

ВПЛИВ ТЕСТОСТЕРОНУ НА ПРОДУКЦІЮ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В МІОКАРДІ ЩУРІВ

У роботі показано, що продукція гідроген сульфїду (H_2S) у міокарді визначається рівнем тестостерону: кастрація самців викликає достовірне збільшення вмісту H_2S , активності цистатіонін- γ -ліази (ЦГЛ), максимальної швидкості утворення H_2S із цистеїну з участю ЦГЛ (V_{max}), а також зменшення константи Міхаеліса (K_m) цього ензиму порівняно з контролем. Проведення замісної гормонотерапії за допомогою тестостерону наближає показники продукції H_2S та кінетичні параметри ЦГЛ до рівня в контрольній групі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гідроген сульфід, цистатіонін- γ -ліаза, кінетичні параметри, самці, тестостерон, міокард.

ВСТУП. Стаття є одним із чинників, які визначають поширеність серцево-судинних захворювань. Так, серед хворих на атеросклероз та ішемічну хворобу серця переважають особи чоловічої статі. В одному з великих досліджень зареєстровано, що у віці 30–39 років атеросклероз коронарних артерій відмічають у 5 % чоловіків і 0,5 % жінок, у віці 40–49 років частота атеросклерозу в чоловіків утричі вища, ніж у жінок, у віці 50–59 років – у чоловіків удвічі вища, після 70 років гендерна відмінність у частоті атеросклерозу та ішемічної хвороби серця нівелюється [8].

Останнім часом з'ясувалось, що поряд із системою оксиду азоту важливу роль у регуляції судинного тону та скоротливості міокарда відіграє біологічно активний метаболіт сірковмісних амінокислот – гідроген сульфід (H_2S) [5]. Можливо, зміни продукції H_2S є ще одним із чинників статтасоційованої патології. На сьогодні відомо [2, 5], що утворення H_2S у тканинах відбувається в реакціях десульфурування цистеїну, гомоцистеїну з участю ензимів цистатіонін- γ -ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1), цистатіонін- β -синтази (ЦБС, КФ 4.2.1.22) і цистеїнамінотрансферази (ЦАТ, КФ 2.6.1.3), відновлення тіосульфату – з участю тіосульфатдитіолсульфідтрансферази (ТСТ, КФ 2.8.1.5), при цьому в серцево-судинній системі основним H_2S -продукующим ензимом є ЦГЛ. Постає питання щодо змін продукції H_2S у міокарді щурів з різним рівнем насиченості організму тестостероном. Метою роботи було оцінити вплив тестостерону на вміст H_2S , активність

ЦГЛ та її кінетичні параметри (K_m , V_{max}) у міокарді щурів-самців.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведено на 45 білих нелінійних щурах-самцях (*Rattus norvegicus*). Усі тварини перебували в стандартних умовах віварію з 12-годинним режимом день/ніч, воду і збалансований гранульований корм отримували *ad libitum*. Дослідження проведено відповідно до загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених на Першому національному конгресі України з біоетики (Київ, 2001), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), інших міжнародних угод та національного законодавства в цій галузі.

Експериментальну модуляцію вмісту тестостерону в організмі щурів виконували шляхом кастрації тварин (тестектомія) 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 [3, 9]. У контрольних тварин розтинали передню черевну стінку з наступним пошаровим зашиванням рани ("псевдооперовані").

Замісну гормонотерапію в кастрованих щурів-самців відтворювали шляхом введення тестостерону пропіонату (завод ООО "Фармадон", м. Ростов-на-Дону) в дозі 1 мг/кг підшкірно 1 раз на день [2, 7]. Ефект замісної терапії оцінювали за рівнем статевих гормонів у сироватці крові.

© А. В. Мельник, 2014.

Вміст тестостерону в гепариновій плазмі крові тварин визначали імуноферментним методом за допомогою стандартних наборів DSLACTIVE Testosterone фірми DSL (USA) згідно з інструкціями фірм-виробників.

Вміст H_2S визначали за методикою [4]. Міокард промивали холодним 1,15 % розчином KCl, подрібнювали ножицями, гомогенізували в середовищі 0,01 M NaOH у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об./хв (тефлон-скло). До 1 мл гомогенату додавали 250 мкл 50 % TXO, центрифугували при 1200 г 15 хв, у супернатанті визначали вміст H_2S спектрофотометричним методом за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном при наявності $FeCl_3$. Всі маніпуляції проводили у стерильних герметизованих пластикових пробірках типу Eppendorf (для попередження втрат H_2S).

Для інших досліджень міокард гомогенізували в середовищі 0,25 M сахарози, 0,01 M Трис (рН 7,4) у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об./хв (тефлон-скло), центрифугували 30 хв при 600 г і при температурі 4–6 °С, відбирали аліквоти пост'ядерного супернатанту в мікропробірки Eppendorf і до проведення досліджень зберігали при -20 °С. Активність цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1) визначали за швидкістю утворення сульфід-аніона [1].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики з визначенням середньої арифметичної та середньої помилки ($M \pm m$). Вірогідність результатів оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента, при цьому вірогідними вважали розбіжності при $p < 0,05$. Кореляційний зв'язок між показниками визначали за допомогою обчислення коефіцієнта кореляції Пірсона (r). Розрахунки проводили за допомогою пакета статистичних програм "Microsoft Excel".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Встановлено, що різна насиченість організму самців тестостероном має значний вплив на обмін H_2S

у міокарді (табл. 1). Так, кастрація самців спричиняла достовірне зростання в міокарді щурів активності ЦГЛ на 20,0 % та вмісту H_2S на 18,2 % порівняно з контрольною групою. Проведення замісної гормонотерапії кастрованим самцям практично повністю нормалізувало метаболізм H_2S у міокарді тварин. Введення тестостерону гонадектомованим самцям викликало зменшення активності ЦГЛ та вмісту H_2S на 17,0 % порівняно з кастрованими тваринами. Проведений кореляційний аналіз показав, що між рівнем тестостерону в плазмі крові та вмістом H_2S й активністю ЦГЛ у міокарді існують достовірні обернені зв'язки.

В подальшому ми оцінили вплив тестостерону на кінетичні параметри реакції десульфування цистеїну з участю ЦГЛ у міокарді щурів (рис.). У міокарді самців за низьких концентрацій цистеїну (0,12–0,95 мМ) реєстрували пряму залежність зі швидкістю ензиматичної реакції (вона перебувала в діапазоні 0,023–0,134 нмоль H_2S /хв·мг протеїну). За умов подальшого збільшення концентрації цистеїну темпи приросту швидкості реакції зменшувались, і при вмісті цистеїну 7,5 мМ крива виходила на плато. Підвищення кількості цистеїну понад 7,5 мМ супроводжувалось явищем субстратного інгібування, тобто зменшенням активності реакції, каталізованої ЦГЛ. За умов гонадектомії самців відмічали зміщення кінетичної кривої в прямих координатах ліворуч, а кривої в координатах Лайнуївера–Берка – праворуч. Поряд із цим реєстрували статистично вірогідне зменшення K_m за цистеїном (на 16,6 %) та збільшення V_{max} (на 11,4 %) реакції утворення H_2S , каталізованої ЦГЛ (табл. 2). Проведення замісної гормонотерапії тестостероном наближало кінетичні криві до таких у контрольній групі тварин, а кінетичні параметри (K_m та V_{max}) статистично вірогідно не відрізнялись від таких у псевдооперованих щурів-самців. Кореляційний аналіз показав існування значних за силою зв'язків між рівнем тестостерону в плазмі крові та K_m (прямий за

Таблиця 1 – Вплив кастрації щурів-самців та замісної гормонотерапії тестостероном на активність ЦГЛ і вміст H_2S у міокарді ($M \pm m$, n=30)

Група тварин	ЦГЛ, нмоль H_2S /хв·мг протеїну	H_2S , нмоль/мг протеїну
Псевдооперовані самці	0,2 1±0,00	2,61±0,11
Кастрація	0,351 ±0,012*	3,19±0,14*
Кастрація + замісна гормонотерапія	0,300±0,011#	2,73±0,09#
Кореляція з рівнем тестостерону (n=301)		
	-0,45°	-0,40°

Примітки. Тут і в наступній таблиці:

- * – достовірність відмінностей ($p < 0,05$) відносно псевдооперованих щурів-самців.
- # – достовірність відмінностей ($p < 0,05$) відносно кастрованих щурів-самців.
- ° – достовірність кореляцій ($p < 0,05$) з рівнем тестостерону.

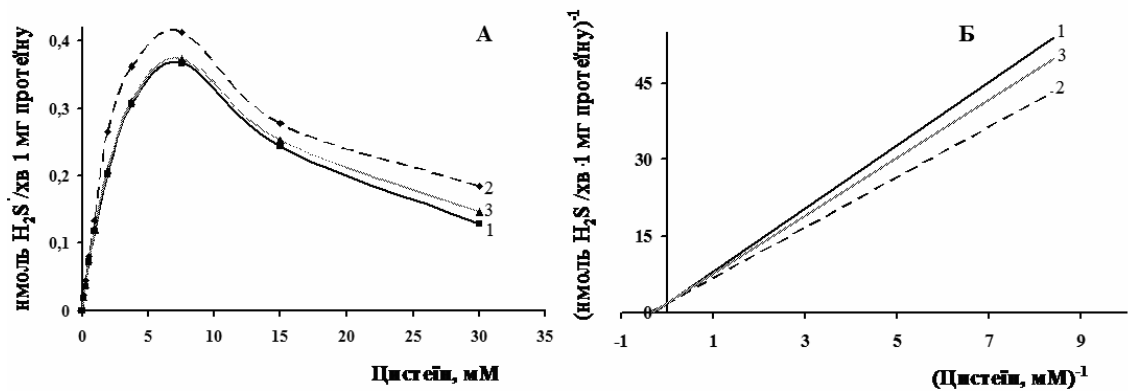


Рис.. Кінетика утворення H_2S із цистеїну з участю ЦГЛ у міокарді щурів-самців у прямих координатах (А) та координатах Лайнуївера–Берка (Б) (1 – псевдооперовані самці; 2 – кастровані самці; 3 – кастровані тварини, яким проводили замісну гормонотерапію тестостероном).

Таблиця 2 – Вплив кастрації щурів-самців та замісної гормонотерапії тестостероном на активність, кінетичні параметри ЦГЛ у міокарді ($M \pm m$, $n=5$)

Група тварин	Km, mM	Vmax, нмоль H_2S /хв·мг протеїну
Псевдооперовані самці	$3,01 \pm 0,04$	$0,526 \pm 0,004$
Кастрація	$2,51 \pm 0,05^*$	$0,586 \pm 0,005^*$
Кастрація + замісна гормонотерапія	$2,91 \pm 0,06^\#$	$0,527 \pm 0,007^\#$
	Кореляція з рівнем тестостерону ($n=15$)	
	$+0,62^\circ$	$-0,58^\circ$

направленістю) і Vmax реакції утворення H_2S з участю ЦГЛ (обернений за направленістю).

Таким чином, чоловічі статеві гормони є одним із визначальних чинників регуляції метаболізму H_2S у міокарді щурів. За умов дефіциту тестостерону (кастрація самців) реєструють збільшення рівня H_2S та зростання активності ЦГЛ порівняно з відповідною групою контролю. Проведення кастрованим тваринам замісної гормонотерапії тестостероном сприяє відновленню метаболізму H_2S у міокарді щурів до рівня контрольних тварин.

Різна насиченість організму щурів тестостероном не лише впливає на активність синтезу H_2S у міокарді щурів, а й змінює кінетичні параметри ензиматичної реакції, каталізованої ЦГЛ. Тестектомія самців спричиняє вірогідне збільшення спорідненості ЦГЛ до цистеїну (достовірно зростає Km) та Vmax. Замісне введення статевих гормонів кастрованим тваринам забезпечує відновлення в міокарді самців кінетичних параметрів ензиматичної реакції з участю ЦГЛ до рівня щурів без змін гормонального статусу.

Виникає питання щодо молекулярних механізмів, які інтегровані в регуляторний вплив чоловічих статевих гормонів на метаболізм H_2S у міокарді. Відомо, що тестостерон

володіє прооксидантними властивостями, тому зменшення рівня вільних радикалів, за умов дефіциту тестостерону, попереджує ковалентну модифікацію активного центру ЦГЛ та супроводжується збільшенням активності даного ензиму. Можливо, за цих умов зменшується окисна деградація H_2S до сульфідів та сульфатів [6, 10]. Одним з імовірних механізмів впливу статевих гормонів на продукцію H_2S є їх здатність модулювати експресію генів, які відповідальні за синтез білка-ензиму ЦГЛ. Однак остаточні молекулярні механізми регуляторного впливу тестостерону на обмін H_2S залишаються нез'ясованими, що є перспективним напрямком подальших досліджень.

ВИСНОВКИ. 1. Гонадектомія самців супроводжується достовірним зростанням активності цистатіонін- γ -ліази (на 20,0 %, $p < 0,05$), вмісту H_2S (на 18,0 %, $p < 0,05$), спорідненості цистатіонін- γ -ліази до цистеїну (на 16,6 %, $p < 0,05$) та максимальної швидкості утворення H_2S (на 11,4 %, $p < 0,05$) в міокарді.

2. Проведення кастрованим самцям замісної гормонотерапії тестостероном наближає продукцію H_2S та кінетичні параметри цистатіонін- γ -ліази в міокарді до рівня тварин без змін гормонального статусу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ольховський О. С. Вікові відмінності продукції гідроген сульфїду в серці та аорті щурів / О. С. Ольховський, А. В. Мельник, Н. В. Заїчко // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2011. – **11**. – С. 133–137.
2. Ali B. H. Sex Ddifference 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.
3. Aloisi A. M. Gonadectomy affects hormonal and behavioral responses to repetitive nociceptive stimulation in male rats / A. M. Aloisi, I. Ceccarelli, P. Fiorenzani // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2003. – **1007**. – P. 232–237.
4. Digoxin increases hydrogen sulfide concentrations in brain, heart and kidney tissues in mice / B. Wilinski, J. Wilinski, E. Somogyi [et al.] // Pharmacol. Rep. – 2011. – **63**, № 5. – P. 1243–1247.
5. Gadalla M. M. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter / M. M. Gadalla, S. H. Snyder // J. Neurochem. – 2010. – **113**. – P. 14–26.
6. Gender differences in the renin-angiotensin and nitric oxide systems: relevance in the normal and diseased kidney / B. B. McGuire, R. W. Watson, F. Perez-Barriocanal [et al.] // Kidney Blood Press. Res. – 2007. – **30**, № 2. – P. 67–80.
7. 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.
8. Moller-Leimkuhler A. M. Gender differences in cardiovascular disease and comorbid depression / A. M. Moller-Leimkuhler // Dialogues Clin Neurosci. – 2007. – **9** (1). – P. 71–83.
9. Postnatal development and testosterone dependence of a rat epididymal protein identified by neonatal tolerization / S. A. Joshi, S. Shaikh, S. Ranpura, V. V. Khole // Reproduction. – 2003. – **125**, № 4. – 3495–3507.
10. Stein A. Redox biology of hydrogen sulfide: Implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology / A. Stein, Sh. M. Bailey // Redox. Biology – 2013. – № 1. – P. 32–39.

А. В. Мельник

ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. И. ПИРОГОВА

ВЛИЯНИЕ ТЕСТОСТЕРОНА НА ПРОДУКЦИЮ ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА В МИОКАРДЕ КРЫС

Резюме

В работе показано, что продукция гидроген сульфид (H_2S) в миокарде определяется уровнем тестостерона: кастрация самцов вызывает достоверное повышение содержания H_2S , активности цистатионин- γ -лиазы (ЦГЛ), максимальной скорости образования H_2S из цистеина при участии ЦГЛ (V_{max}), а также снижение константы Михаэлиса (K_m) этого энзима по сравнению с контролем. Проведение заместительной гормонотерапии с помощью тестостерона приближает показатели продукции H_2S и кинетические параметры ЦГЛ к уровню в контрольной группе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гидроген сульфид, цистатионин- γ -лиаза, кинетические параметры, самцы, тестостерон, миокард.

A. V. Melnyk

I. M. PYROHOV VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

INFLUENCE OF TESTOSTERONE ON HYDROGEN SULFIDE FORMATION IN THE MYOCARDIUM OF RATS

Summary

It is shown that the production of hydrogen sulfide (H_2S) in the myocardium is determined by the level of estradiol: castration of males causes a significant increase in H_2S content, cystathionine γ -lyase (CSE) activity, maximum rate of H_2S formation from cysteine with CSE (V_{max}), as well as an decrease in Michaelis constant (K_m) of this enzyme in comparison with the controls. Hormone replacement therapy with testosterone approximates H_2S production and CSE kinetic parameters to the levels of the control group.

KEY WORDS: hydrogen sulfide, cystathionine γ -lyase, kinetic parameters, male, testosterone, myocardium.

Отримано 08.07.14

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