

## 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 бїлих статевозрїлих лабораторних щурах-самцях. Всї 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 розподїлені 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 інгїбітор цистатіонїн- $\gamma$ -ліази пропаргілгліцин (50 мг/кг в/оч) та неорганїчний 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 мїокарді 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- $\gamma$ -ліази (ЦГЛ), цистеїнамінотрансферази (ЦАТ), тіосульфатдитіолсульфід-трансферази (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/  $\beta$ -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- $\gamma$ -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.

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  $H_2S$  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/H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S 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 метформїну 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 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 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» (18<sup>th</sup> – 20<sup>th</sup> September 2017, Lublin, Poland). – Lublin, Medical University, 2017. – P. 56.
17. Заїчко, Н.В. Вплив антидіабетичних засобів на вміст гідроген сульфїду та активність H<sub>2</sub>S-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/H<sub>2</sub>S 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.

Vlzhchenko, 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/H<sub>2</sub>S 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).*

