

**РОЛЬ СТАТЕВИХ ЧИННИКІВ У ПРОДУКЦІЇ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ
В СЕРЦЕВО-СУДИННІЙ СИСТЕМІ ЩУРІВ**

У роботі досліджено вплив статі та різного рівня насиченості організму щурів статевими гормонами на продукцію гідроген сульфід у серцево-судинній системі щурів. Виявлено, що в серці та аорті щурів-самок активність гідроген сульфідпродукуючих ензимів цистатіонін- γ -ліази, цистеїнамінотрансферази та тіосульфатдитіолсульфідтрансферази достовірно вища, ніж у тварин протилежної статі. Гонадектомія тварин чинить різнонаправлений вплив на продукцію гідроген сульфід у серцево-судинній системі – достовірно збільшує її у самців та зменшує у самок. Замісне введення статевих гормонів кастрованим тваринам повністю повертає продукцію гідроген сульфід у міокарді та аорті щурів до рівня тварин без змін гормонального статусу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **стать, серце, аорта, гідроген сульфід, ензими.**

ВСТУП. Статеві чинники відіграють важливу роль у функціонуванні серцево-судинної системи в нормі та при патології. Відомо, що жінки репродуктивного віку мають нижчі показники систолічного, пульсового артеріального тиску та серцевого викиду порівняно з такими у чоловіків того ж віку [14]. В постменопаузі у жінок частота розвитку ішемічної хвороби серця, артеріальної гіпертензії (АГ) та гіпертрофії лівого шлуночка вища, ніж у доменопаузний період, але значно менша порівняно з такою в чоловіків того ж віку [7].

Статеві відмінності функціонування кардіоваскулярної системи значною мірою пов'язані з різними біологічними ефектами тестостерону та естрогенів. Естрогени посилюють утворення вазодилататорів, зокрема простагліцинів, але гальмують продукцію констрикторних молекул – ендотеліну-1, лейкотриєнів, катехоламінів. Тестостерон, навпаки, індукує вазоконстрикцію, активуючи ренін-ангіотензинову систему і зменшуючи синтез ПГ₂ [9, 10, 12].

Останнім часом з'ясувалось, що важливу роль у регуляції судинного тону та функціонуванні міокарда відіграє біологічно активний метаболіт сірковмісних амінокислот гідроген сульфід (H₂S) [11]. На сьогодні відомо [2], що утворення H₂S у тканинах відбувається в реакціях десульфурування цистеїну, гомоцистеїну з участю ензимів цистатіонін- γ -ліази (КФ

4.4.1.1), цистатіонін- β -синтази (КФ 4.2.1.22) і цистеїнамінотрансферази (КФ 2.6.1.3) та відновлення тіосульфату з участю тіосульфатдитіолсульфідтрансферази (КФ 2.8.1.5). Можливо, гендерні відмінності продукції H₂S в серці та судинах є одним із чинників, який визначає особливості функціонування серцево-судинної системи в організмі осіб обох статей.

Метою даної роботи було вивчити вміст H₂S у сироватці крові та активність ензимів, що забезпечують його утворення в міокарді та аорті щурів обох статей за умов різної насиченості організму статевими гормонами.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведені на білих нелінійних статевозрілих (3 місяці) щурах (40 самцях і 40 самках), отриманих з науково-експериментальної клініки (віварію) Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова. Всі етапи досліджень виконано згідно з Міжнародними вимогами про гуманне поводження з тваринами, дотримуючись правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Під час експериментів тварин утримували в стандартних умовах (з 12-годинним світло-тіньовим режимом і вільним доступом до води та їжі) на раціоні віварію Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова.

© А. В. Мельник, О. С. Ольховський, Н. В. Заїчко, О. М. Колошко, 2011.

Відповідно до мети дослідження, всіх піддослідних тварин поділили на такі групи (по 10 щурів у кожній): 1-ша – щури без змін гормонального статусу (інтактні); 2-га – контрольна група тварин, в яких розтинали передню черевну стінку з наступним пошаровим зашиванням рани (“хибнооперовані”); 3-тя – щури обох статей, яким була проведена гонадектомія (тестектомія або оваріоектомія відповідно); 4-та – тварини обох статей, яким після гонадектомії призначали замісну гормонотерапію, відповідно, тестостероном та естрадіолом. Експериментальну модуляцію вмісту статевих гормонів в організмі щурів виконували за допомогою кастрації тварин (оваріоектомія і тестектомія, відповідно, самкам та самцям щурів) під каліпсоловим наркозом (10 мг/кг) хірургічним методом через серединний розтин передньої черевної стінки згідно із загальноприйнятими методиками. Дослідження проводили через 21 день після кастрації.

Замісну гормонотерапію у кастрованих щурів обох статей відтворювали шляхом введення тестостерону пропіонату (завод ООО “Фармадон”, м. Ростов-на-Дону) – 1 мг/кг підшкірно 1 раз на день, а також естрадіолу гемігідрату (“Естримакс”, АО Гедеон Рихтер) – 150 мг/кг внутрішньошлунково протягом 14 днів [6, 8]. Ефект замісної терапії у самок оцінювали за рівнем статевих гормонів у сироватці крові та за допомогою вагінальних мазків.

Сироватку отримували шляхом центрифугування крові при 1500 g та 18–22 °C протягом 15 хв. Міокард перфузували холодним 1,15 % розчином калію хлориду, гомогенізували при 3000 об./хв (тефлон-скло) в середовищі 1,15 % калію хлориду у співвідношенні 1:4. Аорту ретельно промивали холодним 1,15 % розчином калію хлориду, видаляли адвентицію, а ендотеліальний та м'язовий шари гомогенізували в середовищі 1,15 % калію хлориду у співвідношенні 1:4. Гомогенати органів центрифугували при 600 g та 4 °C упродовж 30 хв для отримання пост'ядерної фракції.

Вміст H_2S у сироватці крові визначали удосконаленим нами спектрофотометричним методом за реакцією з пара-фенілендіаміном [5]. Активність тіосульфатдитіолсульфідтрансферази, цистатіонін- γ -ліази, цистеїнамінотрансферази оцінювали з використанням відповідних інкубаційних середовищ за приростом сульфід-аніона, вміст якого визначали за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном [4].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою стандартних статистичних програм “MS Excel XP”. Вірогідність відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

В роботі використані L-цистеїн, D,L-гомоцистеїн фірми “Sigma” (США), α -кетоглутарат, дитіотреїтол, піридоксальфосфат фірми “Fluka” (Німеччина). Тіосульфат натрію, сульфід натрію, N,N-диметил-пара-фенілендіамін та інші реактиви були вітчизняного виробництва.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Нами показано, що основними прекурсорами H_2S у серцево-судинній системі щурів обох статей є цистеїн та тіосульфат-аніон. Утворення H_2S у міокарді та аорті щурів відбувається в реакціях десульфурування цистеїну з участю цистатіонін- γ -ліази, трансамінування цистеїну з α -кетоглутаратом з участю цистеїнамінотрансферази та в реакції відновлення тіосульфату тіосульфатдитіолсульфідтрансферазою. Разом із тим, реакції десульфурування цистеїну та конденсації цистеїну з гомоцистеїном з участю цистатіонін- β -синтази не є ефективним джерелом H_2S у досліджуваних органах щурів.

Дослідження базальної продукції H_2S у щурів обох статей показало, що утворення цієї біологічно активної речовини в серцево-судинній системі є гендердетермінованим процесом і значно відрізняється у самців та самок. Так, у міокарді та аорті самок утворення H_2S з участю цистатіонін- γ -ліази, цистеїнамінотрансферази та тіосульфатдитіолсульфідтрансферази на 30–40 % перевищувало такі показники в самців того ж віку.

Далі ми визначили вплив різного рівня насиченості організму тварин статевими гормонами на утворення H_2S у серцево-судинній системі щурів. Було виявлено, що кастрація тварин чинила різнонаправлений вплив на ензиматичне утворення H_2S в аорті та міокарді щурів. Гонадектомія самок суттєво зменшувала утворення H_2S у досліджуваних органах. За цих умов реєстрували достовірне зменшення (на 42–60 %) активності цистатіонін- γ -ліази, цистеїнамінотрансферази та тіосульфатдитіолсульфідтрансферази в міокарді та аорті щурів. Разом із тим, орхідектомія самців викликала протилежні зміни продукції H_2S у серцево-судинній системі щурів порівняно з такими у самок: активність цистатіонін- γ -ліази, цистеїнаміно-трансферази та тіосульфатдитіолсульфідтрансферази достовірно зростала на 38–55 %. Отже, кастрація тварин змінювала направленість гендерних відмінностей в ензиматичних системах продукції H_2S у серцево-судинній системі щурів.

Замісне введення статевих гормонів відновлювало вектор статевих відмінностей продукції H_2S у серці та аорті щурів. Зокрема, введення кастрованим самкам естрогенів супро-

воджувалось зростанням активності цистатіонін- γ -ліази, цистеїнамінотрансферази та тіо-сульфатдитіолсульфідтрансферази до рівня у контрольних тварин. Разом із тим, введення тестостерону кастрованим самцям викликало достовірно зниження активності всіх H_2S -продукуючих ензимів у серцево-судинній системі. Таким чином, статеві гормони мали різновекторний вплив на ензимні системи утворення H_2S у серці та аорті тварин.

У подальшому ми оцінили, як впливає стать та зміна насиченості організму щурів статевими гормонами на вміст H_2S у сироватці крові тварин. Нами показано, що самки істотно відрізнялись від самців за рівнем H_2S у сироватці крові, причому в самок цей показник на 22 % перевищував такий у самців. Кастрація самців достовірно збільшувала (на 34 %) вміст H_2S у сироватці крові, тоді як гонадектомія самок характеризувалась статистично вірогідним зниженням (на 40 %) рівня цього метаболіту в крові (табл. 1).

Додаткові докази причетності статевих гормонів до регуляції продукції H_2S у кардіоваскулярній системі щурів та його вмісту в сироватці крові надали результати кореляційного аналізу. Показано, що рівень естрадіолу виявляв пряму кореляційну залежність ($r=0,35-0,48$, $p<0,05$) з активністю цистатіонін- γ -ліази в серці та аорті щурів, а також вмістом H_2S у сироватці крові. Натомість, між рівнем тесто-

стерону та вказаними показниками обміну H_2S відмічалась зворотна кореляційна залежність ($r=0,29-0,41$, $p<0,05$).

Таким чином, проведені дослідження показали, що самці та самки відрізняються за продукцією H_2S у серцево-судинній системі та вмістом цієї біологічно активної молекули в сироватці крові. Зокрема, у самок активність основних H_2S -продукуючих ензимів (цистатіонін- γ -ліази, цистеїнамінотрансферази та тіо-сульфатдитіолсульфідтрансферази) в міокарді та аорті щурів, а також вміст H_2S у сироватці крові тварин викликала різновекторний вплив на показники обміну H_2S . Гонадектомія самок чинила депримууючий вплив на основні ензимні системи утворення H_2S у досліджуваних органах щурів, що супроводжувалось формуванням дефіциту H_2S у сироватці крові, тоді як кастрація самців мала протилежну дію – продукція H_2S у кардіоваскулярній системі та його вміст у крові достовірно зростали. Замість введення тестостерону знижувало, а естрогенів – підвищувало активність H_2S -продукуючих ензимів у серці та аорті та вміст H_2S у сироватці крові, і тому повертало вектор статевих відмінностей до рівня тварин без змін гормонального статусу (табл. 2, 3).

Отримані дані надають нові докази причетності статевих гормонів до регуляції продукції H_2S у серцево-судинній системі щурів. Ви-

Таблиця 1 – Вміст H_2S у сироватці крові щурів обох статей залежно від рівня насиченості організму статевими гормонами ($M\pm m$, $n=10$)

Група тварин	H_2S , мкмоль/л	
	Самці	Самки
Контроль	70,5 \pm 3,86	86,0 \pm 4,12*
“Хибнооперовані”	68,4 \pm 3,10	82,5 \pm 3,78*
Гонадектомія	91,7 \pm 4,12#	49,5 \pm 4,56#
Замісна гормонотерапія	74,8 \pm 3,55	78,4 \pm 3,96

Примітка. Тут і в наступних таблицях: * – $p<0,05$ між самцями та самками контрольних груп; # – $p<0,05$ відносно тварин відповідної групи контролю.

Таблиця 2 – Активність H_2S -продукуючих ензимів у міокарді щурів обох статей залежно від рівня насиченості організму статевими гормонами ($M\pm m$, $n=10$)

Група тварин	Активність ензимів, нмоль/хв на 1 мг протеїну		
	тіо-сульфатдитіол-сульфідтрансфераза	цистатіонін- γ -ліаза	цистеїнамінотрансфераза
Самці			
Контроль	1,28 \pm 0,05	0,28 \pm 0,02	0,46 \pm 0,01
“Хибнооперовані”	1,32 \pm 0,04	0,25 \pm 0,01	0,44 \pm 0,02
Гонадектомія	1,82 \pm 0,06#	0,43 \pm 0,03#	0,64 \pm 0,03#
Замісна гормонотерапія	1,39 \pm 0,04	0,29 \pm 0,02	0,48 \pm 0,02
Самки			
Контроль	1,69 \pm 0,04*	0,39 \pm 0,03*	0,63 \pm 0,02*
“Хибнооперовані”	1,72 \pm 0,05*	0,42 \pm 0,02*	0,64 \pm 0,03*
Гонадектомія	1,00 \pm 0,03#	0,17 \pm 0,04#	0,32 \pm 0,04#
Замісна гормонотерапія	1,62 \pm 0,04	0,35 \pm 0,05	0,55 \pm 0,05

Таблиця 3 – Активність H_2S -продукуючих ензимів у грудній аорті щурів обох статей залежно від рівня насиченості організму статевими гормонами

Група тварин	Активність ензимів, нмоль/хв на 1 мг протеїну		
	тіосульфатдитіол-сульфідтрансфераза	цистатіонін- γ -ліаза	цистеїнаміно-трансфераза
Самці			
Контроль	2,05±0,06	0,74±0,05	0,52±0,06
“Хібнооперовані”	2,11±0,05	0,78±0,06	0,55±0,04
Гонадектомія	2,95±0,07#	1,18±0,03#	0,79±0,03#
Замісна гормонотерапія	2,25±0,08	0,84±0,04	0,60±0,05
Самки			
Контроль	2,67±0,05*	1,08±0,04*	0,70±0,05*
“Хібнооперовані”	2,74±0,07*	1,11±0,03*	0,75±0,06*
Гонадектомія	1,51±0,04#	0,49±0,02#	0,40±0,03#
Замісна гормонотерапія	2,59±0,06	1,02±0,05	0,66±0,04

никає питання щодо можливих механізмів впливу естрогенів та тестостерону на метаболізм H_2S . На сьогодні відомо, що статеві гормони впливають на процеси вільнорадикального окиснення, що може бути одним із можливих молекулярних механізмів їх впливу на утворення H_2S у серцево-судинній системі, адже одним із відомих шляхів регуляції активності H_2S -продукуючих ензимів є їх ковалентна модифікація активними кисневими дериватами [7]. Можливо, статеві гормони регулюють також експресію H_2S -продукуючих ензимів, адже показано, що естрогени та тестостерон через геномні механізми можуть змінювати синтез молекул ендотеліальної NO-синтази [7, 9].

Останнім часом виявлено, що H_2S залучений до регуляції судинного тону, агрегації тромбоцитів, скоротливості міокарда [1, 3, 11]. Ймовірно, статеві відмінності продукції H_2S у серцево-судинній системі є одним із визначальних чинників різної чутливості чоловічого та жіночого організму до розвитку кардіовас-

кулярної патології. Тому подальше вивчення ролі статевих чинників в утворенні H_2S у серці та судинах – досить перспективний напрямок подальших досліджень, який відкриває нові горизонти для розвитку гендерної кардіології.

ВИСНОВКИ. 1. У щурів-самок активність H_2S -продукуючих ензимів цистатіонін- γ -ліази, цистеїнамінотрансферази та тіосульфатдитіол-сульфідтрансферази в серці та аорті, а також вміст H_2S у сироватці крові на 20–40 % перевищують такі показники у самців.

2. Гонадектомія самок спричиняє достовірне зменшення активності H_2S -продукуючих ензимів у серцево-судинній системі, що супроводжується зниженням вмісту H_2S у сироватці крові, тоді як кастрація самців викликає протилежні зміни вказаних показників.

3. Замісне введення кастрованим тваринам естрогенів достовірно збільшує, а тестостерону – зменшує продукцію H_2S у міокарді й аорті щурів та його вміст у сироватці крові.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Заїчко Н. В. Вплив аніонів гідросульфіді, дитіоніту, сульфїту, тіосульфату та сульфату на агрегацію тромбоцитів людини / Н. В. Заїчко, О. О. Пентюк // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 1. – С. 105–113.
2. Мельник А. В. Активність ензимів синтезу гідроген сульфїду в нирках щурів / А. В. Мельник, О. О. Пентюк // Укр. біохім. журн. – 2009. – № 4. – С. 12–22.
3. Мельник А. В. Дослідження ролі гідроген сульфїду та сірковмісних амінокислот в регуляції тону ниркових артерій та фільтрації в нирках / А. В. Мельник // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2009. – **9**, № 4. – С. 98–102.

4. Пат. України на корисну модель № 45018 U МПК (2009) G01N 33/00. Спосіб визначення продукції гідроген сульфїду в органах тварин / Заїчко Н. В., Пентюк Н. О., Мельник А. В., Штатько О. І.; заявник та патентовласник НДІ реабілітації інвалідів н.н.л.к. Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова. – № u 200904434; заявл. 05.05.09; опубл. 26.10.09; Бюл. № 20.

5. Пат. України на корисну модель № 52136 U МПК (2009) G01N 33/68. Спосіб визначення вмісту гідроген сульфїду в плазмі крові / Заїчко Н. В., Пентюк Н. О., Мельник А. В.; заявник та патентовласник НДІ реабілітації інвалідів н.н.л.к. Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пиро-

гова. – № у 201003158 ; заявл. 19.03.10 ; опубл. 10.08.10 ; Бюл. № 15.

6. Ali B. H. Sex difference in the susceptibility of rats to gentamicin nephrotoxicity: influence of gonadectomy and hormonal replacement therapy / B. H. Ali, T. H. Ben Ismail, A. A. Basir // Indian Journal of Pharmacology. – 2001. – **33**. – P. 369–373.

7. Bhupathy P. Influence of sex hormones and phytoestrogens on heart disease in men and women / P. Bhupathy, C. D. Haines, L. A. Leinwand // Womens Health. – 2010. **6**, № 1. P. 77–95.

8. Involvement of calcitonin gene-related peptide in elevation of skin temperature in castrated male rats / M. Yuzurihara, Y. Ikarashi, M. Noguchi, Y. Kase // Urology. – 2003. – **62**, № 5. – P. 947–951.

9. Khalil R. A. Sex Hormones as Potential Modulators of Vascular Function in Hypertension / R. A. Khalil // Hypertension. – 2005. – **46**. – P. 249–253

10. Kienitz T. Testosterone and blood pressure

regulation / T. Kienitz, M. Quinkler // Kidney Blood Press Res. – 2008. – **31**, № 2. – P. 71–79.

11. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // Pharmacological Reports. – 2007. – **59**. – P. 4–24.

12. Pepine C. J. Estrogen and different aspects of vascular disease in women and men / C. J. Pepine, W. W. Nichols, D. F. Pauly // Circ. Res. – 2006. – **99**, № 5. – P. 459–461.

13. Stipanuk M. H. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat / M. H. Stipanuk, P. W. Beck // Biochem. J. – 1982. – **206**, № 2. – P. 267–277.

14. Winer N. Gender differences in vascular compliance in young, healthy subjects assessed by pulse contour analysis / N. Winer, J. R. Sowers, M. A. Weber // J. Clin. Hypertens (Greenwich). – 2001. – **3**, № 3. – P. 145–152.

А. В. Мельник, А. С. Ольховский, Н. В. Заичко, Е. Н. Колошко
ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. И. ПИРОГОВА

РОЛЬ ПОЛОВЫХ ФАКТОРОВ В ПРОДУКЦИИ ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА В СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЕ КРЫС

Резюме

В работе исследовано влияние пола и разного уровня насыщенности организма половыми гормонами на продукцию гидроген сульфида в сердечно-сосудистой системе крыс. Выявлено, что в сердце и аорте крыс-самок активность гидроген сульфидпродуцирующих энзимов цистатионин- γ -лиазы, цистеинамино-трансферазы и тиосульфатдитиолсульфидтрансферазы достоверно выше, чем у животных противоположного пола. Гонадэктомия животных оказывает разнонаправленное влияние на продукцию гидроген сульфида в сердечно-сосудистой системе – достоверно увеличивает ее у самцов и уменьшает у самок. Заместительное введение половых гормонов кастрированным животным практически полностью возвращает продукцию гидроген сульфида в миокарде и аорте крыс к уровню животных без изменений гормонального статуса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пол, сердце, аорта, гидроген сульфид, энзимы.

A. V. Melnyk, O. S. Olkhovskiy, N. V. Zaichko, O. M. Koloshko
M. I. PYROHOV VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

ROLE OF SEX FACTORS IN HYDROGEN SULFIDE PRODUCTION IN THE CARDIOVASCULAR SYSTEM OF RATS

Summary

The influence of gender and different levels of organism saturation of sexual hormones on hydrogen sulfide production in the cardiovascular system of rats was investigated. It was found out, that in the heart and aorta of female rats the activities of hydrogen sulfide-producing enzymes cystathionine γ -lyase, cysteine aminotransferase and thiosulphate sulfurtransferase were significantly higher than for the animals of the opposite sex. The gonadectomy of animals has multidirectional influence on the hydrogen sulfide production in the cardiovascular system – significantly increases its in males and decreases in female rats. Substitutional administration of sex hormones to castrated animals almost entirely returns hydrogen sulfide production in the myocardium and aorta of these rats to the levels of animals without changes of hormonal status.

KEY WORDS: sex, heart, aorta, hydrogen sulfide, enzymes.

Отримано 07.10.11

Адреса для листування: А. В. Мельник, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна.