

© 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)

## СТАТЕВИЙ ДИМОРФІЗМ РЕГУЛЯЦІЇ СУДИННОГО ТОНУСУ У ЩУРІВ

**Резюме.** В роботі показано, що у самок щурів чутливість аорти до вазодилатуючої дії гідроген сульфіда достовірно вища, ніж у самців, що асоціюється з більш високим рівнем у особин жіночої статі гідроген сульфіду в аорті, меншим рівнем сироваткового sVCAM-1 та нижчою активністю процесів пероксидації ліпідів та білків. Показник чутливості аорти до релаксуючої дії  $H_2S$  достовірно та обернено корелює з вмістом у сироватці крові sVCAM-1, малонного діальдегіду та карбонільних груп протеїнів, при чому сила вказаних зв'язків вірогідно вища у самок, ніж у самців.

**Ключові слова:** гідроген сульфід, аорта, вазодилатація, самці, ендотелій, пероксидація ліпідів та протеїнів.

## Вступ

Кардіоваскулярні захворювання є найбільш частою причиною смерті населення України та більшості країн світу [5]. В останні роки накопичені чисельні клінічні, експериментальні та епідеміологічні дані, які засвідчують, що вагому роль у формуванні серцево-судинних захворювань відіграють статеві чинники [12]. З'ясовано, що у молодому та середньому віці поширеність артеріальної гіпертензії серед жінок майже вдвічі нижча, ніж серед чоловіків, тоді як з настанням менопаузи частка жінок різко зростає і стає такою ж, або навіть вищою, ніж у чоловіків [7]. Ці відмінності значною мірою пов'язані з різними біологічними ефектами статевих гормонів [8, 10]. Естрогени посилюють утворення вазодилататорів, зокрема простагландинів, та гальмують продукцію констрикторів - ендотеліну-1, лейкотрієнів, катехоламінів. Тестостерон, навпаки, індукує вазоконстрикцію, активуючи ренін-ангіотензинову систему і зменшуючи синтез простагландину I<sub>2</sub>. Цілком очевидно, що різноспрямований вплив жіночих та чоловічих статевих гормонів на функцію серцево-судинної системи, як і вікові зміни в продукції цих гормонів, значною мірою детермінують статеві відмінності поширеності серцево-судинних хвороб.

Останнім часом показано, що важливу роль в регуляції судинного тонузу відіграє гідроген сульфід ( $H_2S$ ) - біологічно-активний метаболіт сірковмісних амінокислот, газотрансмітер, цитопротектор та антиоксидант [9]. Однак, залишається нез'ясованим існування статевих відмінностей у впливі гідроген сульфіду на тонус судин.

**Мета** дослідження - дослідити вплив донору гідроген сульфіду ( $Na_2S \cdot 9H_2O$ ) на скоротливість кільцевих фрагментів аорти, вміст гідроген сульфіду в аорті, стан ендотеліальної функції та активність про-антиоксидантних систем у щурів різної статі.

## Матеріали та методи

Досліди проведені на 30 білих статевозрілих нелінійних щурах обох статей (*Rattus norvegicus*). 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

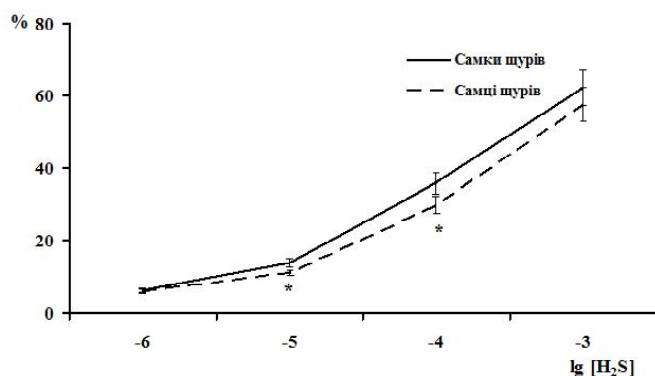
конгресом України з біоетики (Київ, 2001), "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1986), інших міжнародних угод та національного законодавства в цій галузі.

Скоротливість ізольованих фрагментів аорти реєстрували за допомогою тензометричної установки, створеної в ДУ "Інститут фізіології АМН України ім. О.О. Богомольця", за загальноприйнятою методикою [1, 11]. Для оцінки  $H_2S$ -стимульованого розслаблення ізольовані фрагменти аорти, передскороченої фенілефрин (10-6М), перфузували розчинами, що містили одночасно фенілефрин (10-6М) та  $H_2S$  в різних концентраціях (10-2-10-6М), протягом 15 хв кожний з наступною реєстрацією змін ізометричного напруження. Результати представляли у відсотках, які розраховували відносно показника ізометричного напруження фрагменту аорти, досягнутого при дії фенілефрину і прийнятого за 100%.

Для біохімічних досліджень аорту промивали холодним 1,15% розчином KCl, подрібнювали ножицями, гомогенізували в середовищі 0,01 М NaOH у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло). Сироватку отримували центрифугуванням крові при 1500 г 15 хв при 18-22°C. Аліквоти сироватки крові відбирали в мікропробірки Eppendorf і до проведення досліджень зберігали при -20°C. Вміст  $H_2S$  в аорті визначали як описано раніше [6]. Рівень протеїну визначали мікробіуретовим методом [4], малонного діальдегіду (МДА) в крові - за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [2], карбонільних груп протеїнів у крові - за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразинном [3]. Вміст адгезивної молекули судинних клітин-1 (sVCAM-1) в сироватці крові визначали імуноферментним методом за набором "sVCAM-1 ELISA KIT" (Diaclone, Франція) у відповідності до інструкції фірми-виробника. Статистичну обробку даних проводили в пакеті "STATISTIKA 5,5" (належить ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний № АХХR910A374605FA).

## Результати. Обговорення

Як відомо, однією із фізіологічних функцій  $H_2S$  є участь у регуляції судинного тонузу, тому виникає пи-



**Рис. 1.**  $H_2S$ -стимульоване розслаблення кільцевих фрагментів аорти у статевозрілих самок та самців щурів ( $M \pm m$ ,  $n=15$ ).  
**Примітка:** \* -  $p < 0,05$  відносно самок щурів.

тання чи існують статеві відмінності у чутливості аорти до його дії. Тому, в модельних системах *in vitro* була проведена оцінка здатності донору  $H_2S$  -  $Na_2S \cdot 9H_2O$  в діапазоні концентрацій  $10^{-6}$ - $10^{-3}M$  викликати релаксацію ізольованих кільцевих фрагментів аорти у самців та самок щурів. З цією метою ізольовані кільцеві фрагменти аорти, передскорочені фенілефрином ( $10^{-6}M$ ), перфузували протягом 30 хв. розчинами, що містили одночасно фенілефрин в тій же концентрації та  $Na_2S \cdot 9H_2O$  в наведеному діапазоні концентрацій, після чого реєстрували зміни ізометричного напруження. Зменшення величини ізометричного напруження відносно вихідного стану, індукованого фенілефрином, розцінювалось як показник вазорелаксуючої дії  $H_2S$ . На основі отриманих даних були побудовані криві "доза-ефект": по осі абсцис - десятковий логарифм концентрації  $H_2S$  ( $M$ ) у суперфузійному розчині, по осі ординат - нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти під впливом зростаючих концентрацій  $H_2S$ . За 100% був прийнятий рівень  $H_2S$ -стимульованого розслаблення фрагментів аорти, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення.

Встановлено, що у самців щурів інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів аорти, передскорочених фенілефрином, в присутності  $H_2S$  у концентраціях  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}M$  становила  $5,95 \pm 0,56\%$ ;  $11,1 \pm 2,53\%$ ;  $29,8 \pm 1,24\%$ ;  $57,5 \pm 1,10\%$  (рис. 1).

У самок щурів за цих концентрацій  $H_2S$  інтенсивність

**Таблиця 1.** Вміст маркерів окиснення протеїнів та ліпідів в сироватці крові щурів обох статей ( $n=15$ ,  $M \pm m$ ).

№ з/п	Показник	Групи щурів	
		1	2
		Самці	Самки
1	КГП, нмоль/мг протеїнів	$0,85 \pm 0,04$	$0,65 \pm 0,02$ ( $P_{1,2} < 0,05$ )
2	МДА, мкМ	$10,4 \pm 0,49$	$8,20 \pm 0,51$ ( $P_{1,2} < 0,05$ )

**Примітки:** цифрові індекси біля показника  $P$  є номерами груп.

розслаблення кілець аорти перевищувала такі показники дорослих самців відповідно на 4,95; 24,5 ( $p < 0,05$ ); 20,0 ( $p < 0,05$ ) та 8,4%. Таким чином, нами зафіксовані відмінності у скоротливості аорти самців та самок дорослих щурів, які переважно реєструвались у діапазоні концентрацій  $H_2S$   $10^{-5}$ - $10^{-4}M$ , що наближається до його фізіологічних концентрацій в тканинах. Розрахунок середніх ефективних концентрацій підтвердив виявлені закономірності:  $EC_{50}$   $H_2S$  в аорті самок щурів виявилась рівною  $74,3 \pm 5,84$  мкМ, тоді як у самців цей показник становив  $95,7 \pm 6,68$  мкМ і був на 28,8 % більшим, ніж у самок.

Результати наших досліджень засвідчили, що самці та самки щурів відрізняються за вмістом гідроген сульфід у аорті та рівнем sVCAM-1 у сироватці крові. У самок щурів вміст гідроген сульфід у аорті становив  $1,51 \pm 0,05$  нмоль/мг протеїну, а рівень сироваткового sVCAM-1 -  $448 \pm 30,5$  нг/мл. Натомість у статевозрілих самців щурів рівень гідроген сульфід у аорті становить  $1,25 \pm 0,05$  нмоль/мг протеїну, що на 20,9% менше, ніж у самок; вміст sVCAM-1 в сироватці складає  $510 \pm 19,9$  нг/мл, що на 13,8% вище, ніж у самок. Отримані дані свідчать про існування статевих відмінностей функціонування ендотелію судин та продукції аортою гідроген сульфід.

На наступному етапі ми оцінили вміст маркерів пероксидації ліпідів та протеїнів в сироватці крові щурів різної статі (табл. 1).

З'ясувалось, що інтенсивність процесів окисної модифікації ліпідів та протеїнів до певної міри детермінується статтю. Так, у самок щурів вміст у сироватці крові малонового діальдегіду та карбонільних груп протеїнів відповідно на 23,5 та 21,1% менший, ніж у самців.

Аналіз кореляційних зв'язків між чутливістю аорти до вазодилатуючої дії  $H_2S$  та вмістом гідроген сульфід у аорті, рівнем сироваткового sVCAM-1 й активністю процесів пероксидації ліпідів та білків у самок та самців дозволив виявити певні закономірності. Встановлено, що у самок щурів між  $EC_{50}$   $H_2S$  в аорті та рівнем  $H_2S$  виявляються достовірні обернені зв'язки ( $r = -0,62$ ), а з рівнем sVCAM-1, малонового діальдегіду та карбонільних груп протеїнів - достовірні прямі зв'язки ( $r = 0,59-0,70$ ). У самців щурів дані кореляційні зв'язки мали таку ж напруженість, однак їх сила була вірогідно меншою, ніж у самок.

Таким чином, у самок щурів чутливість аорти до вазодилатуючої дії гідроген сульфід достовірно вища, ніж у самців, що асоціюється з більш високим рівнем у особин жіночої статі гідроген сульфід у аорті, меншим рівнем сироваткового sVCAM-1 (маркер ендотеліальної дисфункції) та нижчою активністю процесів пероксидації ліпідів та білків. Гендерні відмінності  $H_2S$ -індукованої вазодилататії аорти щурів до певної міри можна пояснити наявністю статевого диморфізму функціонування ендотелію, який є однією із мішеней реалізації вазодилатуючого потенціалу  $H_2S$  [11], а також

секс-специфічними особливостями процесів окисної модифікації ліпідів та білків, які регулюють функціонування редокс-чутливих K+ATP - каналів - головної мішені в реалізації вазодилатуючої дії H<sub>2</sub>S [9].

### Висновки та перспективи подальших розробок

1. У самок щурів чутливість аорти до вазодилатуючої дії гідроген сульфіда достовірно вища, ніж у самців (EC<sub>50</sub> H<sub>2</sub>S у самок щурів на 28,8% менший, ніж у самців).

2. Вміст гідроген сульфіду в аорті у самок достовірно вищий, тоді як рівень сироваткового sVCAM-1 та активність процесів пероксидації ліпідів й протеїнів

вірогідно більші у самців.

3. Показник чутливості аорти до дії H<sub>2</sub>S достовірно та обернено корелює з сироватковим рівнем sVCAM-1, малонового діальдегіду та карбонільних груп протеїнів; сила вказаних зв'язків вірогідно вища у самок, ніж у самців.

Подальші дослідження в цьому напрямку дозволять поглибити розуміння молекулярних механізмів через які реалізується секс-специфічна чутливість стінки аорти до вазодилатуючої дії нового месенджера гідроген сульфіду, а також можуть стати підґрунтям для розвитку гендерної фізіології та біохімії кардіо-васкулярної системи.

### Список літератури

1. Вікові особливості змін скорочувальних судинних реакцій і вміст вільних радикалів кисню та метаболітів оксиду азоту у мишей лінії BALB/c за умов перебування у зоні відчуження /М.М. Ткаченко, В.Ф. Сагач, О.В. Базілюк//Фізіолог. журнал. - 2005. - Т.51, №3. - С.32-41.
2. Владимиров Ю.В., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. - М.: Наука, 1972. - 252 с.
3. Заїчко Н. В. Окислювальна модифікація білків сироватки крові як маркер активності ревматоїдного артриту та її зміни під впливом фармакотерапії аміноном, індометацином, німесулідом /Н. В. Заїчко //Вісник Вінницького держ. мед. унів. - 2003. - №7 (2/2). - С.664 - 666.
4. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. - М.: Высшая школа, 1980. - 272 с.
5. Купчинская Е.Г. Коррекция факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний у больных артериальной гипертензией /Е.Г. Купчинская, И.В. Лизогуб, О.А. Волошина//Здоров'я України. - 2007. - №21/1. - С.82-83.
6. Digoxin increases hydrogen sulfide concentrations in brain, heart and kidney tissues in mice /B. Wilinski, J. Wilinski, E. Somogyi, J. Piotrowska, M. Gilralska//Pharmacol Rep. - 2011. - 63, № 5. - P.1243-1247.
7. Gender differences in the effects of Angiotensin receptor blockers on cardiovascular disease /H. Yoshida, G. Rosano, M. Shimizu [et al.] //Curr. Pharm. Des. - 2011. - Vol. 17 (11). - P. 1090-1094.
8. Kienitz T. Testosterone and blood pressure regulation / T. Kienitz, M. Quinkler // Kidney Blood Press. Res. - 2008. - Vol. 31 (2). - P. 71-79.
9. Kimura H. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant /H. Kimura, N. Shibuya, Y. Kimura // Antioxid Redox Signal. - 2012. - Vol. 17, №1. - P.45-57.
10. Non-genomic vascular actions of female sex hormones: physiological implications and signalling pathways /S.W. Leung, H. Teoh, W. Keung [et al.] //Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. - 2007. - Vol. 34 (8). - P. 822-826.
11. Role of Hydrogen Sulfide and Sulfur-Containing Amino Acids in Regulation of Tone of Smooth Muscles of the Vascular Wall in Rats /A.V. Mel'nik, N. I. Voloshchouk, N.O. Pentyuk [et al.] //Neurophysiology. - 2010. - Vol. 42, № 2. - P. 126-131.
12. 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.

**Мельник А.В.**

### ПОЛОВОЙ ДИМОРФИЗМ РЕГУЛЯЦИИ СОСУДИСТОГО ТОНУСА У КРЫС

**Резюме.** В работе показано, что у самок крыс чувствительность аорты к вазодилатирующему действию гидроген сульфид-а достоверно выше, чем у самцов, что ассоциируется с более высоким уровнем у самок гидроген сульфид-а в аорте, меньшим уровнем сывороточного sVCAM-1 и меньшей активностью процессов пероксидации липидов и белков. Показатель чувствительности аорты к релаксирующему действию H<sub>2</sub>S достоверно и обратно коррелирует с содержанием в сыворотке крови sVCAM-1, малонового диальдегида и карбонильных групп белков, причем сила указанных связей достоверно выше у самок, чем у самцов.

**Ключевые слова:** гидроген сульфид, аорта, вазодилатация, самцы, эндотелий, пероксидация липидов и протеинов.

**Mel'nik A.V.**

### SEXUAL DIMORPHISM OF VASCULAR TONE REGULATION IN RATS

**Summary.** The article shows that in female rats the sensitivity of the aorta to vasodilatation of hydrogen sulfide is significantly higher than in males, which is associated with higher levels in female of hydrogen sulfide in aorta, lower level of serum sVCAM-1 and lower activity of processes of lipid and protein peroxidation. The index of aorta sensitivity to the relaxing action of H<sub>2</sub>S significantly and inversely correlates with the content in serum of sVCAM-1, malonyl dialdehyde and protein carbonyl groups, while the strength of these connections is significantly higher in females than in males.

**Key words:** hydrogen sulfide, aorta, vasodilatation, males, endothelium, peroxidation of lipids and proteins.

**Рецензент - д.мед.н., проф. Волощук Н.И.**

Стаття надійшла до редакції 7.10.2016р.

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