
© Мельник А.В.

УДК: 546.221.1

Мельник А.В.

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, кафедра біологічної та загальної хімії (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

ВПЛИВ РІЗНОЇ НАСИЧЕНОСТІ ОРГАНІЗМУ САМОК ЩУРІВ ЕСТРАДІОЛОМ НА УТВОРЕННЯ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В МІОКАРДІ

Резюме. У роботі показано, що продукція гідроген сульфїду в міокарді детермінується рівнем естрадіолу: кастрація самок викликає достовірне зменшення в міокарді вмісту H_2S , активності цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ), максимальної швидкості утворення H_2S з цистеїну за участі ЦГЛ (V_{max}), а також підвищення константи Міхаеліса (K_m) цього ензиму в порівнянні з контролем. Проведення замісної гормонотерапії за допомогою естрадіолу наближає показники продукції H_2S і кінетичні

параметри ЦГЛ до рівня в контрольній групі.

Ключові слова: гідроген сульфід, цистатіонін- γ -ліаза, кінетичні параметри, самки, естрадіол, міокард

Вступ

В останні роки накопичені численні клінічні, експериментальні та епідеміологічні дані, які засвідчують, що стать відіграє вагомий роль у розвитку серцево-судинних захворювань (ССЗ) [Tostes et al., 2008]. Найбільш вразливими щодо ССЗ є жінки старшого і похилого віку, а між тим за прогнозами ВООЗ в найближчому майбутньому кожна друга жінка світу буде старше 45 років. Тому такої значимості набувають проблеми гендерної кардіології, адже відмінності у факторах ризику, клінічних проявах, діагностичних і лікувальних підходах для чоловіків та жінок є найбільш значимими саме при ССЗ [Барна, 2007].

Статеві відмінності поширеності кардіоваскулярної патології значною мірою пов'язані з різними біологічними ефектами тестостерону та естрогенів. Як відомо, вплив статевих гормонів на організм і серцево-судинну систему зокрема, реалізується через геномні та негеномні механізми [Tarhouini, 2013]. До негеномних ефектів можна віднести пряму дію статевих гормонів на судини і продукцію ними вазорегуляторних молекул. Естрогени посилюють утворення вазодилататорів, зокрема простагліцинів, але гальмують продукцію констрикторних молекул - ендотеліну-1, лейкотрієнів, катехоламінів.

Останнім часом увагу науковців привертає біологічно-активна речовина гідроген сульфід (H_2S), яка синтезується в серцево-судинній системі в достатніх кількостях і активно бере участь в регуляції судинного тону та скоротливості міокарду [Gadalla, Snyder, 2010]. Основним джерелом її синтезу в серці та судинах є реакція десульфуровування цистеїну за участі ензиму цистатіонін- γ -ліази. Однак, на сьогодні залишається нез'ясованою причетність статевих гормонів, зокрема естрадіолу, до регуляції продукції H_2S в серцево-судинній системі.

Метою дослідження було оцінити вплив естрадіолу на вміст H_2S , активність ЦГЛ та її кінетичні параметри (K_m , V_{max}) в міокарді щурів.

Матеріали та методи

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

Експериментальну модуляцію вмісту естрадіолу в організмі щурів виконували за допомогою кастрації тварин (оваріектомія) під каліпсоловим наркозом (10 мг/

кг) хірургічним методом через середній розтин передньої черевної стінки згідно загальноприйнятих методик. Дослідження проводились через 21 день після кастрації [Aloisi et al., 2003; Joshi et al., 2003]. Контрольним тваринам виконували розтин передньої черевної стінки з наступним пошаровим зашиванням рани ("псевдооперовані").

Замісну гормонотерапію у самок кастрованих щурів відтворювали введенням естрадіолу гемігідрату ("Естримакс", АО Гедеон Рихтер), 150 мг/кг внутрішньошлунково протягом 14 днів [Ali et al., 2001; Yuzurihara et al., 2003]. Ефект замісної терапії оцінювали за рівнем статевих гормонів в сироватці крові, а у самок ще і за допомогою вагінальних мазків.

Вміст естрадіолу в гепариновій плазмі крові тварин визначали імуноферментним методом стандартними наборами DRG Estradiol ELISA фірми DRG (USA) згідно інструкцій фірм-виробників.

Вміст H_2S визначали за методикою [Wilinski et al., 2011]. Міокард промивали холодним 1,15% розчином KCl, підірбнювали 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 г 15 хв., в супернатанті визначали вміст H_2S спектрофотометричним методом за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном в присутності $FeCl_3$. Всі маніпуляції проводили у стерильних герметизованих пластикових пробірках типу Eppendorf (для попередження втрат H_2S).

Для інших досліджень міокард гомогенізували в середовищі 0,25 М сахарози, 0,01 М Трис (pH 7,4) у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об./хв. (тефлон-скло), центрифугували 30 хв. при 600 г при температурі 4-6°C, відбирали аліквоти постядерного супернатанту в мікропробірці Eppendorf і до проведення досліджень зберігали при -20°C. Активність цистатіонін- γ -ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1) визначали за швидкістю утворення сульфід-аніону [Ольховський з співавт., 2011].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за 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 пакету статистичних програм "Microsoft Excel".

Результати. Обговорення

Встановлено, що різна насиченість організму самок естрадіолом має значний вплив на обмін H_2S в міокарді (табл. 1). Так, кастрація самок спричиняла

Таблиця 1. Вплив кастрації самок щурів та замісної гормонотерапії естрадіолом на активність ЦГЛ та вміст H_2S в міокарді ($M \pm m$, $n=30$).

Групи тварин	ЦГЛ, нмоль H_2S / хв. х мг протеїну	H_2S , нмоль / мг протеїну
Псевдооперовані самки	$0,378 \pm 0,013$	$3,11 \pm 0,10$
Кастрація	$0,301 \pm 0,008^*$	$2,60 \pm 0,08^*$
Кастрація + ЗГТ	$0,358 \pm 0,011^\#$	$3,07 \pm 0,06^\#$
	Кореляція з рівнем естрадіолу ($n=30$)	
	$+0,51^*$	$+0,45^*$

Примітки: * - достовірність відмінностей ($p < 0,05$) відносно псевдооперованих самок щурів; # - достовірність відмінностей ($p < 0,05$) відносно кастрованих самок щурів; ° - достовірність кореляцій ($p < 0,05$) з рівнем естрадіолу.

Таблиця 2. Вплив кастрації самок щурів та замісної гормонотерапії естрадіолом на кінетичні параметри ЦГЛ в міокарді ($M \pm m$, $n=5$).

Групи тварин	K_m , мМ	V_{max} , нмоль H_2S / хв. х мг протеїну
Псевдооперовані самки	$2,40 \pm 0,03$	$0,596 \pm 0,003$
Кастрація	$2,97 \pm 0,05^*$	$0,498 \pm 0,004^*$
Кастрація + ЗГТ	$2,37 \pm 0,02^\#$	$0,592 \pm 0,005^\#$
	Кореляція з рівнем естрадіолу ($n=30$)	
	$-0,68^*$	$+0,61^*$

Примітки: * - достовірність відмінностей ($p < 0,05$) відносно псевдооперованих самок щурів; # - достовірність відмінностей ($p < 0,05$) відносно кастрованих самок щурів; ° - достовірність кореляцій ($p < 0,05$) з рівнем естрадіолу.

достовірне зниження активності ЦГЛ на 25,6% та вмісту H_2S на 19,4% в міокарді щурів, порівняно з контрольною групою. Проведення замісної гормонотерапії кастрованим тваринам практично повністю нормалізує метаболізм H_2S в міокарді щурів. Введення естрадіолу оварієктомованим самкам викликає зростання активності

ЦГЛ та вмісту H_2S відповідно на 16,0 та 15,3%, порівняно з кастрованими тваринами. Проведений кореляційний аналіз показав, що між рівнем естрадіолу в плазмі крові та вмістом H_2S й активністю ЦГЛ в міокарді існують достовірні прямі зв'язки.

В подальшому ми оцінили вплив естрадіолу на кінетичні параметри реакції десульфування цистеїну за участі ЦГЛ в міокарді щурів (рис. 1).

Показано, що в міокарді самок за низьких концентрацій цистеїну (0,12-0,95 мМ) реєструвалась пряма залежність з швидкістю ензиматичної реакції (вона знаходилась в діапазоні 0,025-0,148 нмоль H_2S / хв. х мг протеїну). За умов подальшого збільшення концентрації цистеїну темпи приросту швидкості реакції зменшувались і при вмісті цистеїну 7,5 мМ крива виходила на плато. Зростання кількості цистеїну вище 7,5 мМ супроводжувалось явищем субстратного інгібування, тобто зменшенням активності реакції, каталізованої ЦГЛ. За умов гонадектомії самок відмічалось збільшення кінетичної кривої в прямих координатах праворуч, а кривої в координатах Лайнуївера-Берка - ліворуч. Поряд з цим реєструвалось статистично вірогідне збільшення K_m за цистеїном (на 23,8%) та зменшення V_{max} (на 16,4%) реакції утворення H_2S , каталізованої ЦГЛ (табл. 2). Проведення замісної гормонотерапії естрадіолом наближало кінетичні криві до таких у контрольній групі щурів, а кінетичні параметри (K_m та V_{max}) статистично вірогідно не відрізнялись від псевдооперованих самок щурів. Кореляційний аналіз показав існування значних за силою зв'язків між рівнем естрадіолу в плазмі крові та K_m (обернений за направленістю) й V_{max} реакції утворення H_2S за участі ЦГЛ (прямий за направленістю).

Таким чином жіночі статеві гормони є одним із визначальних чинників регуляції метаболізму H_2S в міокарді щурів. За умов дефіциту естрадіолу (кастрація самок), реєструється зниження рівня H_2S та змень-

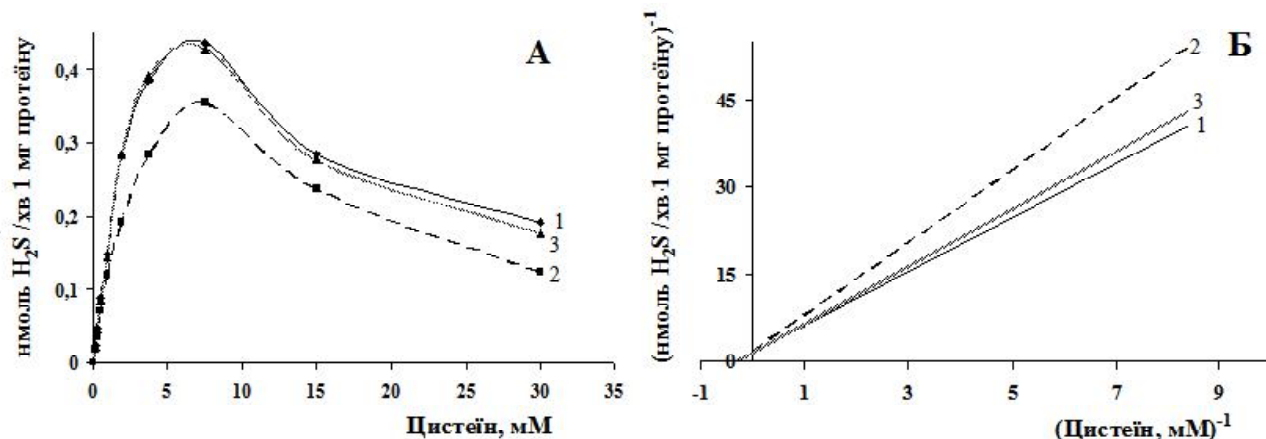


Рис. 1. Кінетика утворення H_2S з цистеїну за участі ЦГЛ в міокарді самок щурів у прямих координатах (А) та координатах Лайнуївера-Берка (Б). Примітки: 1. - псевдооперовані самки; 2 - кастровані самки; 3 - кастровані тварини, яким проводилась ЗГТ естрадіолом.

шення активності ЦГЛ, порівняно з відповідною групою контролю. Проведення ЗГТ кастрованим тваринам естрадіолом сприяє відновленню метаболізму H_2S в міокарді щурів до рівня контрольних тварин.

Різна насиченість організму щурів естрадіолом не лише впливає на активність синтезу H_2S в міокарді щурів, а й змінює кінетичні параметри ензиматичної реакції, каталізованої ЦГЛ. Оваріектомія самок спричиняє вірогідне зниження спорідненості ЦГЛ до цистеїну (достовірно зростає K_m) та V_{max} . Замісне введення статевих гормонів кастрованим тваринам забезпечує відновлення в міокарді самок кінетичних параметрів ензиматичної реакції за участі ЦГЛ до рівня тварин без змін гормонального статусу.

Виникає питання щодо молекулярних механізмів, які інтегровані у регуляторний вплив жіночих статевих гормонів на метаболізм H_2S в міокарді. Відомо, що естрогени володіють антиоксидантними властивостями, тому, ймовірно накопичення вільних радикалів, за умов дефіциту естрадіолу створює умови для ковалентної модифікації активного центру ензиму ЦГЛ та зміни його просторової будови. Можливо, за цих умов надлишок активних форм кисню викликає окисну деградацію H_2S до сульфідів та сульфатів [Stein, Bailey, 2013]. Останім часом показано, що утворення H_2S активується під впливом нітроген монооксиду (NO), синтез якого потенціюється естрадіолом [McGuire et al.,

2007; Stein, Bailey, 2013]. Тому на тлі дефіциту естрадіолу зменшується продукція NO, що супроводжується зниженням активності ЦГЛ та синтезу H_2S . Не виключено також, що одним із ймовірних 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 естрадіолу на обмін H_2S залишається нез'ясованим.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Гонадектомія самок супроводжується достовірним зниженням активності цистатіонін- γ -ліази (на 25,6%, $p < 0,05$), вмісту H_2S (на 19,4%, $p < 0,05$), спорідненості цистатіонін- γ -ліази до цистеїну (на 23,8%, $p < 0,05$) та максимальної швидкості утворення H_2S (на 16,4 %, $p < 0,05$) в міокарді щурів.

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

Подальші дослідження в цьому напрямку дозволять поглибити існуючі уявлення щодо молекулярних механізмів регуляторного впливу жіночих статевих гормонів на метаболізм гідроген сульфід у серцево-судинній системі.

Список літератури

- Барна О. М. Гендерна кардіологія. Проекція на аритмії у жінок / О. М. Барна // Медицинские аспекты здоровья Женщины. - 2007. - Т. 4, № 7. - С. 14-18.
- Ольховський О.С. Вікові відмінності продукції гідроген сульфід у серці та аорті щурів / О.С. Ольховський, А.В. Мельник, Н.В. Заїчко // Актуальні проблеми сучасної медицини. - 2011. - Т.11. - С.133 - 137.
- 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. - Vol. 33. - P. 369-373.
- 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. - Vol. 1007. - P. 232-237.
- Digoxin increases hydrogen sulfide concentrations in brain, heart and kidney tissues in mice / B. Wiliński, J. Wiliński, E. Somogyi [et al.] // Pharmacol Rep. - 2011. - 63, № 5. - P. 1243-1247.
- Endothelin, sex and hypertension / R. C. Tostes, Z. B. Fortes, G. E. Callera [et al.] // Clin. Sci. (Lond). - 2008. - Vol. 114 (2). - P. 85-97.
- Gadalla M. M. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter / M. M. Gadalla, S. H. Snyder // J. Neurochem. - 2010. - 113. - P. 14-26.
- 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. - Vol. 30, №2. - P. 67-80.
- 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. - Vol. 62, № 5. - P. 947-951.
- Key role of estrogens and endothelial estrogen receptor α in blood flow-mediated remodeling of resistance arteries / K. Tarhouni, A. L. Guihot, M. L. Freidja [et al.] // Arterioscler Thromb Vasc Biol. - 2013. - Vol. 33 (3). - P. 605-611.
- 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. - Vol. 125, № 4. - P. 3495-3507.
- 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.

Мельник А.В.

ВЛИЯНИЕ РАЗНОЙ НАСЫЩЕННОСТИ ОРГАНИЗМА САМОК КРЫС ЭСТРАДИОЛОМ НА ОБРАЗОВАНИЕ ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА В МИОКАРДЕ

Резюме. В работе показано, что продукция гидроген сульфид в миокарде детерминруется уровнем эстрадиола: кастрация самок вызывает достоверное уменьшение в миокарде содержания H_2S , активности цистатіонін- γ -ліази (ЦГЛ), максимальной скорости образования H_2S из цистеина при участии ЦГЛ (V_{max}), а также повышение константы Михаэлиса (K_m) этого энзима по сравнению с контролем. Проведение заместительной гормонотерапии с помощью эстрадиола приближает показатели продукции H_2S и кинетические параметры ЦГЛ до уровня в контрольной группе.

Ключевые слова: *водород сульфид, цистатионин-γ-лиаза, кинетические параметры, самки, эстрадиол, миокард.*

Melnik A.V.

INFLUENCE OF ESTRADIOL VARIOUS SATURATION IN FEMALE RATS ON THE HYDROGEN SULFIDE FORMATION IN THE MYOCARDIUM

Summary. *It is shown that the production of hydrogen sulfide in the myocardium is determined by the level of estradiol: castration of females causes a significant decrease in myocardial H₂S content, cystathionine γ-lyase (CSE) activity, maximum rate of H₂S formation from cysteine with CSE (V_{max}), as well as an increase in Michaelis constant (K_m) of this enzyme in comparison with the controls. Hormone replacement therapy with estradiol approximates H₂S production and CSE kinetic parameters to the levels of the control group.*

Key words: *hydrogen sulfide, cystathionine γ-lyase, kinetic parameters, female, estradiol, myocardium.*

Стаття надійшла до редакції 21.11.2014 р.

Мельник Андрій Володимирович - к.мед.н., доцент кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ імені М.І. Пирогова; +38 093 670-27-08; anderneting@gmail.com
