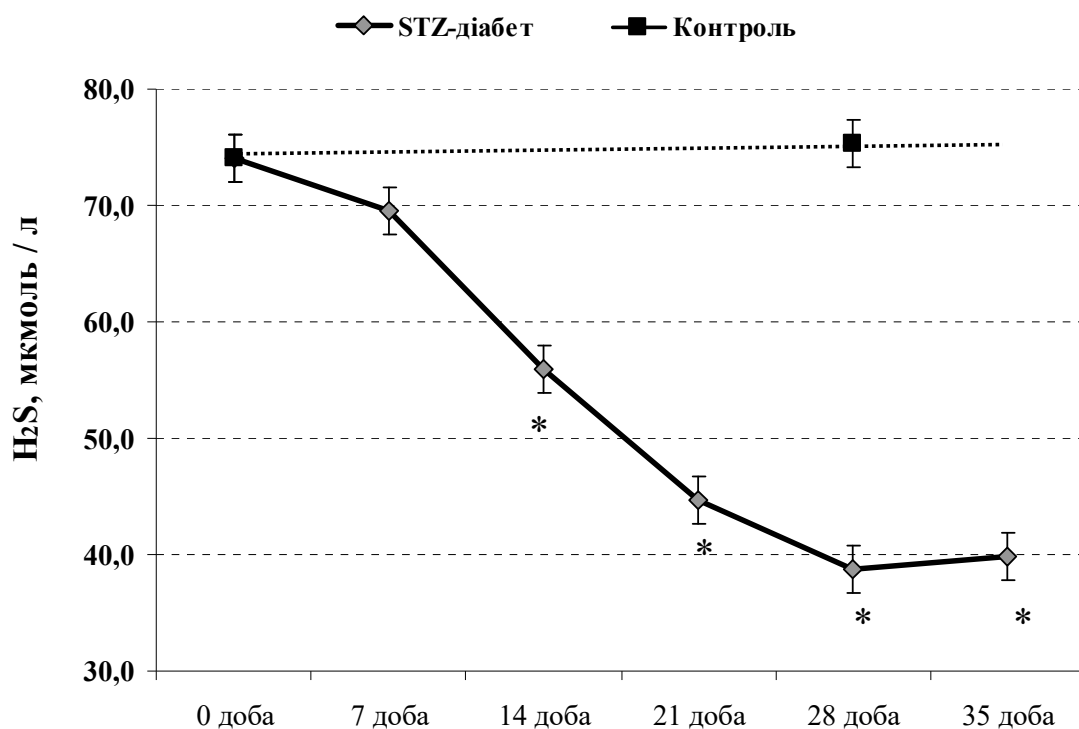


Рис. 3.3. Динаміка вмісту H_2S в сироватці крові щурів після введення стрептозотоцину ($M \pm m$; $n=8$). * - $p < 0,01$ відносно контролю.

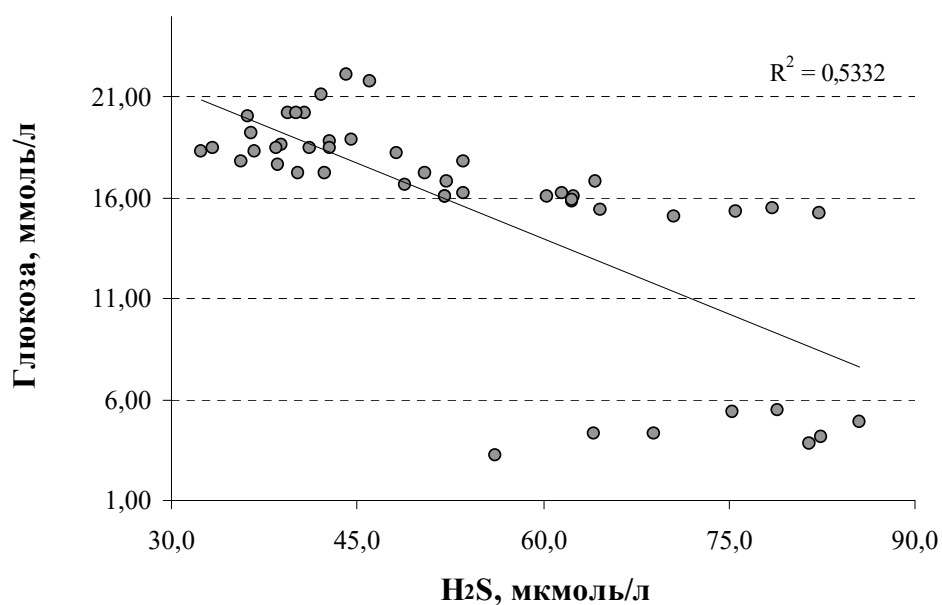


Рис. 3.4. Кореляційний зв'язок між рівнем глюкози та рівнем H_2S в сироватці крові щурів з моделлю стрептозотин-індукованого діабету ($n=48$).

Достовірний обернений сильний зв'язок виявлений між рівнем глікозильованого гемоглобіну та рівнем H_2S в крові у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($r = -0,86$, $p < 0,01$) (рис. 3.5).

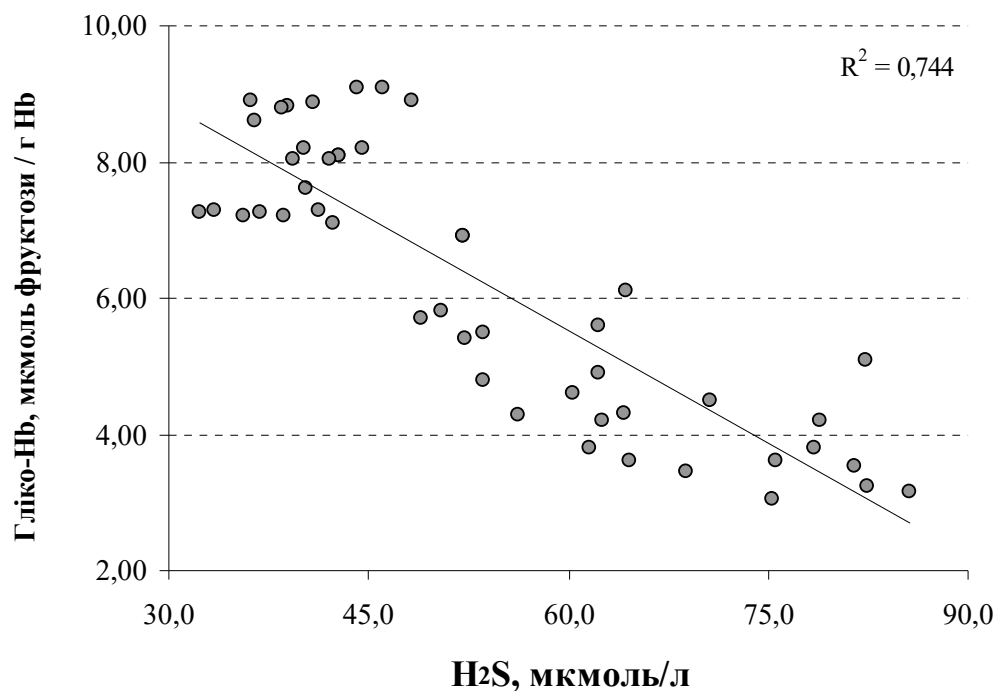


Рис. 3.5 Кореляційний зв'язок між рівнем глікозильованого гемоглобіну (гліко-Нб) та рівнем H_2S в крові у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($n=48$).

Таким чином, формування стрептозотоцин-індукованого діабету достовірно асоціювалось із поступовим зниженням рівня H_2S в сироватці крові. Найбільш суттєві зміни рівня H_2S в сироватці крові реєструвались на другому тижні після введення стрептозотоцину із подальшою стабілізацією процесу на п'ятому тижні. З огляду на виявлені біохімічні зміни у сироватці кров на наступних етапах показники стану системи H_2S в серцево-судинній системі щурів досліджували через 2 та 4 тижня після введення стрептозотоцину.

3.2 Показники обміну H_2S та експресія гену *CSE* в міокарді щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету

На першому етапі ми проаналізували вміст H_2S в міокарді щурів після ініціації стрептозотоцин-індукованого діабету. Як свідчать результати наших досліджень, вміст H_2S в міокарді щурів контрольної групи коливався від 2,93 до 4,35 нмоль/мг протеїну (95% ДІ) і в середньому становив $3,67 \pm 0,15$ нмоль/мг протеїну (рис. 3.6). Через 2 тижні після введення стрептозотоцину вміст H_2S в міокарді щурів був достовірно нижчим на 16,9 %, ніж в контролі і становив $3,05 \pm 0,14$ нмоль/мг протеїну. Через 4 тижні після введення стрептозотоцину реєструвалось ще більш значне падіння рівня H_2S в міокарді щурів: цей показник становив $2,29 \pm 0,20$ нмоль/мг протеїну і був достовірно нижчим на 37,6 та 24,9 % порівняно з контролем та станом на 14 добу, відповідно.

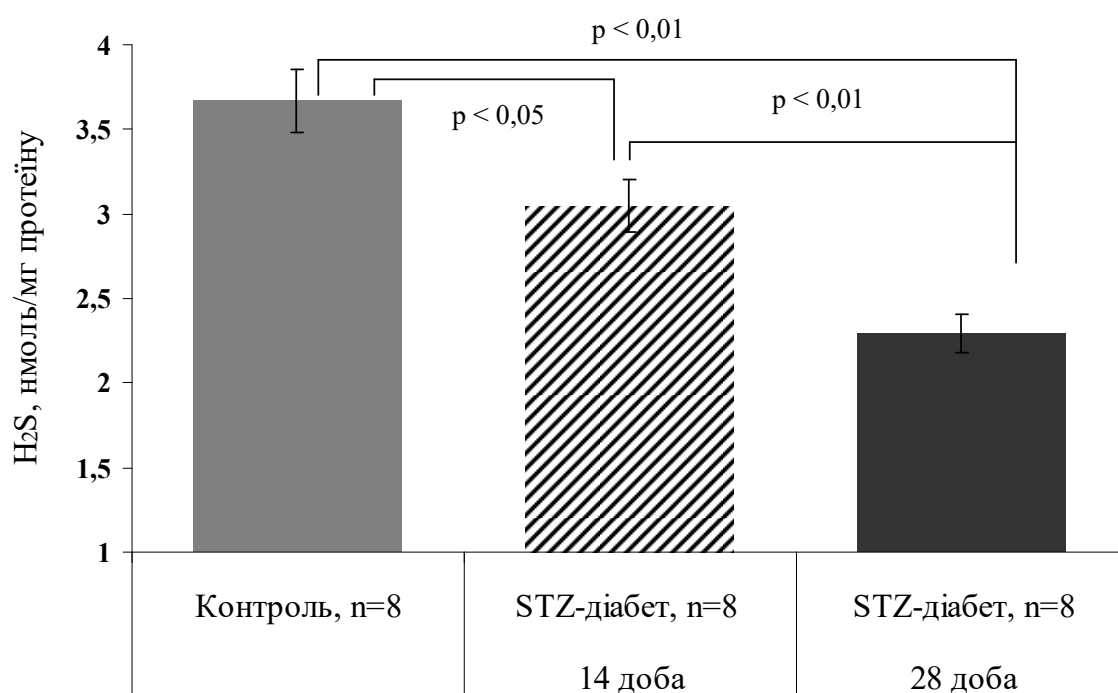


Рис. 3.6 Динаміка вмісту H_2S в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$; $n=8$).

Таким чином, розвиток стрептозотоцин-індукованого діабету супроводжувався формуванням значного дефіциту H_2S в міокарді щурів через 4 тижні від початку експерименту. На наступному етапі ми дослідили питому активність H_2S -синтезуючих ензимів в міокарді щурів за розвитку стрептозотоцин-індукованого діабету.

Основним джерелом H_2S у серцево-судинній системі вважається реакція десульфурування L-цистеїну за участі ПАЛФ-залежного ензиму ЦГЛ [146]. Даний ензим забезпечує гідролітичний розпад L-цистеїну до H_2S , пірувату та аміаку: $L\text{-Цистеїн} + H_2O \rightarrow \text{Піруват} + H_2S + NH_3$.

Результати наших досліджень засвідчили, що активність ЦГЛ в міокарді щурів контрольної групи коливалась від 0,221 до 0,375 нмоль H_2S / хв·мг протеїну (95% ДІ) і в середньому становила $0,301 \pm 0,018$ нмоль H_2S / хв·мг протеїну (рис. 3.7). Через 2 тижні після введення стрептозотоцину в міокарді щурів активність ЦГЛ становила $0,262 \pm 0,017$ нмоль H_2S / хв·мг протеїну і була на 12,8% нижчою, ніж в контролі, однак зміни не були вірогідними.

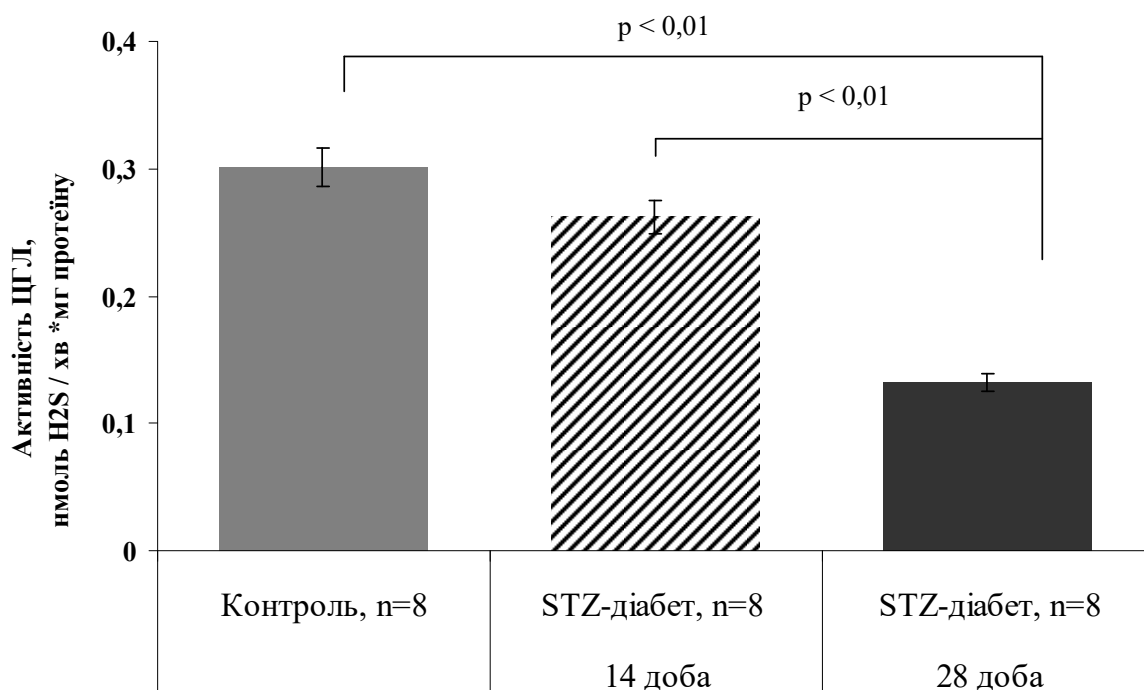


Рис. 3.7. Активність цистатіонін- γ -ліази (ЦГЛ) в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$; $n=8$).

Через 4 тижні після введення стрептозотоцину активність ЦГЛ становила $0,132 \pm 0,014$ нмоль H_2S /мг протеїну і була достовірно нижчою на 55,9%, ніж в контролі, та на 49,5% нижчою порівняно із станом на 14 добу.

Синтез H_2S з L-цистеїну у міокарді може відбуватись за участі ПАЛФ-залежного ензиму ЦАТ, що забезпечує утворення 3-меркаптопірувату [246]. Цей метаболіт далі під впливом ПАЛФ-незалежного ензиму 3-МСТ розкладається до пірувату та H_2S (L-Цистеїн + α -кетоглутарат \rightarrow глутамат + 3-меркаптопіруват \rightarrow піруват + H_2S). Реакція трансамінування цистеїну з α -кетоглутаратом у цьому десульфуразному шляху вважається швидкість-лімітуючою [246].

Результати наших досліджень засвідчили, що активність ЦАТ (+ 3-МСТ) в міокарді щурів контрольної групи коливалась від 1,10 до 1,53 нмоль H_2S / хв·мг протеїну (95% ДІ) і в середньому становила $1,32 \pm 0,05$ нмоль H_2S / хв·мг протеїну (рис. 3.8).

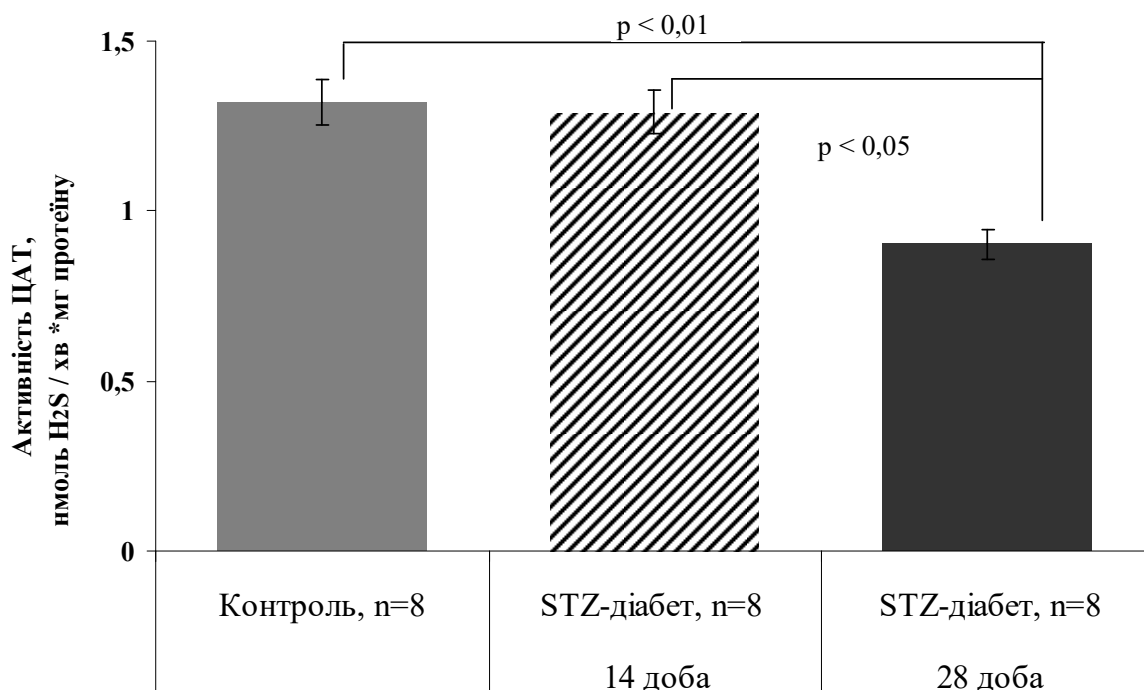


Рис. 3.8 Активність цистеїнамінотрансферази (ЦАТ) в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$; $n=8$).

Через 2 тижні після введення стрептозотоцину достовірних змін активності ЦАТ в міокарді щурів не спостерігалось. Однак через 4 тижні активність цього ензиму становила $0,902 \pm 0,041$ нмоль H_2S / хв·мг протеїну і була достовірно нижчою на 31,6% порівняно з контролем та на 30,0% нижчою порівняно зі станом на 14 добу.

Аналіз загальної десульфуразної активності по L-цистеїну засвідчив, що розвиток стрептозотоцин-індукованого діабету асоціюється із статистично значущим зниженням здатності міокарду до продукції H_2S переважно на 4-му тижні (рис. 3.9). Так, загальна десульфуразна активність міокарду щурів контрольної групи становила $1,62 \pm 0,06$ нмоль H_2S / хв·мг протеїну, у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом на 14 добу вона суттєво не змінилась і склала $1,55 \pm 0,08$ нмоль H_2S / хв·мг протеїну. В той же час, загальна десульфуразна активність міокарду на 28 добу після введення стрептозотоцину становила $1,03 \pm 0,05$ нмоль H_2S / хв·мг протеїну і була статистично значуще нижчою на 36,1 та 33,3% ніж в контролі та на 14 добу дослідю, відповідно.

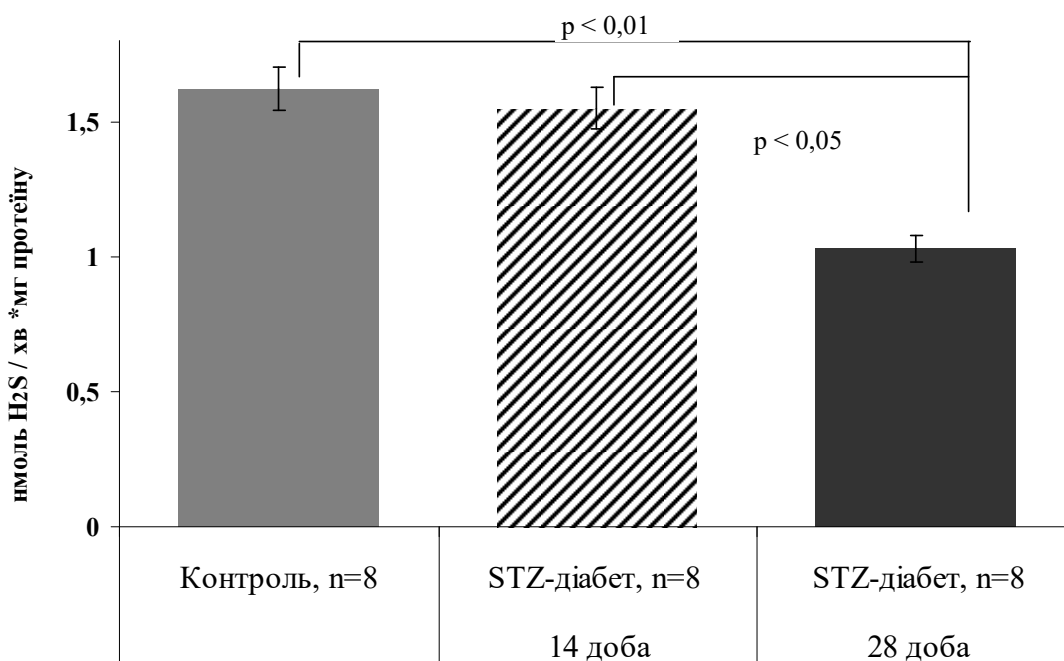


Рис. 3.9 Загальна десульфуразна активність міокарду по L-цистеїну у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$; $n=8$).

Далі ми дослідили в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом активність альтернативного шляху утворення H_2S за участі ПАЛФ-незалежного мітохондріального ензиму ТСТ у реакції відновлення тіосульфат-аніону ($S_2O_3^{2-} + R(SH)_2 \rightarrow SO_3^{2-} + RS_2 + H_2S$) [136].

Встановлено, що активність ТСТ в міокарді щурів контрольної групи коливалась від 1,53 до 2,70 нмоль H_2S / хв·мг протеїну (95% ДІ) і в середньому становила $2,25 \pm 0,15$ нмоль H_2S / хв·мг протеїну (рис. 3.10). Через 2 тижні після ініціації стрептозотоцин-індукованого діабету активність ТСТ в міокарді щурів суттєво не змінилась. Однак через 4 тижні реєструвалось статистично значуще зниження активності цього ензиму до $1,36 \pm 0,10$ нмоль H_2S / хв·мг протеїну, що було на 39,5 та 35,0% нижчим порівняно з контролем та станом на 14 добу, відповідно. Оскільки вказаний ензим відноситься до мітохондріальних, то зниження його активності є потенційною ознакою розвитку мітохондріальної дисфункції міокарду щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету.

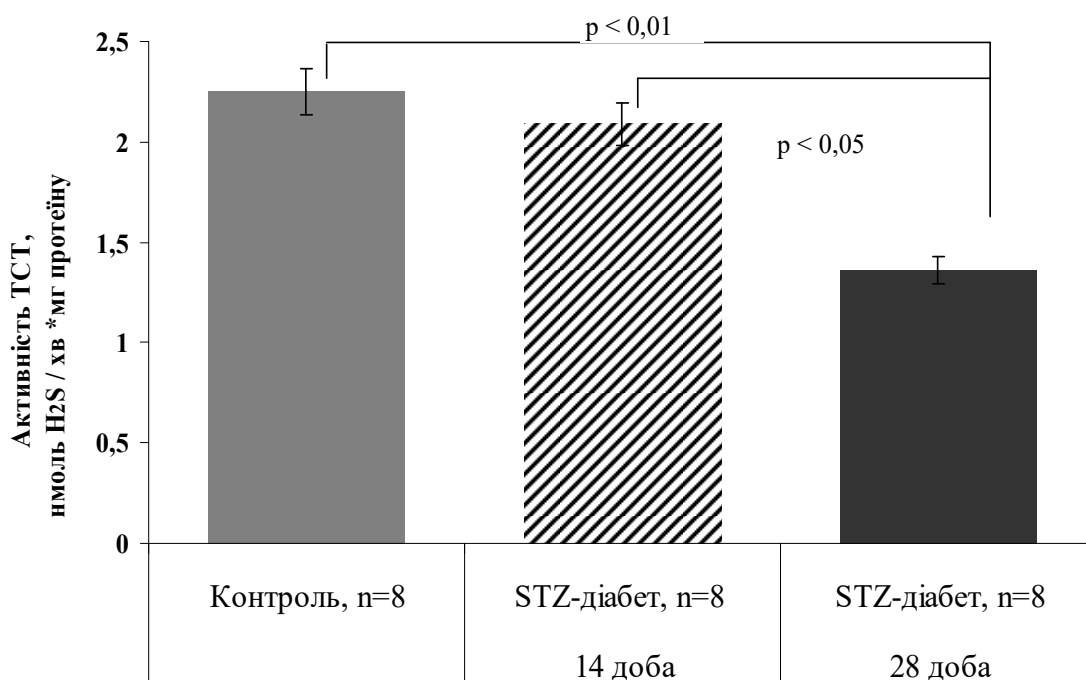


Рис. 3.10 Активність тіосульфатсульфуртрансфери (ТСТ) в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$; $n=8$).

Таким чином, через 4 тижні у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом реєструється статистично значуще зниження активності всіх досліджуваних H_2S -синтезуючих ензимів в міокарді (ЦГЛ, ЦАТ, ТСТ), серед них найбільш суттєво пригнічується активність ЦГЛ.

На наступному етапі було досліджено рівень експресії гена *CSE* в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом. Встановлено, що через 4 тижні після введення стрептозотоцину відбувається статистично значуще зниження експресії гена *CSE* в міокарді щурів (рис. 3.11). Зокрема, станом на 28 добу відносний рівень мРНК ЦГЛ / β -актин в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом був достовірно нижчим в 2,52 рази, ніж у щурів контрольної групи.

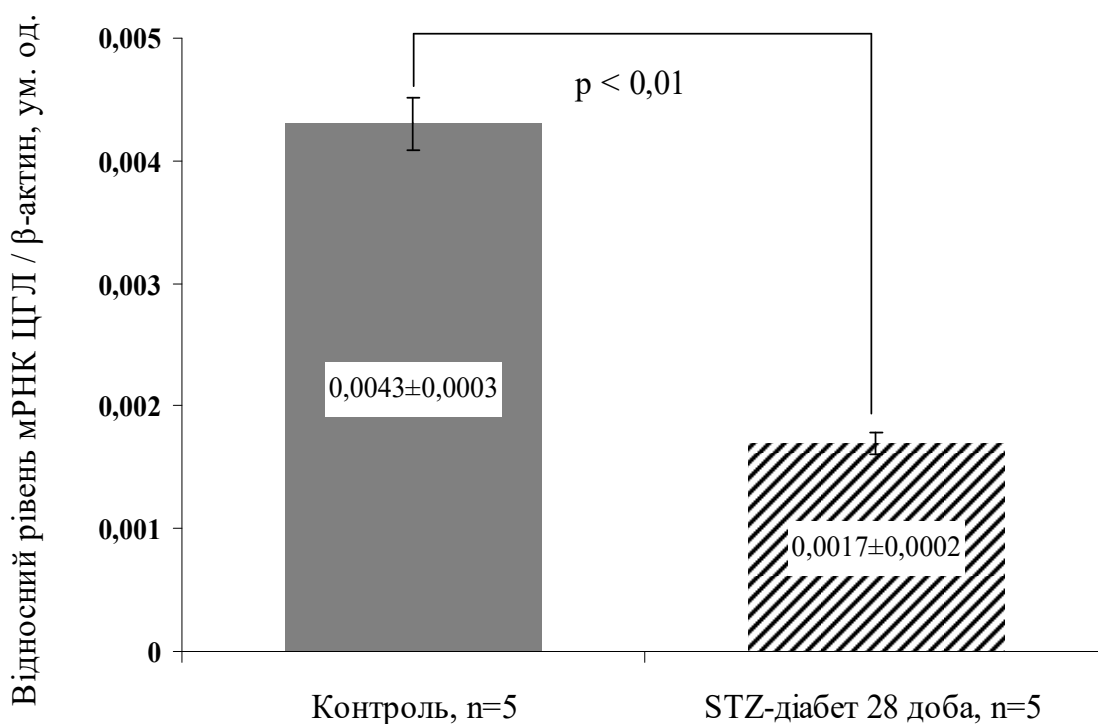


Рис. 3.11 Експресія гена *CSE* в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом відносно референтного гену β -актину ($M \pm m$; $n=5$).

Далі ми дослідили показники утилізації H_2S в міокарді щурів через 2 та 4 тижні після введення стрептозотоцину. Як відомо, в клітинах утилізація H_2S проходить у реакціях ферментативного та неферментативного окиснення

(переважно у мітохондріях), в реакціях метилування (у мітохондріях) та депонування H_2S у складі полісульфідів (у мітохондріях) [146; 258].

Спочатку ми оцінили загальну здатність міокарду до утилізації H_2S за допомогою модельної системи *in vitro*. Встановлено, що швидкість утилізації активність H_2S в міокарді щурів контрольної групи коливалась від 0,483 до 0,772 нмоль S^{2-} / хв·мг протеїну (95% ДІ) і в середньому становила $0,624 \pm 0,047$ нмоль S^{2-} / хв·мг протеїну (рис. 3.12). Через 2 тижні після ініціації стрептозотоцин-індукованого діабету спостерігалось достовірне підвищення швидкості утилізації H_2S в міокарді на 29,8%. Через 4 тижні реєструвалось ще більш істотне підвищення швидкості утилізації H_2S (до $1,177 \pm 0,094$ нмоль S^{2-} / хв·мг протеїну), що було на 88,5 та 45,2% вищим порівняно з контролем та станом на 14 добу, відповідно.

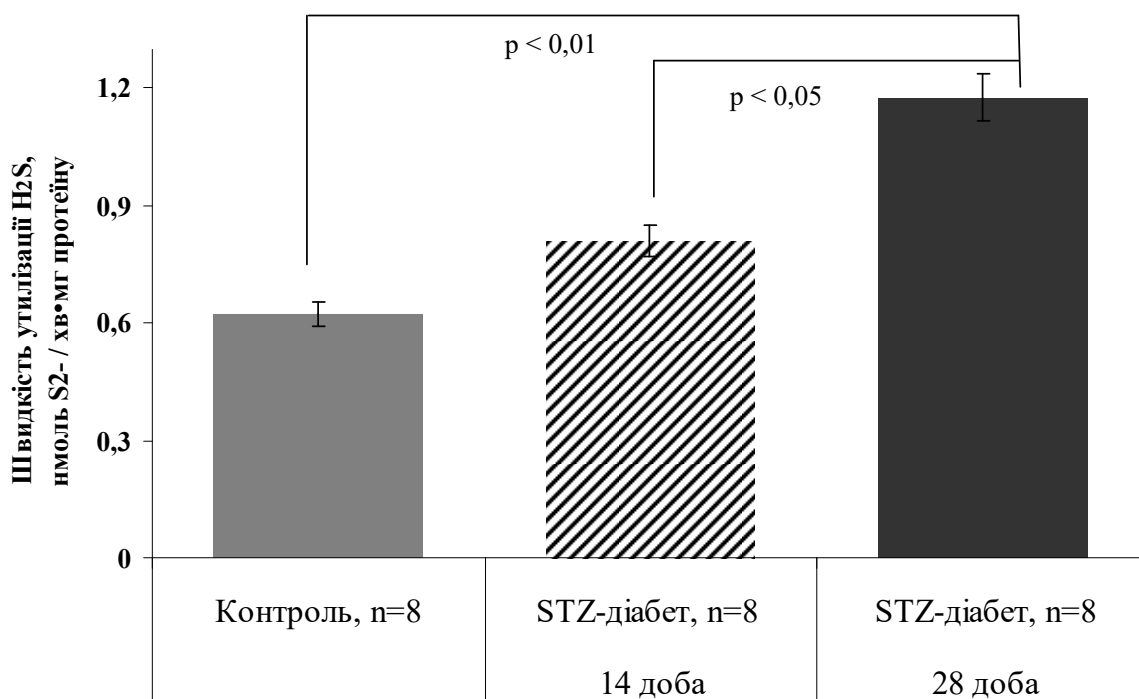


Рис. 3.12 Швидкість утилізації екзогенного H_2S в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$, $n=8$)

Одним із важливих етапів утилізації H_2S є мітохондріальне окиснення сульфїт-аніону за участі сульфїтоксидази ($\text{SO}_3^{2-} + \text{Fe(III)цитохром c} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{Fe(II)цитохром c}$) [115; 202]. Виявилось, що за стрептозотоцин-індукованого діабету в міокарді щурів відбувається пригнічення цього етапу деградації H_2S (рис. 3.13). Так, у щурів контрольної групи активність сульфїтоксидази становила $5,46 \pm 0,35$ нмоль $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ / хв·мг протеїну. Через 2 тижні після ініціації стрептозотоцин-індукованого діабету активність сульфїтоксидази в міокарді щурів суттєво не змінилась. Однак, через 4 тижні реєструвалось достовірне зниження активності сульфїтоксидази до $3,41 \pm 0,36$ нмоль H_2S / хв·мг протеїну, що було на 37,6 та 32,0% нижчим порівняно з контролем та станом на 14 добу, відповідно. Зниження активності цього ензиму може свідчити про розвиток мітохондріальної дисфункції в міокарді щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету.

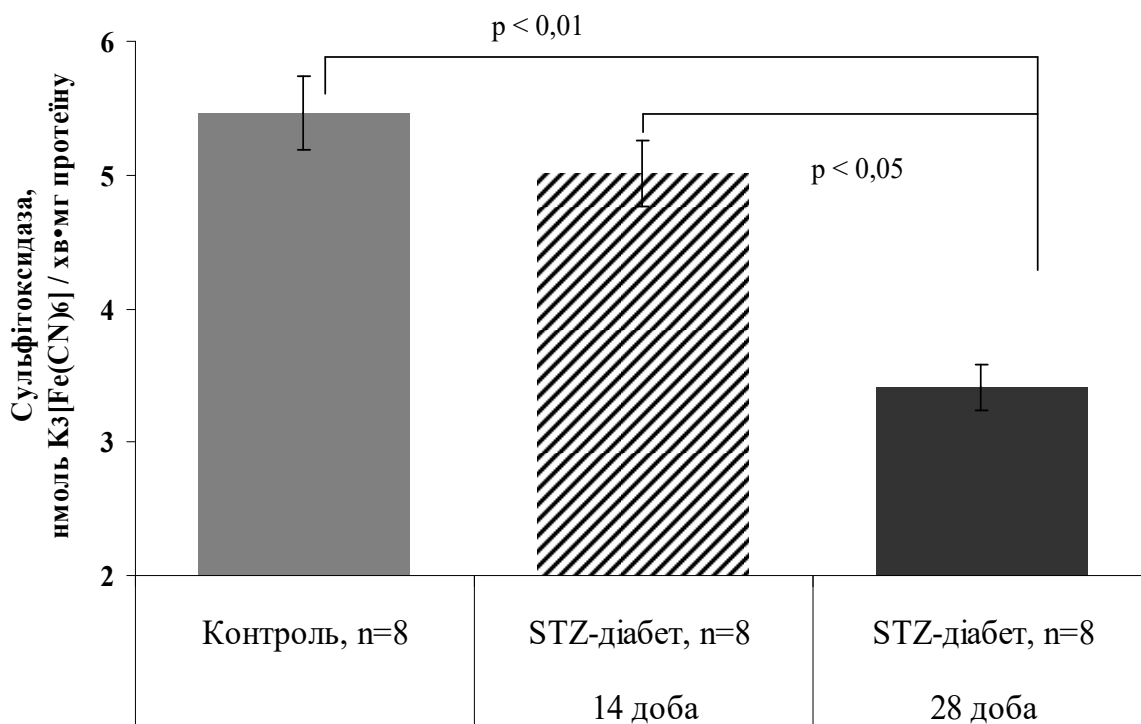


Рис. 3.13 Активність сульфїтоксидази в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$, $n=8$)

Кореляційний аналіз засвідчив, що хронічна гіперглікемія асоціюється з порушеннями обміну H_2S в міокарді (табл. 3.1). Зокрема, за умов стрептозотоцин-індукованого діабету між вмістом H_2S в міокарді та вмістом глюкози в крові виявлявся обернений зв'язок ($r = -0,76$). Також достовірний сильний обернений зв'язок виявлявся між вмістом глікозильованого гемоглобіну та активністю ЦГЛ ($r = -0,84$), статистично значущими виявились також і зв'язки з активністю інших H_2S -синтезуючих ензимів (ЦАТ, ТСТ).

Таким чином, через 4 тижні після індукції цукрового діабету стрептозотоцином в міокарді щурів формується значний дисбаланс у шляхах синтезу та утилізації H_2S , знижується рівень експресії гена *CSE*.

Таблиця 3.1

Коефіцієнти кореляції між рівнем глюкози, глікозильованого гемоглобіну в крові та показниками обміну H_2S в міокарді щурів (n=24)

| Показники | Глюкоза | Гліко-Нб |
|------------------|---------|----------|
| H_2S (міокард) | -0,73* | -0,71* |
| ЦГЛ | -0,75* | -0,84* |
| ЦАТ | -0,56* | -0,74* |
| ТСТ | -0,58* | -0,69* |
| Сульфітоксидаза | -0,60* | -0,71* |

Примітка. * - статистично значущі коефіцієнти кореляції ($p < 0,01$).

3.3 Стан системи H_2S / ЦГЛ та функціональний стан аорти щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом

Як відомо, в судинах активно синтезується ендогенний H_2S . Основним джерелом цього біологічно-активного метаболіту в судинах слугує реакція десульфуровування L-цистеїну за участі ЦГЛ, в той час як внесок інших ензимів є незначним [54; 146]. Тому на наступному етапі ми оцінили стан системи H_2S / ЦГЛ в аорті щурів на етапах розвитку стрептозотоцин-індукованого діабету.

Як свідчать результати наших досліджень, вміст H_2S в аорті щурів контрольної групи коливався від 1,74 до 2,30 нмоль/мг протеїну (95% ДІ) і в середньому становив $1,97 \pm 0,06$ нмоль/мг протеїну (табл. 3.2). Через 2 тижні після введення стрептозотоцину вміст H_2S в аорті щурів був достовірно нижчим на 15,1 %, ніж в контролі. Через 4 тижні після введення стрептозотоцину реєструвалось ще більш значне зниження рівня H_2S в аорті щурів: цей показник був достовірно нижчим на 36,5 та 25,2 % порівняно з контролем та станом на 14 добу, відповідно. Активність ЦГЛ в аорті щурів контрольної групи коливалась від 0,748 до 1,347 нмоль H_2S / хв·мг протеїну (95% ДІ) і в середньому становила $0,966 \pm 0,063$ нмоль H_2S / хв·мг протеїну. Через 2 тижні після введення стрептозотоцину активність ЦГЛ в аорті щурів виявилась достовірно нижчою на 26,2%, ніж в контролі. Через 4 тижні після введення стрептозотоцину активність ЦГЛ виявилась достовірно нижчою на 41,7%, ніж в контролі, та на 21,1% нижчою порівняно із станом на 14 добу.

Таблиця 3.2

Стан системи H_2S / ЦГЛ в аорті щурів з стрептозотозин-індукованим діабетом
($M \pm m$)

| Показник | Контроль (n=8) | STZ-діабет | |
|---|-------------------|---------------------|--------------------------|
| | | 14 доба (n=8) | 28 доба (n=8) |
| H_2S (аорта), нмоль/мг протеїну | $1,97 \pm 0,06$ | $1,67 \pm 0,09^*$ | $1,25 \pm 0,06^{* \#}$ |
| ЦГЛ, нмоль H_2S /хв·мг протеїну | $0,968 \pm 0,062$ | $0,715 \pm 0,041^*$ | $0,564 \pm 0,051^{* \#}$ |

Примітки: 1. * - $p < 0,05$ відносно групи контролю;

2. # - $p < 0,05$ відносно стану на 14 добу.

Слід відзначити, що зміни у системі H_2S / ЦГЛ в аорті узгоджувались із такими у міокарді, але статистично значуще зниження десульфуразної активності в аорті реєструвалось раніше, ніж у міокарді. Порушення стану

системи H_2S / ЦГЛ в аорті може бути предиктором формування ендотеліальної дисфункції у щурів після ініціації цукрового діабету.

Кореляційний аналіз засвідчив, що хронічна гіперглікемія є чинником, який індукує формування дисбаланс в системі H_2S / ЦГЛ в аорті. Так, між вмістом глюкози і рівнем глікозильованого гемоглобіну та вмістом H_2S в аорті виявлявся достовірний обернений зв'язок ($r = -0,58$; $-0,76$, $p < 0,01$). Також статистично значущий зв'язок виявлявся між рівнем глікозильованого гемоглобіну та активністю ЦГЛ ($r = -0,59$; $p < 0,01$). Між вмістом H_2S в аорті та сироватці крові виявлявся достовірний прямий зв'язок ($r = 0,88$, $p < 0,001$). Рівень H_2S в крові також прямо корелював з активністю ЦГЛ в аорті ($r = 0,66$, $p = 0,005$).

Як відомо, однією із фізіологічних функцій H_2S є участь у регуляції судинного тонуусу, тому виникає питання чи змінюється чутливість судин до його дії за умов експериментального цукрового діабету. Тому на наступному етапі, в модельних системах *in vitro* була проведена оцінка здатності донору H_2S - $Na_2S \cdot 9H_2O$ в діапазоні концентрацій 10^{-6} - 10^{-3} М викликати релаксацію ізольованих кільцевих фрагментів аорти щурів контрольної групи та щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом (станом на 28 добу). З цією метою ізольовані кільцеві фрагменти аорти, передскорочені фенілефрином (10^{-6} М), перфузували протягом 30 хв. розчинами, що містили одночасно фенілефрин в тій же концентрації та $Na_2S \cdot 9H_2O$ в наведеному діапазоні концентрацій, після чого реєстрували зміни ізометричного напруження. Зменшення величини ізометричного напруження відносно вихідного стану, індукованого фенілефрином, розцінювалось як показник вазорелаксуючої дії H_2S . На основі отриманих даних були побудовані криві «доза-ефект»: по осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у суперфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій H_2S . За 100% був прийнятий рівень H_2S -стимульованого розслаблення фрагментів аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення.

Встановлено, що у щурів контрольної групи інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти, передскорочених фенілефрином, в присутності H_2S у концентраціях 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3}M становила $5,20\pm 0,32\%$; $11,5\pm 2,14\%$; $30,3\pm 0,86\%$ та $55,7\pm 1,53\%$ (рис. 3.14). У тварин з стрептозотоцин-індукованим діабетом в присутності H_2S у концентраціях 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3}M інтенсивність розслаблення кілець аорти становила $4,39\pm 0,12\%$; $7,67\pm 0,62\%$; $17,9\pm 0,14\%$; $42,3\pm 0,25\%$ і була нижчою, ніж у щурів контрольної групи на 15,6; 33,3; 40,9 та 24,1% ($p < 0,05$).

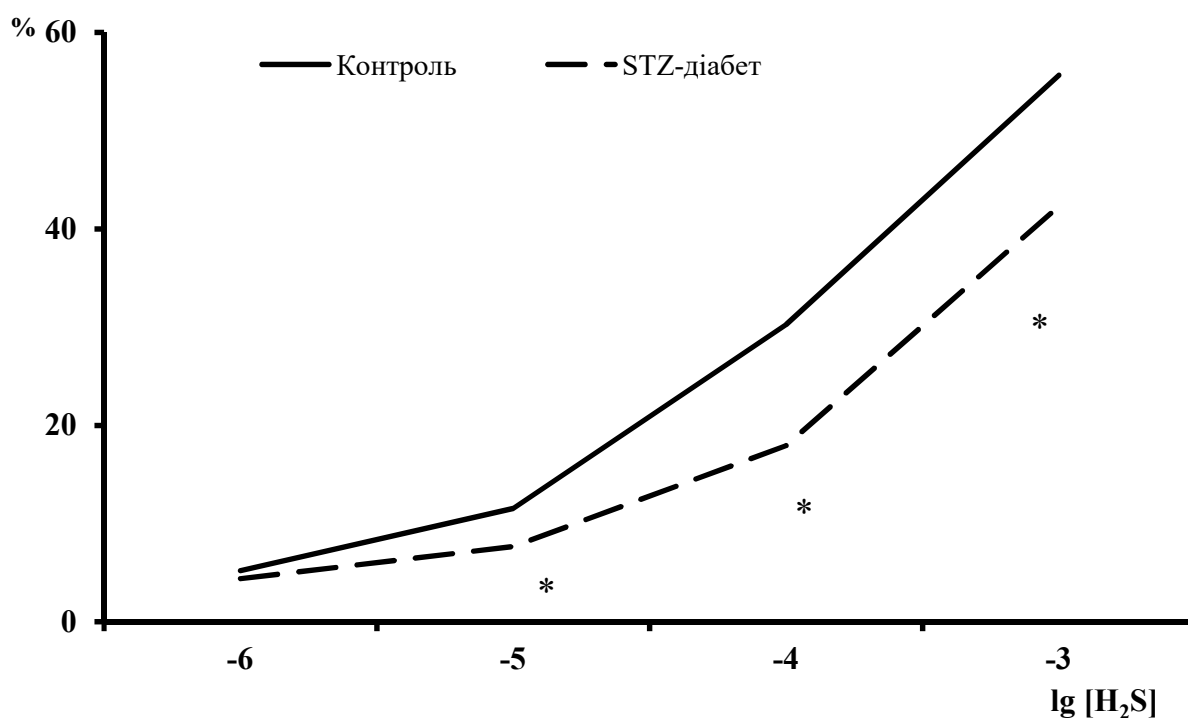


Рис. 3.14 H_2S -стимульоване розслаблення кільцевих фрагментів аорти у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$, $n=5$). * - $p < 0,05$ відносно контролю.

Таким чином, найбільш значні відмінності у скоротливості аорти щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та щурів контрольної групи реєструвались у діапазоні фізіологічних (10^{-4}M) та низьких концентрацій H_2S ($10^{-6} - 10^{-5}\text{M}$). В цілому, крива «доза-ефект» у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом була зміщена праворуч по відношенню до кривої «доза-ефект» у тварин групи контролю.

Розрахунок середніх ефективних концентрацій H_2S для аорти підтвердив виявлені закономірності (рис. 3.15). У щурів контрольної групи $EC_{50} H_2S$ становила $95,0 \pm 3,82$ мкМ. Натомість, за стрептозотоцин-індукованого діабету $EC_{50} H_2S$ становила $156 \pm 6,22$ мкМ, що виявилось статистично значуще вищим на 64,2 %, ніж щурів контрольної групи. Виявлені зміни можуть свідчити про зниження чутливості судин до вазорелаксуючої дії H_2S на тлі хронічної гіперглікемії.

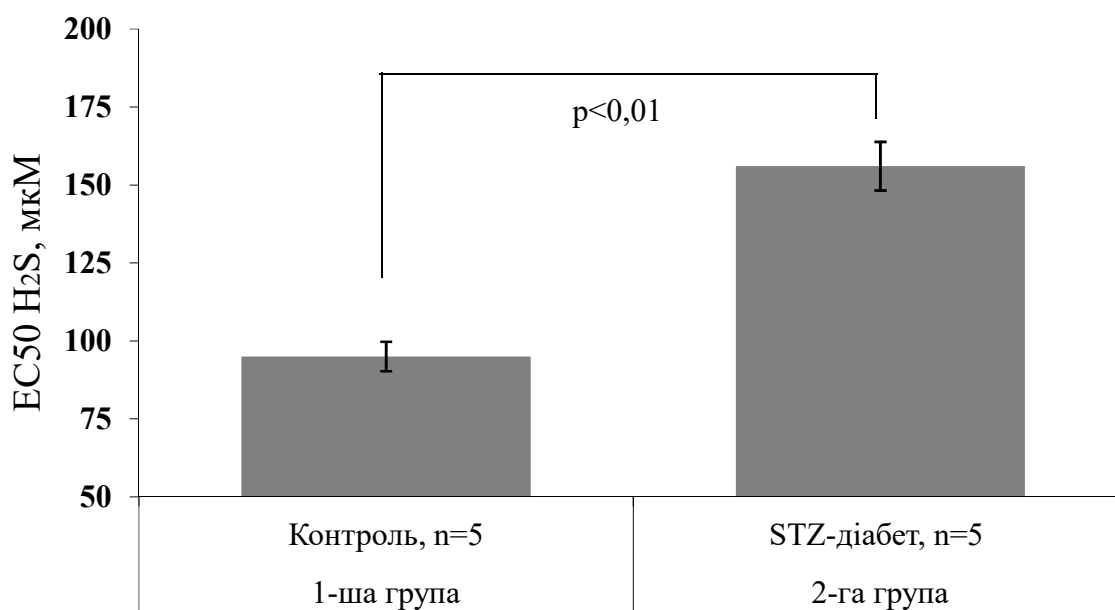


Рис. 3.15 Середні ефективні концентрації (EC_{50}) H_2S для аорти у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та в контролі ($M \pm m$, $n=5$).

Резюме. Таким чином, розвиток стрептозотоцин-індукованого діабету супроводжується суттєвими змінами в обміні H_2S в серцево-судинній системі щурів. В умовах хронічної гіперглікемії істотно посилюється внесок реакції десульфурування цистеїну за участі ЦГЛ у підтримці базальної концентрації H_2S в міокарді, аорті та сироватці крові; пригнічується експресія гена *CSE* (знижується відносний вміст мРНК ЦГЛ/ β -актин) в міокарді, підвищується загальна швидкість споживання H_2S та знижується активність сульфітоксидази.

Не виключено, що за цукрового діабету також інші механізми залучені у формування дефіциту H_2S у серцево-судинній системі, зокрема може знижуватись ефективність депонування та вивільнення H_2S із тканинних депо. Адже, шляхи утворення H_2S , залежні від ЦАТ та ТСТ, також залучені у депонування H_2S у мітохондріях у складі персульфідів та полісульфідів разом із системою тіоредоксинредуктази чи системою глутатіону. Відомо, що хронічна гіперглікемія асоціюється з розвитком оксидативного стресу, що може прискорювати деградацію H_2S .

На наступному етапі дослідження був вивчений вплив модуляторів системи H_2S на біохімічні та функціональні зміни у серцево-судинній системі щурів за умов стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях:
[17; 32; 33; 37; 169]

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ ОБМІНУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА БІОХІМІЧНІ
ТА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ В СЕРЦЕВО-СУДИННІЙ СИСТЕМІ
ЩУРІВ ІЗ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНИМ ДІАБЕТОМ

Відомими біохімічними чинниками розвитку діабет-асоційованих змін у серці та судинах є оксидативний стрес, зростання продукції прозапальних та профіброгенних медіаторів, розвиток мітохондріальної дисфункції, стрес ендоплазматичного ретикулума, формування проатерогенного метаболічного патерну [50; 174]. Одним із найбільш чутливих біохімічних маркерів розвитку фіброзу міокарду та предиктору дисфункції лівого шлуночка є галектин-3 [47]. Експериментально засвідчено, що постінфарктне ремоделювання міокарду супроводжується зростанням міокардіальної та сироваткової експресії галектину-3 [95; 198]. Нещодавно було показано, що інгібітори галектину-3 зменшують прояви оксидативного стресу та нейрозапалення у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом [255]. Діабет-асоційовані порушення біохімічних процесів спричиняють активацію проапоптичних сигнальних шляхів в кардіоміоцитах, які лежать в основі розвитку діабетичної кардіоміопатії [65; 240]. Вплив модуляторів системи H_2S на продукцію галектину-3 та цитометричні параметри міокарду за експериментального цукрового діабету остаточно не з'ясований.

В попередньому розділі роботи було показано, що за стрептозотоцин-індукованого діабету в серцево-судинній системі щурів відбуваються зміни в обміні H_2S – зменшується його загальний вміст в міокарді та аорті; знижується активність H_2S -синтезуючих ензимів, як ПАЛФ-залежних (ЦГЛ, ЦАТ), так і ПАЛФ-незалежних (ТСТ); сповільнюється мітохондріальна деградація H_2S та підвищується загальна швидкість утилізації сульфід-аніону. Метою даного розділу роботи було вивчити активність ПАЛФ-залежних та ПАЛФ-незалежних ензиматичних реакцій обміну H_2S , активність ензимів прооксидантної та

антиоксидантної систем, показники тіол-дисульфідного обміну, рівень сироваткової та міокардіальної експресії галектину-3, цитометричні маркери апоптозу та проліферативної активності міокарду щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом за умов введення модуляторів – пропаргілгліцину та натрій гідрогенсульфіду.

4.1 Вплив пропаргілгліцину та NaHS на обмін гідроген сульфідом та біохімічні показники стану міокарду щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом

Ключовим H_2S -синтезуючим ферментом в серцево-судинній системі вважається ЦГЛ, тому в дослідженні був використаний необоротний інгібітор цього ферменту D,L-пропаргілгліцин (50 мг/кг), а в якості донора H_2S застосовували NaHS (3 мг/кг). Модулятори обміну H_2S вводили з 3-ї по 28 добу в/оч у дозах, що не викликали загибелі тварин і використовуються у щурів в досліджах *in vivo*. NaHS вводили в умовно терапевтичній дозі, яка виявляла цитопротекторні, антиоксидантні та протизапальні властивості в інших дослідженнях *in vivo* у лабораторних щурів лінії Вістар [5; 15]. Тваринам контрольних підгруп вводили еквівалентні об'єми фізіологічного (0,15 М) розчину NaCl.

Спочатку ми оцінили вплив модуляторів обміну H_2S на вміст глюкози та Гліко-Нб в крові щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом. Встановлено, що введення пропаргілгліцину викликало більш виразні порушення обміну вуглеводів у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом. Так, у щурів 3-ої групи станом на 28 добу рівні глюкози та глікозильованого гемоглобіну в крові були статистично значуще вищими (12,9 % та 20,3 %), ніж у щурів 2-ої групи. У той же час, при введенні NaHS приріст рівня глюкози у щурів 4-ої групи був статистично значуще меншим (на 11,4 % та 21,6 %), ніж у щурів 2-ої групи та 3-ої групи, відповідно. Крім того, у щурів 4-ої групи рівень Гліко-Нб виявився статистично значуще нижчим (на 23,3%), ніж у щурів 3-ої групи.

Таблиця 4.1

Вплив пропаргілгліцину та NaHS на вміст глюкози та глікозильованого гемоглобіну в крові щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$)

| Показник | Групи щурів | | | |
|-------------------------------------|-------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | Контроль, n=10 | STZ-діабет, n=10 | STZ-діабет + ППГ, n=10 | STZ-діабет + NaHS, n=10 |
| | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-та |
| Глюкоза, ммоль/л | 4,39±0,21 | 20,1±0,67* | 22,7±0,94*# | 17,8±0,68*#§ |
| Гліко-Нб, мкмоль фруктози / г Нб | 3,75±0,20 | 8,48±0,25* | 10,2±0,50*# | 7,82±0,47*§ |

Примітки: 1. * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи;

2. # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи;

3. § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи.

Введення пропаргілгліцину та NaHS викликало протилежні зміни вмісту H_2S в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом (рис. 4.2). У щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом рівень H_2S в міокарді був статистично значуще нижчим (на 36,7 %), ніж в групі контролю ($2,21 \pm 0,17$ проти $3,49 \pm 0,17$ нмоль/ мг протеїну, $p < 0,05$).

Введення пропаргілгліцину викликало поглиблення стрептозотоцин-індукованого дефіциту H_2S в міокарді: цей показник у щурів 3-ої групи становив $1,56 \pm 0,13$ нмоль/ мг протеїну і був статистично значуще нижчим (на 29,4%, $p < 0,05$), ніж у щурів 2-ої групи. Введення NaHS запобігало зниженню рівня H_2S в міокарді у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом. Зокрема, у щурів 4-ої групи міокардіальний рівень H_2S становив $2,73 \pm 0,16$ нмоль/ мг протеїну і був статистично значуще вищим, ніж у щурів 2-ої (на 23,5 %, $p < 0,05$) та 3-ої груп ($75,0\%$, $p < 0,01$), відповідно.

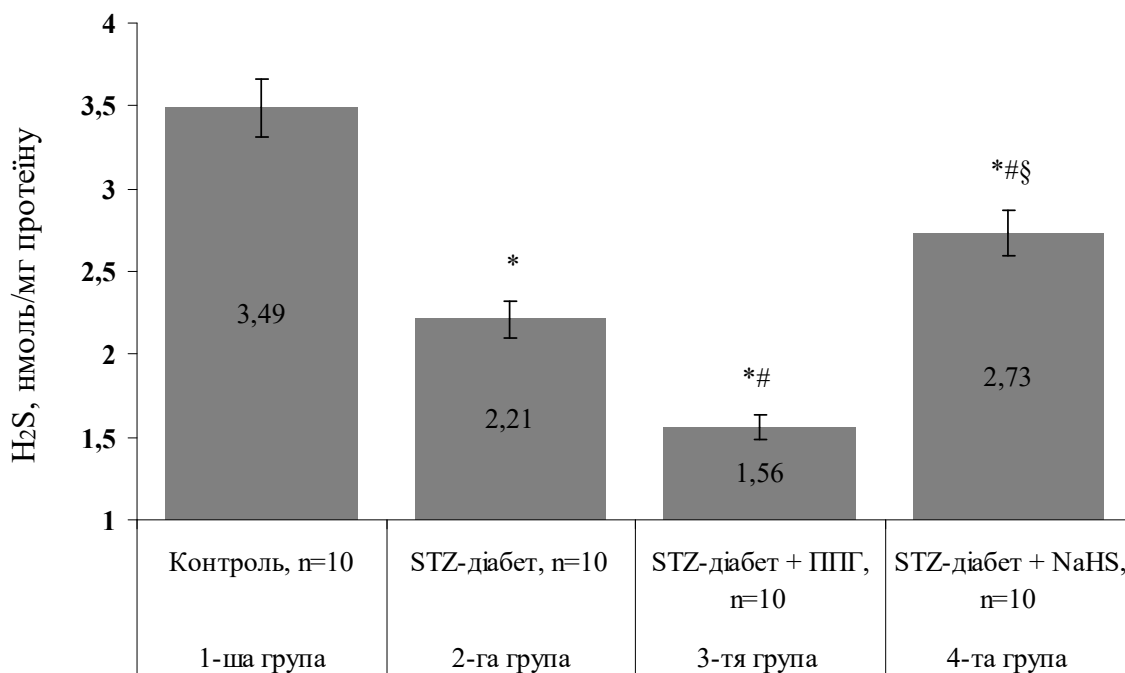


Рис. 4.2 Вплив пропаргілгліцину та NaHS на вміст H₂S в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом (M±m; * - p<0,05 відносно 1-ої групи; # - p<0,05 відносно 2-ої групи; § - p<0,05 відносно 3-ої групи).

Введення пропаргілгліцину викликало поглиблювало діабет-асоційоване зниження H₂S-продукуючої активності міокарду щурів, у той час як введення NaHS справляло протилежний ефект (табл. 4.2). Так, станом на 28 добу у щурів 2-ої групи активність ЦГЛ, ЦАТ та ТСТ в міокарді була статистично значуще нижчою, ніж в групі контролю (на 44,9 %, 31,5 % та 36,7 %, p<0,05). Введення пропаргілгліцину викликало у щурів 3-ої групи статистично значуще зниження активності ЦГЛ - на 35,9 % порівняно з 2-ою групою (p<0,05) і на 71,2 % порівняно з групою контролю (p<0,01), але не спричиняло додаткових змін активності ЦАТ та ТСТ в міокарді. Введення NaHS запобігало зниженню активності H₂S-продукуючих ензимів в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом: станом на 28 добу після введення стрептозотоцину міокардіальна активність ЦГЛ в 4-й групі була статистично значуще вищою, ніж в 3-й групі (на 219,5 %, p<0,01) та 2-й групі (на 104,7 %, p<0,01). В 4-й групі також реєструвалась більш

висока активність ЦАТ (на 20,9 % та 23,4 %) та ТСТ (на 43,5 % та 40,4 %), ніж в 2-й та 3-й групі, відповідно.

Таблиця 4.2

Вплив пропаргілгліцину та NaHS на активність H₂S-синтезуючих ензимів в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом (M±m)

| Активність ензиму, нмоль H ₂ S /хв·мг протеїну | Групи щурів | | | |
|---|----------------|------------------|------------------------|-------------------------|
| | Контроль, n=10 | STZ-діабет, n=10 | STZ-діабет + ППГ, n=10 | STZ-діабет + NaHS, n=10 |
| | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-та |
| ЦГЛ | 0,285±0,018 | 0,128±0,012* | 0,082±0,007** | 0,262±0,015 #§ |
| ЦАТ | 1,28±0,048 | 0,877±0,036* | 0,859±0,092* | 1,06±0,070 ** |
| ТСТ | 2,18±0,130 | 1,38±0,085* | 1,41±0,113* | 1,98±0,085 #§ |

Примітки: 1. * - p<0,05 відносно 1-ої групи;

2. # - p<0,05 відносно 2-ої групи;

3. § - p<0,05 відносно 3-ої групи.

Введення модуляторів обміну H₂S викликало статистично значущі зміни рівня експресії гена *CSE* в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом (рис. 4.3). Так, станом на 28 добу відносний рівень мРНК ЦГЛ / β-актину в міокарді щурів 3-ої групи, яким вводили пропаргілгліцин, був статистично значуще нижчим (на 3,58 рази, p < 0,001), ніж у щурів контрольної групи (0,0012 ± 0,0001 проти 0,0043 ± 0,0003 ум. од.), та нижчим (на 29,4 %, p < 0,05), ніж у щурів 2-ої групи. У той же час, введення NaHS запобігало діабет-асоційованому зниженню міокардіальної експресії гена *CSE* і у щурів 4-ої групи відносний рівень мРНК ЦГЛ / β-актину був статистично значуще вищим, ніж у щурів 2-ої групи (на 35,3 %, p < 0,05) та 3-ої групи (на 91,7 %, p < 0,01).

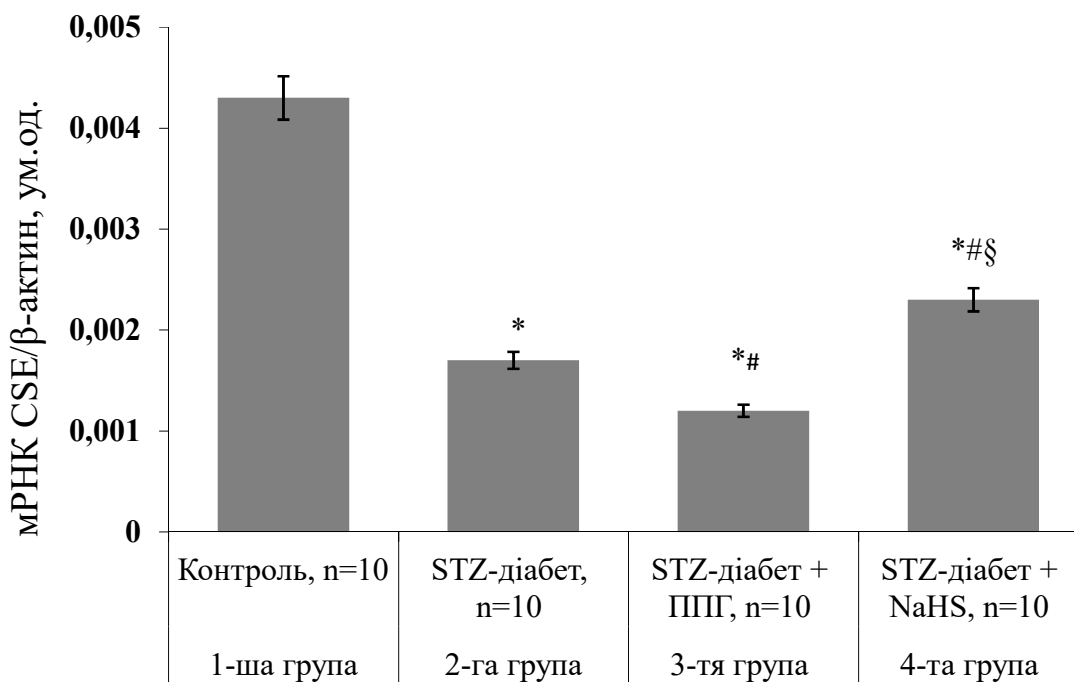


Рис. 4.3 Вплив пропаргілгліцину та NaHS на експресію гена *CSE* в міокарді щурів з стрептозотозин-індукованим діабетом ($M \pm m$). Експресія гена *CSE* в міокарді визначена відносно референтного гену β -актину (мРНК *CSE*/ β -актин)

Оцінка показників деградації H_2S засвідчила, що введення пропаргілгліцину не викликало додаткових змін активності сульфітоксидази у щурів із стрептозотозин-індукованим діабетом (табл. 4.3). Зокрема, у щурів 2-ої та 3-ої групи активність сульфітоксидази була нижчою на 35,7 % та 34,8 %, ніж у щурів контрольної групи ($p < 0,05$). У той же час, введення NaHS запобігало діабет-асоційованому зниженню активності сульфітоксидази – активність цього ензиму в 4-й групі була статистично значуще вищою (на 29,6 % та 27,7 %, $p < 0,05$), ніж в 2-й та 3-й групах.

Введення пропаргілгліцину також не викликало додаткових змін загальної швидкості утилізації H_2S в міокарді щурів із стрептозотозин-індукованим діабетом. Цей показник у щурів 2-ої та 3-ої групи виявився статистично значуще вищим, ніж в контрольній групі, на 80,0 % та 93,8 % ($p < 0,05$), відповідно. У той же час, введення NaHS викликало статистично значуще зниження міокардіальної швидкості утилізації H_2S : цей показник у

щурів 4-ої групи був нижчим (на 24,4 % та 29,8 %, $p < 0,05$), ніж у щурів 2-ої та 3-ої групи.

Таблиця 4.3

Вплив пропаргілгліцину та NaHS на активність сульфітоксидази та швидкість утилізації H_2S в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$)

| Показник | Групи щурів | | | |
|---|-------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | Контроль, n=10 | STZ-діабет, n=10 | STZ-діабет + ППГ, n=10 | STZ-діабет + NaHS, n=10 |
| | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-та |
| Сульфітоксидаза, нмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ / хв·мг протеїну | 5,26±0,32 | 3,38±0,29* | 3,43±0,33* | 4,38±0,21 ^{#§} |
| Швидкість утилізації H_2S , нмоль S^{2-} /хв·мг протеїну | 0,662±0,045 | 1,192±0,075* | 1,283±0,068* | 0,901±0,068 ^{#§} |

Примітки: 1. * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи;

2. # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи;

3. § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи.

Одним із важливих етапів обміну H_2S є участь у підтримці тіол-дисульфідного балансу та депонування у складі персульфідів та полісульфідів у мітохондріях за участі тіоредоксинредуктази та системи глутатіону. Тому на наступному етапі було досліджено вплив модуляторів обміну H_2S на показники тіол-дисульфідного обміну в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом (табл. 4.4). Встановлено, що станом на 28 добу після введення стрептозотоцину в міокарді щурів реєструвалось зниження активності тіоредоксинредуктази (на 38,8 %, $p < 0,01$), знижувався вміст SH-груп (на 38,1%, $p < 0,01$), підвищувався рівень S-S-груп (на 46,9 %, $p < 0,01$) і суттєво знижувався тіол-дисульфідний коефіцієнт (на 58,2 %, $p < 0,005$). Введення пропаргілгліцину поглиблювало діабет-асоційовані порушення тіол-

дисульфідного обміну, зокрема активність тіоредоксинредуктази, рівень SH-груп та тіол-дисульфідний коефіцієнт у щурів 3-ої групи виявились нижчими, ніж в контролі на 51,6 %, 42,3 % та 65,1 % ($p < 0,001$). Натомість, введення NaHS зменшувало розвиток порушень тіол-дисульфідної рівноваги у міокарді – активність тіоредоксинредуктази, рівень SH-груп та тіол-дисульфідний коефіцієнт у щурів 4-ої групи виявились вищими, ніж у щурів 2-ої групи (на 46,6 %, 26,0 % та 61,8 %, $p < 0,05$) та щурів 3-ої групи (на 81,7 %, 42,6 % та 93,8 %, $p < 0,05$).

Таблиця 4.4

Вплив пропаргілгліцину та NaHS на показники тіол-дисульфідного обміну в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$)

| Показник | Групи щурів | | | |
|--|-------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | Контроль, n=10 | STZ-діабет, n=10 | STZ-діабет + ППГ, n=10 | STZ-діабет + NaHS, n=10 |
| | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-та |
| Тіоредоксин- редуктаза, нмоль DTNB / хв·мг протеїну | 5,31±0,45 | 3,25±0,26* | 2,57±0,38* | 4,67±0,35 ^{#§} |
| SH-групи, нмоль/ мг протеїну | 22,3±0,95 | 13,8±0,45* | 12,2±0,52 ^{*#} | 17,4±1,11 ^{*#§} |
| S-S-групи, нмоль/ мг протеїну | 9,87±0,46 | 14,5±0,53* | 15,6±0,67* | 11,7±0,63 ^{*#§} |
| ТДК (SH- / S-S-) | 2,32±0,18 | 0,97±0,07* | 0,81±0,07* | 1,57±0,19 ^{*#§} |

Примітки: 1. * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи;

2. # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи;

3. § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи;

4. ТДК – тіол-дисульфідний коефіцієнт.

Станом на 28 добу після введення стрептозотоцину в міокарді щурів відмічалось посилення продукції супероксид-аніону, вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів, зниження антиоксидантної активності (табл. 4.5). Так, у щурів 2-ої групи в міокарді виявлялось статистично значуще більша активність NADPH-оксидази (на 110 %, $p<0,01$), вищий вміст МДА та карбонільних груп протеїнів (на 79,9 та 113,7 %, $p<0,01$), натомість нижча активність СОД (на 28,1 %, $p<0,05$), ніж у щурів групи контролю.

Таблиця 4.5

Вплив пропаргілгліцину та NaHS на активність ензимів про- / антиоксидантної систем та маркери оксидативного стресу в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M\pm m$)

| Показник | Групи щурів | | | |
|--|-------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | Контроль, n=10 | STZ-діабет, n=10 | STZ-діабет + ППГ, n=10 | STZ-діабет + NaHS, n=10 |
| | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-та |
| NADPH-оксидаза, нмоль / хв·мг протеїну | 0,98±0,05 | 2,06±0,14 * | 2,62±0,08 ** | 1,28±0,11 **§ |
| СОД, ум.од. / мг протеїну | 3,67±0,19 | 2,64±0,19* | 2,06±0,14** | 3,07±0,18 *§ |
| МДА, мкмоль / мг протеїну | 2,49±0,24 | 4,48±0,23* | 5,12±0,24** | 3,23±0,19**§ |
| Карбонільні групи, нмоль/мг протеїну | 0,58±0,05 | 1,24±0,05* | 1,45±0,10* | 0,71±0,02**§ |

Примітки: 1. * - $p<0,05$ відносно 1-ої групи;

2. # - $p<0,05$ відносно 2-ої групи;

3. § - $p<0,05$ відносно 3-ої групи.

Введення пропаргілгліцину суттєво поглиблювало ознаки оксидативного стресу в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом: у щурів 3-ої

групи активність NADPH-оксидази та вміст МДА були статистично значуще вищими (на 27,2 % та 14,3 %, $p < 0,05$), а активність СОД – нижчою (на 21,9 %, $p < 0,05$), ніж у щурів 2-ої групи. Введення NaHS зменшувало виразність оксидативного стресу в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом, зокрема стримувало зростання активності NADPH-оксидази, зменшувало ознаки пероксидації ліпідів та протеїнів, запобігало падінню активності СОД.

Таким чином, введення пропаргілгліцину суттєво поглиблювало діабет-асоційовані порушення різних етапів обміну H_2S в міокарді (зі зниженням активності мітохондріальних ензимів – сульфітоксидази та тіоредоксинредуктази), пригнічувало експресію гена *CSE*, потенціювало розвиток оксидативного стресу. У той же час, введення NaHS запобігало розвитку вказаних порушень і сприяло збереженню редокс-статусу протеїнів в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом.

4.2 Вплив пропаргілгліцину та NaHS на рівень галектину-3 в сироватці крові та міокарді у щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету

На наступному етапі ми дослідили вплив модуляторів обміну H_2S на рівень галектину-3 в сироватці крові та міокарді щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом. Існують переконливі докази, що галектин-3 залучений до регуляції клітинної адгезії, проліферації та диференціації клітин, апоптозу, запалення, імунного гомеостазу, туморогенезу [111]. Зокрема, галектин-3 стимулює синтез профіброгенних та прозапальних медіаторів [62]; проліферацію та трансформацію фібробластів та міофібробластів [108], активує колагеногенез та фіброгенез в міокарді та інших органах [139], бере участь в ангіогенезі та імунозапальній активації ендотелію [96].

Встановлено, що на 28 добу у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом сироватковий рівень галектину-3 виявився статистично значуще вищим (в 3,54 рази, $p < 0,001$), ніж в контролі: $10,7 \pm 0,56$ проти $3,02 \pm 0,28$ нг/мл (рис. 4.4). Введення пропаргілгліцину потенціювало діабет-індуковане

зростання рівня галектину-3, зокрема у щурів 3-ої групи цей показник становив $16,6 \pm 1,28$ нг/мл і був статично значуще вищим в 5,5 рази ($p < 0,001$), ніж в контролі та в 1,55 рази вищим ($p < 0,01$), ніж в у щурів 2-ої групи. Введення NaHS стримувало стрептозотоцин-індуковане підвищення рівня галектину-3 в сироватці крові. Так, у щурів 4-ої групи цей показник становив $8,33 \pm 0,54$ нг/мл, що було статистично значуще нижчим (в 1,28 та 2,0 рази, $p < 0,05$), ніж у щурів 2-ої та 3-ої групи. Слід зауважити, що введення NaHS не дозволило повністю нормалізувати сироватковий рівень галектину-3, оскільки цей показник у щурів 2-ої групи виявився статистично значуще вищим (в 2,76 рази, $p < 0,05$), ніж в контролі.

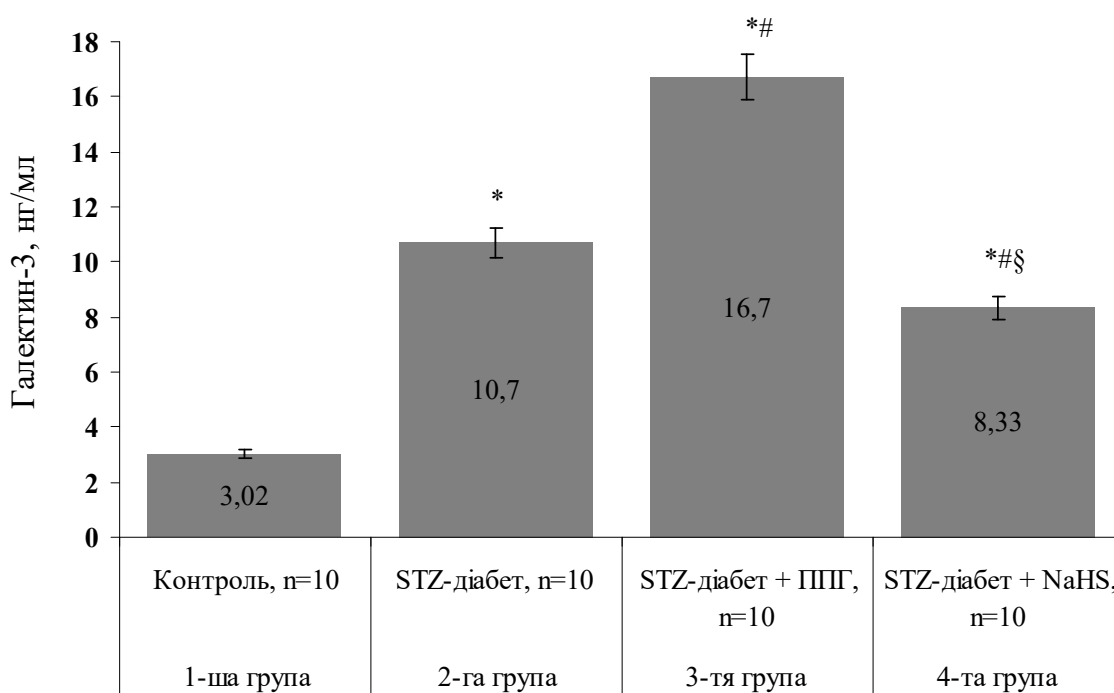


Рис. 4.4 Вплив пропаргілгліцину та NaHS на рівень галектину-3 в сироватці крові щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$; * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи 1; # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи 2; § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи).

Дослідження рівня галектину-3 в міокарді засвідчило аналогічні закономірності (рис. 4.5). У щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом міокардіальний рівень галектину-3 був вищим в 4,98 рази ($p < 0,001$), ніж у щурів

групи контролю. Введення пропаргілгліцину викликало більш виразне зростання експресії цього профіброгенного медіатору в міокарді на тлі стрептозотоцин-індукованого діабету, в той час як введення NaHS справляло протилежний ефект. Так, у щурів 3-ої групи рівень галектину-3 в міокарді був статистично значуще вищим (в 1,78 рази, $p < 0,01$), а у щурів 4-ої групи, навпаки, нижчим (в 2,39 рази, $p < 0,01$), ніж у щурів 2-ої групи.

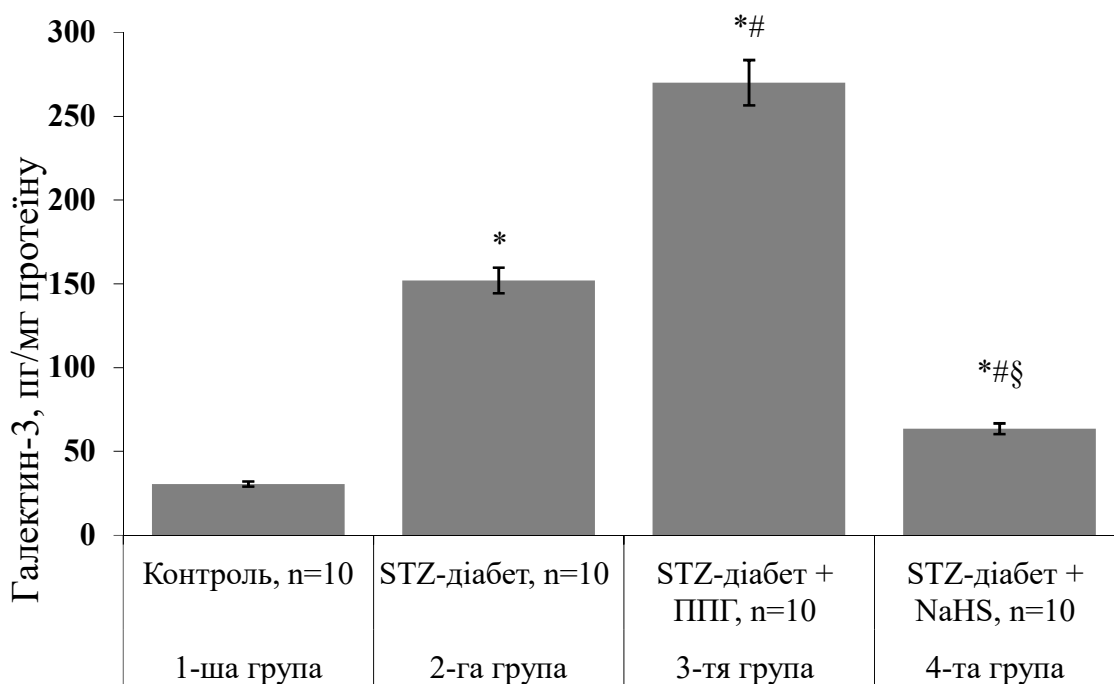


Рис. 4.5 Вплив пропаргілгліцину та NaHS на рівень галектину-3 в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$; * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи 1; # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи 2; § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи).

Кореляційний аналіз показав, що за умов стрептозотоцин-індукованого діабету між рівнем глюкози в крові та сироватковим рівнем галектину-3 виявлявся прямий зв'язок: $r = 0,67$, $p < 0,05$ (рис. 4.6 А). За стрептозотоцин-індукованого діабету більш сильні статистично значущі обернені зв'язки виявлялись між рівнем H_2S в міокарді та рівнем галектину-3 в сироватці крові: $r = 0,75$, $p < 0,05$ (рис. 4.6 Б) і в міокарді $r = -0,80$, $p < 0,01$ (рис. 4.7).

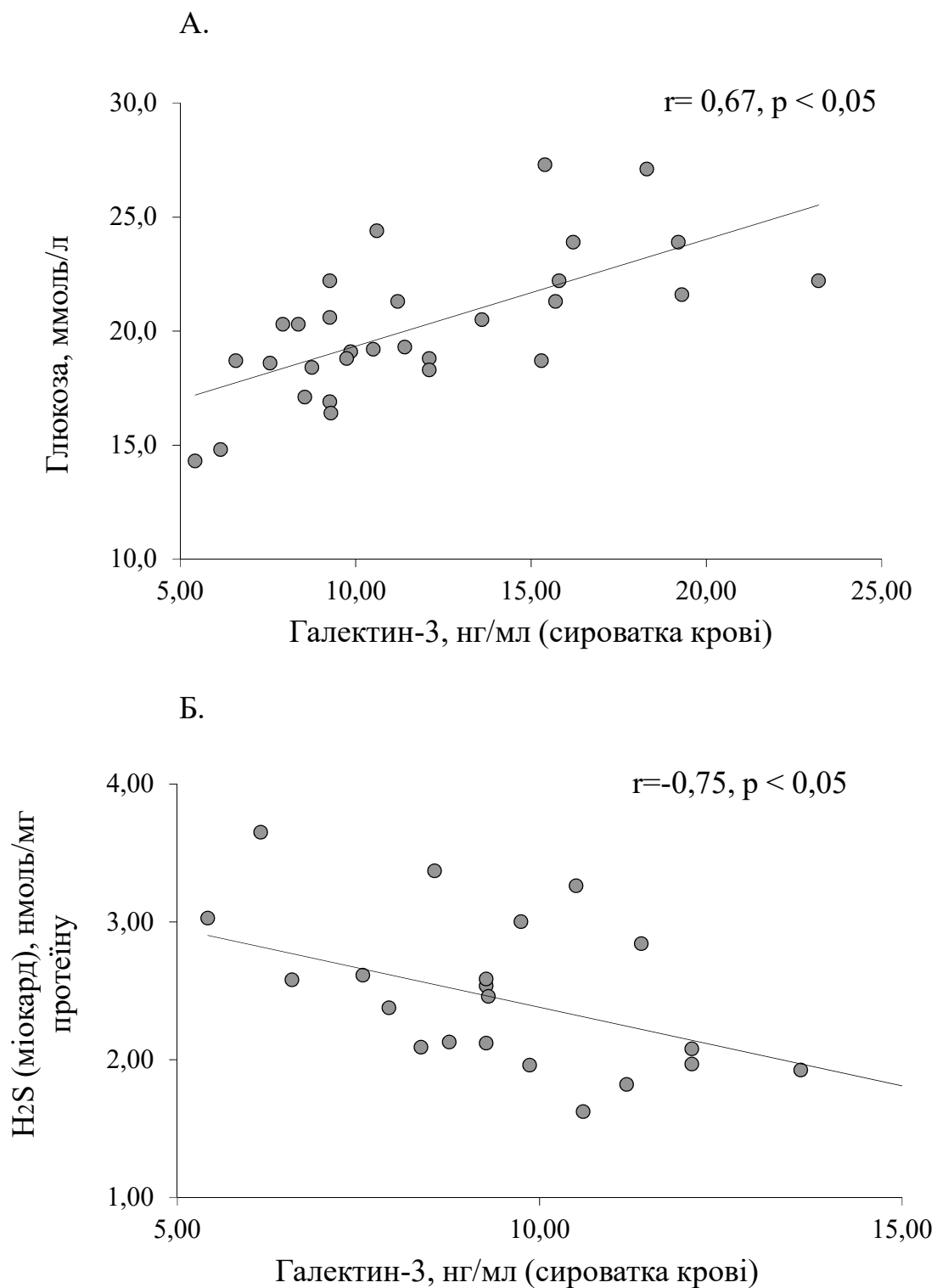


Рис. 4.6 Кореляційні зв'язки між рівнем галектину-3 в сироватці крові та рівнем глюкози (А) і рівнем H₂S в міокарді (Б) у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом (n=30).

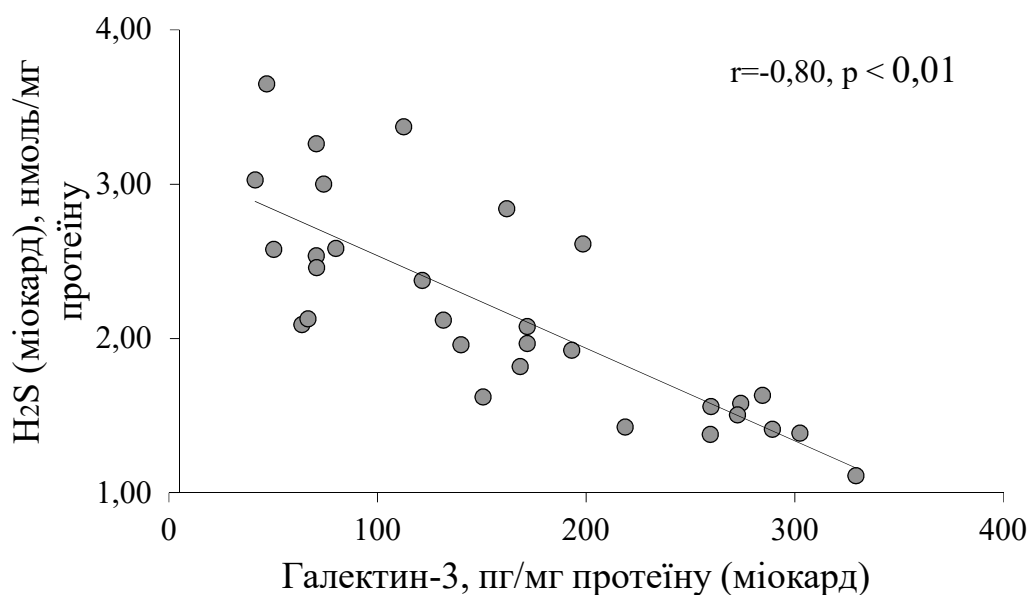


Рис. 4.7 Кореляційний зв'язок між рівнем галектину-3 (міокард) та рівнем H₂S (міокард) у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом (n=30).

Таким чином, пригнічення синтезу H₂S потенціює діабет-індуковане підвищення експресії галектину-3 в міокарді, що може активувати процеси фіброгенезу і стимулювати розвиток діабетичної кардіоміопатії.

4.3 Вплив пропаргілгліцину та NaHS на показники клітинного циклу в міокарді щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом

На наступному етапі було проведено аналіз впливу модуляторів обміну H₂S на показники клітинного циклу в міокарді щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом. Встановлено (табл. 4.5), що станом на 28 добу після індукції діабету стрептозотоцином в ядерній суспензії клітин міокарду щурів реєструвалось підвищення відносної кількості клітин у фазі S синтезу ДНК (ядра із вмістом ДНК > 2с і < 4с) та фазі G₂+M (із вмістом ДНК 4с) на 29,9 % та 32,1 % (p < 0,05) та зменшення кількості клітин у фазі G₀G₁ (з 95,6±0,19 до 94,2±0,11 %, p < 0,05) порівняно з показниками групи контролю. Також у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом спостерігалось підвищення відносної

кількості клітин в ділянці SUB-G0G1 (із ознаками фрагментації ДНК) на 11,5 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

Введення пропаргілгліцину посилювало діабет-асоційовані зміни клітинного циклу в міокарді щурів, зокрема у щурів 3-ої групи відносна кількість клітин у фазах S була вища на 88,7 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. В міокарді щурів 3-ої групи кількість клітин в інтервалі SUB-G0G1 була статистично значуще вища на 27,4 % ($p < 0,05$), ніж в контролі та вища на 14,4 % ($p < 0,05$), ніж в 2-й групі. Введення NaHS стримувало розвиток діабет-асоційованих змін клітинного циклу в міокарді щурів, зокрема в 4-й групі кількість клітин у фазах S, G2+M та інтервалі SUB-G0G1 була статистично значуще менша на 26,2, 17,4 та 12,3 %, ніж в 2-й групі ($p < 0,05$). Крім того, у щурів 4-ої групи відносна кількість клітин у фазі S та інтервалі SUB-G0G1 виявилась статистично значуще нижчою на 49,2 та 23,4 %, ніж у щурів 3-ої групи ($p < 0,01$), відповідно. На рис. 4.8 – 4.11 представлені типові приклади ДНК-гістограм ядерних суспензій клітин міокарда щурів контрольної та дослідних груп.

Виявлені зміни цитометричних показників свідчать, що за умов стрептозотоцин-індукованого діабету відбувається підвищення проліферативної активності клітин міокарду, що здебільшого реалізується за рахунок сполучнотканинних елементів, а також посилюються процеси апоптичної загибелі клітин міокарду. Інгібування продукції H_2S за участі ЦГЛ при введенні пропаргілгліцину посилює цитометричні ознаки апоптозу та проліферативну активність клітин міокарду, у той час як введення NaHS справляє протилежний ефект.

Кореляційний аналіз засвідчив, що за стрептозотоцин-індукованого діабету між відносною кількістю клітин у фазі S та інтервалі SUB-G0G1 та рівнем H_2S в міокарді виявлялись статистично значущі обернені зв'язки середньої сили ($r = -0,54$ та $-0,55$, $p < 0,05$). Натомість між вказаними цитометричними маркерами проліферації та апоптозу та рівнем галектину-3 в міокарді реєструвались прямі кореляції ($r = 0,58$ та $0,62$, $p < 0,05$).

Таблиця 4.5

Вплив пропаргілгліцину та NaHS на показники клітинного циклу в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом (M±m)

| Показники клітинного циклу | Групи щурів | | | |
|----------------------------|---------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|
| | Контроль, n=5 | STZ-діабет, n=5 | STZ-діабет + ППГ, n=5 | STZ-діабет + NaHS, n=5 |
| | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-та |
| G0G1, % | 95,6±0,19 | 94,2±0,11* | 93,8±0,40* | 95,3±0,25 [#] |
| S, % | 0,97±0,04 | 1,26±0,07* | 1,83±0,31* | 0,93±0,08 ^{#§} |
| G2+M, % | 3,43±0,16 | 4,53±0,09* | 4,38±0,21* | 3,74±0,26 [#] |
| SUB-G0G1, % | 13,1±0,34 | 14,6±0,46* | 16,7±0,51 ^{*#} | 12,8±0,53 ^{#§} |

Примітки: 1. * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи;

2. # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи;

3. § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи.

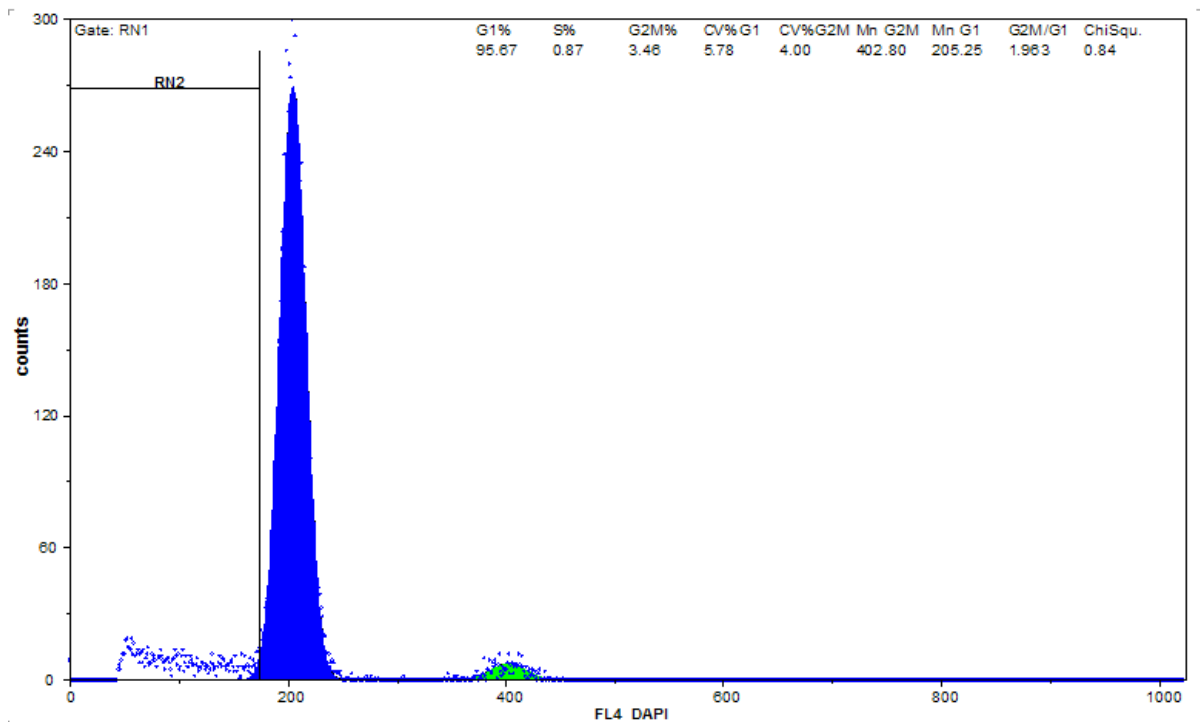


Рис. 4.8 ДНК-гістограми ядерних суспензій клітин міокарду щурів в групі контролю (28 доба, приклад типового дослідження). Показник RN2 (SUB-G0G1, фрагментація ДНК) = 13,1 %.

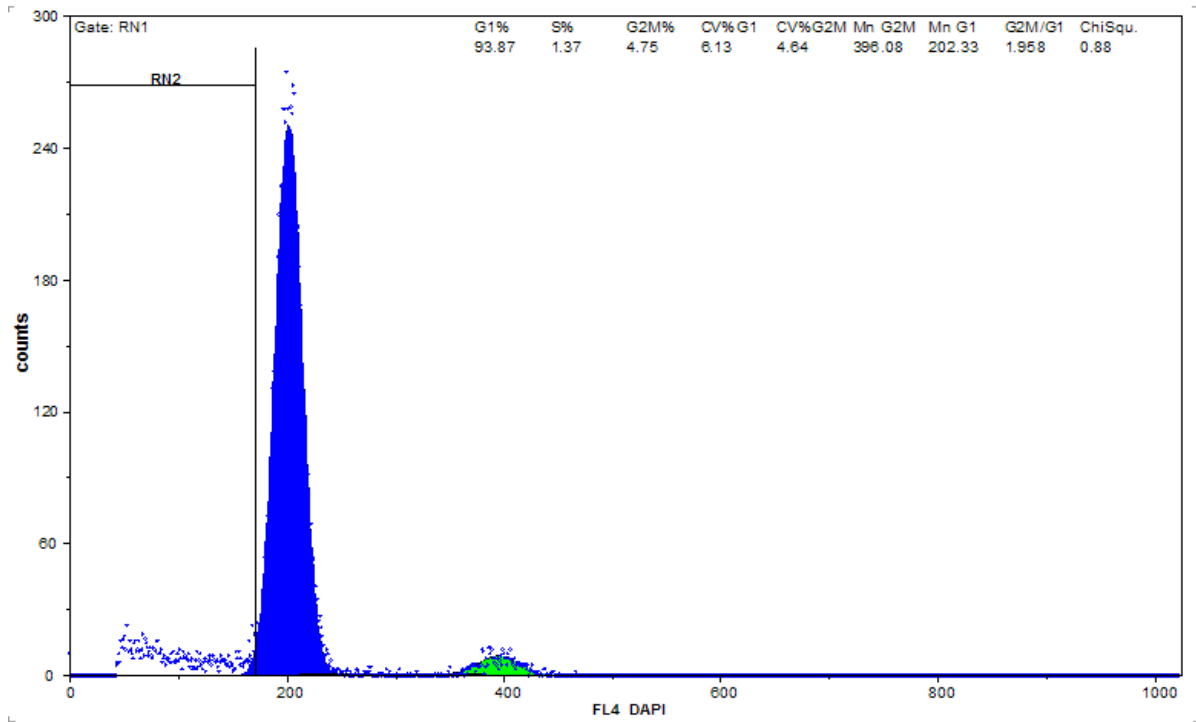


Рис. 4.9 ДНК-гістограма ядерних суспензій клітин міокарду щурів з стрептозотонін-індукованим діабетом (28 доба, приклад типового дослідження). Показник RN2 (SUB-G0G1, фрагментація ДНК) = 14,6 %.

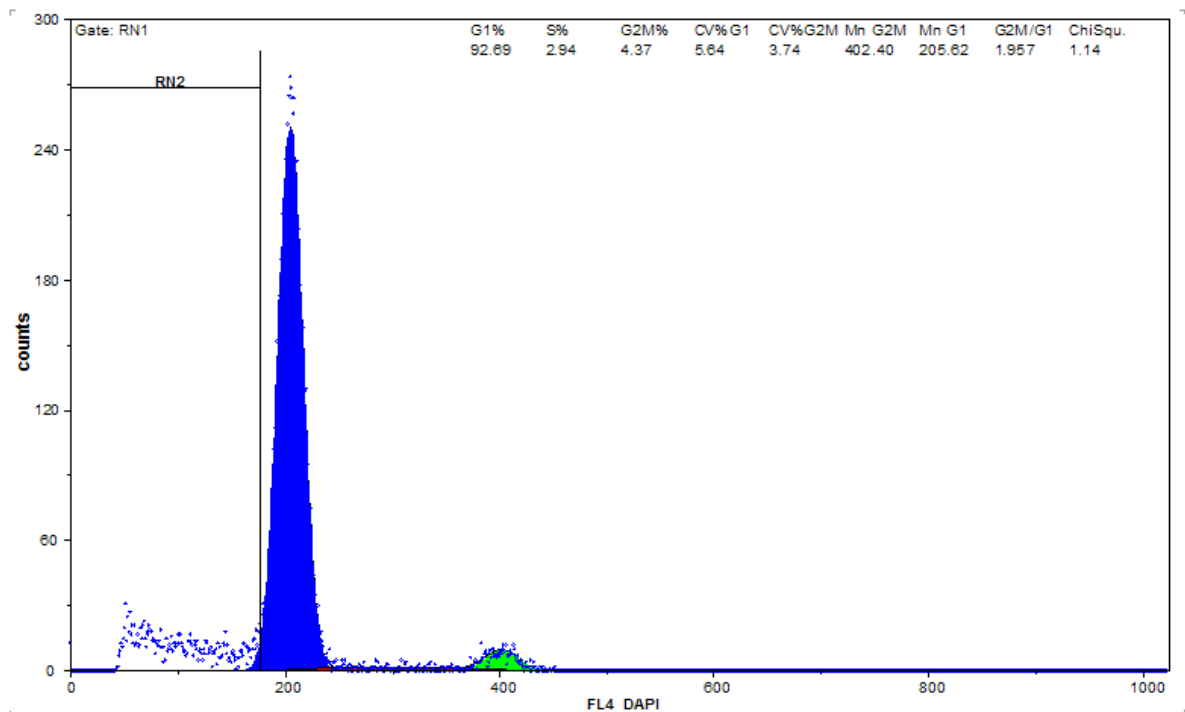


Рис. 4.10 ДНК-гістограма ядерних суспензій клітин міокарду щурів із стрептозотонін-індукованим діабетом + пропаргілгліцин (28 доба, приклад типового дослідження). Показник RN2 (SUB-G0G1, фрагментація ДНК) = 16,7%.

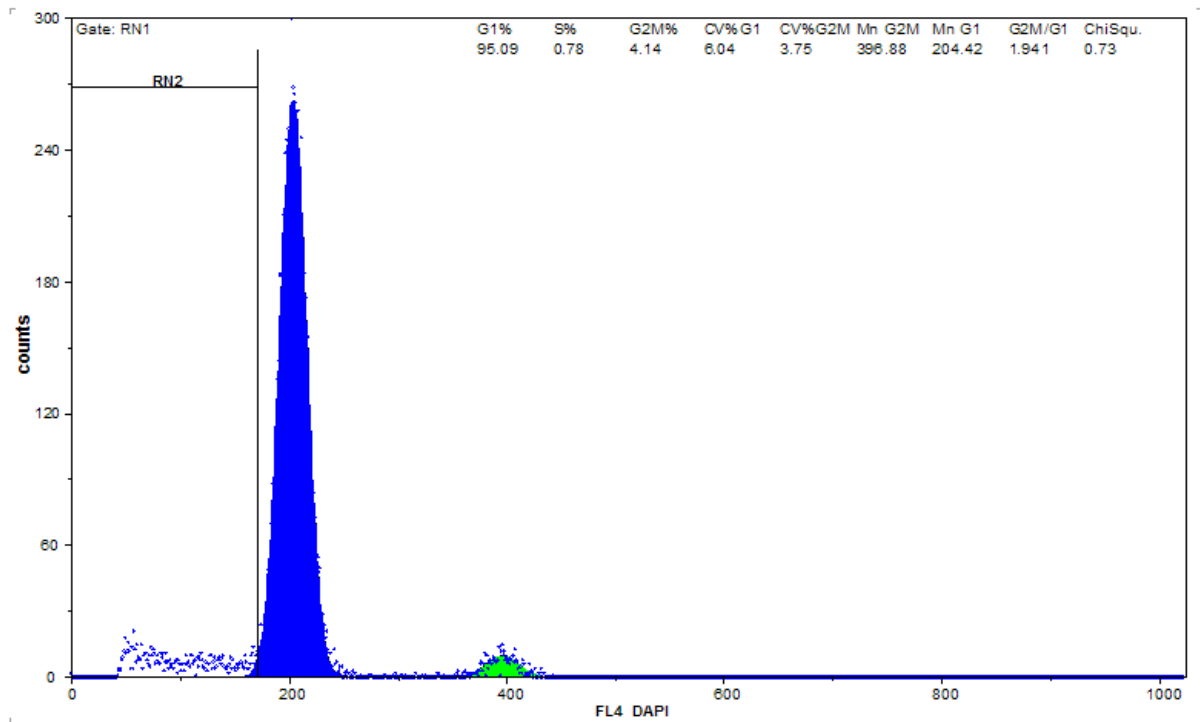


Рис. 4.11 ДНК-гістограма ядерних суспензій клітин міокарду щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом + NaHS (28 доба, приклад типового дослідження). Показник RN2 (SUB-G0G1, фрагментація ДНК) = 12,8 %.

Дослідження відносної маси серця та маси лівого шлуночка не виявило істотних відмінностей між показниками у щурів в групі контролю та у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом станом на 28 добу дослідження (рис. 4.12). У той же час, введення пропаргілгліцину викликало статистично значуще збільшення відносної маси серця (на 18,7 %, $p < 0,05$) та маси лівого шлуночка (на 30,0 %, $p < 0,05$) порівняно з контрольною групою. Введення NaHS не викликало суттєвих змін відносної маси серця та маси лівого шлуночка у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом: в 4-й групі вказані показники суттєво не відрізнялись від таких в групі контролю і були статистично значуще нижчими (на 20,3 та 24,0%, $p < 0,05$), ніж у щурів 3-ої групи, відповідно.

Таким чином, тривале введення пропаргілгліцину поглиблювало розлади клітинного циклу (підвищувало проліферативну активність, посилювало апоптоз) в міокарді щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету, що створювало передумови для розвитку діабетичної кардіоміопатії.

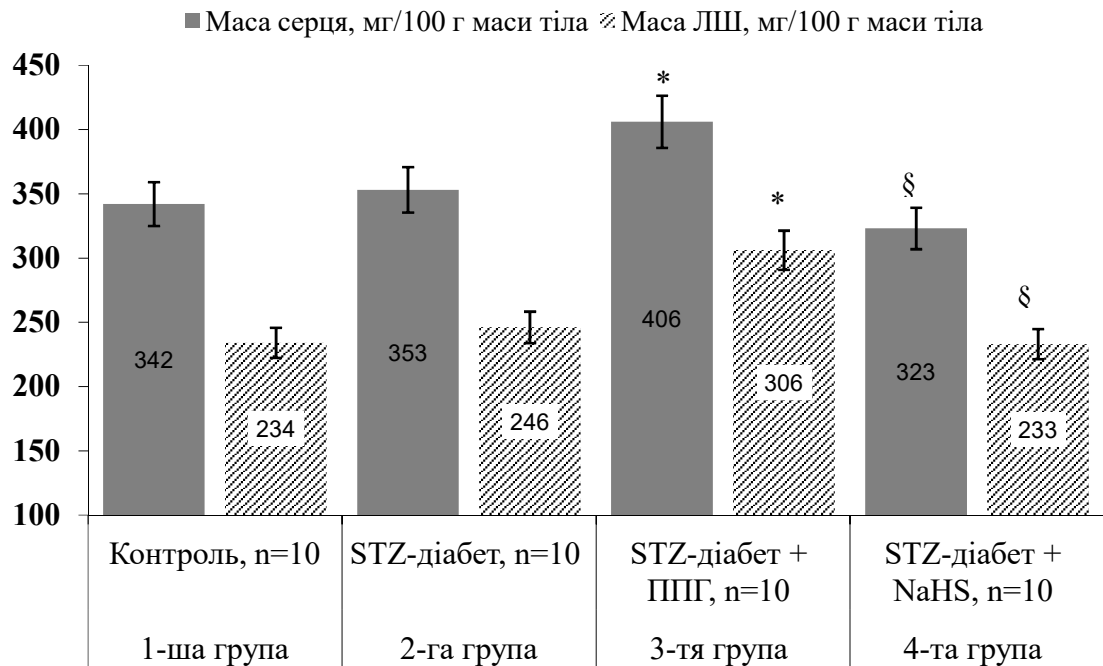


Рис. 4.12 Вплив пропаргілгліцину та NaHS на масу серця та масу міокарду лівого шлуночка (ЛШ) щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$; * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи 1; # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи 2; § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи).

4.4 Вплив пропаргілгліцину та NaHS на стан системи H_2S / ЦГЛ та скоротливість аорти у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом

На наступному етапі був проведений аналіз впливу модуляторів обміну H_2S на показники стану грудної аорти щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом. У щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом рівень H_2S в аорті виявився статистично значуще нижчим (на 31,0 %, $p < 0,05$), ніж в групі контролю (табл. 4.6). Введення пропаргілгліцину викликало поглиблення стрептозотоцин-індукованого дефіциту H_2S в аорті: цей показник у щурів 3-ої групи був статистично значуще нижчим (на 55,9 %, $p < 0,05$), ніж у щурів 2-ої групи. Введення NaHS запобігало зниженню рівня H_2S в аорті у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом. Так, у щурів 4-ої групи рівень H_2S в аорті був

статистично значуще вищим, ніж у щурів 2-ої (на 23,6 %, $p<0,05$) та 3-ої групи (180 %, $p<0,01$), відповідно.

Станом на 28 добу у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом активність ЦГЛ в аорті була статистично значуще нижчою, ніж в групі контролю (на 38,9 %, $p<0,05$). Введення пропаргілгліцину поглиблювало діабет-асоційоване зниження H_2S -продукуючої активності аорти щурів, у той час як введення NaHS справляло протилежний ефект. Зокрема, у щурів 3-ої групи реєструвалось статистично значуще зниження активності ЦГЛ - на 31,8 % порівняно з 2-ою групою ($p<0,05$) і на 58,3 % порівняно з групою контролю ($p<0,01$). Введення NaHS запобігало зниженню активності ЦГЛ в аорті у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом: станом на 28 добу після введення стрептозотоцину активність цього ензиму в 4-й групі була статистично значуще вищою, ніж в 3-й групі (на 113 %, $p<0,01$) та 2-й групі (на 45,4 %, $p<0,05$).

Таблиця 4.6

Вплив пропаргілгліцину та NaHS на стан системи H_2S / ЦГЛ в аорті щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M\pm m$)

| Показник | Групи щурів | | | |
|---|-------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | Контроль, n=10 | STZ-діабет, n=10 | STZ-діабет + ППГ, n=10 | STZ-діабет + NaHS, n=10 |
| | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-та |
| H_2S (аорта), нмоль/мг протеїну | 1,84±0,08 | 1,27±0,05* | 0,56±0,05*# | 1,57±0,06*#§ |
| ЦГЛ, нмоль H_2S /хв·мг протеїну | 0,943±0,052 | 0,576±0,042* | 0,393±0,038*# | 0,838±0,044*#§ |

Примітки: 1. * - $p<0,05$ відносно 1-ої групи;

2. # - $p<0,05$ відносно 2-ої групи;

3. § - $p<0,05$ відносно 3-ої групи.

Введення модуляторів обміну H_2S викликало статистично значущі зміни рівня експресії гена *CSE* в аорті щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом (рис. 4.13). Станом на 28 добу відносний рівень мРНК ЦГЛ / β -актину в аорті щурів 2-ої групи був статистично значуще нижчим (на 72 %, $p < 0,001$), ніж у щурів контрольної групи. У щурів 3-ої групи із стрептозотоцин-індукованим діабетом, яким вводили пропаргілгліцин, відносний рівень мРНК ЦГЛ / β -актину був статистично значуще нижчим (на 84,3 %, $p < 0,001$), ніж у щурів контрольної групи, та нижчим (на 44,0 %, $p < 0,05$), ніж у щурів 2-ої групи. У той же час, введення $NaHS$ запобігало діабет-асоційованому зниженню судинної експресії гена *CSE* і у щурів 4-ої групи відносний рівень мРНК ЦГЛ / β -актину був статистично значуще вищим, ніж у щурів 2-ої групи (на 48,8 %, $p < 0,05$) та 3-ої групи (на 166 %, $p < 0,01$), відповідно.

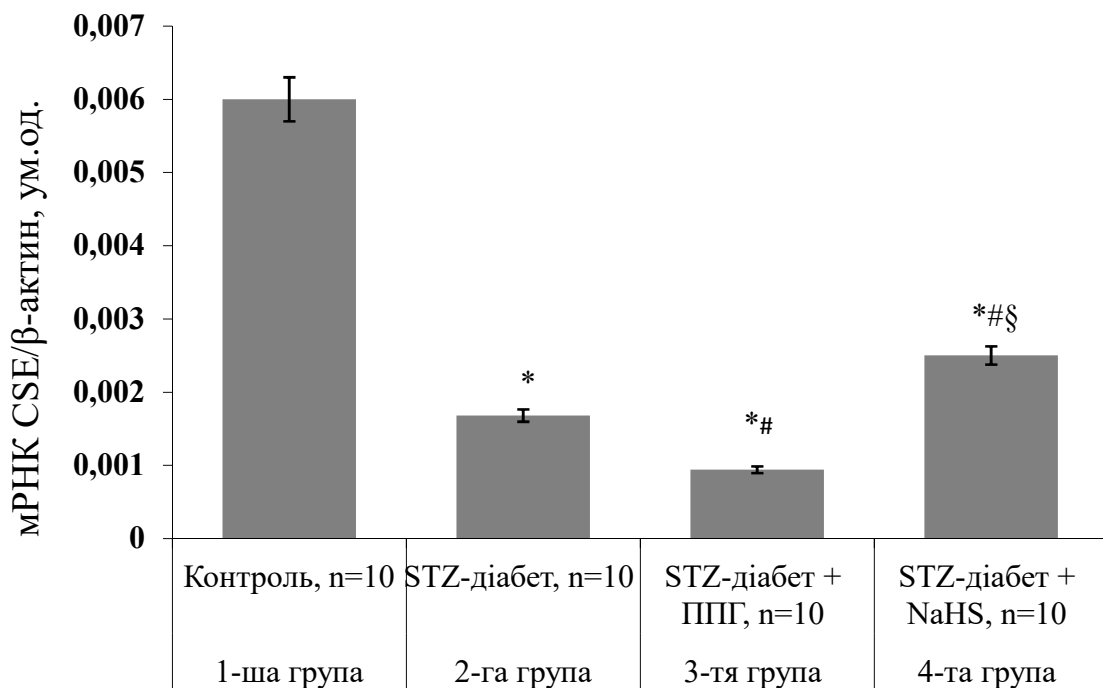


Рис. 4.13 Вплив пропаргілгліцину та $NaHS$ на експресію гена *CSE* в грудній аорті щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$). Експресія гена *CSE* в аорті визначена відносно референтного гену β -актину (мРНК *CSE* / β -актин)

На наступному етапі ми оцінили, як впливають модулятори системи H_2S / ЦГЛ на скоротливість аорти щурів за умов стрептозотоцин-індукованого діабету. Раніше нами було засвідчено, що у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом відмічається зниження (в 1,3-1,4 рази) інтенсивності релаксації ізольованих кільцевих фрагментів грудної аорти у присутності H_2S у концентраціях 10^{-6} - 10^{-3}M відносно контрольної групи ($p < 0,05$). У щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом EC_{50} H_2S була в 1,64 рази вищою, а крива «доза-ефект» зміщена праворуч по відношенню до такої у щурів контрольної групи.

Як показано на рис. 4.14, у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом, яким вводили пропаргілгліцин, реєструвалось ще більш значне зменшення чутливості судин до вазорелаксуючої дії H_2S : інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти, передскорочених фенілефрином, в присутності H_2S у концентраціях 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} М становила $3,53 \pm 0,47\%$; $6,10 \pm 0,49\%$; $14,8 \pm 0,51\%$; $37,4 \pm 1,56\%$; що за середніми величинами було менше на 32,1; 47,0; 51,2 та 32,9%, ніж показники групи контролю. Крива «доза-ефект» у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом, яким вводили пропаргілгліцин, зміщувалась праворуч відносно такої у дослідних щурів, яким не вводили модулятори. У щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом, яким вводили NaHS , показники розслаблення кільцевих фрагментів аорти, передскорочених фенілефрином, в присутності H_2S у концентраціях 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} М наближались до таких в контролі і становили $5,73 \pm 0,07\%$; $11,1 \pm 0,93\%$; $24,1 \pm 0,82\%$; $49,2 \pm 0,89\%$, відповідно. За умов введення NaHS крива «доза-ефект» зміщувалась ліворуч відносно кривої «доза-ефект» у щурів стрептозотоцин-індукованим діабетом, яким не вводили модулятори.

Аналіз середніх ефективних концентрацій засвідчив (рис. 4.15), що у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом, яким вводили пропаргілгліцин, EC_{50} H_2S становила $177 \pm 7,87$ мкМ і була статистично значуще вищою на 86,3%, ніж в контролі ($p < 0,05$) та на 13,5% вищою, ніж у піддослідних щурів, яким не вводили модулятори ($p > 0,05$). В той же час, у щурів, яким вводили NaHS , EC_{50}

H_2S для аорти становила $104 \pm 4,57$ мкМ і була статистично значуще нижчою на 33,3 та 41,2% ($p < 0,01$), ніж у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом, яким вводили пропаргілгліцин.

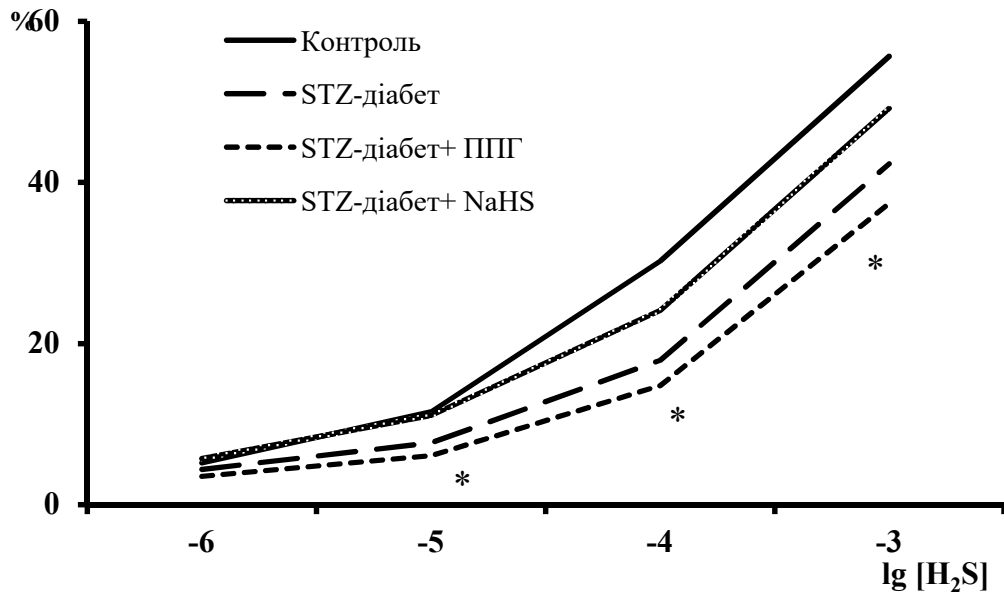


Рис. 4.14 Вплив пропаргілгліцину та NaHS на H_2S -стимульоване розслаблення кільцевих фрагментів аорти у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$, $n=5$). * - $p < 0,05$ відносно контролю.

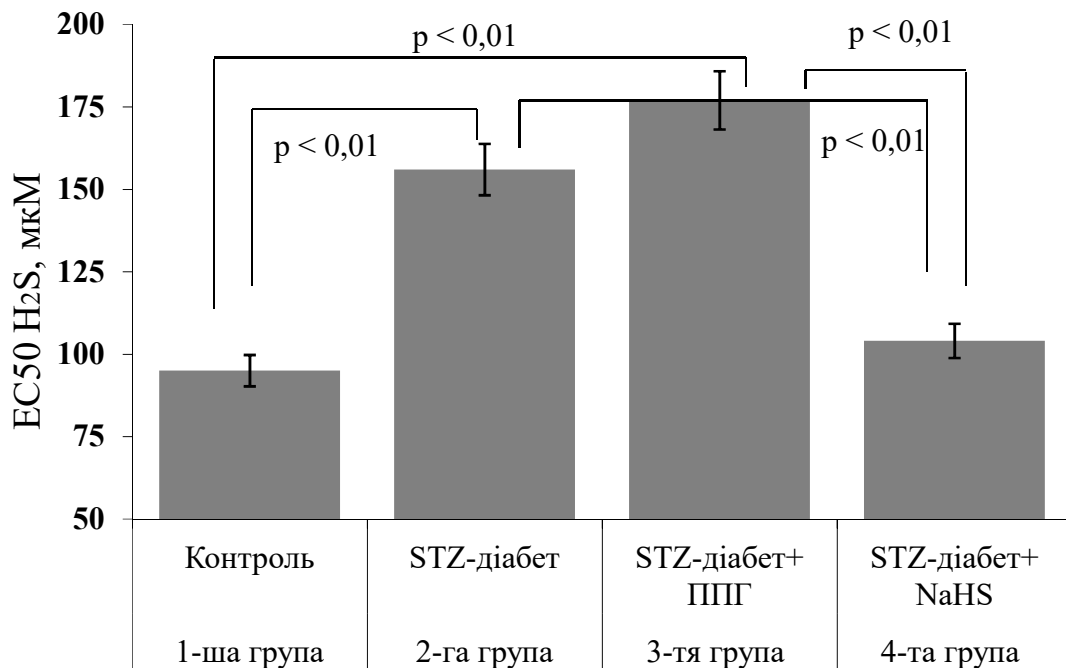


Рис. 4.15 Середні ефективні концентрації (EC_{50}) H_2S для аорти в групах щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом за умов введення пропаргілгліцину та NaHS ($M \pm m$, $n=5$).

Резюме. Підсумовуючи вищенаведені результати розділу, слід сказати, що вплив модуляторів обміну H_2S на стан міокарду та аорти щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом підтвердив, що зниження вмісту цього біологічно-активного метаболіту за дії пропаргілгліцину асоціюється з посиленням процесів вільно-радикального окиснення та зниженням антиоксидантного захисту (із підвищенням активності NADPH-редуктази, зниженням активності СОД); порушеннями тіол-дисульфідного обміну (із зменшенням активності тіоредоксинредуктази та зниженням тіол-дисульфідного коефіцієнту) та зниженням мітохондріальних етапів утилізації H_2S (за участі сульфітоксидази); підвищенням експресії профіброгенного та прозапального медіатора – галектину-3 в сироватці крові та міокарді; посиленням цитометричних ознак проліферації та апоптозу в міокарді; зниженням чутливості судин до вазорелаксуючої дії H_2S . NaHS зменшує виразність діабет-асоційованих змін показників системи H_2S , посилює експресію гена *CSE* в міокарді та аорті, відновлює активність сульфітоксидази та тіоредоксинредуктази, зменшує ознаки оксидативного стресу, запобігає зростанню рівня галектину-3 в сироватці крові та міокарді, проявляє вазопротекторний ефект у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом. Застосування NaHS в умовно терапевтичній дозі (3 мг/кг в/оч) не викликало додаткового підвищення рівня глікемії і стримувало зростання рівня Гліко-Нб у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом, у той час як введення пропаргілгліцину справляло протилежний ефект.

На наступному етапі дослідження був вивчений вплив антидіабетичного засобу метформіну та його поєднання з NaHS на показники системи H_2S у серцево-судинній системі щурів за умов стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях: [17; 29; 32; 34; 36; 37; 157; 166; 167; 172; 259; 261]

РОЗДІЛ 5
ВПЛИВ МЕТФОРМІНУ ТА ЙОГО ПОЄДНАННЯ З НАТРІЙ
ГІДРОГЕНСУЛЬФІДОМ НА РІВЕНЬ H_2S ТА АСОЦІЙОВАНІ БІОХІМІЧНІ
ПОРУШЕННЯ В СЕРЦЕВО-СУДИННІЙ СИСТЕМІ ЩУРІВ ІЗ
СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНИМ ДІАБЕТОМ

Результати попередніх розділів роботи засвідчили, що за умов експериментального цукрового діабету порушення обміну H_2S є чинником, який поглиблює діабет-асоційовані зміни в серцево-судинній системі: промотує розвиток оксидативного стресу та порушення тіол-дисульфідного обміну, підвищує експресію профібrogenного медіатора галектину-3, поглиблює цитометричні ознаки апоптозу та проліферативної активності в клітинах міокарду, зменшує вазорелаксацію. Корекція обміну H_2S в серцево-судинній системі може стримувати розвиток діабетичної кардіоміопатії і пошук засобів з таким фармакологічним ефектом залишається актуальним. Одним із відомих антидіабетичних засобів з незалежним кардіопротекторним ефектом є метформін [78; 105; 148]. В дослідженні Wiliński B. et al. (2013) було показано, що метформін підвищує рівень ендogenous H_2S в органах здорових мишей [235], але вплив цього засобу на стан системи H_2S в серці та судинах за умов цукрового діабету залишається не визначеним. Існують дані, що H_2S може зменшувати глюкозо-стимульовану секрецію інсуліну та сприяти протекції бета-клітин підшлункової залози при цукровому діабеті 2 типу [165]. Не виключено, що донори H_2S можуть модифікувати антидіабетичний ефект метформіну.

Метою цього розділу роботи було дослідити вплив метформіну та його поєднання з натрій гідрогенсульфідом ($NaHS$) на вміст H_2S , активність H_2S -синтезуючих ензимів та асоційовані біохімічні порушення в міокарді та аорті щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету.

5.1 Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на обмін гідроген сульфідів та біохімічні показники стану міокарду щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом

Спочатку ми оцінили вплив метформіну та його поєднання з NaHS на вміст глюкози та Гліко-Нб в крові щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом. Зауважимо, що метформін застосовували в дозі 500 мг/кг в/шл та NaHS у дозі 3 мг/кг в/оч (з 3-ої по 28 добу після ініціації стрептозотоцин-індукованого діабету). Результати наших досліджень засвідчили, що введення метформіну викликало зниження рівня глюкози та Гліко-Нб в крові у тварин із стрептозотоцин-індукованим діабетом (табл. 5.1). Так, у щурів 3-ої групи станом на 28 добу рівні глюкози та глікозильованого гемоглобіну в крові були статистично значуще нижчими (на 27,1 % та 10,7 %, $p < 0,05$), ніж у щурів 2-ої групи.

Таблиця 5.1

Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на вміст глюкози та глікозильованого гемоглобіну в крові щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом (M±m)

| Показник | Групи щурів | | | |
|--|-------------------|---------------------|------------------------------------|--|
| | Контроль, n=10 | STZ-діабет, n=10 | STZ-діабет + метформін, n=10 | STZ-діабет + метформін + NaHS, n=10 |
| | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-та |
| Глюкоза, ммоль/л | 4,26±0,22 | 19,5±0,46* | 14,2±0,53*# | 12,0±0,32*#§ |
| Гліко-Нб, мкмоль фруктози / г Нб | 3,97±0,28 | 8,71±0,32* | 7,78±0,42*# | 5,01±0,35*#§ |

Примітки: 1. * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи;

2. # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи;

3. § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи.

Введення NaHS не погіршувало гіпоглікемічний ефект метформіну і навіть сприяло більш ефективному контролю глікемії за умов стрептозотоцин-індукованого діабету: рівень глюкози та Гліко-Нв у щурів 4-ої групи був статистично значуще нижчим (на 38,4 % та 42,5 %, $p < 0,05$), ніж у щурів 2-ої групи та нижчим (на 15,5 % та 35,6 %, $p < 0,05$), ніж у щурів 3-ої групи, відповідно.

Встановлено, що введення метформіну зменшувало ознаки стрептозотоцин-індукованого дефіциту H_2S в міокарді. Так, у щурів 3-ої групи рівень H_2S був статистично значуще вищим (на 28,6%), ніж у щурів 2-ої групи ($2,61 \pm 0,08$ проти $2,03 \pm 0,09$ нмоль/ мг протеїну, $p < 0,05$). Введення метформіну разом з NaHS більш ефективно стримувало діабет-асоційоване падіння рівня H_2S в міокарді: у щурів 4-ої групи цей показник становив $3,01 \pm 0,13$ нмоль/ мг протеїну і був статистично значуще вищим, ніж у щурів 2-ої (на 48,3 %, $p < 0,05$) та 3-ої груп (15,3%, $p < 0,05$), відповідно.

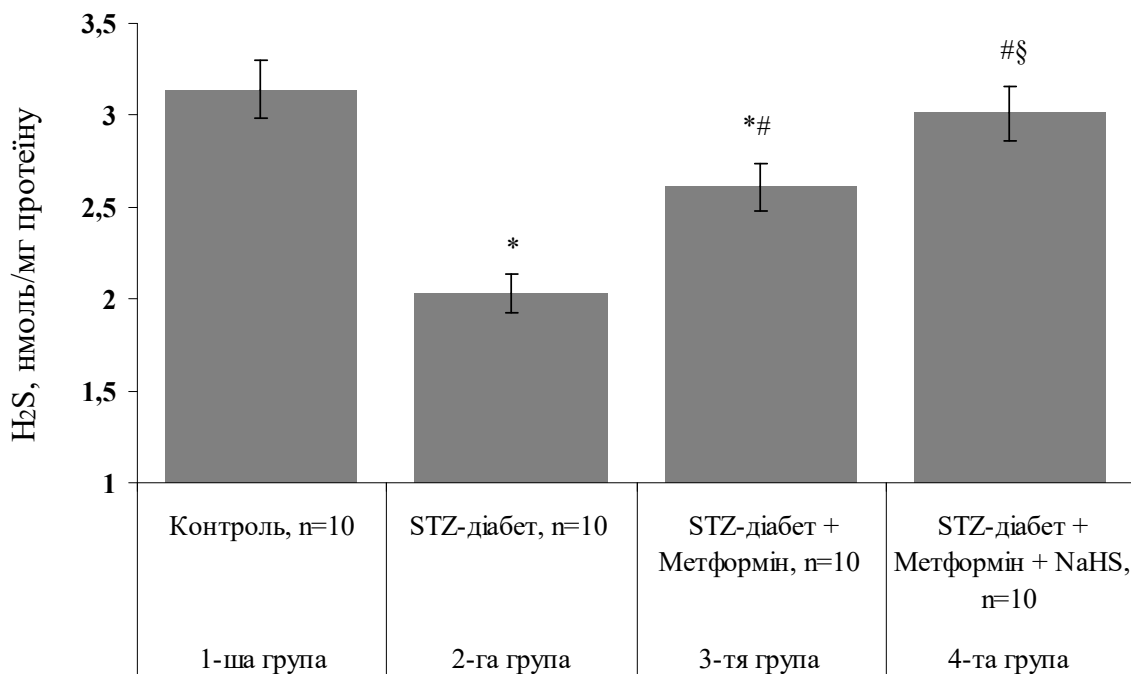


Рис. 5.1 Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на вміст H_2S в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$; * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи 1; # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи 2; § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи).

Введення метформіну достовірно зменшувало діабет-асоційоване зниження H_2S -продукуючої активності міокарду щурів (табл. 5.2). Так, станом на 28 добу у щурів 3-ої групи активність ЦГЛ та ТСТ в міокарді була статистично значуще вищою, ніж у щурів 2-ої групи (на 58,0 % та 15,3 %, $p < 0,05$). Введення метформіну у поєднанні з NaHS більш ефективно відновлювало активність H_2S -продукуючих ензимів в міокарді: станом на 28 добу активність ЦГЛ в 4-й групі була статистично значуще вищою, ніж в 2-й групі (на 109,5 %, $p < 0,01$) та 3-й групі (на 32,6 %, $p < 0,01$). В 4-й групі також реєструвалась більш висока активність ЦАТ (на 29,7 % та 23,4 %) та ТСТ (на 43,1% та 24,1 %), ніж в 2-й та 3-й групі, відповідно.

Таблиця 5.2

Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на активність H_2S -синтезуючих ензимів в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$)

| Активність ензиму, нмоль H_2S /хв·мг протеїну | Групи щурів | | | |
|---|----------------|------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| | Контроль, n=10 | STZ-діабет, n=10 | STZ-діабет + метформін, n=10 | STZ-діабет + метформін + NaHS, n=10 |
| | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-га |
| ЦГЛ | 0,298±0,014 | 0,136±0,009* | 0,215±0,011*# | 0,285±0,013 #§ |
| ЦАТ | 1,23±0,050 | 0,894±0,028* | 0,940±0,038* | 1,16±0,067 #§ |
| ТСТ | 2,14±0,087 | 1,37±0,036* | 1,58±0,059*# | 1,96±0,082 #§ |

Примітки: 1. * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи;

2. # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи;

3. § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи.

Введення метформіну не викликало статистично значущих змін рівня експресії гена *CSE* в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом (рис. 5.2). Так, станом на 28 добу відносний рівень мРНК ЦГЛ / β -актину в

міокарді щурів 2-ої групи та 3-ої групи становив $0,0017 \pm 0,0002$ та $0,0018 \pm 0,0002$ ум. од. ($p > 0,5$), відповідно. У той же час, введення метформіну у комбінації з NaHS запобігало діабет-асоційованому зниженню міокардіальної експресії гена *CSE* і у щурів 4-ої групи відносний рівень мРНК ЦГЛ / β -актину становив $0,0028 \pm 0,0003$ ум. од. і був статистично значуще вищим, ніж у щурів 2-ої та 3-ої груп (на 64,7 та 55,6 %, $p < 0,05$).

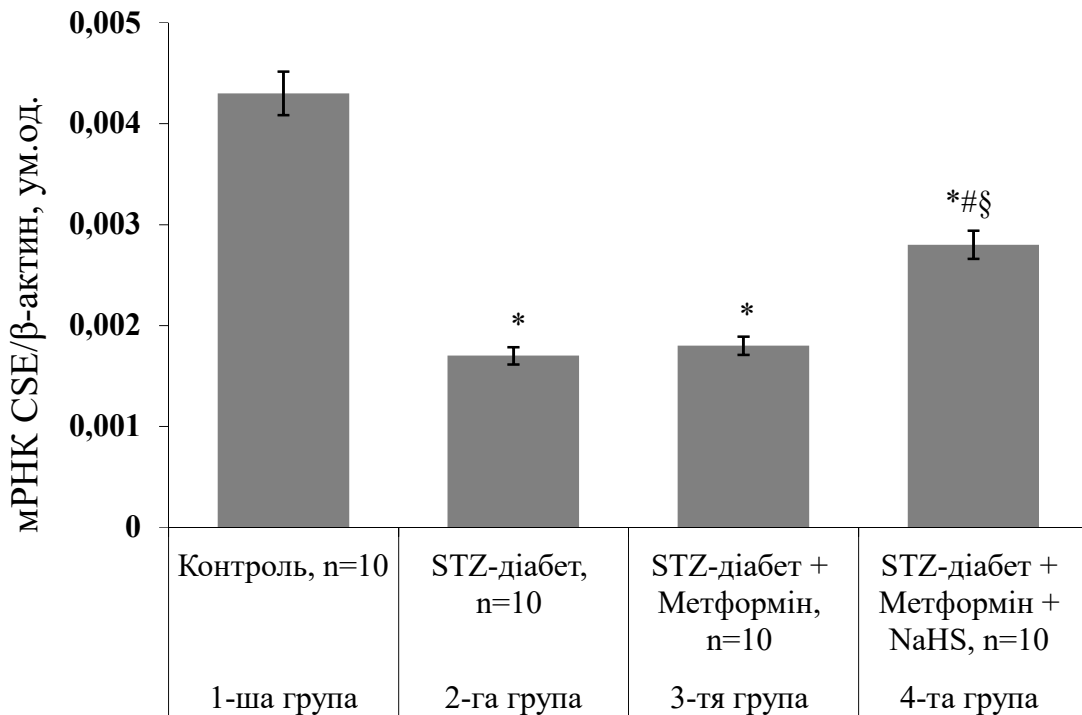


Рис. 5.2 Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на експресію гена *CSE* в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$; * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи 1; # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи 2; § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи). Експресія гена *CSE* в міокарді визначена відносно референтного гену β -актину (мРНК *CSE* / β -актин).

Оцінка показників деградації H_2S засвідчила, що введення метформіну суттєво не впливало на активність сульфітоксидази в міокарді щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом (табл. 5.3). Так, у щурів 2-ої та 3-ої групи активність цього ензиму була нижчою на 38,8 % та 31,1 %, ніж у щурів контрольної групи ($p < 0,05$). У той же час, введення метформіну у комбінації з NaHS запобігало діабет-асоційованому зниженню активності сульфітоксидази:

цей показник в 4-й групі виявився статистично значуще вищим (на 42,6 % та 26,7 %, $p < 0,05$), ніж в 2-й та 3-й групах.

Введення метформіну викликало достовірне зменшення загальної швидкості утилізації H_2S в міокарді щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом. Цей показник у щурів 3-ої групи виявився нижчим (на 22,4 %, $p < 0,05$), ніж в 2-й групі, відповідно. У той же час, введення метформіну у комбінації з NaHS викликало ще більш значуще зниження міокардіальної швидкості утилізації H_2S : цей показник у щурів 4-ої групи був нижчим (на 34,5% та 15,6 %, $p < 0,05$), ніж у щурів 2-ої та 3-ої групи, відповідно.

Таблиця 5.3

Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на активність сульфатоксидази та швидкість утилізації H_2S в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$)

| Показник | Групи щурів | | | |
|---|-------------------|---------------------|------------------------------------|--|
| | Контроль, n=10 | STZ-діабет, n=10 | STZ-діабет + метформін, n=10 | STZ-діабет + метформін + NaHS, n=10 |
| | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-та |
| Сульфатоксидаза, нмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ / хв·мг протеїну | 5,33±0,33 | 3,26±0,24* | 3,67±0,28* | 4,65±0,27 #§ |
| Швидкість утилізації H_2S , нмоль S^{2-} /хв·мг протеїну | 0,671±0,043 | 1,168±0,039* | 0,906±0,030*# | 0,765±0,043 #§ |

Примітки: 1. * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи;

2. # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи;

3. § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи.

Раніше було показано, що станом на 28 добу після введення стрептозотоцину в міокарді щурів реєструвалось зниження активності тіоредоксинредуктази, знижувався вміст SH-груп, підвищувався рівень S-S-груп і суттєво знижувався тіол-дисульфідний коефіцієнт. Введення метформіну

достовірно зменшувало діабет-асоційовані порушення тіол-дисульфідного обміну: активність тіоредоксинредуктази, рівень SH-груп та тіол-дисульфідний коефіцієнт у щурів 3-ої групи виявились вищими, ніж у щурів 2-ої групи на 34,1 %, 16,1 % та 44,4 %, $p < 0,05$ (табл. 5.4). Поєднання метформіну з NaHS більш ефективно стримувало порушення тіол-дисульфідної рівноваги у міокарді, зокрема активність тіоредоксинредуктази, рівень SH-груп та тіол-дисульфідний коефіцієнт у щурів 4-ої групи виявились вищими, ніж у щурів 2-ої групи (на 59,5 %, 33,8 % та 96,7 %, $p < 0,05$) та щурів 3-ої групи (на 18,9 %, 15,2, % та 36,1 %, $p < 0,05$), відповідно.

Таблиця 5.4

Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на показники тіолдисульфідного обміну в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$)

| Показник | Групи щурів | | | |
|--|-------------------|---------------------|------------------------------------|--|
| | Контроль, n=10 | STZ-діабет, n=10 | STZ-діабет + метформін, n=10 | STZ-діабет + метформін + NaHS, n=10 |
| | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-та |
| Тіоредоксин- редуктаза, нмоль DTNB / хв·мг протеїну | 5,14±0,27 | 3,11±0,16* | 4,17±0,32*# | 4,96±0,21#§ |
| SH-групи, нмоль/ мг протеїну | 22,1±0,78 | 13,6±0,57* | 15,8±0,47*# | 18,2±0,95*#§ |
| S-S-групи, нмоль/ мг протеїну | 9,15±0,35 | 15,4±0,59* | 12,3±0,50*# | 10,6±0,51*#§ |
| ТДК (SH- / S-S-) | 2,47±0,17 | 0,90±0,06* | 1,30±0,06*# | 1,77±0,16*#§ |

Примітки: 1. * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи;

2. # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи;

3. § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи.

У попередньому розділі було показано, що в міокарді щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом виявлялось підвищення активності

NADPH-оксидази, зростання вмісту МДА та карбонільних груп протеїнів на тлі зниженої активності СОД, що свідчить про розвиток оксидативного стресу. Введення метформіну суттєво зменшувало вказані зміни в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом (табл. 5.5). Так, у щурів 3-ої групи активність NADPH-оксидази, вміст МДА та карбонільних груп протеїнів були статистично значуще нижчими (на 30,2 %, 21,9 % та 21,0 %, $p < 0,05$), ніж у щурів 2-ої групи.

Таблиця 5.5

Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на показники прооксидантної та антиоксидантної систем в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$)

| Показник | Групи щурів | | | |
|--|-------------------|---------------------|------------------------------------|--|
| | Контроль, n=10 | STZ-діабет, n=10 | STZ-діабет + метформін, n=10 | STZ-діабет + метформін + NaHS, n=10 |
| | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-та |
| NADPH-оксидаза, нмоль / хв·мг протеїну | 0,95±0,06 | 1,82±0,07* | 1,27±0,06 ^{**} | 1,03±0,04 ^{#§} |
| СОД, ум.од. / мг протеїну | 3,58±0,12 | 2,57±0,12* | 2,91±0,18* | 3,46±0,15 ^{#§} |
| МДА, мкмоль / мг протеїну | 2,67±0,25 | 4,34±0,17* | 3,39±0,21 ^{**} | 2,62±0,13 ^{#§} |
| Карбонільні групи, нмоль/мг протеїну | 0,62±0,03 | 1,19±0,04* | 0,94±0,03 ^{**} | 0,57±0,02 ^{#§} |

Примітки: 1. * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи;

2. # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи;

3. § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи.

Введення метформіну у поєднанні з NaHS більш ефективно зменшувало ознаки оксидативного стресу в міокарді за стрептозотоцин-індукованого

діабету. Зокрема, у щурів 4-ої групи активність NADPH-оксидази, рівень МДА та карбонільних груп були статистично значуще нижчими (на 18,9 %, 22,7 % та 39,4 %, $p < 0,05$), а активність СОД вищою (на 19,0 %%, $p < 0,05$), ніж у щурів 3-ої групи.

Таким чином, застосування метформіну у комбінації з NaHS порівняно з ізольованим застосуванням забезпечувало більш виразний гіпоглікемічний ефект і більш ефективно запобігало зниженню рівня H_2S в міокарді, підвищувало активність та експресію ЦГЛ, сприяло нормалізації процесів утилізації H_2S , зменшувало явища оксидативного стресу у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом.

5.2 Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на рівень галектину-3 в сироватці крові та міокарді у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом

На наступному етапі ми оцінити вплив метформіну та його поєднання з NaHS на експресію галектину-3 в сироватці крові та міокарді. Раніше нами було показано, що на 28 добу у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом реєструвалось зростання сироваткового рівня галектину-3 і при введенні інгібітору синтезу H_2S цей ефект посилювався, а при введенні NaHS зменшувався.

Результати цього експерименту засвідчили, що введення метформіну викликало тенденцію до зниження сироваткового рівня галектину-3 у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом, зокрема у щурів 3-ої групи цей показник був на 14,8 % нижчим, ніж у щурів 2-ої групи ($9,28 \pm 0,68$ нг/мл проти $10,9 \pm 0,51$ нг/мл, $p < 0,1$), відповідно. У той же час, введення метформіну у комбінації з NaHS ефективно забезпечувало зниження рівня галектину-3 в сироватці крові за умов діабету. У щурів 4-ої групи сироватковий рівень галектину-3 був статистично-значуще нижчим, ніж у щурів 2-ої та 3-ої групи

(на 42,6 % та 32,5 %, $p < 0,05$), хоча і залишився вищим ($6,26 \pm 1,02$ проти $2,85 \pm 0,32$ нг/мл, $p < 0,05$), ніж в контролі.

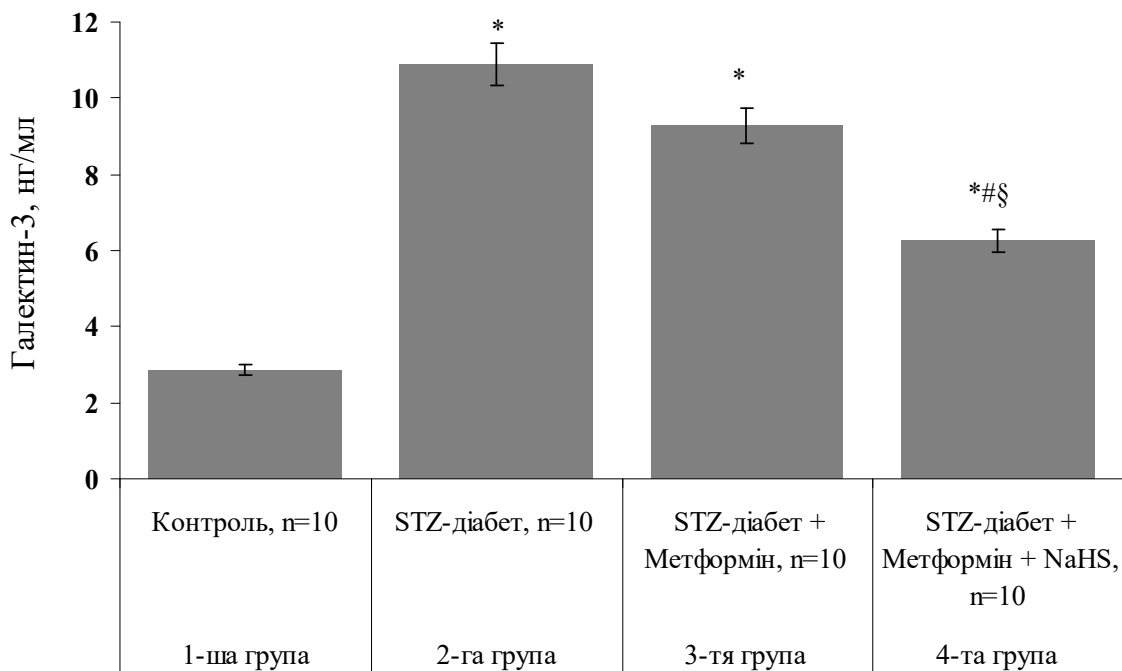


Рис. 5.4. Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на рівень галектину-3 в сироватці крові щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$; * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи; # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи; § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи).

Оцінка рівня галектину-3 в міокарді засвідчила, що введення метформіну і, особливо, його поєднання з NaHS, забезпечувало достовірне зниження міокардіальної експресії цього медіатора фіброгенезу за експериментального діабету (рис. 5.5). У щурів 3-ої групи, які отримували метформін, рівень галектину-3 в міокарді був статистично значуще нижчим (на 47,4 %, $p < 0,05$), ніж у нелікованих щурів 2-ої групи. У щурів 4-ої групи, які отримували метформін та NaHS, рівень галектину-3 в міокарді був на 63,6% ($p < 0,01$) нижчим, ніж у щурів 2-ої групи, та на 31,3 % ($p < 0,05$) нижчим, ніж у щурів 3-ої групи.

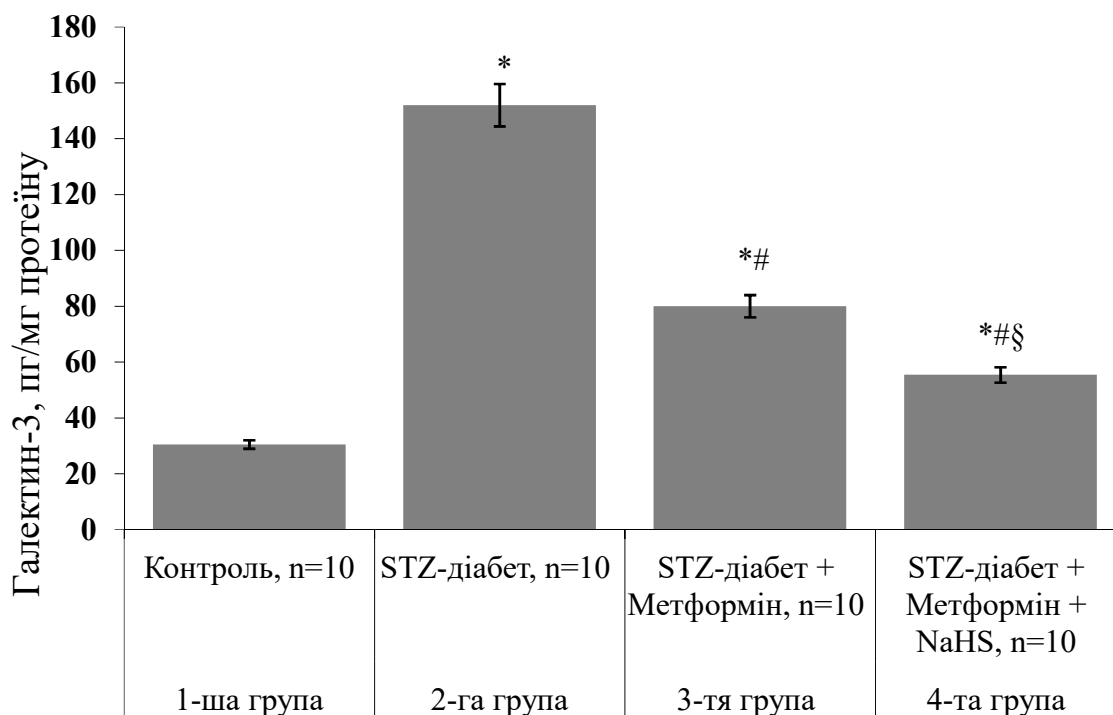


Рис. 5.5 Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на рівень галектину-3 в міокарді щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$; * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи 1; # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи 2; § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи).

Таким чином, поєднання метформіну з NaHS продемонструвало здатність коригувати сироваткову та міокардіальну експресію галектину-3 за умов експериментального діабету, що може мати антифіброгенний ефект і у перспективі запобігати розвитку діабетичної кардіоміопатії.

5.3 Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на стан системи H_2S / ЦГЛ в аорті у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом

На наступному етапі ми оцінили вплив метформіну та його поєднання з NaHS на показники стану грудної аорти щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом. Як було зазначено у попередніх розділах, за умов стрептозотоцин-індукованого діабету реєструвалось зниження рівня H_2S в аорті, змешувалась питома активність ЦГЛ та пригнічувалась експресія гена *CSE*. Встановлено, що введення метформіну запобігало формуванню стрептозотоцин-індукованого

дефіциту H_2S в аорті: цей показник у щурів 3-ої групи був статистично значуще нижчим (на 26,1 %, $p < 0,05$), ніж у щурів 2-ої групи. Введення метформіну у поєднанні з NaHS більш ефективно коригувало рівень H_2S в аорті у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом. Зокрема, у щурів 4-ої групи рівень H_2S в аорті був статистично значуще вищим, ніж у щурів 2-ої (на 46,8 %, $p < 0,05$) та 3-ої групи (16,4 %, $p < 0,05$), відповідно.

Введення метформіну запобігало діабет-асоційованому зниженню активності ЦГЛ в аорті: у щурів 3-ої групи активність цього ензиму була статистично значуще вищою на 32,9 % порівняно з 2-ою групою ($p < 0,05$). Введення метформіну у комбінації з NaHS більш ефективно запобігало зниженню активності ЦГЛ в аорті у щурів з діабетом: станом на 28 добу після введення стрептозотоцину активність цього ензиму в 4-й групі була статистично значуще вищою, ніж в 3-й групі (на 25,6 %, $p < 0,05$) та 2-й групі (на 66,9 %, $p < 0,01$).

Таблиця 5.7

Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на стан системи H_2S / ЦГЛ в аорті щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$)

| Показник | Групи щурів | | | |
|---|-------------------|---------------------|------------------------------------|--|
| | Контроль, n=10 | STZ-діабет, n=10 | STZ-діабет + метформін, n=10 | STZ-діабет + метформін + NaHS, n=10 |
| | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-та |
| H_2S (аорта), нмоль/мг протеїну | 1,54±0,07 | 1,11±0,04* | 1,40±0,05 # | 1,63±0,06 #§ |
| ЦГЛ, нмоль H_2S /хв·мг протеїну | 0,915±0,054 | 0,565±0,036* | 0,751±0,040*# | 0,943±0,035 #§ |

Примітки: 1. * - $p < 0,05$ відносно 1-ої групи;

2. # - $p < 0,05$ відносно 2-ої групи;

3. § - $p < 0,05$ відносно 3-ої групи.

Введення метформіну супроводжувалось підвищенням експресії гена *CSE* в аорті щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом: у щурів 3-ої групи відносний рівень мРНК ЦГЛ / β -актин був вищим на 64,7% ($p < 0,05$), ніж у щурів 2-ої групи (рис. 5.6). Ведення метформіну у поєднанні з NaHS викликало ще більш значуще підвищення судинної експресії гена *CSE*: у щурів 4-ої групи відносний рівень мРНК ЦГЛ / β -актин був вищим, ніж у щурів 2-ої групи (на 205,8 %, $p < 0,001$) та 3-ої групи (на 85,7 %, $p < 0,01$), відповідно.

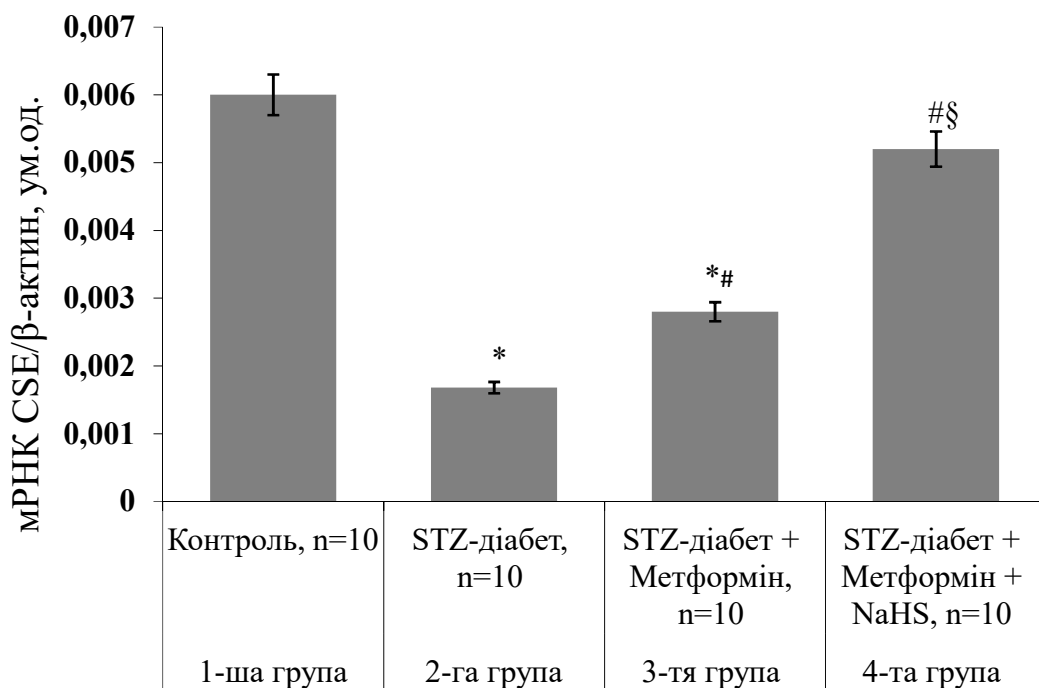


Рис. 5.6 Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на експресію гена *CSE* в грудній аорті щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$). Експресія гена *CSE* в аорті визначена відносно референтного гену β -актину (мРНК *CSE* / β -актин).

У попередніх розділах в стендових дослідженнях *in vitro* ми показали, що стрептозотоцин-індукований діабет спричиняє суттєві порушення в регуляції судинного тонуусу, про що свідчить зменшення чутливості ізольованих фрагментів аорти до дії вазодилататора H_2S . Тому, на наступному етапі, ми оцінили, чи впливає введення метформіну на функціональний стан судин, а саме

на чутливість ізольованих фрагментів аорти до вазодилатуючої дії H_2S , у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом (рис. 5.7, 5.8).

Застосування метформіну зменшувало негативний вплив стрептозотоцин-індукованого діабету на H_2S -індуковану релаксацію аорти: крива «доза-ефект» зміщувалась ліворуч відносно такої у тварин дослідної групи, які не отримували метформін, а також реєструвалось зниження EC_{50} H_2S (до $124 \pm 5,32$ мкМ). Введення NaHS щурам з стрептозотоцин-індукованим діабетом потенціювало вазопротективний ефект метформіну: зміщення кривої «доза-ефект» ліворуч було більш суттєвим, ніж у тварин з діабетом, які отримували лише метформін. EC_{50} H_2S у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом, які отримували метформін та NaHS, наближалась до такої у щурів контрольної групи і становила $97,7 \pm 6,44$ мкМ.

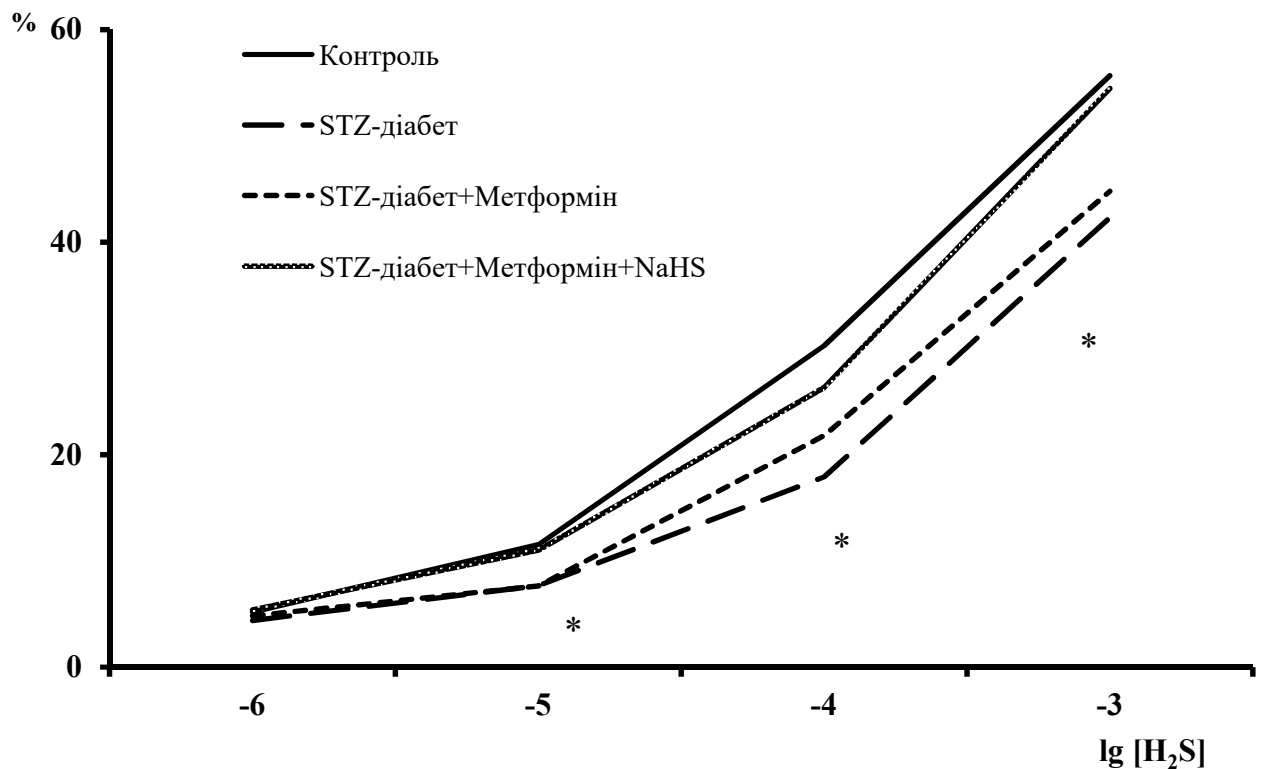


Рис. 5.7 Вплив метформіну та його поєднання з NaHS на H_2S -стимульоване розслаблення кільцевих фрагментів аорти у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ($M \pm m$, $n=5$). * - $p < 0,05$ відносно контролю.

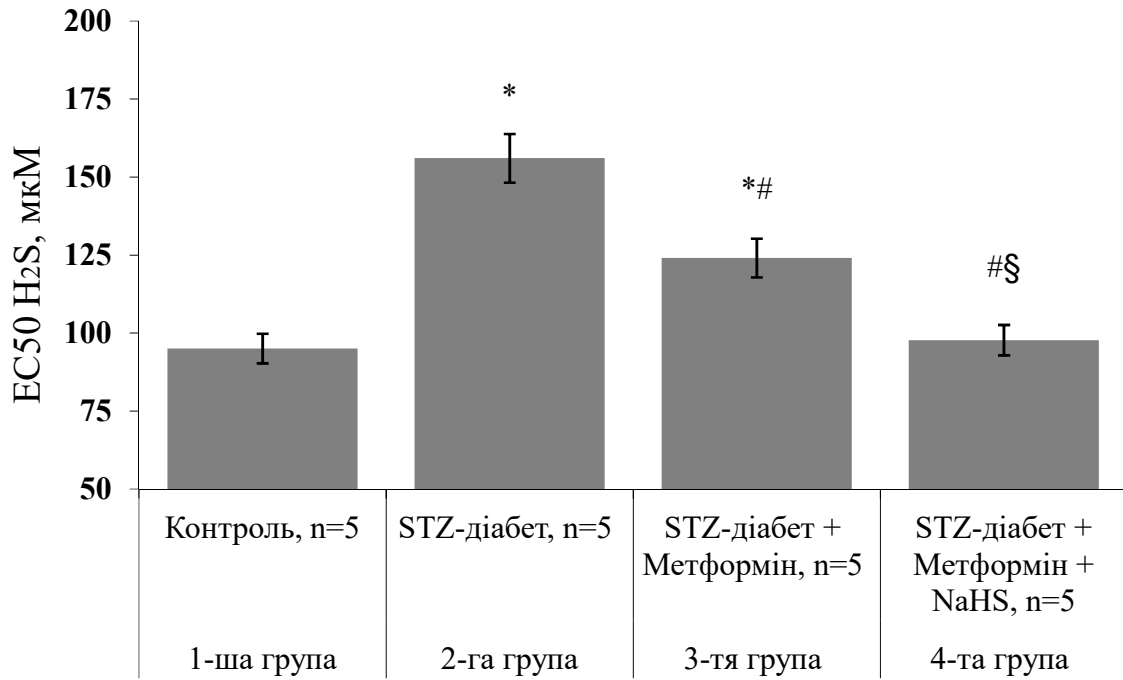


Рис. 5.8 Середні ефективні концентрації (EC₅₀) H₂S для аорти в групах щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та за його корекції (M±m, n=5).

Отже, результати наших досліджень засвідчили, що до реалізації вазопротекторного ефекту метформіну залучена система H₂S / ЦГЛ. Поєднання метформіну з NaHS справляло більш виразний протективний ефект на функціональний стан судин, ніж ізольоване введення метформіну, за умов стрептозотоцин-індукованого діабету.

Резюме. Використання метформіну за умов стрептозотоцин-індукованого діабету забезпечувало корекцію показників обміну H₂S в серцево-судинній системі, зменшувало ознаки оксидативного стресу та запобігало зростанню експресії профіброгенного медіатора галектину-3 в міокарді, сприяло збереженню судинної експресії ЦГЛ та чутливості судин до вазодилатуючої дії H₂S. Застосування донору H₂S - натрій гідрогенсульфіду потенціювало гіпоглікемічний, антиоксидантний та антифіброгенний ефекти метформіну за експериментального цукрового діабету.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях: [19; 20; 21; 33; 34; 35; 36; 38; 42; 168; 170; 171].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Цукровий діабет є глобальною медико-соціальною проблемою через велику поширеність, ранній розвиток ускладнень, високу інвалідизацію та смертність хворих. За даними ВООЗ поширеність цукрового діабету у різних країнах світу складає 4-8% [6]. Епідеміологічні дослідження в Україні свідчать про постійне збільшення числа хворих серед населення на 5-7% щорічно. Станом на 2016 рік в Україні зареєстровано близько 1,2 млн хворих на цукровий діабет, серед них понад 200 тис є інсулінозалежними [44].

До найбільш поширених ускладнень цукрового діабету 1 та 2 типу відносять ураження серця та судин [4; 9]. Патогенетичні механізми діабет-асоційованої кардіоваскулярної дисфункції та кардіоміопатії в першу чергу ґрунтуються на активації вільно-радикальних процесів, глікозилюванні протеїнів, розладах енергопостачаючих процесів, порушеннях електролітного обміну, стимуляції синтезу медіаторів запалення та фіброгенезу, дисбалансі в системі вазодилататорів та вазоконстрикторів [9; 50; 174; 214]. За останні роки накопичилось чимало інформації, що до розвитку діабетичної кардіоміопатії залучений H_2S [133; 144; 248; 267].

Профілактика діабетичної кардіоміопатії в першу чергу ґрунтується на адекватному глікемічному контролі. При виборі антидіабетичної терапії перевагу надають засобам, які поряд з гіпоглікемічною дією мають антиоксидантний ефект та здатні відновлювати секреторну функцію бета-клітин підшлункової залози. Такі властивості притаманні метформіну – препарату першого ряду в лікуванні цукрового діабету 2 типу. Метформін поліпшує чутливість клітин до інсуліну, виявляє гіпоглікемічний, антиоксидантний та протизапальний ефекти, покращує функції міокарду [164; 200]. Накопичується все більше доказів доцільності застосування метформіну у хворих на цукровий діабет 1 типу задля покращення метаболічних процесів [56; 88; 140; 200; 224].

В одному з досліджень було засвідчено, що введення метформіну підвищує вміст ендogenous H_2S в органах здорових мишей [235]. Залишається не визначеним, чи впливає метформін на обмін H_2S в серцево-судинній системі на тлі цукрового діабету. В дослідях *in vivo* засвідчено, що ендogenous H_2S здатний зменшувати глюкозо-стимульовану секрецію інсуліну, має антиоксидантні властивості і може сприяє протекції β -клітин підшлункової залози [165]. Не виключено, що модулятори обміну H_2S можуть модифікувати антидіабетичну ефективність метформіну.

Дисертаційне дослідження було присвячено вирішенню актуального завдання сучасної медицини та медичної біохімії – на основі встановлення ролі системи гідроген сульфід (H_2S) в механізмах ушкодження міокарду за умов експериментального цукрового діабету обґрунтувати нові підходи до підвищення ефективності метаболічної кардіопротекції.

Досліди проведені на 184 білих статевозрілих лабораторних щурах-самцях масою 180-250 г, отриманих з віварію ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Всі етапи експериментів виконані відповідно до загальних етичних принципів (Страсбург, 1986), що засвідчено комітетом з біоетики ВНМУ ім. М.І. Пирогова (протокол №10 від 27.10.2016; №4 від 13.05.2021). Згідно мети та завдань дослідження тварини були розподілені на 3 серії дослідів ($n=10$ в групі). Цукровий діабет у щурів викликали шляхом одноразового внутрішньочеревинного введення (в/оч) стрептозотоцину (40 мг/кг) на 0,1 М цитратному буфері (рН 4,5). Щурам контрольної групи в/оч вводили 0,1 М цитратний буфер (0,1 мл/ 100 г маси). Після ініціації діабету з 3 по 28 добу досліду проводили введення модуляторів обміну H_2S та антидіабетичного препарату. Для модуляції стану системи H_2S були застосовані необоротний інгібітор цистатіонін- γ -ліази пропаргілгліцин (50 мг/кг в/оч) та неорганічний донор H_2S – NaHS (3 мг/кг в/оч). Метаболічну корекцію проводили метформіном (500 мг/кг інтрагастрально) та його поєднанням з NaHS. Через

визначені умовами експерименту проміжки часу тварин знеживлювали шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом.

На першому етапі дослідження було вивчена динаміка рівня глюкози, глікозильованого гемоглобіну та рівня H_2S в сироватці крові у щурів у різні терміни стрептозотоцин-індукованого діабету. Перед початком експерименту у всіх тварин визначали рівень глюкози в периферійній крові за допомогою електронного глюкометра. В подальшому у тварин дослідних груп визначали рівень глюкози, глікозильованого гемоглобіну та H_2S в крові на 7-у, 14-у, 21-у, 28-у та 35-у добу після введення стрептозотоцину, в контролі ці показники визначали на 0-у та 28-у добу досліді. Виявилось, що через тиждень після ініціації стрептозотоцин-індукованого діабету у щурів не спостерігалось статистично значущих змін рівня H_2S в сироватці крові: на 7-у добу цей показник становив $69,5 \pm 3,00$ проти $74,1 \pm 3,60$ мкмоль/л (вихідний рівень, $p > 0,5$). У щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом з 14-ої доби реєструвалось зниження рівня H_2S в сироватці крові на 24,5% (до $55,9 \pm 2,11$ мкмоль/л) із подальшим зниженням показника на 21-шу, 28-му та 35-ту доби (на 39,8; 47,7 та 46,2%, відповідно). Зниження рівня H_2S в сироватці крові у щурів після ініціації стрептозотоцин-індукованого діабету був найбільш виразним з 2-го по 4-й тиждень, з 4-го тижня подальшого зниження рівня H_2S не спостерігалось. Тому подальші біохімічні дослідження проводили станом на 28-у добу після ініціації стрептозотоцин-індукованого діабету.

Виявлені нами зміни рівня H_2S в сироватці крові на тлі цукрового діабету не суперечать результатам більшості експериментальних та клінічних досліджень. За даними літератури, у хворих на цукровий діабет II типу, а також у щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом реєструється дефіцит H_2S в сироватці крові, який корелює з важкістю цукрового діабету та наявністю серцево-судинних ускладнень [99; 116; 209]. Хронічна гіперглікемія також є причиною низького рівня H_2S в ендотеліальних клітинах [208]. В той же час в поодиноких дослідженнях показано збільшення плазмового рівня H_2S та його ензиматичного утворення в печінці та підшлунковій залозі за

експериментального цукрового діабету [239; 256]. Існує думка, що гіперпродукція H_2S виникає лише на початкових стадіях діабету як протективний механізм у відповідь на оксидативно-нітрозативний стрес [210].

Серед можливих причин зниження вмісту H_2S в сироватці крові на тлі стрептозотоцин-індукованого діабету можна виділити наступні: 1) порушення експресії та / або активності H_2S -синтезуючих ферментів в серцево-судинній системі; 2) зміни швидкості утилізації H_2S в міокарді та аорті щурів, що і стало предметом подальших досліджень.

Відомо, що продукцію H_2S в серці та судинах забезпечують реакції десульфурування цистеїну за участі ПАЛФ-залежних ензимів – ЦГЛ та ЦАТ у асоціації з ПАЛФ-незалежними ензимами 3-МСТ та тіоредоксинредуктазою [54; 129; 246; 258]. Утворення H_2S також може відбуватись у реакції відновлення тіосульфат-аніону за участі ТСТ та відновленого глутатіону [136; 258]. Утилізація H_2S в тканинах може відбуватись ензиматичним шляхом, одним з етапів якого є мітохондріальне окиснення сульфід-аніону за участі сульфідоксидази [115; 258]. Насьогодні бракує цілісної інформації щодо змін активності ПАЛФ-залежних і ПАЛФ-незалежних шляхів синтезу та деградації H_2S в серцево-судинній системі у різні терміни цукрового діабету.

Результати наших досліджень засвідчили, що розвиток стрептозотоцин-індукованого діабету у щурів супроводжується змінами обміну H_2S в серцево-судинній системі, що виявляються вже на 2-му тижні і суттєво посилюються на 4-му тижні експерименту. Станом на 28-му добу після ініціації діабету у щурів виявлялись наступні зміни: в міокарді знижується рівень H_2S (на 37,6 %, $p < 0,01$); зменшується (на 55,9%, 31,6% та 39,5 %; $p < 0,01$) активність H_2S -синтезуючих ензимів - ЦГЛ, ЦАТ, ТСТ; знижується активність мітохондріального етапу утилізації H_2S за участі сульфідоксидази (на 37,6 %, $p < 0,01$) на тлі підвищення загальної швидкості споживання H_2S ; пригнічується експресія гена *CSE* (зниження відносного рівня мРНК ЦГЛ/ β -актин в 2,52 рази, $p < 0,01$). Кореляційний аналіз засвідчив, що хронічна гіперглікемія асоціюється з порушеннями обміну H_2S в міокарді. Зокрема, за умов

стрептозотоцин-індукованого діабету між вмістом H_2S в міокарді та вмістом глюкози в крові виявлявся обернений зв'язок ($r = -0,76$, $p < 0,01$). Також достовірний сильний обернений зв'язок виявлявся між вмістом глікозильованого гемоглобіну та активністю ЦГЛ ($r = -0,84$, $p < 0,01$).

Аналогічні зміни системи H_2S / ЦГЛ виявлялись в аорті щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом: рівень H_2S та активність ЦГЛ зменшувались в 1,3-1,4 рази ($p < 0,01$). За цих умов суттєво зменшувалась чутливість аорти до вазорелаксуючої дії H_2S , про що свідчить істотне підвищення EC_{50} H_2S (з $95,0 \pm 3,82$ до $156 \pm 6,22$ мкМ, $p < 0,01$). Між вмістом глюкози і рівнем глікозильованого гемоглобіну та вмістом H_2S в аорті виявлявся обернений зв'язок ($r = -0,58$; $-0,76$, $p < 0,01$). Порушення стану системи H_2S / ЦГЛ в аорті може бути предиктором формування ендотеліальної дисфункції у щурів після ініціації цукрового діабету.

Депримуєчий вплив експериментального цукрового діабету на продукцію H_2S в серцево-судинній системі підтверджується даними літератури. За різних експериментальних моделей цукрового діабету (високофруктозна та високожирова дієти, а також введення стрептозотоцину) в міокарді реєстрували зниження швидкості утворення H_2S в реакції, каталізованій ЦГЛ, а також відмічали зниження експресії цього ензиму [53; 84; 121]. Подібна направленість змін метаболізму H_2S зафіксована і в інших органах: хронічна гіперглікемія спричиняла інгібування ЦГЛ в підшлунковій залозі [263], а також супроводжувалась зменшенням експресії ЦГЛ в печінці та зростанням швидкості деградації H_2S [152; 208].

Ключовими патогенетичними механізмами діабет-асоційованих порушень у серці та судинах є оксидативний стрес, зростання продукції прозапальних та профіброгенних медіаторів, мітохондріальна дисфункція, стрес ендоплазматичного ретикулула, дисліпідемія [50; 174]. Тому на наступному етапі ми оцінили вплив модуляторів обміну H_2S на діабет-асоційовані біохімічні, цитометричні та морфофункціональні зміни в серцево-судинній системі щурів з експериментальним діабетом.

Спершу ми оцінили вплив модуляторів обміну H_2S на про- / антиоксидантний статус міокарду та аорти. Результати наших досліджень показали, що введення інгібітору ЦГЛ пропаргілгліцину (50 мг/кг) щурам із стрептозотоцин-індукованим діабетом викликає поглиблення дефіциту H_2S в міокарді та аорті (на 29,4 та 55,9 %, $p < 0,05$), що асоціюється з додатковим посиленням (в 1,2-1,3 рази, $p < 0,05$) процесів вільно-радикального окиснення із підвищенням активності NADPH-редуктази, збільшенням рівня МДА та карбонільних груп протеїнів; зниженням антиоксидантного захисту (із зниженням активності СОД); порушеннями тіол-дисульфідного обміну (із зменшенням активності тіоредоксинредуктази, зниженням тіол-дисульфідного коефіцієнту); зниженням мітохондріальних етапів утилізації H_2S (за участі сульфітооксидази). Введення NaHS (3 мг/кг) запобігає зниженню рівня H_2S в міокарді та аорті; зменшує діабет-асоційовані порушення обміну H_2S - підвищує активність ЦГЛ (на 219 %, $p < 0,01$) сульфітооксидази (на 29,6 %, $p < 0,05$), збільшує експресію гена *CSE* (в 1,35 рази, $p < 0,05$); зменшує прояви тіол-дисульфідних порушень та оксидативного стресу; підвищує вазорелаксацію у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом.

Антиоксидантні властивості H_2S реалізуються через різноманітні механізми [90; 91; 154; 160; 175; 232; 242]. По-перше H_2S - сильний відновник, тому виявляє прямі антиоксидантні ефекти і є скавенджером активних форм кисню та нітрогену. По-друге H_2S здатний викликати персульфідацію еритроїд-похідного ядерного фактору транскрипції Nrf2, його транслокацію в ядро, що супроводжується збільшенням продукції тіоредоксину, глутатіону, активності тіоредоксинредуктази. По-третє він виявляє непряму антиоксидантну дія, яка асоціюється з його здатністю збільшувати активність антиоксидантних ензимів – супероксиддисмутази та каталази та знижувати активність прооксидантного ензиму NADPH-оксидази.

Далі нами оцінена роль системи H_2S на процеси фіброгенезу. Одним із найбільш чутливих біохімічних маркерів розвитку фіброзу міокарду та предиктору дисфункції лівого шлуночка є галектин-3 [47]. Галектин-3

залучений до регуляції багатьох процесів, зокрема клітинної адгезії, проліферації та диференціації клітин, апоптозу, запалення, імунного гомеостазу, туморогенезу [111]. Галектин-3 стимулює синтез профіброгенних та прозапальних медіаторів [62; 63]; стимулює проліферацію та трансформацію фібробластів та міофібробластів [108], активує колагеногенез та фіброгенез в різних органах – міокарді, печінці, нирках та легенях [139], бере участь в процесах ангиогенезу та імунозапальної активації ендотелію [96]. Нами було встановлено, що розвиток стрептозотоцин-індукованого діабету супроводжується зростанням рівня галектину-3 (профіброгенного медіатора, предиктора ремоделювання серця та серцевої недостатності) в сироватці крові в 3,54 рази ($10,7 \pm 0,56$ проти $3,02 \pm 0,28$ нг/мл, $p < 0,001$) та міокарді в 4,98 рази ($p < 0,001$). Модуляція обміну H_2S викликала статистично значущі зміни експресії галектину-3 в міокарді та сироватці крові щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом. Так, введення пропаргілгліцину посилювало діабет-асоційоване зростання рівня галектину-3 в міокарді та сироватці крові (в 1,78 та 1,55 рази, $p < 0,01$), у той час як введення $NaHS$ справляло протективний ефект і зменшувало експресію цього медіатору (в 2,76 та 2,39 рази, $p < 0,01$). Рівень галектину-3 в міокарді обернено корелював з рівнем H_2S ($r = -0,80$, $p < 0,01$), у той час як сироватковий рівень галектину-3 та прямо корелював з рівнем глюкози в крові ($r = 0,67$, $p < 0,05$). Отже дефіцит H_2S та пригнічення експресії ЦГЛ потенціюють діабет-індуковане підвищення рівня галектину-3 в міокарді та сироватці крові, що може ініціювати процеси фіброгенезу і розвиток діабетичної кардіоміопатії.

Виникає питання щодо біохімічних механізмів впливу пропаргілгліцину та $NaHS$ на систему галектину-3 в органах тварин за цукрового діабету. В дослідженнях *in vitro* показано, що експресія галектину-3 в культурі ендотеліальних клітин посилюється на тлі гіперглікемії [99]. Результати наших досліджень показали, що використання донору H_2S за цукрового діабету супроводжується гіпоглікемічним ефектом, тоді як застосування інгібітору синтезу H_2S , навпаки поглиблює гіперглікемію. Отже, рівень глюкози в крові є

одним із метаболічних факторів через який опосередковується вплив модуляторів обміну H_2S на рівень профіброгенного медіатора галектину-3 в серці та нирках щурів.

Як відомо, діабет-асоційовані порушення біохімічних процесів спричиняють активацію проапоптичних сигнальних шляхів в кардіоміоцитах, які лежать в основі розвитку діабетичної кардіоміопатії [65; 240]. Встановлено, що за стрептозотоцин-індукованого діабету реєструвалось підвищення проліферативної активності клітин міокарду (збільшення клітин у фазах S та G2+M на 30-32%, $p < 0,05$), підвищення рівня фрагментації ДНК (на 11,5%, $p < 0,05$). Введення пропаргілгліцину посилювало цитометричні ознаки апоптозу (збільшення частки клітин в інтервалі SUB-G0G1 на 27,4 %, $p < 0,05$) та проліферативної активності клітин міокарду (збільшення частки клітин в фазі S на 88,7 %, $p < 0,05$) а введення NaHS справляло протилежний ефект. Між рівнем H_2S в міокарді та кількістю клітин у фазі S та інтервалі SUB-G0G1 виявлялись статистично значущі обернені зв'язки ($r = -0,54$ та $-0,55$, $p < 0,05$). Вказані цитометричні маркери прямо корелювали з рівнем галектину-3 в міокарді ($r = 0,58$ та $0,62$, $p < 0,05$). Введення пропаргілгліцину викликало збільшення відносної маси серця та маси лівого шлуночка (на 18,7 та 30,0 %, $p < 0,05$), а введення NaHS не спричиняло такого ефекту у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом.

Отже, за умов стрептозотоцин-індукованого діабету відбувається підвищення проліферативної активності клітин міокарду, що переважно реалізується за рахунок сполучнотканинних елементів, посилюються процеси апоптичної загибелі клітин міокарду. Інгібування ЦГЛ-залежного синтезу H_2S посилює цитометричні ознаки апоптозу та проліферативну активність клітин міокарду, у той час як введення NaHS справляє протилежний ефект. Зауважимо, що введення NaHS в умовно терапевтичній дозі (3 мг/кг) не викликало додаткового підвищення рівня глікемії і стримувало зростання рівня глікозильованого гемоглобіну за стрептозотоцин-індукованого діабету, у той час як введення пропаргілгліцину справляло протилежний ефект.

Виникає питання щодо причинно-наслідкового зв'язку між змінами параметрів клітинного циклу та системи H_2S у міокарді тварин з діабетом. Зниження концентрації H_2S в міокарді може активуватися окиснювальний стрес, що призводить до посилення окисної модифікації численних білків (ферментів, компонентів цитоскелету, рецепторів, факторів транскрипції тощо), дисфункції мітохондріальних пор з подальшою активацією рецептор-незалежного апоптозу [196]. Відомо, що H_2S може стабілізувати мітохондрії у разі ішемічно-реперфузійних порушень [83]; зменшувати кількість апоптотичних міокардіоцитів; збільшувати транскрипцію мРНК антиапоптотичного фактору Bcl-2. Також H_2S інгібує транскрипцію мРНК проапоптотичного Bax, каспази 3 та стимулює вивільнення цитохрому C з мітохондрій шляхом сульфгідратації NF- κ B [196; 223; 230]. H_2S бере участь у стабілізації Nrf2 через активацію CSE/Akt шляху, таким чином пригнічуючи апоптоз міокардіоцитів [251], а також може викликати транслокацію з ядра фактору Bach1 за допомогою ERK1/2-залежного шляху, що призводить до відновлення сигналізації Nrf2 [180]. Було також показано, що H_2S знижує апоптотичну активність за допомогою наступних сигнальних шляхів IGF1R/pAkt, AMPK/mTOR, PI3K/Akt та NADPH/JNK/NF- κ B [220]. Здатність H_2S зменшувати активність поліплоїдизації міокардіоцитів може бути пов'язана з його антифібротичною активністю, оскільки введення екзогенних донорів H_2S у щурів з діабетом супроводжується зниженням активності NF- κ B, TGF- β 1, MMP-2, проколагену-1 [85]. Крім того, антифіброзна дія H_2S може бути реалізована шляхом інактивації синтезу колагену за допомогою сигнального шляху TGF- β 1/Smad [206].

За результатами наших досліджень встановлено, що порушення H_2S -сигналіngu є важливим елементом патогенезу діабетичної кардіоміопатії. Цілком очевидно, що корекція обміну H_2S в серцево-судинній системі може стримувати розвиток діабетичної кардіоміопатії, до того ж в ряді експериментальних досліджень продемонстровано потужні кардіопротективні властивості H_2S . Зокрема, донори H_2S зменшували розмір інфаркту міокарда,

попереджували патологічне ремоделювання міокарду за умов серцевої недостатності [82; 182], стримували розвиток кардіального фіброзу через інгібування проліферації та трансформації фібробластів у міофібробласти, індукованої трансформуючим фактором росту- $\beta 1$ [126]. Введення NaHS зменшувало розвиток мікроциркуляторних та гемодинамічних зрушень у шлуночках серця на момент експериментальної коронарооклюзії та сприяло більш повноцінній реканалізації на тлі реперфузії [30; 207; 237]. В той же час інгібування продукції H_2S за введення пропаргілгліцину збільшувало розмір інфаркту міокарду та посилювало міокардіальне запалення у щурів [142; 254].

Пошук засобів, які б забезпечували корекцію метаболізму H_2S в серцево-судинній системі залишається актуальним. З цієї точки зору перспективним є антидіабетичний асіб метформін, який володіє незалежним кардіопротекторним ефектом [78; 105; 148] і продемонстрував здатність підвищувати рівень H_2S в органах здорових тварин [235]. В одній роботі було засвідчено, що введення низьких доз метформіну (10 мг/кг маси тіла) не впливало на рівень H_2S в плазмі крові у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом [80]. Тому на наступному етапі ми дослідили вплив метформіну та його поєднання з NaHS на показники системи H_2S у серцево-судинній системі щурів за умов стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету.

За результатами наших досліджень, введення метформіну (в дозі 500 мг/кг) забезпечувало корекцію показників обміну H_2S в серцево-судинній системі, зменшувало ознаки оксидативного стресу, стримувало зростання експресії галектину-3 в міокарді, сприяло збереженню судинної експресії CSE та чутливості аорти до вазодилатуючої дії H_2S у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом. Серед біохімічних механізмів, які забезпечують вплив метформіну на систему H_2S в міокарді та аорті можна виділити наступні: 1) гіпоглікемічна дія [225], адже відомо, що хронічна гіперглікемія асоціюється зі зниженням активності та експресії ЦГЛ в печінці, підшлунковій залозі, міокарді, зростанням швидкості утилізації H_2S та формуванням дефіциту H_2S в сироватці крові та органах щурів [152; 208]; 2) антиоксидантний ефект [81]. Показано, що

активні форми кисню можуть спричиняти зменшення активності утворення H_2S в реакції гідролізу цистеїну за участі ЦГЛ, а також беруть безпосередню участь в утилізації H_2S окиснювальним шляхом [160].

При застосуванні метформіну у поєднанні з $NaHS$ (3 мг/кг) забезпечувалась більш ефективна корекція діабет-асоційованих змін системи H_2S в міокарді: збільшувалась активність цистатіонін- γ -ліази, цистеїнамінотрасферази, сульфітоксидази (в 1,3-1,4 рази, $p < 0,01$); посилювався антиоксидантний ефект - збільшувалась активність тіоредоксинредуктази (в 1,5 рази, $p < 0,01$), антифіброгенний ефект (зменшувався рівень галектину-3 в міокарді та сироватці крові в 1,6 та 1,4 рази, $p < 0,01$).

Нами було встановлено, що до реалізації вазопротекторного ефекту метформіну залучена система H_2S / ЦГЛ: введення цього засобу викликало підвищення рівня H_2S в аорті, збільшувало десульфуразну активність ЦГЛ та судинну експресію гена *CSE* (в 2 рази, $p < 0,001$). Застосування метформіну зменшувало негативний вплив стрептозотоцин-індукованого діабету на H_2S -індуковану релаксацію аорти: крива «доза-ефект» зміщувалась ліворуч відносно такої у тварин нелікованих тварин, знижувалась EC_{50} H_2S (до $124 \pm 5,32$ мкМ). Поєднання метформіну з $NaHS$ за стрептозотоцин-індукованого діабету справляло більш виразний протективний ефект на функціональний стан судин, ніж ізольоване введення метформіну.

За результатами власних досліджень та літературних даних нами створено схему (рис. 6.1) на якій відображена роль системи H_2S в механізмах ураження міокарду та нові механізми кардіоцитопротекторної дії метформіну за умов експериментального цукрового діабету.

Таким чином, метформін забезпечує корекцію обміну H_2S в серцево-судинній системі, запобігає зростанню експресії галектину-3 в сироватці крові та міокарді, сприяє збереженню чутливості судин до вазодилатуючої дії H_2S . Застосування $NaHS$ потенціює гіпоглікемічний, антиоксидантний, антифіброгенний та вазопротективний ефекти метформіну за умов стрептозотоцин-індукованого діабету. Корекція рівня H_2S в серцево-судинній

системі на ранніх етапах розвитку діабету є потенційно перспективною стратегією профілактики діабетичної кардіоміопатії.

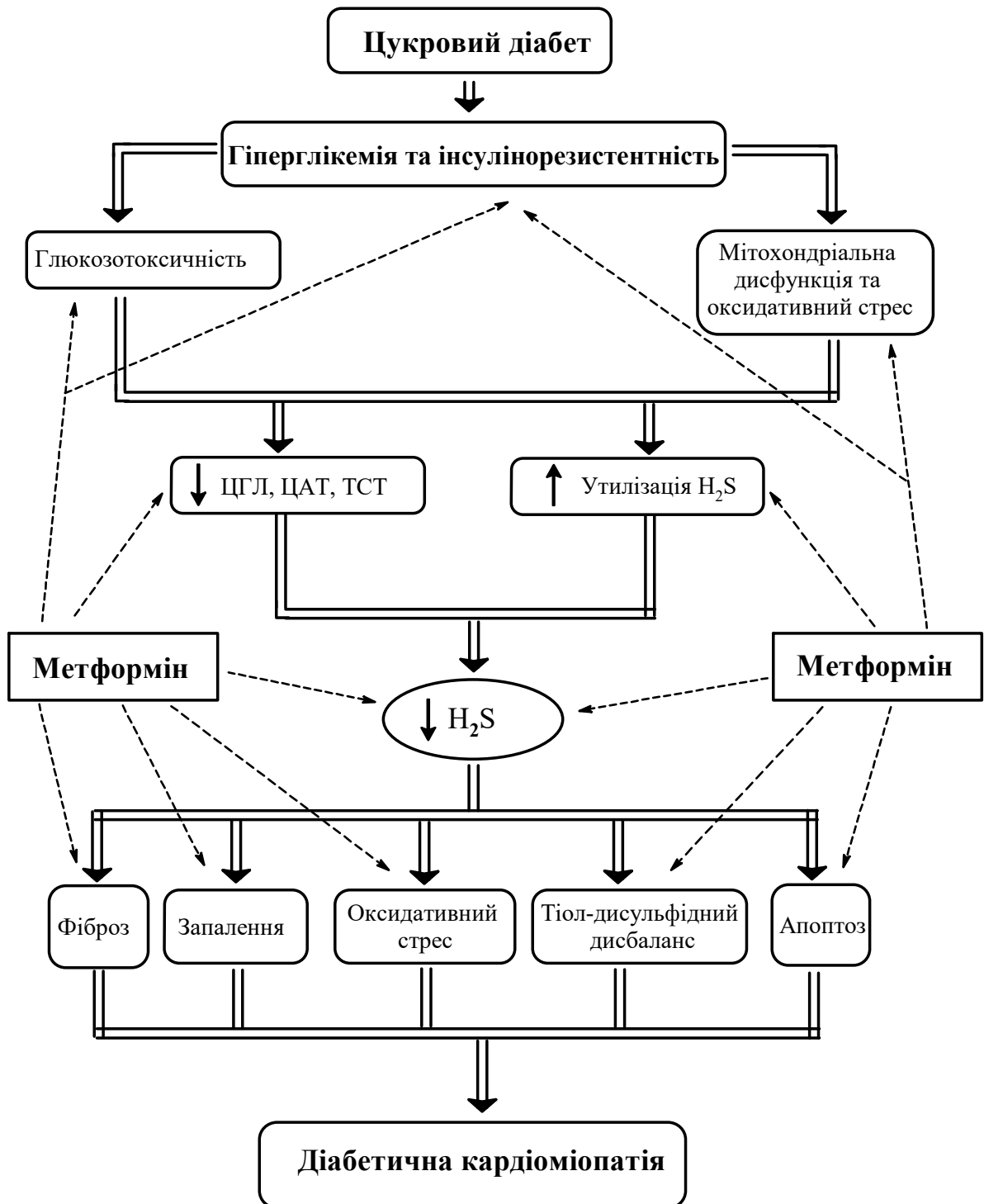


Рис. 6.1 Роль системи H_2S в патогенезі діабетичної кардіоміопатії та нові механізми кардіоцитопротекторної дії метформіну.

Примітка. Пунктирною стрілкою позначені механізми дії метформіну.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та досягнуто вирішення наукової задачі - на основі встановлення ролі системи гідроген сульфїду (H_2S) в механїзмах ушкодження мїокарду за умов експериментального цукрового діабету обґрунтовані нові підходи до підвищення ефективності метаболїчної кардіопротекції шляхом застосування антидіабетичного засобу метформїну у поєднанні з донором H_2S .

1. Розвиток стрептозотоцин-їндукованого діабету у щурів супроводжується змінами обміну H_2S в серцево-судинній системі: в мїокарді та аорті знижується рївень H_2S (на 37,6 та 36,5 %, $p < 0,01$); знижується (на 55,9 %, 31,6% та 39,5 %; $p < 0,01$) активність H_2S -синтезуючих ензимів (цистатїонїн- γ -ліази, цистеїнамїнотрансферази, тїосульфатдїтїолсульфїдтрансферази); знижується активність етапів утилізації H_2S за участі сульфїтоксидази (на 37,6 %, $p < 0,01$); пригнїчується експресія гена *CSE* (зниження вїдносного рївня мРНК цистатїонїн- γ -ліаза/ β -актин в 2,52 рази, $p < 0,01$); зменшується чутливїсть аорти до вазорелаксуючої дїї H_2S ($EC_{50} H_2S$ зростає з $95,0 \pm 3,82$ до $156 \pm 6,22$ мкМ, $p < 0,01$).

2. Введення їнгїбітору цистатїонїн- γ -ліази пропаргїлгліцину (50 мг/кг) поглиблює (на 29,4 та 55,9 %, $p < 0,05$) дефіцит H_2S в мїокарді та аорті щурів їз стрептозотоцин-їндукованим діабетом, що асоціюється з посиленням процесів вїльно-радикального окиснення та зниженням антиоксидантного захисту (їз підвищенням активності NADPH-редуктази, зниженням активності СОД); порушеннями тїол-дисульфїдного обміну (їз зменшенням активності тїоредоксинредуктази, зниженням тїол-дисульфїдного коефїцієнту), зниженням мїтохондрїальних етапів утилізації H_2S (за участі сульфїтоксидази). Введення NaHS (3 мг/кг) запобїгає зниженню рївня H_2S в мїокарді та аорті; зменшує діабет-асоційовані порушення обміну H_2S - підвищує активність цистатїонїн- γ -

ліази (на 219 %, $p < 0,01$) та сульфатоксидази (на 29,6 %, $p < 0,05$), збільшує експресію гена *CSE* (в 1,35 рази, $p < 0,05$); зменшує прояви тіол-дисульфідних порушень та оксидативного стресу; підвищує вазорелаксацію у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом.

3. Введення модуляторів обміну H_2S викликало протилежні зміни експресії профіброгенного та прозапального медіатора галектину-3 в міокарді та сироватці крові за стрептозотоцин-індукованого діабету. Введення пропаргілгліцину посилювало діабет-асоційоване зростання рівня галектину-3 в міокарді та сироватці крові (в 1,78 та 1,55 рази, $p < 0,01$), у той час як введення $NaHS$ справляло протективний ефект і зменшувало експресію цього медіатору (в 2,76 та 2,39 рази, $p < 0,01$). Рівень галектину-3 в міокарді обернено корелював з рівнем H_2S ($r = -0,80$, $p < 0,01$), у той час як сироватковий рівень галектину-3 прямо корелював з рівнем глюкози в крові ($r = 0,67$, $p < 0,05$).

4. За стрептозотоцин-індукованого діабету реєструвалось підвищення проліферативної активності клітин міокарду (збільшення клітин у фазах S та G2+M на 30-32%, $p < 0,05$), підвищення рівня фрагментації ДНК (на 11,5%). Введення пропаргілгліцину посилювало цитометричні ознаки апоптозу (збільшення частки клітин в інтервалі SUB-G0G1 на 27,4 %, $p < 0,05$) та проліферативної активності клітин міокарду (збільшення частки клітин в фазі S на 88,7 %, $p < 0,05$) а введення $NaHS$ справляло протилежний ефект. Між рівнем H_2S в міокарді та кількістю клітин у фазі S та інтервалі SUB-G0G1 виявлялись статистично значущі обернені зв'язки ($r = -0,54$ та $-0,55$, $p < 0,05$). Вказані цитометричні маркери прямо корелювали з рівнем галектину-3 в міокарді ($r = 0,58$ та $0,62$, $p < 0,05$). Введення пропаргілгліцину викликало збільшення відносної маси серця та маси лівого шлуночка (на 18,7 та 30,0 %, $p < 0,05$), а введення $NaHS$ не спричиняло такого ефекту у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом.

5. Введення метформіну (500 мг/кг) за стрептозотоцин-індукованого діабету забезпечувало корекцію показників обміну H_2S в серцево-судинній системі, зменшувало ознаки оксидативного стресу, стримувало зростання

експресії галектину-3 в міокарді, сприяло збереженню судинної експресії *CSE* та чутливості аорти до вазодилатуючої дії H_2S . При застосуванні метформіну у поєднанні з $NaHS$ (3 мг/кг) забезпечувалась більш ефективна корекція діабет-асоційованих змін системи H_2S в міокарді та аорті (збільшувалась активність цистатіонін- γ -ліази, цистеїнамінотрасферази, сульфітоксидази в 1,3-1,4 рази, $p < 0,01$); посилювались антиоксидантний (збільшувалась активність тіоредоксинредуктази в 1,5 рази, $p < 0,01$), антифіброгенний (зменшувався рівень галектину-3 в міокарді та сироватці крові в 1,6 та 1,4 рази, $p < 0,01$), вазопротекторний ефекти. Застосування донорів H_2S поряд з антидіабетичними засобами є потенційно перспективною стратегією профілактики діабетичної кардіоміопатії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Владимиров, Ю. А., & Арчаков, А. И. (1972). *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*. Москва: Наука.
2. Власенко, М. В. (2013). Цукровий діабет: діагностика і моніторинг. *Ліки України*, 9-10, 17-18.
3. Власенко, М. В., Кучевська, Н. В., Кривов'яз, Ю. О., & Секрет, Т. В. (2016). Метформін у лікуванні цукрового діабету 2-го типу: у фокусі уваги — клінічні аспекти. *Практикуючий лікар*, 3(5), 26-30.
4. Власенко, М. В., & Соколова, Л. К. (2020). Цукровий діабет: досягнення глікемічних цілей в амбулаторних умовах, УКР. МЕД. ЧАСОПИС, 3 (137): https://www.umj.com.ua/wp/wp-content/uploads/2020/05/SD_7.pdf?upload=
5. Волощук, Н. І., & Таран, І. В. (2011). Гостра токсичність гідроген сульфідів та його вплив на протизапальний ефект диклофенаку в експерименті. *Медична хімія*, 13(4), 88-90.
6. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ). [Електронний ресурс]. Режим доступу: www.euro.who.int.
7. Грицюк, М. І., Бойчук, Т. М., & Петришен, О. І. (2014). Порівняльна характеристика експериментальних моделей цукрового діабету. *Світ медицини та біології*, 2(44), 199-203.
8. Гульчій, М. В., Замолотова, К. О., Соколова, Л. К., Бойко, О. А., Сакало, О. А., Власенко, Н. Г., & Петренко, Л. І. (2014). Системний контроль глікозильованого гемоглобіну — шлях до покращення лікування і якості життя людей з цукровим діабетом. *Діабет, ожиріння, метаболічний синдром*, 4, 91-98.
9. Журавльова, Л. В., Сокольнікова, Н. В., & Рогачова, Т. А. (2020). *Сучасний погляд на ураження серцево-судинної системи при цукровому діабеті і методи їх корекції: фокус на діабетичну кардіоміопатію: наукова*

монографія для студентів, лікарів-інтернів та лікарів широкого профілю.
Харків: ХНМУ.

10. Заїчко, Н. В. (2003). Окислювальна модифікація білків сироватки крові як маркер активності ревматоїдного артриту та її зміни під впливом фармакотерапії амізонам, індометацином, німесулідом. *Вісник Вінницького державного медичного університету*, 7, 664 - 666.
11. Заїчко, Н. В., Пентюк, Н. О., Мельник, А. В., & Штатсько, О. І. (2009) Патент України на корисну модель 45018. Київ: Державна служба інтелектуальної власності України.
12. Заїчко, Н. В., Пентюк, Н. О., Мельник, А. В., Штатсько, О. І., & Андрушко, І. І. (2009). Утворення гідроген сульфід у органах щурів. *Медична хімія*, 11(4), 7–13.
13. Заїчко, Н. В., Пентюк, Н. О., Пентюк, Л. О., Мельник, А. В., & Андрушко, І. І. (2009). Визначення вмісту гідроген сульфід у сироватці крові. *Вісник наукових досліджень*, 1, 29-32.
14. Заїчко, Н. В. Платонова, Т. М., & Чернищенко, Т. М. (2010). Вплив сірковмісних амінокислот та їхніх похідних на плазмові фактори та інгібітори зсідання крові. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*, 1. 67-74.
15. Заїчко, Н. В., Платонова, Т. М., Чернищенко, Т. М., Гриненко, Т. В., & Юсова, О. І. (2010). Вплив гідроген сульфід на систему гемостазу щурів. *Медичні перспективи*, 15(1), 15-20.
16. Заїчко, Н. В., Мельник, А. В., Ольховський, О. С., & Заїчко, К. О. (2012). Патент України на корисну модель 75683. Київ: Державна служба інтелектуальної власності України.
17. Заїчко, Н. В., Йолтухівський, М. М., Ольховський, О. С., & Паламарчук, І. В. (2013). Вікові особливості впливу пропаргілгліцину та натрій гідрогенсульфід на показники обміну H_2S в міокарді щурів. *Вісник проблем біології і медицини*, 2(105), 105-110.

18. Заїчко, Н. В., Ольховський, О. С., Юрченко, П. О., Мельник, А. В., & Штатко, О. І. (2013). Патент України на корисну модель 87884. Київ: Державна служба інтелектуальної власності України.
19. Заїчко, Н. В., Паламарчук, І. В., & Струтинська, О. Б. (2016). Патент України на корисну модель 107767. Київ: Державна служба інтелектуальної власності України.
20. Заїчко, Н. В., Паламарчук, І. В., & Струтинська, О. Б. (2017). *Вплив антидіабетичних засобів на вміст гідроген сульфїду та активність H_2S -синтезуючих ензимів в органах щурів із стрептозотоциновим діабетом*, Мат. LX науково-практичної конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (присвячена 60-річчю ТДМУ, 14 червня 2017 р., Тернопіль).
21. Заїчко, Н. В., Струтинська, О. Б., Паламарчук, І. В., & Штатко, О. І. (2017). *Вплив антидіабетичних засобів на систему цистатіонін-гама-ліази/гідроген сульфїду в міокарді та нирках щурів*, Матеріали V Національного з'їзду фармакологів України (18-20 жовтня 2017 р., Запоріжжя).
22. Камышников, В. С. (2000). *Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике*. Минск: Беларусь.
23. Караваев П. Г., Веклич А. С., & Козиолова Н. А. (2019). *Диабетическая кардиомиопатия: особенности сердечно-сосудистого ремоделирования*. Российский кардиологический журнал, (11), 42-47.
24. Кіхтяк, О. П. (2011). *Зміни глікемії під впливом цукрознижувальних засобів у щурів зі стрептозотоциновим діабетом на тлі висококалорійної дієти*. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*, 1, 39-44.
25. Кметь, О. Г., Філіпець, Н. Д., Давиденко, І. С., & Кметь, Т.І. (2019). *Експериментальне моделювання цукрового діабету 2 типу*. *Клінічна та експериментальна патологія*, 18(1), 59-64.
26. Кобалава Ж. Д., Медовщиков В. В., Ешниязов Н. Б., & Хасанова Э. Р. (2019). *Современная парадигма патофизиологии, профилактики и лечения*

- сердечной недостаточности при сахарном диабете 2 типа. *Российский кардиологический журнал*, 11, 98-111.
27. Кобалава, Ж.Д., Ешниязов, Н.Б., Медовщиков, В.В., & Хасанова, Э.Р. (2019). Сахарный диабет 2-го типа и сердечная недостаточность: инновационные возможности управления прогнозом. *Кардиология*, 59(4), 76-87.
28. Левицький, В. А., & Міськів, В. А. (2009). Спосіб моделювання експериментального цукрового діабету. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*, 9(26), 82-85.
29. Мельник, А. В. Заїчко, Н. В., & Паламарчук, І. В. (2014). Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на біохімічні показники та тонус аорти щурів різних вікових груп. *Вісник Вінницького національного медичного університету*, 18(2), 397-400.
30. Мельник, А. В., Заїчко, Н. В., Ходаківський, О. А., & Ходаківська, О. В. (2017). Статеві особливості впливу гідроген сульфїду на перебіг ішемії / реперфузії в міокарді щурів. *Фізіологічний журнал*, 5, 25-30.
31. Олещук, О. М., & Лой, Г. Я. (2020). Механізми реалізації кардіопротективних ефектів метформіну (огляд літератури). *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 29(14), 299-307.
32. Паламарчук, І. В., & Заїчко, Н. В. (2015). Вплив гідроген сульфїду на маркери оксидативного стресу в міокарді щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом, III міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (24-25 вересня 2015 р., Дніпропетровськ).
33. Паламарчук, І. В., & Заїчко, Н. В. (2015). *Продукція гідроген сульфїду в аорті щурів за умов стрептозотоцинового діабету та його корекції метформіном*, Мат. VIII науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини» (10 листопада 2015 р., Вінниця).

34. Паламарчук, І. В. (2016). *Вміст галектину-3 в сироватці крові щурів за стрептозотоцинового діабету та його корекції*, Мат. XIII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2016» (7-8 квітня 2016 р. Вінниця).
35. Паламарчук, І. В., & Заїчко, Н. В. (2016). *Вплив гідроген сульфід та метформіну на біохімічні зміни в міокарді щурів за стрептозотоцинового діабету*, Мат. Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодення» (24 лютого 2016 р., Вінниця).
36. Паламарчук, І. В., & Заїчко, Н. В. (2016). Патент України на корисну модель 107766. Київ: Державна служба інтелектуальної власності України.
37. Паламарчук, І. В. (2017). *Вплив екзогенного гідроген сульфід на експресію та активність цистатіонін-гама-ліази в міокарді щурів за стрептозотоцинового діабету*, Мат. XIV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2017» (26 - 28 квітня 2017 р., Вінниця).
38. Паламарчук, І. В., Струтинська, О. Б., Мельник, А. В., & Заїчко, Н. В. (2020). *Вплив метформіну та його поєднання з натрій гідрогенсульфідом на стан системи H₂S та асоційовані біохімічні порушення в міокарді та нирках щурів за стрептозотин-індукованого діабету*. *Вісник проблем біології і медицини*, 3(157), 133-137.
39. Семенов, С., Бабій, С., Плахотний, Є., Штеменко, Н., Величко, О., & Штеменко, О. (2016). *Редокс-стан тканин нирок щурів за введення кластерних сполук Ренію з адамантильними лігандами у моделі токсичної нефропатії*. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 72, 33-40.
40. Сергієнко, В. О., & Сергієнко, О. О. (2020). *Діабетична кардіоміопатія: діагностичні біомаркери*. *Міжнародний ендокринологічний журнал*, 16(6), 11-22.
41. Струтинська, Н. А., Семенихіна, О. М., Чорна, С. В., Вавілова, Г. Л., & Сагач, В. Ф. (2011). *Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкриття*

- мітохондріальної пори у серці дорослих і старих щурів. *Фізіол. Журн*, 57(6), 3-13.
42. Струтинська, О. Б., Паламарчук, І. В., & Заїчко, Н. В. (2016). *Вплив гідроген сульфїду на антидіабетичний ефект метформїну за стрептозотоцинового діабету у щурів*, Мат. Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодення» (24 лютого 2016 р., Вінниця).
43. Ткаченко, М. М., Сагач, В. Ф., & Базілюк, О.В. (2005). Вікові особливості змін скорочувальних судинних реакцій і вміст вільних радикалів кисню та метаболітів оксиду азоту у мишей лінії BALB/c за умов перебування у зоні відчуження. *Фізіолог. журн.*, 51(3), 32-41.
44. Цитовський, М. Н. (2017). Статистичний, клінічний та морфологічний аспекти впливу цукрового діабету на стан серцево-судинної системи. *Наук. вісник Ужгородського університету, серія «Медицина»*, 1 (55), 168-177.
45. Abiola, M., Favier, M., Christodoulou-Vafeiadou, E., Pichard, A. L., Martelly, I., Guillet-Deniau, I. (2009). Activation of Wnt/beta-catenin signaling increases insulin sensitivity through a reciprocal regulation of Wnt10b and SREBP-1c in skeletal muscle cells. *PLoS On*, 4(12): e8509.
46. Altaany, Z, Ju Y, Yang, G, & Wang, R. (2014). The coordination of S-sulfhydration, S-nitrosylation, and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide. *Sci Signal*, 7(342): doi: 10.1126/scisignal.2005478.
47. Amin, H. Z., Amin, L. Z., & Wijaya, I. P. (2017). Galectin-3: a novel biomarker for the prognosis of heart failure. *Clujul medical (1957)*, 90(2), 129–132.
48. Anisimov, V.N. (2014). Do metformin a real anticarcinogen? A critical reappraisal of experimental data. *Ann. Transl. Med*, 2: doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.
49. Arkat, S., Umbarkar, P., Singh, S., & Sitasawad, S. L. (2016). Mitochondrial Peroxiredoxin-3 protects against hyperglycemia induced myocardial damage in Diabetic cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med*, 97, 489-500.

50. Athithan, L., Gulsin, G. S., McCann, G. P., & Levelt, E. (2019). Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiology, theories and evidence to date. *World J Diabetes*; 10(10), 490-510
51. Atkinson, L. L., Kozak, R., Kelly, S. E., Onay Besikci, A., Russell, J. C., & Lopaschuk, G. D. (2003). Potential mechanisms and consequences of cardiac triacylglycerol accumulation in insulin-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284(5), 923-930.
52. Bajaj, S. (2015). RSSDI clinical practice recommendations for the management of type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Diabetes Dev. Ctries*, 38, 1-115.
53. Barr, L. A., Shimizu, Y., Lambert, J. P., Nicholson, C. K., Calvert, J. W. (2015). Hydrogen sulfide attenuates high fat diet-induced cardiac dysfunction via the suppression of endoplasmic reticulum stress. *Nitric Oxide*, 46, 145-156.
54. Beltowski, J. (2019). Synthesis, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Hydrogen Sulfide: An Overview. *Methods Mol Biol*: doi: 10.1007/978-1-4939-9528-8_1.
55. Bertero, E., & Maack, C. (2018). Metabolic remodelling in heart failure. *Nat Rev Cardiol*, 15(8), 457-470.
56. Beysel, S., Unsal, I. O., Kizilgul, M., Caliskan, M., Ucan, B., & Cakal, E. (2018). The effects of metformin in type 1 diabetes mellitus. *BMC endocrine disorders*, 18(1): <https://doi.org/10.1186/s12902-017-0228-9>.
57. Boon, R. A., Iekushi, K., Lechner, S., Seeger, T., Fischer, A., Heydt, S. ... Dimmeler, S. (2013). MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature*, 495(7439), 107-110.
58. Bostelaar, T., Vitvitsky, V., Kumutima, J., Lewis, B. E., Yadav, P. K., Brunold, T. C. ... Banerjee, R. (2016). Hydrogen Sulfide Oxidation by Myoglobin. *J Am Chem Soc*, 138(27), 8476-8488.
59. Bugger, H., & Abel, E. D. (2014). Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*, 57(4), 660-671.

60. Carbonero, F., Benefiel, A. C., & Gaskins, H. R. (2012). Contributions of the microbial hydrogen economy to colonic homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9(9), 504-518.
61. Che, H., Wang, Y., Li, Y., Lv, J., Li, H., Liu, Y. ... Wang, L. (2020). Inhibition of microRNA-150-5p alleviates cardiac inflammation and fibrosis via targeting Smad7 in high glucose-treated cardiac fibroblasts. *J Cell Physiol*. 235(11), 7769-7779.
62. Chen, C., Duckworth, C. A., Zhao, Q., Pritchard, D. M., Rhodes, J. M., & Yu, L. G. (2013). Increased circulation of galectin-3 in cancer induces secretion of metastasis-promoting cytokines from blood vascular endothelium. *Clin. Cancer Res*, 19(7), 1693-1704.
63. Chen, P. W., Hsu, L. W., Chang, H. Y., Huang, T. C., Yu, J. R., Liao, H. Y. ... Liu, P. Y. (2019). Elevated Platelet Galectin-3 and Rho-Associated Protein Kinase Activity Are Associated with Hemodialysis Arteriovenous Shunt Dysfunction among Subjects with Diabetes Mellitus. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2019/8952414.
64. Chen, X., Liu, G., Zhang, W., Zhang, J., Yan, Y., Dong, W. ... Zhang, M. (2015). Inhibition of MEF2A prevents hyperglycemia-induced extracellular matrix accumulation by blocking Akt and TGF- β 1/Smad activation in cardiac fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol*, 69, 52-61.
65. Chen, Y., Hua, Y., Li, X., Arslan, I. M., Zhang, W., & Meng, G. (2020). Distinct Types of Cell Death and the Implication in Diabetic Cardiomyopathy. *Frontiers in pharmacology*, 11: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00042>
66. Chengji, W., & Xianjin, F. (2019). Exercise protects against diabetic cardiomyopathy by the inhibition of the endoplasmic reticulum stress pathway in rats. *J Cell Physiol*, 234(2), 1682-1688.
67. Chung, S. T., Chacko, S. K., Sunehag, A. L., & Haymond, M. W. (2015). Measurements of Gluconeogenesis and Glycogenolysis: A Methodological Review. *Diabetes*, 64(12), 3996-4010.

68. Cong, W., Ruan, D., Xuan, Y., Niu, C., Tao, Y., Wang, Y. ... Tan, Y. (2015). Cardiac-specific overexpression of catalase prevents diabetes-induced pathological changes by inhibiting NF- κ B signaling activation in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 89(B), 314-325.
69. Costantino, S., Paneni, F., Lüscher, T. F., & Cosentino, F. (2016). MicroRNA profiling unveils hyperglycaemic memory in the diabetic heart. *Eur Heart J*, 37(6), 572-576.
70. D'Auria, F., Polito, M. V., Vitulano, G., Ciccarelli, M., De Rosa, R., Gigantino, A. ... Galasso, G. (2018). Predictors of left ventricular reverse remodeling in patients with chronic heart failure. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 19(8), 465-469.
71. De Angelis, E., Pecoraro, M., Rusciano, M. R., Ciccarelli, M., & Popolo, A. (2019). Cross-Talk between Neurohormonal Pathways and the Immune System in Heart Failure: A Review of the Literature. *Int J Mol Sci*, 20(7): doi: 10.3390/ijms20071698
72. Del Re D. P., Amgalan D., Linkermann A., Liu Q., & Kitsis R. N. (2019). Fundamental Mechanisms of Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease. *Physiol Rev*, 99(4), 1765-1817.
73. DeRoo, E. P., Wroblewski, S. K., Shea, E. M., Al-Khalil, R. K., Hawley, A. E., Henke, P. K. ... Diaz, J. A. (2015). The role of galectin-3 and galectin-3-binding protein in venous thrombosis. *Blood*, 125(11), 1813-1821
74. Dillmann, W. H. (2019). Diabetic Cardiomyopathy. *Circ Res*, 124(8), 1160-1162.
75. Dombkowski, R., Russell, M., & Olson, K. (2004). Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*, 286, 678-685.
76. Donnarumma, E., Trivedi, R. K., & Lefer, D. J. (2017). Protective Actions of H₂S in Acute Myocardial Infarction and Heart Failure. *Compr Physiol*, 7(2), 583-602.
77. Dowling, R., Goodwin, P. J., & Stambolic, V. (2011). Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. *BMC Med*, 9: doi: 10.1186/1741-7015-9-33.

78. Driver C., Bamitale K. D. S., Kazi A., Olla M., Nyane N.A., & Owira P. M. O. (2018). Cardioprotective Effects of Metformin. *J Cardiovasc Pharmacol*, 72(2), 121-127.
79. Durante, W. (2016). Hydrogen Sulfide Therapy in Diabetes-Accelerated Atherosclerosis: A Whiff of Success. *Diabetes*, 65(10), 2832-2834.
80. Dutta, M., Biswas, U. K., Chakraborty, R., Banerjee, P., Raychaudhuri, U., & Kumar, A. (2014). Evaluation of plasma H₂S levels and H₂S synthesis in streptozotocin induced Type-2 diabetes-an experimental study based on Swietenia macrophylla seeds. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4(1), 483–487.
81. Dziubak, A., Wójcicka, G., Wojtak, A., & Bełtowski, J. (2018). Metabolic Effects of Metformin in the Failing Heart. *Int J Mol Sci*, 19(10): doi: 10.3390/ijms19102869
82. Ellmers, L. J., Templeton, E. M., Pilbrow, A. P., Frampton, C., Ishii, I., Moore, P. K. ... Cameron, V. A. (2020). Hydrogen Sulfide Treatment Improves Post-Infarct Remodeling and Long-Term Cardiac Function in CSE Knockout and Wild-Type Mice. *Int J Mol Sci*, 21(12): doi: 10.3390/ijms21124284.
83. Elrod, J. W., Calvert, J. W., Morrison, J., Doeller, J. E., Kraus, D. W., Tao, L. ... Lefer, D. J. (2007) Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, 15560–15565
84. El-Sayed, S. S., Zakaria, M. N., Abdel-Ghany, R. H., & Abdel-Rahman, A. A. (2016). Cystathionine- γ lyase-derived hydrogen sulfide mediates the cardiovascular protective effects of moxonidine in diabetic rats. *Eur J Pharmacol*, 783, 73-84.
85. El-Seweidy, M. M., Sadik, N. A., & Shaker, O. G. (2011). Role of sulfurous mineral water and sodium hydrosulfide as potent inhibitors of fibrosis in the heart of diabetic rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, 506(1), 48-57.
86. Endoh, M. (2006). Signal transduction and Ca²⁺ signaling in intact myocardium. *J Pharmacol Sci*, 2006, 100, 525–537.

87. Evangelista, I., Nuti, R., Picchioni, T., Dotta, F., & Palazzuoli, A. (2019). Molecular Dysfunction and Phenotypic Derangement in Diabetic Cardiomyopathy. *Int J Mol Sci*, 20(13): doi: 10.3390/ijms20133264.
88. Faichney, J. D., & Tate, P. W. (2003). Metformin in Type 1 Diabetes. Is this a good or bad idea? *Diabetes Care*, 26(5): <https://doi.org/10.2337/diacare.26.5.1655>
89. Falcão-Pires, I., & Leite-Moreira, A. F. (2012). Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment. *Heart Fail Rev*, 17(3), 325-44.
90. Filipovic, M. R., Miljkovic, J., Allgäuer, A., Chaurio, R., Shubina, T., Herrmann, M., & Ivanovic-Burmazovic, I. (2012). Biochemical insight into physiological effects of H₂S: reaction with peroxynitrite and formation of a new nitric oxide donor, sulfinyl nitrite. *Biochem J*, 441(2), 609-621.
91. Filipovic, M. R. (2015). Persulfidation (S-sulfhydration) and H₂S. *Handb Exp Pharmacol*, 230, 29-59.
92. Foretz, M., Guigas, B. & Viollet, B. (2019). Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 15, 569-589.
93. Franssen, C., Chen, S., Unger, A., Korkmaz, H. I., De Keulenaer, G. W., Tschöpe, C. ... Hamdani, N. (2016). Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Heart Fail*, 4(4), 312-324.
94. Frantz, S., Falcao-Pires, I., Balligand, J. L., Bauersachs, J., Brutsaert, D., Ciccarelli, M. ... Heymans, S. (2018). The innate immune system in chronic cardiomyopathy: a European Society of Cardiology (ESC) scientific statement from the Working Group on Myocardial Function of the ESC. *Eur J Heart Fail*, 20(3), 445-459.
95. Frunza, O., Russo, I., Saxena, A., Shinde, A. V., Humeres, C., Hanif, W. ... Frangogiannis, N. G. (2016). Myocardial Galectin-3 Expression Is Associated with Remodeling of the Pressure-Overloaded Heart and May Delay the

- Hypertrophic Response without Affecting Survival, Dysfunction, and Cardiac Fibrosis. *The American journal of pathology*, 186(5), 1114–1127.
96. Funasaka, T., Raz, A., & Nangia-Makker, P. (2014). Galectin-3 in angiogenesis and metastasis. *Glycobiology*, 24(10), 886-891.
 97. Gajdosík, A., Gajdosíková, A., Stefek, M., Navarová, J., & Hozová, R. (1999). Streptozotocin-induced experimental diabetes in male Wistar rats. *Gen Physiol Biophys*, 54-62: PMID: 10703720.
 98. Gheibi, S., Jeddi, S., Kashfi, K., & Ghasemi, A. (2019). Effects of Hydrogen Sulfide on Carbohydrate Metabolism in Obese Type 2 Diabetic Rats. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(1): doi: 10.3390/molecules24010190.
 99. Gheibi, S., Samsonov, A. P., Gheibi, S., Vazquez, A. B., & Kashfi, K. (2020). Regulation of carbohydrate metabolism by nitric oxide and hydrogen sulfide: Implications in diabetes. *Biochem Pharmacol*: doi: 10.1016/j.bcp.2020.113819.
 100. Giuffrè, A., & Vicente, J. B. (2018). Hydrogen Sulfide Biochemistry and Interplay with Other Gaseous Mediators in Mammalian Physiology. *Oxid Med Cell Longev*. doi: 10.1155/2018/6290931.
 101. Gollmer, J., Zirlik, A., & Bugger H. (2020). Mitochondrial Mechanisms in Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes Metab J*, 44(1), 33-53.
 102. Goyal, S. N., Reddy, N. M., Patil, K. R., Nakhate, K. T., Ojha, S., Patil, C. R., & Agrawal, Y. O. (2016). Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chem Biol Interact*, 244, 49-63.
 103. Gu, S., Shi, J., Tang, Z., Sawhney, M., Hu, H., Shi, L. ... Dong, H. (2015). Comparison of glucose lowering effect of metformin and acarbose in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *PLoS One*, 10(5): e0126704.
 104. Guma, M., Wang, Y., Viollet, B., & Liu-Bryan, R. (2015). AMPK Activation by A-769662 Controls IL-6 Expression in Inflammatory Arthritis. *PLoS One*, 10(10): e0140452.
 105. Gundewar, S., Calvert, J. W., Jha, S., Toedt-Pingel, I., Ji, S. Y., Nunez, D. ... Lefer, D. J. (2009). Activation of AMP-activated protein kinase by metformin

- improves left ventricular function and survival in heart failure. *Circ Res*, 104(3), 403-411.
106. Guo, S., Meng, X. W., Yang, X. S., Liu, X. F., Ou-Yang, C. H., & Liu, C. (2018). Curcumin administration suppresses collagen synthesis in the hearts of rats with experimental diabetes. *Acta Pharmacol Sin*, 39(2), 195-204.
107. Han, A., Lu, Y., Zheng, Q., Zhang, J., Zhao, Y., Zhao, M., & Cui, X. (2018). Qiliqiangxin Attenuates Cardiac Remodeling via Inhibition of TGF- β 1/Smad3 and NF- κ B Signaling Pathways in a Rat Model of Myocardial Infarction. *Cell Physiol Biochem*, 45(5), 1797-1806.
108. Henderson, N. C., Mackinnon, A. C., Farnworth, S. L., Poirier, F., Russo, F. P., Iredale, J. P. ... Sethi, T. (2006). Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(13), 5060–5065.
109. Herum, K. M., Choppe, J., Kumar, A., Engler, A. J., & McCulloch, A. D. (2017). Mechanical regulation of cardiac fibroblast profibrotic phenotypes. *Mol Biol Cell*, 28(14), 1871-1882.
110. Hosoki, R., Matsuki, N., & Kimura, H. (1997). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(3), 527–531.
111. Hrynchyshyn, N., Jourdain, P., Desnos, M., Diebold, B., Funck, F. (2013). Galectin-3: a new biomarker for the diagnosis, analysis and prognosis of acute and chronic heart failure. *Arch Cardiovasc Dis*, 106(10), 541-546.
112. Hughes, M. N., Centelles, M. N., & Moore, K. P. (2009). Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. *Free Radic Biol Med*, 47(10), 1346-1353.
113. Huynh, K., Kiriazis, H., Du, X. J., Love, J. E., Gray, S. P., Jandeleit-Dahm, K. A. ... Ritchie R. H. (2013). Targeting the upregulation of reactive oxygen species subsequent to hyperglycemia prevents type 1 diabetic cardiomyopathy in mice. *Free Radic Biol Med*, 60, 307-317.
114. Im, I., Jang, M. J., Park, S. J., Lee, S. H., Choi, J. H., Yoo, H. W. ... Han, Y. M. (2015). Mitochondrial Respiratory Defect Causes Dysfunctional Lactate

- Turnover via AMP-activated Protein Kinase Activation in Human-induced Pluripotent Stem Cell-derived Hepatocytes. *J Biol Chem*, 290(49), 29493-29505.
115. Jackson, M. R., Melideo, S. L., & Jorns, M. S. (2012). Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite. *Biochemistry*, 51(34), 6804-6815.
116. Jain, S. K., Bull, R., Rains, J. L., Bass, P. F., Levine, S. N., Reddy, S. ... Bocchini, J.A. (2010). Low levels of hydrogen sulfide in the blood of diabetes patients and streptozotocin-treated rats causes vascular inflammation? *Antioxid Redox Signal*, 12(11), 1333-1337.
117. Jennings, M. L. (2013). Transport of H₂S and HS(-) across the human red blood cell membrane: rapid H₂S diffusion and AE1-mediated Cl(-)/HS(-) exchange. *Am J Physiol Cell Physiol*, 305(9), 941-950.
118. Jia, G., Habibi, J., DeMarco, V. G., Martinez-Lemus, L. A., Ma, L., Whaley-Connell, A. T. ... Sowers, J. R. (2015). Endothelial Mineralocorticoid Receptor Deletion Prevents Diet-Induced Cardiac Diastolic Dysfunction in Females. *Hypertension*, 66(6), 1159-1167.
119. Jia, G., DeMarco, V. G., & Sowers, J. R. (2016). Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol*, 12(3), 144-153.
120. Jia, G., Whaley-Connell, A., & Sowers, J. R. (2018). Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease. *Diabetologia*, 61(1), 21-28.
121. Jin, S., Pu, S. X., Hou, C. L., Ma, F. F., Li, N., Li, X. H. ... Zhu, Y. C. (2015). Cardiac H₂S Generation Is Reduced in Ageing Diabetic Mice. *Oxid Med Cell Longev*: doi: 10.1155/2015/758358.
122. Ju, Y., Untereiner, A., Wu, L., & Yang, G. (2015). H₂S-induced S-sulfhydration of pyruvate carboxylase contributes to gluconeogenesis in liver cells. *Biochim Biophys Acta*, 1850(11), 2293-2303.
123. Kabil, O., & Banerjee, R. (2014). Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling. *Antioxid Redox Signal*, 20(5), 770-782.

124. Kanagy, N. L., Szabo, C., & Papapetropoulos, A. (2017). Vascular biology of hydrogen sulfide. *Am J Physiol Cell Physiol*, 312(5), 537-C549.
125. Kaneko, Y., Kimura, Y., Kimura, H., & Niki, I. (2006). L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes*, 55(5), 1391-1397.
126. Kang, S. C., Sohn, E. H., & Lee, S. R. (2020). Hydrogen Sulfide as a Potential Alternative for the Treatment of Myocardial Fibrosis. *Oxid Med Cell Longev*: doi: 10.1155/2020/4105382.
127. Karakikes, I., Chaanine, A. H., Kang, S., Mukete, B. N., Jeong, D., Zhang, S. ... Lebeche D. (2013). Therapeutic cardiac-targeted delivery of miR-1 reverses pressure overload-induced cardiac hypertrophy and attenuates pathological remodeling. *J Am Heart Assoc*, 2(2): e000078.
128. Kim, J. A, Jang, H. J, Martinez-Lemus, L. A, & Sowers, J. R. (2012). Activation of mTOR/p70S6 kinase by ANG II inhibits insulin-stimulated endothelial nitric oxide synthase and vasodilation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302(2), 201-208.
129. Kimura, H. (2011). Hydrogen sulfide: its production and functions. *Exp Physiol*, 96(9), 833-835.
130. Kimura, H. (2019). Signaling by hydrogen sulfide (H₂S) and polysulfides (H₂Sn) in the central nervous system. *Neurochem Int*, 126, 118-125.
131. Kolesnyk, Yu. M., Ivanenko, T. V., Abramov, A. V., & Kuzo, N. V. (2016). Current methods of the modeling of experimental diabetes mellitus type 2: a literature review. *Патология*, 1(36), 10-14.
132. Kristensen, J. M., Treebak, J. T., Schjerling, P., Goodyear, L., & Wojtaszewski, J. F. (2014). Two weeks of metformin treatment induces AMPK-dependent enhancement of insulin-stimulated glucose uptake in mouse soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 306(10), 1099-1109.

133. LaPenna, K. B., Polhemus, D. J., Doiron, J. E., Hidalgo, H. A., Li, Z., & Lefer, D. J. (2021). Hydrogen Sulfide as a Potential Therapy for Heart Failure—Past, Present, and Future. *Antioxidants*, 10: [https:// doi.org/10.3390/antiox10030485](https://doi.org/10.3390/antiox10030485)
134. Lee J. H., Kim J. H., Kim J. S., Chang J. W., Kim S. B., Park J. S., & Lee S. K. (2013). AMP-activated protein kinase inhibits TGF- β -, angiotensin II-, aldosterone-, high glucose-, and albumin-induced epithelial-mesenchymal transition. *Am. J. Physiol – Ren Physiol*, 304 (6), 686–697.
135. Lee, T. W., Bai, K. J., Lee, T. I., Chao, T. F., Kao, Y. H., & Chen, Y. J. (2017). PPARs modulate cardiac metabolism and mitochondrial function in diabetes. *J Biomed Sci*, 24(1), 5.
136. Leskova, A., Pardue, S., Glawe, J. D., Kevil, C. G., & Shen, X. (2017). Role of thiosulfate in hydrogen sulfide-dependent redox signaling in endothelial cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 313(2), 256-264.
137. Levick, S. P., & Widiapradja, A. (2020). The Diabetic Cardiac Fibroblast: Mechanisms Underlying Phenotype and Function. *Int J Mol Sci*, 21(3): doi: 10.3390/ijms21030970.
138. Li, L., Hsu, A., & Moore, P. K. (2009). Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation - a tale of three gases! *Pharmacology and Therapeutics*, 123(3), 386–400.
139. Li, L. C., Li, J., & Gao, J. (2014). Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 351(2), 336-343.
140. Libman, I. M., Miller, K. M., DiMeglio, L. A., Bethin, K. E., Katz, M. L., Shah, A. ... T1D Exchange Clinic Network Metformin RCT Study Group. (2015). Effect of Metformin Added to Insulin on Glycemic Control Among Overweight/Obese Adolescents With Type 1 Diabetes: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 314(21):2241-2250.
141. Liu, C., Lu, X. Z., Shen, M. Z., Xing, C. Y., Ma, J., Duan, Y. Y., & Yuan, L. J. (2015). N-Acetyl Cysteine improves the diabetic cardiac function: possible role

- of fibrosis inhibition. *BMC Cardiovasc Disord*, 15: doi: 10.1186/s12872-015-0076-3.
142. Liu, F., Liu, G. J., Liu, N., Zhang, G., Zhang, J. X., & Li, L. F. (2015). Effect of hydrogen sulfide on inflammatory cytokines in acute myocardial ischemia injury in rats. *Exp Ther Med*, 9(3), 1068-1074.
 143. Liu, M., Chen, Z., & Chen, L. (2016). Endoplasmic reticulum stress: A novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(4), 425–443.
 144. Liu, M., Li, Y., Liang, B., Li, Z., Jiang, Z., Chu, C., & Yang, J. (2018). Hydrogen sulfide attenuates myocardial fibrosis in diabetic rats through the JAK/STAT signaling pathway. *Int J Mol Med*, 41(4), 1867-1876.
 145. Liu, X., & Liu, S. (2017). Role of microRNAs in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. *Biomed Rep*, 6(2), 140-145.
 146. Lowicka, E., & Beltowski, J. (2007). Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol. Rep*, 59, 4-24
 147. Luo, B., Li, B., Wang, W., Liu, X., Xia, Y., Zhang, C. ... An F. (2014). NLRP3 gene silencing ameliorates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes rat model. *PLoS One*, 9(8): e104771.
 148. Luo, F., Das, A., Chen, J., Wu, P., Li, X., & Fang, Z. (2019). Metformin in patients with and without diabetes: a paradigm shift in cardiovascular disease management. *Cardiovasc Diabetol*, 18(1): doi: 10.1186/s12933-019-0860-y.
 149. Lv, Z., & Guo, Y. (2020). Metformin and Its Benefits for Various Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11: doi: 10.3389/fendo.2020.00191.
 150. Ma, H., Li, S. Y., Xu, P., Babcock, S.A., Dolence, E. K., Brownlee, M. ... Ren, J. (2009). Advanced glycation endproduct (AGE) accumulation and AGE receptor (RAGE) up-regulation contribute to the onset of diabetic cardiomyopathy. *J Cell Mol Med*, 13(8B), 1751-1764.
 151. Manna, P., & Jain, S. K. (2011). Hydrogen sulfide and L-cysteine increase phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP₃) and glucose utilization by inhibiting phosphatase and tensin homolog (PTEN) protein and activating

- phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/serine/threonine protein kinase (AKT)/protein kinase C ζ / λ (PKC ζ / λ) in 3T3L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 286(46), 39848-39859.
152. Manna, P., Gungor, N., McVie, R., & Jain, S.K. (2014). Decreased cystathionine- γ -lyase (CSE) activity in livers of type 1 diabetic rats and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of type 1 diabetic patients. *J Biol Chem*, 289(17), 11767-11778.
153. Matei, I. V., Ii, H., & Yaegaki, K. (2017). Hydrogen sulfide enhances pancreatic β -cell differentiation from human tooth under normal and glucotoxic conditions. *Regen Med*, 12(2), 125-141.
154. Matsuzawa, A. (2017). Thioredoxin and redox signaling: Roles of the thioredoxin system in control of cell fate. *Arch Biochem Biophys*, 617, 101-105.
155. McCreight, L. J., Bailey, C. J., & Pearson, E. R. (2016). Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia*, 59(3), 426-435.
156. Mel'nik, A. V., Zaichko, N. V., & Palamarchuk, I. V. (2014). *Gender dimorphism of hydrogen sulfide production and physiological effects in cardiovascular system*, The Third International Conference on H₂S Biology and Medicine (June 4-6, 2014, Kyoto, Japan). *Nitric Oxide*, 39(1), 16.
157. Melnyk, A. V., Zaichko, N. V., Palamarchuk, I. V., & Strutynska, O. B. (2020). Effect of H₂S metabolism modulators on the level of galectin-3 in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *The European Journal of Biomedical and Life Sciences*, 4, 29-36.
158. Módis, K., Ju, Y., Ahmad, A., Untereiner, A. A., Altaany, Z., Wu, L. ... Wang, R. (2016). S-Sulfhydration of ATP synthase by hydrogen sulfide stimulates mitochondrial bioenergetics. *Pharmacol Res*, 113(Pt A), 1116-1124.
159. Moreno-Navarrete, J. M., Ortega, F. J., Rodríguez-Hermosa, J. I., Sabater, M., Pardo, G., Ricart W., & Fernández-Real, J. M. (2011). OCT1 Expression in adipocytes could contribute to increased metformin action in obese subjects. *Diabetes*. 60(1). 168-176.
160. Murphy, B., Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2019). Hydrogen sulfide signaling in mitochondria and disease. *FASEB J*, 33(12), 13098-13125.

161. Nair, N., Kumar, S., Gongora, E., & Gupta, S. (2013). Circulating miRNA as novel markers for diastolic dysfunction. *Mol Cell Biochem.* 376(1-2), 33-40.
162. Ni, R., Cao, T., Xiong, S., Ma, J., Fan, G. C., Lacefield, J. C. ... Peng T. (2016). Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med*, 90, 12-23.
163. Nishigaki, A., Noma, H., & Kakizawa, T. (1989). The relations between doses of streptozotocin and pathosis in induced diabetes mellitus. *Shikwa Gakuho*, 89(3), 639-662.
164. Nna, V. U., Abu Bakar, A. B., Md Lazin, M. R. M. L., & Mohamed M. (2018). Antioxidant, anti-inflammatory and synergistic anti-hyperglycemic effects of Malaysian propolis and metformin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*, 120, 305-320.
165. Okamoto, M., Yamaoka, M., Takei, M., Ando, T., Taniguchi, S., Ishii, I. ... Kimura, T. (2013). Endogenous hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from a high-fat diet-induced glucotoxicity and prevents the development of type 2 diabetes *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 442(3-4), 227-233.
166. Palamarchuk, I. V. (2018). *Modulators of hydrogen sulfide metabolism influence antioxidant/prooxidant system in streptozotocin-induced diabetic rat heart*, Мат. XV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2018» (18 - 20 квітня 2018 р., Вінниця).
167. Palamarchuk, I. V., & Zaichko, N. V. (2018). *Hydrogen sulfide metabolism modulators influence thiol/disulphide status in streptozotocin-induced diabetic rat's heart*, FEBS3+meeting - XI Parnas Conference – Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (3-5-September 2018, Kyiv, Ukraine). *Ukr. Biochem. J.*, 90(Special Issue), 126.
168. Palamarchuk, I. V., & Zaichko, N. V. (2018). *Metformin and its combination with sodium hydrosulfide influences plasma galectin-3 and CSE/H₂S system in diabetic rat's heart*, ICHSBM 2018: 20th International Conference on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine (September 10-11, 2018, Japan World Academy

- of Science, Engineering and Technology, Tokyo, Japan). *International Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 12(9), 4.
169. Palamarchuk, I. V., & Zaichko, N. V. (2019). *Changes in hydrogen sulphide system in myocardium of rats with experimental diabetes*, Abstr. 27th International Conference on “Diabetes and Endocrinology” (16 - 17 May, 2019, Prague, Czech Republic). *Journal of Diabetology*, 3, 24.
170. Palamarchuk, I. V., & Zaichko, N. V. (2019). *Metformin and its combination with sodium hydrosulfide influences CSE/H₂S system in aorta of diabetic rats*, Матеріали XII Українського біохімічного конгресу (30 вересня - 4 жовтня 2019 р., Тернопіль). *Медична та клінічна хімія*, 21(3), 230-231.
171. Palamarchuk, I. V., Zaichko, N. V., & Ostrenyuk, R. S. (2018). *Metformin and its combination with sodium hydrosulfide influence thiol/disulphide status and antioxidant/prooxydant system in streptozotocin-induced diabetic rat heart*, Abstracts book. SMARTLION2018 2nd Symposium Innovation in Medicine (October 11-13, 2018, Lviv, Ukraine).
172. Palamarchuk, I. V., Zaichko, N. V., Mel'nik, A. V., Nechyporuk, V. M., & Yurchenko, P. O. (2020). *Cardiomyocyte DNA content and its link to CSE/H₂S system in the heart of experimental diabetic rats*. *Georgian Medical News*, 4(301), 147-152.
173. Paneni, F. (2018). *Empagliflozin across the stages of diabetic heart disease*. *Eur Heart J*, 39(5), 371-373.
174. Pappachan, J. M., Varughese, G. I., Sriraman, R., & Arunagirinathan, G. (2013). *Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnostic evaluation and management*. *World journal of diabetes*, 4(5), 177–189.
175. Parsanathan, R., & Jain, S. K. (2018). *Hydrogen sulfide increases glutathione biosynthesis, and glucose uptake and utilisation in C2C12 mouse myotubes*. *Free Radic. Res*, 52, 288–303
176. Patel M., & Shah G. (2010). *Possible role of hydrogen sulfide in insulin secretion and in development of insulin resistance*. *J Young Pharm*, 2(2), 148-151.

177. Paul, B. D., & Snyder, S. H. (2015). Protein sulfhydration. *Methods Enzymol*, 555, 79-90.
178. Paul, B. D., & Snyder, S. H. (2018). Gasotransmitter hydrogen sulfide signaling in neuronal health and disease. *Biochem Pharmacol*, 149, 101-109.
179. Paulus, W. J., & Tschöpe, C. (2013). A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol*, 62(4), 263-271.
180. Peake, B.F., Nicholson, C.K., Lambert, J.P., Hood, R.L., Amin, H., Amin, S., & Calvert, J.W. (2013). Hydrogen sulfide preconditions the db/db diabetic mouse heart against ischemia-reperfusion injury by activating Nrf2 signaling in an Erk-dependent manner. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 304(9), 1215-1224.
181. Petrie, J. R., Chaturvedi, N., Ford, I., Brouwers, M., Greenlaw, N., Tillin, T. ... REMOVAL Study Group. (2017). Cardiovascular and metabolic effects of metformin in patients with type 1 diabetes (REMOVAL): a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 5(8), 597–609.
182. Polhemus, D. J., Calvert, J. W., Butler, J., & Lefer, D. J. (2014). The cardioprotective actions of hydrogen sulfide in acute myocardial infarction and heart failure. *Scientifica (Cairo)*: doi: 10.1155/2014/768607.
183. Protti, A., Properzi, P., Magnoni, S., Santini, A., Langer, T., Guenzani, S. ... Gattinoni, L. (2016). Skeletal muscle lactate overproduction during metformin intoxication: An animal study with reverse microdialysis. *Toxicol Lett*, 255, 43-46.
184. Pryor, R., & Cabreiro, F. (2015). Repurposing metformin: An old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochem. J*, 471, 307–322.
185. Pugliese, G., Iacobini, C., Ricci, C., Blasetti Fantauzzi, C., & Menini S. (2014). Galectin-3 in diabetic patients. *Clin Chem Lab Med*, 52(10), 1413-1423.

186. Puthanveetil, P., Zhang, D., Wang, Y., Wang, F., Wan, A., Abrahani, A., & Rodrigues, B. (2012). Diabetes triggers a PARP1 mediated death pathway in the heart through participation of FoxO1. *J Mol Cell Cardiol.* 53(5), 677-686.
187. Rajesh, M., Bátkai, S., Kechrid, M., Mukhopadhyay, P., Lee, W. S., Horváth, B. ... Pacher, P. (2012). Cannabinoid 1 receptor promotes cardiac dysfunction, oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*, 61(3), 716-727.
188. Revenko, O., Zaichko, N., Wallace, J., & Zayachkivska, O. (2020). Exogenous hydrogen sulfide for the treatment of mesenteric damage associated with fructose-induced malfunctions via inhibition of oxidative stress. *Ukrainian Biochemical Journal*, 92(2), 86-97.
189. Rojas, L. B. A., & Gomes, M. B. (2013). Metformin: An old but still the best treatment for type 2 diabetes. *Diabetol. Metab. Syndr*, 5: doi: 10.1186/1758-5996-5-6.
190. Romaine, A., Sørensen, I. W., Zeltz, C., Lu, N., Erusappan, P. M., Melleby, A. O. ... Gullberg, D. (2018). Overexpression of integrin $\alpha 11$ induces cardiac fibrosis in mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 222(2): doi: 10.1111/apha.12932.
191. Rose, P., Moore, P. K., & Zhu, Y. Z. (2017). H₂S biosynthesis and catabolism: new insights from molecular studies. *Cell Mol Life Sci*, 74(8), 1391-1412.
192. Saeed, M., Tapia, G., Ariansen, I., Stene, L.C., Seljeflot, I., Tell, G.S. ... Joner, G. (2021). Serum Galectin-3 and Subsequent Risk of Coronary Heart Disease in Subjects With Childhood-Onset Type 1 Diabetes: A Cohort Study. *Diabetes Care*, 44(3), 810-816.
193. Saghazadeh-Dezfuli, M., Fanaei, H., Gharib-Naseri, M. K., Nasri, S., & Mard S. A. (2017). Antidiarrheal effect of sodium hydrosulfide in diabetic rats: In vitro and in vivo studies. *Neurogastroenterology & Motility*: <https://doi.org/10.1111/nmo.13273>
194. Sbodio, J. I., Snyder, S. H., & Paul, B. D. (2019). Regulators of the transsulfuration pathway. *Br J Pharmacol*, 176(4), 583-593.

195. Sedgwick, B., Riches, K., Bageghni, S. A., O'Regan, D. J., Porter, K. E., & Turner, N. A. (2014). Investigating inherent functional differences between human cardiac fibroblasts cultured from nondiabetic and Type 2 diabetic donors. *Cardiovasc Pathol*, 23(4), 204-210.
196. Sen, N., Paul, B. D., Gadalla, M. M., Mustafa, A. K., Sen, T., Xu, R., Kim, S., Snyder, S. H. (2012). Hydrogen sulfide-linked sulfhydrylation of NF-kappaB mediates its antiapoptotic actions. *Mol Cell*, 45(1), 13-24.
197. Shamhart, P. E., Luther, D. J., Adapala, R. K., Bryant, J. E., Petersen K. A., Meszaros, J. G., & Thodeti, C. K. (2014). Hyperglycemia enhances function and differentiation of adult rat cardiac fibroblasts. *Can J Physiol Pharmacol*, 92(7), 598-604.
198. Sharma, U.C, Mosleh, W., Chaudhari, M.R., Katkar, R., Weil, B., Evelo, C. ... Suzuki, G. (2017). Myocardial and Serum Galectin-3 Expression Dynamics Marks Post-Myocardial Infarction Cardiac Remodelling. *Heart Lung Circ*, 26(7), 736-745.
199. Shen, J. Z, & Young, M. J. (2012). Corticosteroids, heart failure, and hypertension: a role for immune cells? *Endocrinology*, 153(12), 5692-5700.
200. Sikorskaya K., Zarzecka I., Ejikeme U., & Russell J. (2021). The use of metformin as an add-on therapy to insulin in the treatment of poorly controlled type 1 diabetes mellitus in adolescents. *Metabolism Open*, 9: <https://doi.org/10.1016/j.metop.2021.100080>.
201. Singh, V. P., Baker, K. M., & Kumar, R. (2008). Activation of the intracellular renin-angiotensin system in cardiac fibroblasts by high glucose: role in extracellular matrix production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294(4), 1675-1684.
202. Stein, A., & Bailey, Sh. M. (2013). Redox biology of hydrogen sulfide: Implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Redox Biology*, 1, 32-39

203. Stipanuk, M. H., & Beck, P. W. (1982). Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem. J*, 206(2), 267-277.
204. Su, M., Wang, J., Wang, C., Wang, X., Dong, W., Qiu, W. ... Hui, R. (2015). MicroRNA-221 inhibits autophagy and promotes heart failure by modulating the p27/CDK2/mTOR axis. *Cell Death Differ*, 22(6), 986-999.
205. Sultana, M. R., Bagul, P. K., Katare, P. B., Anwar Mohammed, S., Padiya, R., & Banerjee, S. K. (2016). Garlic activates SIRT-3 to prevent cardiac oxidative stress and mitochondrial dysfunction in diabetes. *Life Sci*, 164, 42-51.
206. Sun, L., Jin, H., Sun, L., Chen, S., Huang, Y., Liu, J. ... Du, J. (2015). Hydrogen sulfide alleviates myocardial collagen remodeling in association with inhibition of TGF- β /Smad signaling pathway in spontaneously hypertensive rats. *Mol Med*, 20, 503-515.
207. Sun, X., Wang, W., Dai, J., Jin, S., Huang, J., Guo C. ... Wang, Y. (2017). A Long-Term and Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donor Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Sci Rep*, 7(1): doi: 10.1038/s41598-017-03941-0.
208. Suzuki, K., Olah, G., Modis, K., Coletta, C., Kulp, G., Gerö, D. ... Szabo, C. (2011). Hydrogen sulfide replacement therapy protects the vascular endothelium in hyperglycemia by preserving mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(33), 13829-13834.
209. Suzuki, K., Sagara, M., Aoki, C., Tanaka, S., & Aso, Y. (2017). Clinical Implication of Plasma Hydrogen Sulfide Levels in Japanese Patients with Type 2 Diabetes. *Intern Med*, 56(1), 17-21.
210. Szabo, C. (2012). Roles of hydrogen sulfide in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal*, 17(1), 68-80.
211. Takahashi, N., Wei, F. Y., Watanabe, S., Hirayama, M., Ohuchi, Y., Fujimura, A. ... Tomizawa, K. (2017). Reactive sulfur species regulate tRNA methylthiolation and contribute to insulin secretion. *Nucleic Acids Res*, 45(1), 435-445.

212. Talior-Volodarsky, I., Connelly, K. A., Arora, P. D., Gullberg, D., & McCulloch, C.A. (2012). $\alpha 11$ integrin stimulates myofibroblast differentiation in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*, 96(2), 265-275.
213. Tan, L. J., Nye, B. G., & Wende, A. R. (2017). Diabetes-Related Cardiac Dysfunction. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*, 32(2), 171–179.
214. Tan, Y., Zhang, Z., Zheng, C., Wintergerst, K. A., Keller, B. B., & Cai, L. (2020). Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence. *Nat Rev Cardiol*, 17, 585–607.
215. Tang, M., Zhong, M., Shang, Y., Lin, H., Deng, J., Jiang, H. ... Zhang, W. (2008). Differential regulation of collagen types I and III expression in cardiac fibroblasts by AGEs through TRB3/MAPK signaling pathway. *Cell Mol Life Sci*, 65(18), 2924-2932.
216. Tang, G., Zhang, L., Yang, G., Wu, L., & Wang, R. (2013). Hydrogen sulfide-induced inhibition of L-type Ca^{2+} channels and insulin secretion in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 56(3), 533-541.
217. Tao ,A., Song, J., Lan, T., Xu, X., Kvietys, P., Kao, R. ... Rui, T. (2015). Cardiomyocyte-fibroblast interaction contributes to diabetic cardiomyopathy in mice: Role of HMGB1/TLR4/IL-33 axis. *Biochim Biophys Acta*, 1852(10 Pt A), 2075-2085.
218. Teng, H., Wu, B., Zhao, K., Yang, G., Wu, L., & Wang, R. (2013). Oxygen-sensitive mitochondrial accumulation of cystathionine β -synthase mediated by Lon protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(31), 12679-12684.
219. Tocchetti, C. G., Caceres, V., Stanley, B. A., Xie, C., Shi, S., Watson, W.H. ... Aon M. A. (2012). GSH or palmitate preserves mitochondrial energetic/redox balance, preventing mechanical dysfunction in metabolically challenged myocytes/hearts from type 2 diabetic mice. *Diabetes*. Dec; 61(12), 3094-105.
220. Tsai, C.Y., Wen, S.Y., Shibu, M.A., Yang, Y.C., Peng, H., Wang, B. ... Lee, C.Y. (2015). Diallyl trisulfide protects against high glucose-induced cardiac apoptosis by stimulating the production of cystathionine gamma-lyase-derived hydrogen sulfide. *Int. J. Cardiol.*, 195, 300-310.

221. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34) (1998). *Lancet*, 352, 854–865.
222. Untereiner, A., & Wu, L. (2018). Hydrogen Sulfide and Glucose Homeostasis: A Tale of Sweet and the Stink. *Antioxid Redox Signal*, 28(16), 1463-1482.
223. Varfolomeev, E., Goncharov, T., & Vucic, D. (2015). Roles of c-IAP proteins in TNF receptor family activation of NF- κ B signaling. *Methods Mol Biol*, 1280, 269–282.
224. Vella, S., Buetow, L., Royle, P., Livingstone, S., Colhoun, H. M., & Petrie, J. R. (2010). The use of metformin in type 1 diabetes: a systematic review of efficacy. *Diabetologia*, 53(5), 809-820.
225. Vilar, L., Canadas, V., Arruda, M.J., Arahata, C., Agra, R., Pontes, L. ... Gusmão, A. (2010). Comparison of metformin, gliclazide MR and rosiglitazone in monotherapy and in combination for type 2 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 54(3), 311-318.
226. Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., & Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*, 122(6), 253-270.
227. Vitvitsky, V., Yadav, P.K., Kurthen, A., & Banerjee, R. (2015). Sulfide oxidation by a noncanonical pathway in red blood cells generates thiosulfate and polysulfides. *J Biol Chem*, 290(13), 8310-8320.
228. Vitvitsky, V., Miljkovic, J. L., Bostelaar, T., Adhikari, B., Yadav, P. K., Steiger, A. K. ... Filipovic, M. R. (2018). Cytochrome c Reduction by H₂S Potentiates Sulfide Signaling. *ACS Chem Biol*. 13(8), 2300-2307.
229. Wallace, J., & Wang, R. (2015). Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. *Nat Rev Drug Discov*, 14, 329-345.
230. Wang X., Wang Q., Guo W., & Zhu Y. Z. (2011). Hydrogen sulfide attenuates cardiac dysfunction in a rat model of heart failure: a mechanism through cardiac mitochondrial protection. *Biosci Rep*, 31(2), 87-98.

231. Watson, C. J., Gupta, S. K., O'Connell, E., Thum, S., Glezeva, N., Fendrich, J. ... Thum, T. (2015). MicroRNA signatures differentiate preserved from reduced ejection fraction heart failure. *Eur J Heart Fail*, 17(4), 405-415.
232. Wedmann, R., Bertlein, S., Macinkovic, I., Böltz, S., Miljkovic, J. Lj., Muñoz, L. E. ... Filipovic, M. R. (2014). Working with "H₂S": facts and apparent artifacts. *Nitric Oxide*, 41, 85-96.
233. White, J. R. (2014). A brief history of the development of diabetes medications. *Diabetes Spectr*, 27, 82–86.
234. WHO. The top 10 causes of death [updated May 2018]. World Health Organization, Geneva. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
235. Wiliński, B., Wiliński, J., Somogyi, E., Piotrowska, J., & Opoka, W. (2013). Metformin raises hydrogen sulfide tissue concentrations in various mouse organs. *Pharmacol Rep*, 65(3), 737-742.
236. Witters, L. A. (2001). The blooming of the French lilac. *J. Clin. Investig*, 108, 1105–1107.
237. Wu, D., Wang, J., Li, H., Xue, M., Ji, A., & Li, Y. (2015). Role of Hydrogen Sulfide in Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev*: doi: 10.1155/2015/186908.
238. Wu, H., Li, G. N., Xie, J., Li, R., Chen, Q. H., Chen, J. Z. ... Xu, B. (2016). Resveratrol ameliorates myocardial fibrosis by inhibiting ROS/ERK/TGF- β /periostin pathway in STZ-induced diabetic mice. *BMC Cardiovasc Disord*, 16: doi: 10.1186/s12872-015-0169-z.
239. Wu, L., Yang, W., Jia, X., Yang, G., Duridanova, D., Cao, K., & Wang, R. (2009). Pancreatic islet overproduction of H₂S and suppressed insulin release in Zucker diabetic rats. *Lab Invest*. 89(1), 59-67.
240. Wu, W., Liu, X., & Han, L. (2019). Apoptosis of cardiomyocytes in diabetic cardiomyopathy involves overexpression of glycogen synthase kinase-3 β . *Bioscience reports*, 39(1): <https://doi.org/10.1042/BSR20171307>

241. Xie, L., Gu, Y., Wen, M., Zhao, S., Wang, W., Ma, Y. ... Ji, Y. (2016). Hydrogen Sulfide Induces Keap1 S-sulhydrylation and Suppresses Diabetes-Accelerated Atherosclerosis via Nrf2 Activation. *Diabetes*, 65(10), 3171-3184.
242. Xie, Z. Z., Liu, Y., & Bian, J. S. (2016). Hydrogen Sulfide and Cellular Redox Homeostasis. *Oxid Med Cell Longev*, doi: 10.1155/2016/6043038.
243. Xin, G., Wei, Z., Ji, C., Zheng, H., Gu, J., Ma, L. ... Huang, W. (2016). Metformin Uniquely Prevents Thrombosis by Inhibiting Platelet Activation and mtDNA Release. *Sci Rep*, 6: doi: 10.1038/srep36222.
244. Xu, J., Zhou, Q., Xu, W., & Cai, L. (2012). Endoplasmic reticulum stress and diabetic cardiomyopathy. *Exp Diabetes Res*: doi: 10.1155/2012/827971.
245. Xue, R., Hao, D. D., Sun, J. P., Li, W. W., Zhao, M. M., Li, X. H. ... Zhu, Y.C. (2013). Hydrogen sulfide treatment promotes glucose uptake by increasing insulin receptor sensitivity and ameliorates kidney lesions in type 2 diabetes. *Antioxid Redox Signal*, 19(1), 5-23.
246. Yadav, P. K., Yamada, K., Chiku, T., Koutmos, M., & Banerjee, R. (2013). Structure and kinetic analysis of H₂S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase. *J Biol Chem*, 288(27), 20002-20013.
247. Yamazaki, K. G., Gonzalez, E., & Zambon, A. C. (2012). Crosstalk between the renin-angiotensin system and the advance glycation end product axis in the heart: role of the cardiac fibroblast. *J Cardiovasc Transl Res*, 5(6), 805-813.
248. Yang, F., Zhang, L., Gao, Z., Sun, X., Yu, M., Dong, S. ... Lu, F. (2017). Exogenous H₂S Protects Against Diabetic Cardiomyopathy by Activating Autophagy via the AMPK/mTOR Pathway. *Cell Physiol Biochem*, 43(3), 1168-1187.
249. Yang, F., Qin, Y., Wang, Y., Meng, S., Xian, H., Che, H. ... Wang, L. (2019). Metformin Inhibits the NLRP3 Inflammasome via AMPK/mTOR-dependent Effects in Diabetic Cardiomyopathy. *Int J Biol Sci*, 15(5), 1010-1019.
250. Yang, G. (2014). Protein S-sulhydrylation as a major sources of H₂S bioactivity. *Receptors & Clinical Investigation*, 1(4): doi: 10.14800/rci.337.

251. Yang, H., Mao, Y., Tan, B., Luo, S., & Zhu, Y. (2015). The protective effects of endogenous hydrogen sulfide modulator, S-propargyl-cysteine, on high glucose-induced apoptosis in cardiomyocytes: A novel mechanism mediated by the activation of Nrf2. *Eur. J. Pharmacol.*, 761, 135-143.
252. Yang, J., Gupta, V., Carroll, K. S., & Liebler, D. C. (2014). Site-specific mapping and quantification of protein S-sulphenylation in cells. *Nat Commun*, 5: doi: 10.1038/ncomms5776.
253. Yang, W., Yang, G., Jia, X., Wu, L., & Wang, R. (2005). Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *J Physiol*, 569(Pt 2), 519-531.
254. Yao, X., Tan, G., He, C., Gao, Y., Pan, S., Jiang, H., & Sun, X. (2012). Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes from myocardial ischemia-reperfusion injury by enhancing phosphorylation of apoptosis repressor with caspase recruitment domain. *Tohoku J Exp Med*, 226(4), 275-285.
255. Yin, Q., Chen, J., Ma, S., Dong, C., Zhang, Y., Hou, X. ... Liu, B. (2020). Pharmacological Inhibition of Galectin-3 Ameliorates Diabetes-Associated Cognitive Impairment, Oxidative Stress and Neuroinflammation in vivo and in vitro. *J Inflamm Res*, 13, 533-542.
256. Yusuf, M., Kwong Huat, B. T., Hsu, A., Whiteman, M., Bhatia, M., & Moore, P. K. (2005). Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 333(4), 1146-1152.
257. Zaichko, N. V., Mel'nik, A. V., Olhovskiy, A. S., & Palamarchuk, I.V. (2014). *Disturbances in hydrogen sulfide synthesis and degradation in rats' myocardium in aging*, The Third International Conference on H₂S Biology and Medicine (June 4-6, 2014, Kyoto, Japan). *Nitric Oxide*, 39(1), 18.
258. Zaichko, N. V., Melnik, A. V., Yoltukhivskyy, M. M., Olhovskiy, A. S., & Palamarchuk, I. V. (2014). Hydrogen sulfide: modern aspects of metabolism, biological and medical role. *Ukr. Biochem. J*, 86(5), 5-25.

259. Zaichko, N. V., Palamarchuk I. V., & Strutynska O. B. (2017). *Propargylglycin and hydrogen sulfide effects on plasma galectin-3 in streptozotocin-induced diabetic rats*, Programme and book of abstracts, «VIII Lviv - Lublin conference of experimental and clinical biochemistry» (18th – 20th September 2017, Lublin, Poland). Lublin, Medical University.
260. Zaichko N. V., Palamarchuk I. V., Blazhchenko V. V., & Ostrenyuk, R. S. (2018). *The hydrogen sulfide system disturbances: ethiology and pathogenetic effects*, Abstracts book. SMARTLION2018 2nd Symposium Innovation in Medicine (October 11-13, 2018, Lviv, Ukraine).
261. Zaichko, N. V., Palamarchuk, I. V., Blazhchenko, V. V., & Ostrenyuk, R. S. (2019). *Age related changes in hydrogen sulfide metabolism in rats organs : connection with mediators of angiogenesis*, Матеріали XII Українського біохімічного конгресу (30 вересня - 4 жовтня 2019 р., Тернопіль). Медична та клінічна хімія, 21(3), 187-188.
262. Zaorska, E., Tomasova, L., Koszelewski, D., Ostaszewski, R., & Ufnal, M. (2020). Hydrogen Sulfide in Pharmacotherapy, Beyond the Hydrogen Sulfide-Donors. *Biomolecules*, 10(2): doi: 10.3390/biom10020323.
263. Zhang, L., Yang, G., Tang, G., Wu, L., & Wang, R. (2011). Rat pancreatic level of cystathionine γ -lyase is regulated by glucose level via specificity protein 1 (SP1) phosphorylation. *Diabetologia*, 54(10), 2615-2625.
264. Zhang, L., Yang, G., Untereiner, A., Ju, Y., Wu, L., & Wang, R. (2013). Hydrogen sulfide impairs glucose utilization and increases gluconeogenesis in hepatocytes. *Endocrinology*, 154(1), 114-26.
265. Zhang, Y., Wang, J. H., Zhang, Y. Y., Wang, Y.Z. , Wang, J., Zhao, Y. ... Pan, Z. W. (2016). Deletion of interleukin-6 alleviated interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy of mice through affecting TGF β 1 and miR-29 pathways. *Sci Rep*, 6: doi: 10.1038/srep23010.
266. Zhang, Y., Zhang, Y. Y., Li T. T., Wang, J., Jiang, Y., Zhao, Y. ... Pan, Z. W. (2018). Ablation of interleukin-17 alleviated cardiac interstitial fibrosis and

- improved cardiac function via inhibiting long non-coding RNA-AK081284 in diabetic mice. *J Mol Cell Cardiol*, 115, 64-72.
267. Zhao, S., Li, X., Li, X., Wei, X., & Wang, H. (2021). Hydrogen Sulfide Plays an Important Role in Diabetic Cardiomyopathy. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.627336>
268. Zheng, J., Woo, S.L., Hu, X., Botchlett, R., Chen, L., Huo, Y., & Wu, C. (2015). Metformin and metabolic diseases: A focus on hepatic aspects. *Front. Med*, 9, 173–186.
269. Zhou, X., An, G., & Lu, X. (2015). Hydrogen sulfide attenuates the development of diabetic cardiomyopathy. *Clin Sci (Lond)*, 128(5), 325-335.
270. Cohen, H. J., & Fridovich, I. (1971). Hepatic sulfite oxidase. Purification and properties. *J. Biol. Chem*, 246(2), 359-366.
271. Fukui, T., Ishizaka, N., Rajagopalan, S., Laursen, J. B., Capers, Q. 4th, Taylor, W. R. ... Griendling, K. K. (1997). p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ. Res*, 80(1), 45-51.
272. Jung, H. I., Lim, H. W., Kim, B. C., Park, E. H., & Lim, C. J. (2004). Differential thioredoxin reductase activity from human normal hepatic and hepatoma cell lines. *Yonsei Medical Journal*, 45(2), 263-272.
273. Huang, P., Shen, Z., Yu, W., Huang, Y., Tang, C., Du, J., & Jin, H. (2017). Hydrogen Sulfide Inhibits High-Salt Diet-Induced Myocardial Oxidative Stress and Myocardial Hypertrophy in Dahl Rats. *Frontiers in pharmacology*, 8, 128. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00128>
274. Zlobine, I., Gopal, K., & Ussher, J. R. (2016). Lipotoxicity in obesity and diabetes-related cardiac dysfunction. *Biochim Biophys Acta*, 1861(10), 1555-1568.

ДОДАТОК А
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Вікові особливості впливу пропаргілгліцину та натрій гідрогенсульфіду на показники обміну H_2S в міокарді щурів / Н.В. Заїчко, М.М. Йолтухівський, О.С. Ольховський, І.В. Паламарчук // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – № 2 (105). – С. 105 – 110. *(Дисертант особисто виконала дослідження показників обміну H_2S у міокарді дорослих щурів, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
2. Hydrogen sulfide: modern aspects of metabolism, biological and medical role / N.V. Zaichko, A.V. Melnik, M.M. Yoltukhivskyy, A.S. Olhovskiy, I.V. Palamarchuk // Ukr. Biochem. J. – 2014. – № 86 (5). – P. 5–25. *(Видання включено до бази даних Scopus. Дисертантом особисто проведено збір та узагальнення частини наукової інформації з медичної ролі модуляторів обміну H_2S , написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
3. Мельник, А.В. Вплив модуляторів обміну гідроген сульфідом на біохімічні показники та тонус аорти щурів різних вікових груп / А.В. Мельник, Н.В. Заїчко, І.В. Паламарчук // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2014. – № 18 (2). – С. 397 – 400. *(Дисертант особисто брала участь у дослідженні впливу модуляторів обміну H_2S на показники стану аорти статевозрілих щурів, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
4. Вплив метформіну та його поєднання з натрій гідрогенсульфідом на стан системи H_2S та асоційовані біохімічні порушення в міокарді та нирках щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету/ І.В. Паламарчук, О.Б. Струтинська, А.В. Мельник, Н.В. Заїчко // Вісник проблем біології і

- медицини. – 2020. – № 3 (157). – С. 133-137. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-3-157-133-137 (*Видання включене до міжнародних наукометричних баз. Дисертант особисто брала участь у моделюванні діабету та провела біохімічні дослідження міокарду щурів, написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).
5. Effect of H₂S metabolism modulators on the level of galectin-3 in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus / A.V. Melnyk, N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk, O.B. Strutynska // The European Journal of Biomedical and Life Sciences. – 2020. – No 4. – P.29-36. DOI: <https://doi.org/10.29013/ELBLS-20-4-29-36> (*Фахове видання Австрії. Видання включене до міжнародних наукометричних баз. Дисертант особисто брала участь у моделюванні діабету, проводила біохімічні дослідження у міокарді щурів, написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).
 6. Cardiomyocyte DNA content and its link to CSE/H₂S system in the heart of experimental diabetic rats / I.V. Palamarchuk, N.V. Zaichko, A.V. Mel'nik, V.M. Nechyporuk, P.O. Yurchenko // Georgian Medical News. – 2020. – Vol. 4, No 301. – P. 147 – 152. (*Фахове видання Грузії. Видання включено до бази даних Scopus. Дисертант особисто провела всі експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).
 7. Патент на корисну модель №107766, Україна, МПК (2016.01) А61К 33/00 А61Р 3/10 (2006.01). Спосіб профілактики діабетичної кардіоміопатії в експерименті / Паламарчук І.В., Заїчко Н.В.; Науково-дослідний інститут реабілітації інвалідів (навчально-науково-лікувальний комплекс) Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. - № u201511677; заявл. 26.11.2015; опубл. 24.06.2016; Бюл. № 12. (*Дисертантом особисто проведено експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез*).

8. Патент на корисну модель №107767, Україна, МПК А61К 31/10 (2006.01) А61Р 3/10 (2006.01). Застосування натрієвої солі гідрогенсульфіду для потенціювання вазопротективного ефекту антидіабетичних засобів / Заїчко Н.В., Паламарчук І.В., Струтинська О.Б.; заявник та патентовласник Науково-дослідний інститут реабілітації інвалідів (навчально-науково-лікувальний комплекс) Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. – № u201511678; заявл. 26.11.2015; опубл. 24.06.2016; Бюл. № 12. *(Дисертантом особисто проведено експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання та оформлення патенту виконано у співавторстві)*
Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:
9. Zaichko, N. V. Disturbances in hydrogen sulfide synthesis and degradation in rats' myocardium in aging / N.V. Zaichko, A.V. Mel'nik, A. S. Olhovskiy, I.V. Palamarchuk // The Third International Conference on H₂S Biology and Medicine (June 4-6, 2014, Kyoto, Japan). – Nitric Oxide. – 2014. – № 39(1). – P.18. *(Дисертант брала участь в експериментальних дослідженнях, статистичному аналізі матеріалу, написання тез виконано у співавторстві).*
10. Mel'nik, A.V. Gender dimorphism of hydrogen sulfide production and physiological effects in cardiovascular system / A.V. Mel'nik, N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk // The Third International Conference on H₂S Biology and Medicine (June 4-6, 2014, Kyoto, Japan). – Nitric Oxide. – 2014. – № 39(1). – P.16. *(Дисертант брала участь в експериментальних дослідженнях, статистичному аналізі матеріалу, написання тез виконано у співавторстві).*
11. Паламарчук, І.В. Вплив гідроген сульфїду на маркери оксидативного стресу в міокарді щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом / І.В. Паламарчук, Н.В. Заїчко // III міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (24-25

- вересня 2015 р., Дніпропетровськ). – Дніпропетровськ, 2015. – С. 138. *(Дисертантом особисто проведено всі експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).*
12. Паламарчук, І.В. Продукція гідроген сульфід у аорті щурів за умов стрептозотоцинового діабету та його корекції метформіном / І.В Паламарчук, Н.В. Заїчко // Мат. VIII науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини» (10 листопада 2015 р., Вінниця). – Вінниця, 2015. – С.198-199. *(Дисертантом особисто проведено всі експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).*
13. Паламарчук, І.В. Вміст галектину-3 в сироватці крові щурів за стрептозотоцинового діабету та його корекції / І.В Паламарчук // Мат. XIII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2016» (7-8 квітня 2016 р. Вінниця). – Вінниця, 2016. – С.157.
14. Паламарчук, І.В. Вплив гідроген сульфід та метформіну на біохімічні зміни в міокарді щурів за стрептозотоцинового діабету / І.В Паламарчук, Н.В. Заїчко // Мат. Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодні» (24 лютого 2016 р., Вінниця). – Вінниця, 2016. – С. 76 – 78. *(Дисертантом особисто проведено всі експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).*
15. Струтинська, О.Б. Вплив гідроген сульфід на антидіабетичний ефект метформіну за стрептозотоцинового діабету у щурів // О.Б. Струтинська, І.В Паламарчук, Н.В Заїчко // Мат. Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодні» (24 лютого 2016 р., Вінниця). - Вінниця, 2016. – С. 91 – 93. *(Дисертантом особисто проведено біохімічні дослідження маркерів оксидативного стресу, статистичний аналіз матеріалу, написання тез).*

виконано у співавторстві).

16. Zaichko, N.V. Propargylglycin and hydrogen sulfide effects on plasma galectin-3 in streptozotocin-induced diabetic rats / N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk, O.B. Strutynska // Programme and book of abstracts, «VIII Lviv - Lublin conference of experimental and clinical biochemistry» (18th – 20th September 2017, Lublin, Poland). – Lublin, Medical University, 2017. – P. 56.
17. Заїчко, Н.В. Вплив антидіабетичних засобів на вміст гідроген сульфїду та активність H₂S-синтезуючих ензимів в органах щурів із стрептозотоциновим діабетом / Н.В. Заїчко, І.В. Паламарчук, О.Б. Струтинська // Мат. LX науково-практичної конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (присвячена 60-річчю ТДМУ, 14 червня 2017 р., Тернопіль). – Тернопіль, 2017. – С.290 – 292. *(Дисертантом особисто проведено біохімічні дослідження міокарду щурів, статистичний аналіз матеріалу, написання тез виконано у співавторстві).*
18. Паламарчук, І.В. Вплив екзогенного гідроген сульфїду на експресію та активність цистатіонін-гама-ліази в міокарді щурів за стрептозотоцинового діабету / І.В Паламарчук // Мат. XIV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2017» (26 - 28 квітня 2017 р., Вінниця). – Вінниця, 2017. – С. 220 – 221.
19. Вплив антидіабетичних засобів на систему цистатіонін-гама-ліази/гідроген сульфїду в міокарді та нирках щурів / Н.В. Заїчко, О.Б. Струтинська, І.В. Паламарчук, О.І. Штатько // Матеріали V Національного з'їзду фармакологів України (18-20 жовтня 2017 р., Запоріжжя). – Запоріжжя, 2017. - С. 46. *(Дисертантом особисто проведено біохімічні дослідження міокарду щурів, статистичний аналіз матеріалу, написання тез виконано у співавторстві).*
20. Palamarchuk I.V. Modulators of hydrogen sulfide metabolism influence

- antioxidant/prooxidant system in streptozotocin-induced diabetic rat heart / I.V. Palamarchuk // Мат. XV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2018» (18 - 20 квітня 2018 р., Вінниця). – Вінниця, 2018. – С. 122.
21. The hydrogen sulfide system disturbances: ethiology and pathogenetic effects / N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk, V.V. Blazhchenko, R.S Ostrenyuk. // Abstracts book. SMARTLION2018 2nd Symposium Innovation in Medicine (October 11-13, 2018, Lviv, Ukraine). – Львів, 2017. - С. 46 - 47. *(Дисертант брала участь в аналізі та узагальненні матеріалу, написанні та оформленні тез).*
22. Palamarchuk, I.V. Metformin and its combination with sodium hydrosulfide influence thiol/disulphide status and antioxidant/prooxydant system in streptozotocin-induced diabetic rat heart / I.V. Palamarchuk, N.V. Zaichko, R.S. Ostrenyuk // Abstracts book. SMARTLION2018 2nd Symposium Innovation in Medicine (October 11-13, 2018, Lviv, Ukraine). – Львів, 2017. - С.73. *(Дисертантом особисто проведено біохімічні дослідження міокарду щурів, статистичний аналіз матеріалу, написання тез виконано у співавторстві).*
23. Palamarchuk, I.V. Metformin and its combination with sodium hydrosulfide influences plasma galectin-3 and CSE/H₂S system in diabetic rat's heart / I.V. Palamarchuk, N.V. Zaichko // ICHSBM 2018: 20th International Conference on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine (September 10-11, 2018, Japan World Academy of Science, Engineering and Technology, Tokyo, Japan). - International Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences. - 2018. – Vol. 12, No 9. – P.4. [dai.waset.org /1307-6892/86069](http://dai.waset.org/1307-6892/86069). *(Дисертантом особисто проведено всі експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання та оформлення тез).*
24. Palamarchuk, I.V. Hydrogen sulfide metabolism modulators influence thiol/disulphide status in streptozotocin-induced diabetic rat's heart / I.V.

- Palamarchuk, N.V. Zaichko // FEBS3+meeting - XI Parnas Conference – Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (3-5-September 2018, Kyiv, Ukraine). – Ukr. Biochem. J. – 2018. – Vol. 90, Special Issue. – P.126. *(Дисертантом особисто проведено біохімічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання та оформлення тез).*
25. Palamarchuk, I.V. Changes in hydrogen sulphide system in myocardium of rats with experimental diabetes / I.V. Palamarchuk, N.V. Zaichko // Abstr. 27th International Conference on “Diabetes and Endocrinology” (16 - 17 May, 2019, Prague, Czech Republic). – Journal of Diabetology. – 3. – P. 24. *(Дисертантом особисто проведено експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).*
26. Age related changes in hydrogen sulfide metabolism in rats organs : connection with mediators of angiogenesis / N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk, V.V. Blazhchenko, R.S Ostrenyuk // Матеріали XII Українського біохімічного конгресу (30 вересня - 4 жовтня 2019 р., Тернопіль). - Медична та клінічна хімія. – 2019. – Т.21, №3 (додаток). – С.187-188. *(Дисертант брала участь у експериментальних дослідженнях, аналізі та узагальненні матеріалу, написанні та оформленні тез).*
27. Palamarchuk, I.V. Metformin and its combination with sodium hydrosulfide influences CSE/H₂S system in aorta of diabetic rats / I.V. Palamarchuk, N.V. Zaichko // Матеріали XII Українського біохімічного конгресу (30 вересня - 4 жовтня 2019 р., Тернопіль). - Медична та клінічна хімія. – 2019. – Т.21, №3 (додаток). – С.230-231. *(Дисертантом особисто проведено біохімічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання та оформлення тез).*

ДОДАТОК Б
АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях та конгресах різного рівня:

1. The Third International Conference on H₂S Biology and Medicine (Kyoto, Japan, June 4-6, 2014, форма участі - публікація тез).
2. III міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 24 - 25 вересня 2015 р., форма участі - публікація тез).
3. VIII науково-практична конференція з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини» (Вінниця, 10 листопада 2015 р., форма участі - усна доповідь, публікація тез).
4. XIII Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2016» (Вінниця, 7-8 квітня 2016 р., форма участі – усна доповідь, публікація тез).
5. Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодення» (Вінниця, 24 лютого 2016 р., форма участі – усна доповідь, публікація тез).
6. XIV Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2017» (Вінниця, 26 - 28 квітня 2017 р., форма участі – усна доповідь, публікація тез).
7. VIII Lviv - Lublin conference of experimental and clinical biochemistry» (Lublin, Poland, 18th – 20th September, 2017, форма участі – постерна доповідь, публікація тез).
8. LX науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», присвячена 60-річчю ТДМУ (Тернопіль, 14 червня 2017 р., форма участі - публікація тез).
9. V Національний з'їзд фармакологів України (18-20 жовтня 2017 р.,

Запоріжжя, форма участі - усна доповідь, публікація тез).

10. SMARTLION2018 2nd Symposium Innovation in Medicine. (Львів, 11-13 жовтня, 2018, форма участі – постерна доповідь, публікація тез).
11. ICHSBM 2018: 20th International Conference on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine (September 10-11, 2018 Tokyo, Japan, World Academy of Science, Engineering and Technology, форма участі – публікація тез).
12. FEBS3+meeting - XI Parnas Conference – Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (3-5 вересня 2018, Київ, форма участі – постерна доповідь, публікація тез).
13. XV Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2018» (Вінниця, 18-20 квітня 2018 р., форма участі – усна доповідь, 1-ше місце на конкурсі молодих вчених).
14. 5th World Congress On Hydrogen Sulfide In Biology & Medicine (May 31 – June 3, 2018 – Toronto, Canada, форма участі – постерна доповідь).
15. XII Український біохімічний конгрес (Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р., форма участі – публікація тез).
16. 27th International Conference on “Diabetes and Endocrinology” (Prague, Czech Republic, 16 - 17 May, 2019, форма участі – усна доповідь, публікація тез).

ДОДАТОК В

Акти впровадження



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького
д.мед.н., проф. Наконечний А.Й.

“ 31 ” березня 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: роль системи гідроген сульфід у механізмах ураження міокарду та кардіопротекції за умов експериментального цукрового діабету.

2. Установа, її адреса, виконавці: кафедра біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, асистент Паламарчук Ірина Віталіївна

3. Джерела інформації:

1. Cardiomyocyte DNA content and its link to CSE/H₂S system in the heart of experimental diabetic rats / I.V. Palamarchuk, N.V. Zaichko, A.V. Mel'nik, V.M. Nechyporuk, P.O. Yurchenko // Georgian Medical News. – 2020. – Vol. 4, No 301. – P. 147 – 152.
2. Effect of H₂S metabolism modulators on the level of galectin-3 in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus / A.V. Melnyk, N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk, O.B. Strutynska // The European Journal of Biomedical and Life Sciences. – 2020. – No 4. – P.29-36. DOI: <https://doi.org/10.29013/ELBLS-20-4-29-36>.

4. Де і коли впроваджено: у науково-педагогічний процес кафедри медичної біології ЛНМУ ім. Данила Галицького у 2020-2021 навчальному році.

5. Результати впровадження: науково-навчальний процес кафедри.

Використання результатів досліджень І.В. Паламарчук в науково-навчальному процесі дозволить здобувачам вищої освіти розширити теоретичні уявлення та здобути нові дослідницькі навички щодо ролі системи гідроген сульфід у механізмах ураження міокарду та цитопротекції за умов цукрового діабету.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри медичної біології ЛНМУ ім. Данила Галицького, протокол № 1 від 31 серпня 2020 р.

Відповідальний за впровадження:

**Завідувач кафедри медичної біології
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького
д. б. н., професор**

З.Д. Воробець

ДОДАТОК В (продовження)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного
університету ім. Т.Г. Шевченка
_____ Остапченко Л. І.
_____ 07 грудня 2021 року



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: роль системи гідроген сульфід у механізмах ураження міокарду та кардіопротекції за умов експериментального цукрового діабету.

2. Установа, її адреса, виконавці: кафедра біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, асистент Паламарчук Ірина Віталіївна

3. Джерела інформації:

1. Cardiomyocyte DNA content and its link to CSE/H₂S system in the heart of experimental diabetic rats / I.V. Palamarchuk, N.V. Zaichko, A.V. Mel'nik, V.M. Nechyporuk, P.O. Yurchenko // Georgian Medical News. – 2020. – Vol. 4, No 301. – P. 147 – 152.
2. Effect of H₂S metabolism modulators on the level of galectin-3 in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus / A.V. Melnyk, N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk, O.B. Strutynska // The European Journal of Biomedical and Life Sciences. – 2020. – No 4. – P.29-36. DOI: <https://doi.org/10.29013/ELBLS-20-4-29-36>.

4. Де і коли впроваджено: у науково-педагогічний процес кафедри клінічної медицини навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету ім. Т.Г. Шевченка у 2021 р.

5. Результати впровадження: науково-навчальний процес кафедри.

Використання результатів досліджень І.В. Паламарчук в науково-навчальному процесі дозволить здобувачам вищої освіти розширити теоретичні уявлення та здобути нові дослідницькі навички щодо ролі системи гідроген сульфід у механізмах ураження міокарду та цитопротекції за умов цукрового діабету.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри клінічної медицини навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету ім. Т.Г. Шевченка, протокол № 17 від 06 грудня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри клінічної медицини
ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського
національного університету ім. Т.Г. Шевченка,
д. мед. н., професор

Масвський О.С.

ДОДАТОК В (продовження)

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор з науково-педагогічної роботи
Полтавського державного медичного університету
д. мед. н., проф. Дворник В.М.

2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: роль системи гідроген сульфід у механізмах ураження міокарду та кардіопротекції за умов експериментального цукрового діабету.

2. Установа, її адреса, виконавці: кафедра біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, асистент Паламарчук Ірина Віталіївна

3. Джерела інформації:

1. Cardiomyocyte DNA content and its link to CSE/H₂S system in the heart of experimental diabetic rats / I.V. Palamarchuk, N.V. Zaichko, A.V. Mel'nik, V.M. Nechyporuk, P.O. Yurchenko // Georgian Medical News. – 2020. – Vol. 4, No 301. – P. 147 – 152.
2. Effect of H₂S metabolism modulators on the level of galectin-3 in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus / A.V. Melnyk, N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk, O.B. Strutynska // The European Journal of Biomedical and Life Sciences. – 2020. – No 4. – P.29-36. DOI: <https://doi.org/10.29013/ELBLS-20-4-29-36>.

4. Де і коли впроваджено: у науково-педагогічний процес кафедри біоорганічної та біологічної хімії Полтавського державного медичного університету у 2021 р.

5. Результати впровадження: науково-навчальний процес кафедри.

Використання результатів досліджень І.В. Паламарчук в науково-навчальному процесі дозволить здобувачам вищої освіти розширити теоретичні уявлення та здобути нові дослідницькі навички щодо ролі системи гідроген сульфід у механізмах ураження міокарду та цитопротекції за умов цукрового діабету.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри кафедри біоорганічної та біологічної хімії Полтавського державного медичного університету, протокол № 5 від 14 серпня 2021 р.
Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри біоорганічної та біологічної хімії,

д. мед. н., проф. Непорада К.С.

ДОДАТОК В (продовження)

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з науково-педагогічної
 (навчальної) роботи
 Вінницького національного медичного
 університету ім.М.І. Пирогова
 д.мед.н., проф. Ю.Й. Гумінський

квітень 2021 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Назва пропозиції для впровадження:** роль системи гідроген сульфід у механізмах ураження міокарду та кардіопротекції за умов експериментального цукрового діабету.
- 2. Установа, її адреса, виконавці:** кафедра біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, асистент Паламарчук Ірина Віталіївна
- 3. Джерела інформації:**
 1. Cardiomyocyte DNA content and its link to CSE/H₂S system in the heart of experimental diabetic rats / I.V. Palamarchuk, N.V. Zaichko, A.V. Mel'nik, V.M. Nechyporuk, P.O. Yurchenko // Georgian Medical News. – 2020. – Vol. 4, No 301. – P. 147 – 152.
 2. Effect of H₂S metabolism modulators on the level of galectin-3 in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus / A.V. Melnyk, N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk, O.B. Strutynska // The European Journal of Biomedical and Life Sciences. – 2020. – No 4. – P.29-36. DOI: <https://doi.org/10.29013/ELBLS-20-4-29-36>.
- 4. Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М.І. Пирогова у 2020-2021 навчальному році.
- 5. Результати впровадження: науково-навчальний процес кафедри.**
 Використання результатів досліджень І.В. Паламарчук в науково-навчальному процесі дозволить здобувачам вищої освіти розширити теоретичні уявлення та здобути нові дослідницькі навички щодо біохімічних показників обміну гідроген сульфід у міокарді та ролі цього газотрансміттера в механізмах розвитку діабет-асоційованого ураження серцево-судинної системи.
- 6. Зауваження та пропозиції:** не вносились.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри біологічної та загальної хімії, протокол № 16 від 8 квітня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри біологічної та загальної хімії, д. мед. н., професор

Заїчко Н.В.

ДОДАТОК В (продовження)



ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
(навчальної) роботи
Вінницького національного медичного
університету ім.М.І. Пирогова

д.мед.н., проф. Ю.Й. Гумінський

"23" квітня 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: роль системи гідроген сульфїду в механізмах ураження міокарду та кардіопротекції за умов експериментального цукрового діабету.

2. Установа, її адреса, виконавці: кафедра біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, асистент Паламарчук Ірина Віталіївна

3. Джерела інформації:

1. Вплив метформіну та його поєднання з натрій гідрогенсульфідом на стан системи H₂S та асоційовані біохімічні порушення в міокарді та нирках щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету/ І.В. Паламарчук, О.Б. Струтинська, А.В. Мельник, Н.В. Заїчко // Вісник проблем біології і медицини. – 2020. – № 3 (157). – С. 133-137. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-3-157-133-137
2. Патент на корисну модель №107767, Україна, МПК А61К 31/10 (2006.01) А61Р 3/10 (2006.01). Застосування натрієвої солі гідрогенсульфїду для потенціювання вазопротективного ефекту антидіабетичних засобів / Заїчко Н.В., Паламарчук І.В., Струтинська О.Б.; заявник та патентовласник Науково-дослідний інститут реабілітації інвалідів (навчально-науково-лікувальний комплекс) Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. – № u201511678; заявл. 26.11.2015; опубл. 24.06.2016; Бюл. № 12.

4. Де і коли впроваджено: у науково-педагогічний процес кафедри фармакології ВНМУ ім. М.І. Пирогова у 2020-2021 навчальному році.

5. Результати впровадження: науково-навчальний процес кафедри.

Використання результатів досліджень І.В. Паламарчук в науково-навчальному процесі дозволить здобувачам вищої освіти розширити теоретичні уявлення та здобути нові дослідницькі навички щодо ролі системи гідроген сульфїду в механізмах кардіопротекторної дії антидіабетичного засобу метформіну за умов цукрового діабету.

6. Зауваження та пропозиції: не вносились.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології, протокол № 13 від 23.04. 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри фармакології,
д. мед. н., професор

Волощук Н.І.

ДОДАТОК В (продовження)

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з науково-педагогічної
 (навчальної) роботи
 Вінницького національного медичного
 університету ім.М.І. Пирогова
 д.мед.н., проф. Ю.Й. Гумінський

Григорук 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Назва пропозиції для впровадження:** роль системи гідроген сульфід у механізмах ураження міокарду та кардіопротекції за умов експериментального цукрового діабету.
 - 2. Установа, її адреса, виконавці:** кафедра біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, асистент Паламарчук Ірина Віталіївна
 - 3. Джерела інформації:**
 1. Cardiomyocyte DNA content and its link to CSE/H₂S system in the heart of experimental diabetic rats / I.V. Palamarchuk, N.V. Zaichko, A.V. Mel'nik, V.M. Nechyporuk, P.O. Yurchenko // Georgian Medical News. – 2020. – Vol. 4, No 301. – P. 147 – 152.
 2. Effect of H₂S metabolism modulators on the level of galectin-3 in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus / A.V. Melnyk, N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk, O.B. Strutynska // The European Journal of Biomedical and Life Sciences. – 2020. – No 4. – P.29-36. DOI: <https://doi.org/10.29013/ELBLS-20-4-29-36>.
 3. Патент на корисну модель №107766, Україна, МПК (2016.01) A61K 33/00 A61P 3/10 (2006.01). Спосіб профілактики діабетичної кардіоміопатії в експерименті / Паламарчук І.В., Заїчко Н.В.; Науково-дослідний інститут реабілітації інвалідів (навчально-науково-лікувальний комплекс) Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. - № u201511677; заявл. 26.11.2015; опубл. 24.06.2016; Бюл. № 12.
 - 4. Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри внутрішньої медицини №2 ВНМУ ім. М.І. Пирогова у 2020-2021 навчальному році.
 - 5. Результати впровадження:** науково-навчальний процес кафедри.
 Використання результатів досліджень І.В. Паламарчук в науково-навчальному процесі дозволить здобувачам вищої освіти розширити теоретичні уявлення та здобути нові дослідницькі навички щодо ролі системи гідроген сульфід у механізмах ураження міокарду та цитопротекції за умов цукрового діабету.
 - 6. Зауваження та пропозиції:** не вносились.
- Обговорено та затверджено на засіданні кафедри внутрішньої медицини №2, протокол № 12 від 17 травня 2021 р.
- Відповідальний за впровадження:
- Завідувач кафедри внутрішньої медицини №2
 д. мед. н., професор
- Шевчук С.В.*
 Шевчук С.В.