

© Мельник А.В.

УДК: 546.221.1:611.018.54:577.175.6

Мельник А.В.

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

СТАТЕВІ ОСОБЛИВОСТІ РІВНЯ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ

Резюме. В роботі показано, що стать є одним із визначальних детермінант рівня гідроген сульфід у сироватці крові. Встановлено, що рівень гідроген сульфід у самок є достовірно вищим, ніж у самців. Кастрація самок спричиняє достовірне зменшення вмісту H_2S в сироватці крові, тоді як тестектомія самців викликає протилежні зміни. Проведення замісної гормонотерапії кастрованим тваринам естрадіолом/тестостероном наближає показники вмісту H_2S в крові до рівня у тварин без змін гормонального статусу.

Ключові слова: гідроген сульфід, сироватка крові, стать.

Вступ

В останні роки накопичені численні клінічні, експериментальні та епідеміологічні дані, які засвідчують, що стать відіграє вагомий роль у розвитку серцево-судинних захворювань [10]. Найбільш вразливими щодо хвороб серця та судин 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 серцево-судинних захворювань [2, 5]. Незважаючи на величезну кількість досліджень повної ясності в розумінні молекулярних механізмів, що лежать в основі статевих відмінностей поширеності кардіоваскулярної патології ще немає. Останнім часом увагу науковців привертає вивчення нової біологічно-активної молекули гідроген сульфід (H_2S) - важливого газотрансмітера, який синтезується в тканинах у достатніх кількостях і активно бере участь в регуляції судинного тону, скоротливості міокарда, нейромодуляції, цитопротекції, запаленні тощо [6, 11]. Однак, на сьогодні залишається практично не вирішеним питання щодо існування статевих відмінностей рівнів H_2S в сироватці крові.

Метою дослідження було оцінити вплив статі та різного рівня насиченості організму щурів статевими гормонами на вміст H_2S у сироватці крові щурів.

Матеріали та методи

Досліди проведені на 60 білих нелінійних щурах обох статей (*Rattus norvegicus*). Всі тварини перебували в стандартних умовах виварію 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 статевих гормонів

в організмі щурів виконували за допомогою кастрації тварин (оваріектомія та тестектомія відповідно самкам та самцям щурів) під каліпсоловим наркозом (10 мг/кг) хірургічним методом через середній розтин передньої черевної стінки згідно загальноприйнятих методик. Дослідження проводились через 21 день після кастрації [4, 9].

Замісну гормонотерапію у самців і самок кастрованих щурів відтворювали введенням 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 [3, 8].

Вміст H_2S в сироватці визначали за реакцією утворення тіоніну з використанням *n*-фенілендіаміну адаптованим нами методом [1]. В пробірку з 0,5 мл 1% розчину ацетату цинка додавали 0,1 мл сироватки крові, 2,5 мл дистильованої води та перемішували. Потім додавали 0,5 мл 50 мМ водного розчину *n*-фенілендіаміну гідрохлориду, 0,4 мл 30 мМ розчину $FeCl_3$ в 1,2М HCl . Інкубували 5 хвилин при кімнатній температурі, після чого додавали 1 мл 20% ТХО для осадження протеїнів. Центрифугували 10 хвилин при 3000 об/хв. Вимірювали оптичну щільність надосадової рідини на фотоелектрокалориметрі при довжині хвилі 590 нм в кюветі на 1,0 см проти контролю на реактиви (в якому замість сироватки крові брали 0,1 мл розчину альбуміну з концентрацією 75 г/л). В якості стандартів використовували водні розчини натрію сульфід ($Na_2S \times 9H_2O$) з концентрацією 7,5-750 мкг/мл (31,2- 3120 мкмоль/л), які обробляли як дослідні проби. Вміст H_2S розраховували за відношенням оптичної щільності дослідної проби до оптичної щільності стандартної проби за формулою: $C_d = (E_d / E_{cr}) \times C_{cr}$ мкг/мл (мкмоль/л), де C_d - концентрація натрію сульфід в сироватці крові, E_d - оптична щільність дослідної проби, E_{cr} - оптична щільність стандартної проби, C_{cr} - концентрація стандартної проби з вмістом натрію сульфід 75 мкг/мл (312 мкмоль/л).

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 $p < 0,05$. Розрахунки проводили за допомогою пакету статистичних програм "Microsoft Excel".

Результати. Обговорення

Дослідження рівня гідроген сульфід у сироватці крові щурів показало, що у тварин обох статей цей показник має статистично вірогідні відмінності (рис. 1). Виявилось, що у самок інтактних тварин вміст гідроген сульфід у крові на 20,5% вищий ($p < 0,05$), ніж у самців. Проведення перцентильного аналізу показало, що у самців щурів медіана рівня гідроген сульфід становила 76,7 (95% CI 69,4-91,8) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25} - P_{75} знаходився в діапазоні 73,0-82,6 мкмоль/л. У самок інтактних щурів медіана становила 94,6 (95% CI 81,8-108) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25} - P_{75} знаходився в діапазоні 90,2-99,3 мкмоль/л.

Кастрація самців та самок щурів чинила різноспрямований вплив на рівень гідроген сульфід у сироватці крові (рис. 2). Тестектомія самців супроводжувалась вірогідним збільшенням рівня гідроген сульфід у сироватці крові на 33,8% ($p < 0,05$), порівняно з інтактними самцями, медіана становила 105 (95% CI 91,4-118) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25} - P_{75} знаходився в діапазоні 97,8-113 мкмоль/л. В той же час овариєктомія самок спричиняла статистично достовірне зменшення рівня гідроген сульфід у сироватці крові на 23,4% ($p < 0,05$), медіана становила 72,5 (95% CI 63,6-84,1) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25} - P_{75} знаходився в діапазоні 66,9-74,3 мкмоль/л. За цих умов змінюється вектор статевих відмінностей рівня цистеїну в сироватці крові щурів, порівняно з таким у інтактних тварин: у кастрованих самок щурів вміст цього сірковмісного газотрансміттера стає достовірно меншим на 31,0% ($p < 0,05$), ніж у кастрованих самців.

Замісна гормонотерапія кастрованих тварин естрадіолом та тестостероном повертало вектор статевих відмінностей рівня гідроген сульфід у сироватці крові до рівня інтактних тварин (рис. 3). Замісна терапія кастрованих самців тестостероном спричиняла достовірне зменшення рівня цього сірковмісного метаболіту в сироватці крові на 23,6% ($p < 0,05$), порівняно з кастрованими самцями, медіана становила 78,7 (95% CI 69,8-91,7) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25} - P_{75} знаходився в діапазоні 75,9-85,4 мкмоль/л. В той же час введення естрадіолу кастрованим самкам спричиняло достовірне зростання вмісту гідроген сульфід у сироватці крові на 24,8% ($p < 0,05$), порівняно з кастрованими самками, медіана становила 90,0 (95% CI 79,7-102) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25} - P_{75} знаходився в діапазоні 84,5-97,3 мкмоль/л. За цих умов у самок рівень гідроген сульфід у сироватці крові був на 8,4% вищим ($p < 0,05$), ніж у самців, характер статевих відмінностей наближався до інтактних тварин.

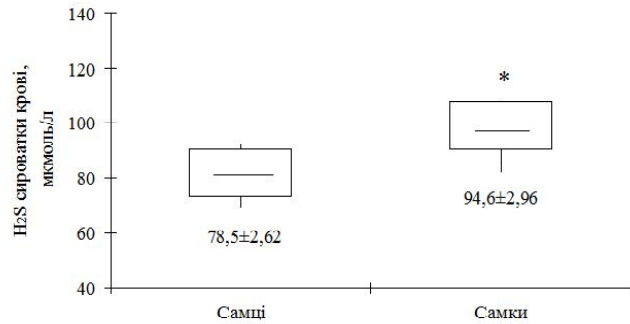


Рис. 1. Вміст гідроген сульфід у сироватці крові щурів різної статі ($M \pm m$, $n=10$); * - $p < 0,05$ між показниками самців та самок щурів. Верхня і нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75} , лінії за межами боксів - P_5 та P_{95} , лінія у середині боксів - медіана.

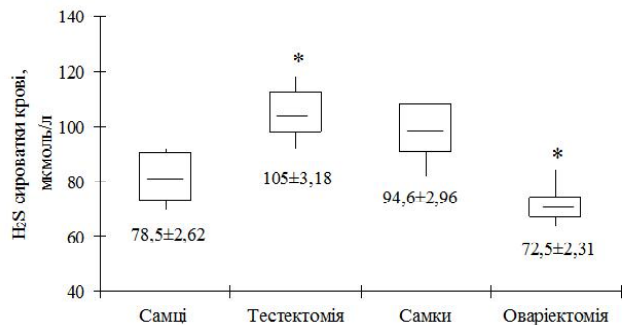


Рис. 2. Вплив кастрації щурів різної статі на вміст гідроген сульфід у сироватці крові щурів різної статі ($M \pm m$, $n=10$); * - $p < 0,05$ відносно показників інтактних щурів відповідної статі. Верхня і нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75} , лінії за межами боксів - P_5 та P_{95} , лінія у середині боксів - медіана

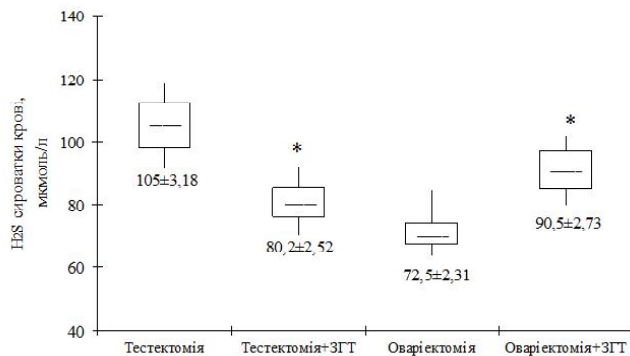


Рис. 3. Вплив замісної гормонотерапії (ЗГТ) кастрованих тварин на вміст гідроген сульфід у сироватці крові щурів різної статі ($M \pm m$, $n=10$); * - $p < 0,05$ відносно показників кастрованих тварин відповідної статі. Верхня і нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75} , лінії за межами боксів - P_5 та P_{95} , лінія у середині боксів - медіана.

Таким чином стать та рівень статевих гормонів є одним із визначальних чинників регуляції рівня H_2S в сироватці крові щурів. Наші дослідження показали, що в сироватці крові самок щурів вміст H_2S вірогідно вищий, ніж у самців. За умов дефіциту тестостерону (кастрація самців) відмічається зростання рівня H_2S , тоді як

за умов дефіциту естрадіолу (кастрація самок), навпаки реєструється зниження рівня H_2S в крові, порівняно з відповідною групою контролю. Проведення ЗГТ кастрованим тваринам відповідно тестостероном / естрадіолом сприяє відновленню вмісту H_2S в сироватці крові щурів до рівня контрольних тварин.

Виникає питання щодо молекулярних механізмів, які інтегровані у формування гендерного диморфізму рівня H_2S в сироватці крові. Можна думати, що визначальним чинником стать-специфічних особливостей вмісту H_2S в крові є статеві гормони. Відомо, що естрогени володіють антиоксидантними властивостями, тоді як тестостерон - навпаки посилює генерацію активних форм кисню [7]. Ймовірно, накопичення вільних радикалів (за умов дефіциту естрадіолу та надлишку тестостерону) викликає деградацію гідроген сульфід у шляхом його окиснення, або сприяє ковалентній модифікації активного центру H_2S -продукуючого ензиму цистатіонін- γ -ліази, що веде до пригнічення синтезу H_2S . Не виключено також, що одним із ймовірних механізмів впливу статевих гормонів на продукцію H_2S є їх здатність модулю-

вати експресію відповідних генів, які відповідальні за синтез H_2S -продукуючих ензимів. Однак, остаточні молекулярні механізми регуляторного впливу статевих гормонів на обмін H_2S залишаються нез'ясованими.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. У сироватці крові самок щурів вміст гідроген сульфід у 20,5% більший ($p < 0,05$), ніж у самців.

2. Гонадектомія самок супроводжується достовірним зниженням вмісту H_2S (на 23,4%, $p < 0,05$), тоді як кастрація самців викликає вірогідне підвищення рівня H_2S (на 33,8%, $p < 0,05$), порівняно з тваринами без змін гормонального статусу.

3. Замісна гормонотерапія кастрованих тварин тестостероном / естрадіолом наближає вміст H_2S у сироватці крові до рівня щурів без змін гормонального статусу.

Подальші дослідження в цьому напрямку дозволять розширити уявлення про молекулярні механізми через які реалізується статеві особливості вмісту гідроген сульфід у сироватці крові.

Список літератури

1. Визначення вмісту гідроген сульфід у сироватці крові /Н.В. Заїчко, Н.О. Пентюк, Л.О. Пентюк [та ін.] // Вісник наук. досліджень. - 2009. - №1. - С.29-32.
2. Барна О.М. Гендерна кардіологія. Проекція на аритмію у жінок /О.М. Барна // Мед. аспекти здоров'я жінки. - 2007. - Т.4, №7. - С.14-18.
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 J. of Pharmacology. - 2001. - Vol.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. NY. Acad. Sci. - 2003. - Vol.1007. - P.232-237.
5. Barrett-Connor E. Commentary: Masculinity, femininity and heart disease /E. Barrett-Connor // Intern. J. of Epidemiology. - 2007. - Vol.36 (3). - P. 621-622.
6. Gadalla M.M. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter /M.M. Gadalla, S.H. Snyder // J. Neurochem. - 2010. - №113. - P.14-26.
7. 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.
8. Involvement of calcitonin gene-related peptide in elevation of skin temperature in castrated male rats /M. Yuzurihara, Y. Ikarashi, M. Noguchi [et al.] // Urology. - 2003. - Vol.62, №5. - P.947-951.
9. Postnatal development and testosterone dependence of a rat epididymal protein identified by neonatal tolerization /S.A. Joshi, S. Shaikh, S. Ranpura [et al.] // Reproduction. - 2003. - Vol.125, №4. - P.3495-3507.
10. Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure /V. Regitz-Zagrosek, S. Oertelt-Prigione, U. Seeland [et al.] // Circ. J. - 2010. - Vol.74 (7). - P.1265-1273.
11. 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.

ПОЛОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ УРОВНЯ ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС

Резюме. В работе показано, что пол является одним из основных детерминант уровня гидроген сульфид в сыворотке крови. Установлено, что уровень гидроген сульфид у самок достоверно выше, чем у самцов. Кастрация самок вызывает достоверное уменьшение содержания H_2S в сыворотке крови, тогда как тестектомия самцов вызывает противоположные изменения. Проведение заместительной гормонотерапии кастрированным животным эстрадиолом / тестостероном приближает показатели содержания H_2S в крови до уровня животных без изменений гормонального статуса.

Ключевые слова: гидроген сульфид, сыворотка крови, пол.

Melnik A.V.

SEXUAL FEATURES OF SERUM HYDROGEN SULFIDE LEVELS IN RATS

Summary. It is shown that sex is one of the key determinants of the serum hydrogen sulfide levels. It was established that serum hydrogen sulfide level in females is significantly higher than in males. Castration of females causes a significant decrease in serum H_2S content, whereas testectomy goes with opposite changes. Hormone replacement therapy with estradiol/testosterone approximates serum H_2S content to levels in animals without changes of hormonal status.

Key words: hydrogen sulfide, blood serum, sex.

Рецензент - д.мед.н., доцент Заїчко Н.В.

Стаття надійшла до редакції 10.11.2016р.

Мельник Андрій Володимирович - к.мед.н., доцент кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М.І.Пирогова; +38 (093)6702708; anderneting@gmail.com