

10. Michail S, Sylvester F, Fuchs G, Issenman R. Clinical efficacy of probiotics: review of the evidence with focus on children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2006;43(4):550-7.

11. Abu-Raddad LJ. Epidemiological benefits of more-effective tuberculosis vaccines, drugs, and

diagnostics. *Proceedings National Acad. Science.* 2009;106(33):13980-5.

12. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 2005;56:845-57.

Стаття надійшла до редакції
29.10.2014



УДК 591.147:546.221:616.127

А.В. Мельник

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

*Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова
кафедра біологічної та загальної хімії
(зав. – д. мед. н. Н.В. Заїчко)
вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна
M.I. Pirogov Vinnitsa National Medical University
Department of Biological and General Chemistry
Pirogov st., 56, Vinnitsa, 21018, Ukraine
e-mail: anderneting@gmail.com*

Ключові слова: *гідроген сульфід, цистатіонін- γ -ліаза, кінетичні параметри, самки, естрадіол, міокард*
Key words: *hydrogen sulfide, cystathionine γ -lyase, kinetic parameters, female, estradiol, myocardium*

Реферат. Влияние разной насыщенности организма самок крыс эстрадиолом на образование гидроген сульфида в миокарде. Мельник А.В. Гидроген сульфид – сигнальная молекула, которая регулирует тонус сосудов и сократимость миокарда. На сегодня неизвестна роль эстрадиола на продукцию гидроген сульфида в сердечно-сосудистой системе крыс, что и стало целью нашего исследования. В работе оценено влияние эстрадиола на содержание гидроген сульфида, активность цистатионин- γ -лиазы и ее кинетические параметры – константу Михаэлиса (K_m) и максимальную скорость (V_{max}) в миокарде крыс. Опыты проведены на 45 белых нелинейных самках крыс. Дефицит половых гормонов создавали путем кастрации – овариэктомии. Заместительную гормонотерапию кастрированным животным проводили эстрадиолом. Показано, что продукция гидроген сульфида в миокарде определяется уровнем эстрадиола: кастрация самок вызывает достоверное уменьшение в миокарде содержания гидроген сульфида, активности цистатионин- γ -лиазы, максимальной скорости образования гидроген сульфида из цистеина при участии цистатионин- γ -лиазы, а также повышение константы Михаэлиса энзима по сравнению с контролем. Проведение заместительной гормонотерапии кастрированным самкам с помощью эстрадиола приближает уровень гидроген сульфида, активность цистатионин- γ -лиазы и кинетические параметры реакции десульфуривания цистеина при участии этого энзима в миокарде крыс до уровня в контрольной группе. Таким образом эстрадиол в сердечно-сосудистой системе самок крыс регулирует обмен гидроген сульфида, а именно повышает активность цистатионин- γ -лиазы и увеличивает ее средство к цистеину.

Abstract. Estradiol of various saturation and its influence on hydrogen sulfide formation in the myocardium of female rats. Melnik A.V. Hydrogen sulfide is signalling molecule that regulates vascular tone and myocardial contractility. Role of estradiol in hydrogen sulfide production in cardiovascular system of rats remains unclear and this becomes research objective. Effect of estradiol on hydrogen sulfide level, cystathionine- γ -lyase activity and its kinetic

parameters - Michaelis constant (Km) and maximum rate (Vmax) in rats' heart was estimated. Experiments were conducted on 45 white nonlinear female rats. Deficit of sex hormones level in females was modulated by castration - ovariectomy and hormone replacement therapy with estradiol. 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 hydrogen sulfide content, cystathionine- γ -lyase activity, maximum rate of hydrogen sulfide formation from cysteine in participation of cystathionine- γ -lyase, as well as increase in Michaelis constant of this enzyme in comparison with the controls. Hormone replacement therapy with estradiol brings nearer hydrogen sulfide level, cystathionine- γ -lyase activity and kinetic parameters of cysteine desulfuration reaction in the rats' myocardium to the levels of the control group. Thus, estradiol is involved in regulation of hydrogen sulfide production in cardiovascular system of rats, namely it increases cystathionine- γ -lyase activity and its affinity to cysteine.

В останні роки накопичені численні клінічні, експериментальні та епідеміологічні дані, які засвідчують, що стать відіграє вагомий роль у розвитку серцево-судинних захворювань (ССЗ) [7]. Найбільш вразливими щодо ССЗ є жінки старшого й похилого віку, а між тим за прогнозами ВООЗ у найближчому майбутньому кожна друга жінка світу буде старше 45 років. Тому такої значущості набувають проблеми гендерної кардіології, адже відмінності у факторах ризику, клінічних проявах, діагностичних і лікувальних підходах для чоловіків та жінок є найбільш значущими саме при ССЗ [1].

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 [11]. 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 у регуляції судинного тону та скоротливості міокарда [8]. Основним джерелом її синтезу в серці та судинах є реакція десульфуровання 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 ДОСЛІДЖЕНЬ

Досліди проведені на 45 білих нелінійних самках щурів (*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 із загальними етичними принципами експериментів на тваринах, ухваленими 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 серединний розтин передньої черевної стінки згідно із загальноприйнятими методиками. Дослідження проводились через 21 день після кастрації [5, 12]. Контрольним тваринам виконували розтин передньої черевної стінки з наступним пошаровим зашиванням рани («псевдоперевані»).

Замісну гормонотерапію у самок кастрованих щурів відтворювали введенням естрадіолу гемігідрату («Естримакс», АО Гедеон Рихтер), 150 мг/кг внутрішньошлунково протягом 14 днів [4, 10]. Ефект замісної терапії оцінювали за рівнем статевих гормонів у сироватці крові, а у самок ще й за допомогою вагінальних мазків.

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

Вміст H_2S визначали за методикою [6]. 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% ТХО, центрифугували при 1200 g 15 хв., в супернатанті визначали вміст H_2S спектрофотометричним методом за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном за наявності $FeCl_3$. Всі маніпуляції

проводили у стерильних герметизованих пластикових пробірках типу Eppendorf (для попередження втрат H₂S).

Для інших досліджень міокард 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 хв. при 600 g при температурі 4-6°C, відбирали аліквоти пост'ядерного супернатанту в мікропробірки 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 [3].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики з визначенням середньої арифметичної та середньої помилки (M±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) [2]. Розрахунки проводили на персональному комп'ютері в пакеті «STATISTIKA 5,5» (належить ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний № АХХR910A374605FA).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що різна насиченість організму самок естрадіолом має значний вплив на обмін H₂S в міокарді (табл. 1). Так, кастрація самок спричиняла достовірне зниження активності ЦГЛ на 25,6% та вмісту H₂S на 19,4% в міокарді щурів, порівняно з контрольною групою. Проведення замісної гормонотерапії кастрованим тваринам практично повністю нормалізує метаболізм H₂S в міокарді щурів. Введення естрадіолу оварієктомованим самкам викликає зростання активності ЦГЛ та вмісту H₂S відповідно на 16,0 та 15,3%, порівняно з кастрованими тваринами. Проведений кореляційний аналіз показав, що між рівнем естрадіолу в плазмі крові та вмістом H₂S й активністю ЦГЛ в міокарді існують достовірні прямі зв'язки.

Таблиця 1

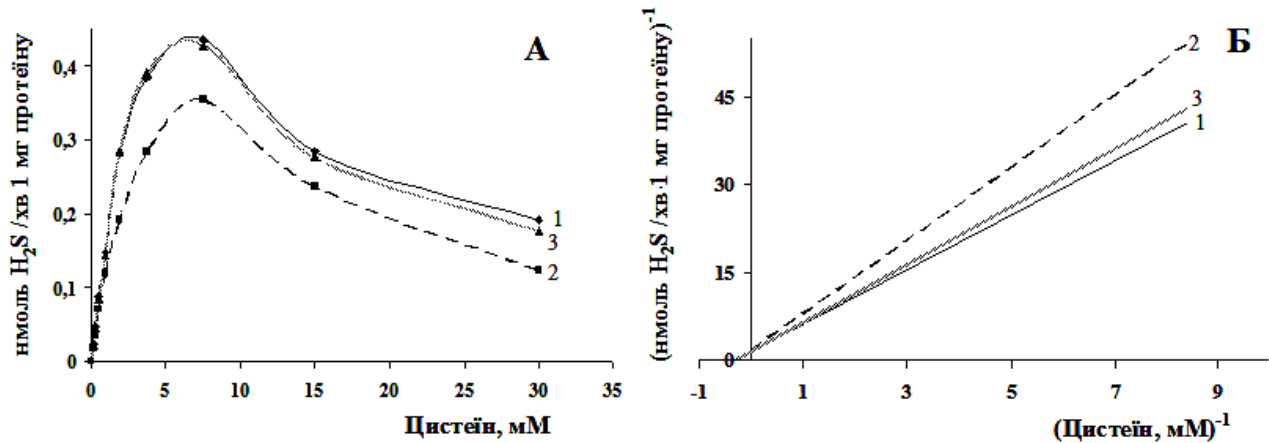
Вплив кастрації самок щурів та замісної гормонотерапії естрадіолом на активність ЦГЛ та вміст H₂S в міокарді (M±m, n=30)

Групи тварин	ЦГЛ, нмоль H ₂ S / хв·мг протеїну	H ₂ S, нмоль /мг протеїну
Псевдооперовані самки	0,378 ±0,013	3,11±0,10
Кастрація	0,301±0,008*	2,60±0,08*
Кастрація + ЗГТ	0,358 ±0,011#	3,07±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.

У подальшому ми оцінили вплив естрадіолу на кінетичні параметри реакції десульфурування цистеїну за участі ЦГЛ в міокарді щурів (рис.). Показано, що в міокарді самок за низьких концентрацій цистеїну (0,12-0,95мМ) реєструвалась пряма залежність зі швидкістю ензиматичної реакції (вона знаходилась у діапазоні 0,025-0,148 нмоль H₂S / 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. Зростання кількості цистеїну вище 7,5 мМ супроводжувалось явищем субстратного інгібування, тобто зменшенням активності реакції, каталізованої ЦГЛ. За умов гонадектомії самок відзначалось змішування кінетичної кривої в

прямих координатах праворуч, а кривої в координатах Лайнуївера-Берка – ліворуч. Поряд з цим реєструвалось статистично вірогідне збільшення Km за цистеїном (на 23,8%) та зменшення Vmax (на 16,4%) реакції утворення H₂S, каталізованої ЦГЛ (табл. 2). Проведення замісної гормонотерапії естрадіолом наближало кінетичні криві до таких у контрольній групі щурів, а кінетичні параметри (Km та Vmax) статистично вірогідно не відрізнялись від псевдооперованих самок щурів. Кореляційний аналіз показав існування значних за силою зв'язків між рівнем естрадіолу в плазмі крові та Km (обернений за направленістю) й Vmax реакції утворення H₂S за участі ЦГЛ (прямий за направленістю).



1 - псевдооперовані самки; 2 - кастровані самки; 3 - кастровані тварини, яким проводилась ЗГТ естрадіолом

Кінетика утворення H₂S з цистеїну за участі ЦГЛ в міокарді самок шурів у прямих координатах (А) та координатах Лайнуївера-Берка (Б)

Таким чином, жіночі статеві гормони є одним з визначальних чинників регуляції метаболізму H₂S в міокарді шурів. За умов дефіциту естрадіолу (кастрація самок), реєструється зниження рівня H₂S та зменшення активності ЦГЛ порів-

няно з відповідною групою контролю. Проведення ЗГТ кастрованим тваринам естрадіолом сприяє відновленню метаболізму H₂S в міокарді шурів до рівня контрольних тварин.

Таблиця 2

Вплив кастрації самок шурів та замісної гормонотерапії естрадіолом на кінетичні параметри ЦГЛ в міокарді (M±m, n=5)

Групи тварин	Km, mM	Vmax, нмоль H ₂ S / хв·мг протеїну
Псевдооперовані самки	2,40±0,03	0,596±0,003
Кастрація	2,97 ±0,05*	0,498 ±0,004*
Кастрація + ЗГТ	2,37±0,02#	0,592±0,005#
Кореляція з рівнем естрадіолу (n=15)		
	-0,68°	+0,61°

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

Різна насиченість організму шурів естрадіолом не лише впливає на активність синтезу H₂S в міокарді шурів, а й змінює кінетичні параметри ензиматичної реакції, каталізованої ЦГЛ. Оваріектомія самок спричиняє вірогідне зниження спорідненості ЦГЛ до цистеїну (достовірно зростає Km) та Vmax. 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, інтегрованих у регуляторний вплив жіночих статевих гормонів на метаболізм H₂S в

міокарді. Відомо, що естрогени мають антиоксидантні властивості, тому, ймовірно, накопичення вільних радикалів, за умови 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 H₂S до сульфідів та сульфатів [13]. Останім часом показано, що утворення H₂S активується під впливом нітроген монооксиду (NO), синтез якого потенціюється естрадіолом [9, 13]. Тому на тлі дефіциту естрадіолу зменшується продукція NO, що супроводжується зниженням активності ЦГЛ та синтезу H₂S. 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

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.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барна О.М. Гендерна кардіологія. Проекція на аритмії у жінок / О.М. Барна // Медицинские аспекты здоровья женщины. – 2007. – Т. 4, № 7. – С. 14–18.

2. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов / Е.В. Гублер. – М.: Медицина, 1978. – 294 с.

3. 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.

4. 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 J. Pharmacology. – 2001. – Vol. 33. – P. 369-373.

5. 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.

6. Digoxin increases hydrogen sulfide concentrations in brain, heart and kidney tissues in mice / B. Wiliński, J. Wiliński, E. Somogyi, J. Piotrowska [et al.] // Pharmacol Rep. – 2011. – Vol. 63, N 5. – P. 1243-1247.

7. Endothelin, sex and hypertension / R.C. Tostes, Z.B. Fortes, G.E. Callera [et al.] // Clin. Sci. (Lond). – 2008. – Vol. 114, N 2. – P. 85-97.

8. Gadalla M.M. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter / M.M. Gadalla, S.H. Snyder // J. Neurochem. – 2010. – Vol. 113. – P. 14-26.

9. Gender differences in the renin-angiotensin and nitric oxide systems: relevance in the normal and diseased kidney / B.B. McGuire, R.W. Watson, F. Pérez-Barriocanal [et al.] // Kidney Blood Press Res. – 2007. – Vol. 30, N 2. – P.67-80.

10. 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, N 5. – P. 947-951.

11. 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, N 3. – P. 605-611.

12. 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, N 4. – P. 3495-3507.

13. Stein A. Redox biology of hydrogen sulfide: Implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology / A. Stein, Sh.M. Bailey // Redox Biology – 2013. – N 1. – P.32-39.

REFERENCES

1. Barna OM. Gender cardiology. [Projection on arrhythmias in women Medical aspects of women's health]. 2007;4(7):14-18. Ukrainian.

2. Gubler EV. [Computational methods of analysis and recognition of pathological processes]. Medical. 1978;294. Russian.

3. Olhovskiy AS, Melnik AV, Zaichko NV. [Age-related differences in production of hydrogen sulfide in heart and aorta of rats]. Actual problems of modern medicine. 2011;4:133-7. Ukrainian.

4. Ali BH, Ben Ismail TH, Basir AA. Sex Ddifference in the susceptibility of rats to gentamicin nephrotoxicity: influence of gonadectomy and hormonal repla-

cement therapy. Indian Journal of Pharmacology. 2001;33:369-73.

5. Aloisi AM, Ceccarelli I, Fiorenzani P. Gonadectomy affects hormonal and behavioral responses to repetitive nociceptive stimulation in male rats. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2003;1007:232-7.

6. Wiliński B, Wiliński J, Somogyi E, Piotrowska J, Góralaska M. Digoxin increases hydrogen sulfide concentrations in brain, heart and kidney tissues in mice. Pharmacol Rep. 2011;63(5):1243-47.

7. Tostes RC, Fortes ZB, Callera GE, et al. Endothelin, sex and hypertension. Clin. Sci. (Lond). 2008;114(2):85–97.

8. Gadalla MM, Snyder SH. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *Neurochem.* 2010;113:14-26.

9. McGuire BB, Watson RW, Pérez-Barriocanal F, et al. Gender differences in the renin-angiotensin and nitric oxide systems: relevance in the normal and diseased kidney. *Kidney Blood Press Res.* 2007;30(2):67-80.

10. Yuzurihara M, Ikarashi Y, Noguchi M, Kase Y. Involvement of calcitonin gene-related peptide in elevation of skin temperature in castrated male rats. *Urology.* 2003;62(5):947-51.

11. Tarhouni K, Guihot AL, Freidja ML, et al. Key role of estrogens and endothelial estrogen receptor α in blood flow-mediated remodeling of resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(3):605-11.

12. Joshi SA, Shaikh S, Ranpura S, Khole VV. Post-natal development and testosterone dependence of a rat epididymal protein identified by neonatal tolerization. *Reproduction.* 2003;125(4):3495-507.

13. Stein A, Bailey ShM. Redox biology of hydrogen sulfide: Implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Redox Biology.* 2013;1:32-39.

Стаття надійшла до редакції
11.09.2014

