

**СТАТЕВІ ВІДМІННОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ ГОМОЦИСТЕЇНУ  
В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ**

*У роботі досліджено вплив статі й різного рівня насиченості організму щурів статевими гормонами на вміст гомоцистеїну в сироватці крові та активність ензимів, які беруть участь у його метаболізмі в печінці. Показано, що в самців вміст гомоцистеїну в сироватці крові достовірно вищий, а активність ензимів метилування та транссульфування гомоцистеїну в печінці є вірогідно меншою, ніж у самок. Гонадектомія знижує вираження статевих відмінностей метаболізму гомоцистеїну в печінці, тоді як проведення замісної гормонотерапії відновлює гендерний диморфізм в обміні цієї сірковмісної амінокислоти у щурів.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** **стать, печінка, гомоцистеїн, ензими метилування та транссульфування, щури.**

ВСТУП. Синдром гіпергомоцистеїнемії є відомим фактором ризику розвитку серцево-судинних захворювань. Механізми впливу надлишку гомоцистеїну (ГЦ) на стан серцево-судинної системи різноманітні й реалізуються через гіпометилування, оксидативний стрес, порушення синтезу факторів гемокоагуляції, гальмування продукування нітроген монооксиду (NO), гідроген сульфїду тощо [1, 2]. Останнім часом з'являються дані про наявність гендерних відмінностей вмісту ГЦ у сироватці крові [6]: рівень ГЦ у жінок репродуктивного віку є вірогідно меншим, ніж у чоловіків того ж віку, що певною мірою пояснює більшу чутливість чоловічого організму до розвитку серцево-судинної патології. На сьогодні залишається нез'ясованим питання щодо молекулярних механізмів, які лежать в основі статевих відмінностей метаболізму ГЦ. Тому метою даного дослідження було оцінити вплив статі й різного рівня насиченості організму щурів статевими гормонами на вміст ГЦ у сироватці крові та активність ГЦ-метаболізуючих ензимів у печінці.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди проведено на 90 білих безпородних щурах з індивідуальною масою 250–270 г, які перебували на стандартному раціоні віварію з водним режимом ad libitum та 12-годинним світловим режимом день/ніч. Дослідження виконували згідно з міжнародними вимогами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, © А. В. Мельник, Н. В. Заїчко, Н. І. Волощук, 2013.

що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), правилами гуманного ставлення до експериментальних тварин, затвердженими комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова (протокол № 13 від 7 жовтня 2010 р.).

Експериментальне моделювання дефіциту статевих гормонів у щурів проводили шляхом кастрації (оваріоектомія і тастектомія, відповідно, самкам та самцям) під кетаміновим наркозом (10 мг/кг) хірургічним методом через серединний розтин передньої черевної стінки згідно із загальноприйнятими методиками. Дослідження проводили через 21 день після кастрації [4, 11]. У контрольних тварин розтинали передню черевну стінку з наступним пошаровим зашиванням рани (псевдооперовані). Замісну гормонотерапію (ЗГТ) у самців і самок кастрованих щурів відтворювали шляхом введення тестостерону пропіонату (завод ООО "Фармадон", м. Ростов-на-Дону), 1 мг/кг підшкірно 1 раз на день; естрадіолу гемігідрату ("Естримакс", АО Гедеон Рихтер), 150 мг/кг внутрішньошлунково протягом 14 днів [3]. Ефект замісної терапії в щурів обох статей оцінювали за рівнем статевих гормонів у сироватці крові, а в самок ще і за допомогою вагінальних мазків.

Біохімічні дослідження виконано в науково-дослідній клініко-діагностичній лабораторії Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова, сертифікованій МОЗ України (свідоцтво про переатес-

тацію № 002/10 від 11 січня 2010 р.). Кров для досліджень у щурів брали із серця після анестезії кетаміном (10 мг/кг маси тіла внутрішньочеревно). Забір крові здійснювали за допомогою вакутейнерів у стерильні пластикові пробірки Vacuette (Greiner Bio-One, Австрія). Сироватку та ЕДТА-плазму отримували шляхом центрифугування крові при 1500 g 15 хв за 18–22 °С. Для біохімічних досліджень аліквоти сироватки та плазми відбирали в мікропробірки Eppendorf і до проведення досліджень зберігали при -20 °С.

Печінку перфузували холодним 1,15 % розчином калію хлориду і гомогенізували при 3000 об./хв (тефлон-скло) в середовищі 1,15 % калію хлориду (співвідношення 1:3). Гомогенати центрифугували впродовж 30 хв при 600 g, аліквоти пост'ядерного супернатанту відбирали в мікропробірки Eppendorf і до проведення досліджень зберігали при -20 °С.

Рівень загального ГЦ в ЕДТА-плазмі крові визначали методом ІФА за допомогою набору "Homocysteine EIA" (Axis-Shield, Англія) на аналізаторі STAT FAX 303/PLUS. Вміст естрадіолу і тестостерону в сироватці крові тварин визначали імуноферментним методом стандартними наборами DRG Estradiol ELISA фірми DRG (США) та DSLACTIVE Testosterone фірми DSL (США) згідно з інструкціями фірм-виробників.

Цистатіоназну активність цистатіонін- $\gamma$ -ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1) визначали за утворенням цистеїну в реакції розщеплення цистатіоніну [10], а цистатіонінсинтазну активність цистатіонін- $\beta$ -синтази (ЦБС, КФ 4.2.1.22) – за утворенням цистатіоніну в реакції конденсації гомоцистеїну із серином [9]. S-аденозилгомоцистеїнгідролазну активність (АГГ, КФ 3.3.1.1) визначали в реакції гідролізу S-аденозилгомоцистеїну за приростом сульфгідрильних груп [12]. Активність метіонінаденозилтрансферази (МАТ, КФ 2.5.1.6) визначали за приростом неорганічного фосфату [5], а бетаїнгомоцистеїнметилтрансферази (БГМТ, КФ 2.1.1.5) – за зниженням сульфгідрильних груп [7].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Спершу ми оцінили вплив статі й різного рівня насиченості організму щурів статевими гормонами на вміст ГЦ у сироватці крові (рис.). Було виявлено, що у самок контрольної групи вміст цієї сірковмісної амінокислоти в сироватці крові достовірно менший (на 18,5 %), ніж у самців. Кастрація тварин обох статей викликала різноспрямовані зміни вмісту ГЦ у сироватці крові. Зокрема, оваріоектомія самок супроводжувалась вірогідним збільшенням (на 16,9 %)

цього показника у сироватці крові, тоді як гонадектомія самців, навпаки, призводила до його зниження на 13,9 %. При цьому в кастрованих самок рівень ГЦ у крові був достовірно вищим, ніж у кастрованих тварин протилежної статі. Замісна гормонотерапія викликала в гонадектомованих щурів відновлення характеру гендерних відмінностей рівня ГЦ у крові. Так, замісне введення кастрованим самкам естрогенів супроводжувалося достовірним зменшенням (на 13,5 %) рівня цієї сірковмісної амінокислоти в крові, її вміст наближався до такого у псевдооперованих тварин. Натомість замісне введення гонадектомованим самцям тестостерону призводило до статистично вірогідного зростання вмісту ГЦ (на 15,0 %), причому рівень цього показника достовірно не відрізнявся від контролю.

На наступному етапі ми оцінили активність ензимів метилування (БГМТ, МАТ, АГГ) і транссульфування (ЦБС, ЦГЛ) ГЦ у печінці щурів обох статей та її зміни за умов різного рівня насиченості організму тварин статевими гормонами (табл.). З'ясовано, що у самок контрольної групи інтенсивність метаболізму ГЦ у реакціях метилування і транссульфування значно перевищувала таку в самців. Так, активність ензимів БГМТ, МАТ, АГГ, ЦБС та ЦГЛ у псевдооперованих самок була, відповідно, на 23,3; 21,5; 17,9; 25,0; 28,0 % вищою, ніж у самців. Гонадектомія щурів обох статей чинила протилежний вплив на активність процесів метилування і транссульфування в печінці тварин. Так, оваріоектомія самок супроводжувалась достовірним зменшенням активності БГМТ, МАТ, АГГ, ЦБС та ЦГЛ, відповідно, на 16,2; 14,6; 13,3; 16,8; 18,4 %, тоді

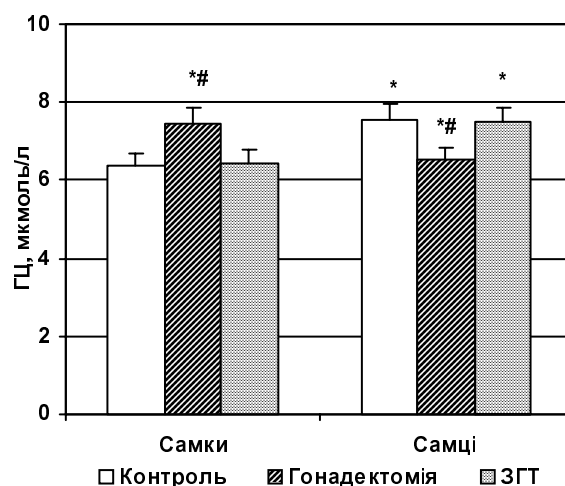


Рис. Вплив статі й різного рівня насиченості організму щурів статевими гормонами на вміст ГЦ у сироватці крові (\* –  $p < 0,05$  між самцями та самками у відповідних групах; # –  $p < 0,05$  відносно відповідної групи контролю).

Таблиця – Вплив статі й різного рівня насиченості організму щурів статевими гормонами на активність ензимів метилування і транссульфування ГЦ у печінці ( $M \pm m$ ,  $n=15$ )

| Активність ензимів, нмоль/хв на 1 мг протеїну | Самці     |              |           | Самки      |              |            |
|---|-----------|--------------|-----------|------------|--------------|------------|
|   | контроль  | гонадектомія | ЗГТ       | контроль   | гонадектомія | ЗГТ        |
| БГМТ  | 3,56±0,06 | 4,20±0,10#   | 3,62±0,08 | 4,39±0,09* | 3,68±0,07*#  | 4,45±0,05* |
| МАТ   | 2,70±0,10 | 3,21±0,11#   | 2,74±0,15 | 3,28±0,13* | 2,80±0,14*#  | 3,23±0,12* |
| АГГ   | 3,52±0,12 | 4,11±0,11#   | 3,58±0,13 | 4,15±0,14* | 3,60±0,13*#  | 4,16±0,12* |
| ЦБС   | 14,8±0,76 | 17,8±0,67#   | 15,2±0,79 | 18,5±0,81* | 15,4±0,78*#  | 18,1±0,85* |
| ЦГЛ   | 15,7±0,31 | 19,3±0,30#   | 16,2±0,40 | 20,1±0,24* | 16,4±0,38*#  | 19,5±0,36* |

Примітки:

- 1) \* –  $p < 0,05$  відносно відповідної групи тварин протилежної статі;
- 2) # –  $p < 0,05$  відносно відповідної групи контролю.

як тестектомія самців викликала підвищення їх активності на 18,0; 18,9; 16,8; 20,3; 22,9 % відносно групи псевдооперованих щурів. За цих умов у печінці кастрованих самок реєстрували достовірно нижчу активність ГЦ-метаболізуючих ензимів порівняно з групою гонадектомованих самців. Проведення замісної гормонотерапії кастрованим тваринам обох статей відновлювало гендерні відмінності метаболізму ГЦ у печінці щурів. При цьому активність процесів метилування і транссульфування в печінці самців і самок статистично достовірно не відрізнялася від такої у відповідній групі контролю.

Таким чином, у ході досліджень встановлено, що в організмі тварин обох статей існували достовірні відмінності метаболізму ГЦ. Виявлено, що в самок вміст ГЦ у сироватці крові та активність ГЦ-метаболізуючих ензимів у печінці були достовірно вищими, ніж у самців. Показано, що важливим чинником, який забезпечує реалізацію статевих відмінностей метаболізму ГЦ у печінці щурів, є рівень статевих гормонів. Так, високий вміст естрогенів і низький рівень тестостерону асоціювалися з низьким рівнем гомоцистеїну та високою активністю ензимних систем метилування і транссульфування, тоді як високий рівень тестостерону та дефіцит естрогенів – з високим рівнем гомоцистеїну та низькою активністю ГЦ-метаболізуючих ензимів.

Виникає питання щодо молекулярних механізмів, які лежать в основі регуляторного впливу статевих гормонів на активність ензимів метаболізму ГЦ. Важливе місце в регуляції метаболізму ГЦ у печінці належить S-аденозилметіоніну, який утворюється з метіоніну в реакції, каталізованій МАТ. Відомо, що цей метаболіт є негативним алостеричним ефектором метилентетрагідрофолатредуктази та позитивним модулятором цистатіонін- $\beta$ -синтази [2, 8]. Ми показали, що за умов дефіциту естрогенів та надлишку тестостерону знижувалась активність МАТ, що призводило до нако-

пичення S-аденозилметіоніну, зменшення активності ЦБС і катаболізму ГЦ у шляху транссульфування. Оскільки в реакціях транссульфування відбувається утилізація приблизно 70–80 % усього ГЦ [2, 8], можна стверджувати, що пригнічення їх активності є однією з важливих причин підвищення рівня ГЦ у сироватці крові щурів.

Відомо, що деякі ферменти обміну ГЦ (а саме БГМТ, ЦБС) є редокс-чутливими [8, 15], тобто їх активність регулюється на посттрансляційному рівні шляхом модифікації сульфгідрильних груп їх активних центрів реакційно-здатними формами кисню чи іншими тіолами. За умов надлишку тестостерону чи дефіциту естрогенів створюються умови для накопичення активних кисневих радикалів, які можуть ковалентно модифікувати вказані ензими і тому пригнічувати метаболізм ГЦ у шляхах транссульфування та метилування.

Можливо, депримуюча дія надлишку тестостерону та дефіциту естрогенів на активність ГЦ-метаболізуючих ензимів є наслідком їх регуляторного впливу на експресію відповідних генів [13, 14], адже відомо, що стероїдні гормони реалізують деякі зі своїх біологічних ефектів через цитозольні рецептори шляхом впливу на транскрипцію певних генів і, відповідно, синтезу білків.

**ВИСНОВКИ.** 1. У самок щурів контрольної групи вміст ГЦ у сироватці крові на 18,5 % менший, тоді як активність ензимів метилування і транссульфування ГЦ у печінці на 18–28 % вища, ніж у самців.

2. Гонадектомія тварин обох статей змінює вектор статевих відмінностей метаболізму ГЦ: у кастрованих самок реєструють достовірно вищий вміст ГЦ у сироватці крові та вірогідно нижчу активність ГЦ-метаболізуючих ензимів у печінці порівняно з кастрованими самцями.

3. Замісна гормонотерапія, проведена кастрованим тваринам, відновлює характер статевих відмінностей процесів транссульфу-

вання і метилування ГЦ; рівень ГЦ у сироватці крові та активність ГЦ-метаболізуючих ензимів

достовірно не відрізняються від таких у контрольній групі тварин.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вплив гострої метіонінової гіпергомоцистеїнемії на утворення гідроген сульфід у органах щурів та його корекція комплексом вітамінів B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub> / Н. В. Заїчко, І. І. Андрушко, А. В. Мельник, О. І. Штатко // Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. – 2009. – № 4. – С. 29–35.
2. Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології / О. О. Пентюк, М. Б. Луцюк, І. І. Андрушко, К. П. Постовітенко // Укр. біохім. журн. – 2003. – 75, № 1. – С. 5–17.
3. 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.
4. 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.
5. Chiang P. K. Activation of methionine for transmethylation. Purification of the S-adenosylmethionine synthetase of bakers' yeast and its separation into two forms / P. K. Chiang, G. L. Cantoni // J. Biol. Chem. – 1977. – 252, №13. – P. 4506–4513.
6. Endogenous sex steroids and circulating homocysteine in healthy Greek postmenopausal women [Text] / G. E. Christodoulakos, I. V. Lambrinouadaki, D. A. Rizos [et al.] // Hormones. – 2006. – 5. – P. 35–41.
7. Ericson L. E. Betaine-homocysteine methyltransferases. III. The methyl donor specificity of the transferase isolated from pig liver / L. E. Ericson // Acta. Chem. Scand. – 1960. – 14. – P. 2127–2134.
8. Finkelstein J. D. Homocysteine: A History in Progress / J. D. Finkelstein // Nutrition Reviews. – 2000. – 58, № 7. – P. 193–204.
9. Goldstein J. L. Cystathionine synthase activity in human lymphocytes: induction by phytohemagglutinin / J. L. Goldstein, B. K. Campbell, S. M. Gartler // J. Clin. Invest. – 1972. – 51, №4. – P. 1034–1037.
10. Heinonen K. Studies on cystathionase activity in rat liver and brain during development. Effects of hormones and amino acids in vivo / K. Heinonen // Biochem. J. – 1973. – 136, № 4. – P. 1011–10155.
11. 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.
12. Isa Y. Effect of vitamin B6 deficiency on S-adenosylhomocysteine hydrolase activity as a target point for methionine metabolic regulation / Y. Isa, H. Tsuge, T. Hayakawa // J. Nutr. Sci. Vitaminol. – 2006. – 52, № 5. – P. 302–306.
13. Khalil R. A. Sex Hormones as Potential Modulators of Vascular Function in Hypertension / R. A. Khalil // Hypertension. – 2005. – 46. – P. 249–253.
14. Kienitz T. Testosterone and blood pressure regulation / T. Kienitz, M. Quinkler // Kidney Blood Press Res. – 2008. – 31, № 2. – P. 71–79.
15. Millian N. S. Human betaine-homocysteine methyltransferase is a zinc metalloenzyme / N. S. Millian, T. A. Garrow // Arch. Biochem. Biophys. – 1998. – 356, № 1. – P. 93–98.

**А. В. Мельник, Н. В. Заїчко, Н. І. Волощук**  
ВИННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЦИНСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ Н. І. ПИРОГОВА

## ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МЕТАБОЛИЗМА ГОМОЦИСТЕИНА В ПЕЧЕНИ КРЫС

### Резюме

*В работе исследовано влияние пола и разного уровня насыщенности организма крыс половыми гормонами на содержание гомоцистеина в сыворотке крови и активность энзимов, принимающих участие в его метаболизме в печени. Показано, что у самцов содержание гомоцистеина в сыворотке крови достоверно выше, а активность энзимов метилирования и транссульфурирования гомоцистеина в печени достоверно меньше, чем у самок. Гонадэктомия снижает выраженность половых различий метаболизма гомоцистеина*

в печени, в то время как проведение заместительной гормонотерапии восстанавливает гендерный диморфизм в обмене этой серосодержащей аминокислоты у крыс.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пол, гомоцистеин, энзимы транссульфурирования и метилирования, печень, крысы.

**A. V. Melnyk, N. V. Zaichko, N. I. Voloshchuk**  
M. I. PYROHOV VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

## **SEX-RELATED DIFFERENCES OF HOMOCYSTEINE METABOLISM IN RAT LIVER**

### **Summary**

*Sex-related differences in enzymes activity of homocysteine hepatic metabolism and plasma homocysteine concentrations of rats at modulation of sex hormones saturation in organism were investigated. It was shown that plasma homocysteine concentrations was significantly higher but activity of methylation and transsulfuration hepatic enzymes was significantly lower in male rats than in female rats. Gonadectomy decreased sex-related differences of homocysteine hepatic metabolism but hormone replacement therapy restored gender dimorphism of homocysteine metabolism in rat.*

KEY WORDS: **gender, liver, homocysteine, methylation and transsulfuration enzymes, rats.**

Отримано 11.12.12

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