

Вплив статевих гормонів на вміст ДНК та експресію цистатіонін-γ-ліази в міокарді щурів

А. В. Мельник, Н. В. Заїчко, І. Л. Черешнюк, О. А. Ходаківський, О. А. Гайдук

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна

Залишаються невизначеними статеві особливості функціонування системи цистатіонін-γ-ліаза/гідроген сульфід у серці та її зв'язок із вмістом ДНК в ядрах клітин міокарда залежно від рівня статевих гормонів.

Мета роботи – оцінити вплив різного рівня статевих гормонів на фрагментацію ДНК, показники клітинного циклу, експресію цистатіонін-γ-ліази та вміст гідроген сульфиду (H_2S) у серці в самців, самок щурів.

Матеріали та методи. Досліди здійснили на 40 білих лабораторних щурах обох статей. Дефіцит статевих гормонів в організмі щурів створювали за допомогою кастрації (оваріектомія та тестектомія відповідно самкам і самцям щурів) хірургічним методом. Уміст естрадіолу та тестостерону у плазмі крові тварин визначали імуноферментним методом. Рівень ДНК в ядрах клітин міокарда досліджували методом проточної ДНК-цитометрії. Експресію гена цистатіонін-γ-ліази визначали методом полімеразно-ланцюгової реакції в режимі «реального часу» (Real-time PCR). Вміст H_2S у серці оцінювали спектрофотометричним методом. Результати статистично опрацювали за допомогою стандартних методів із застосуванням пакета прикладних програм MS Excel і Statistica SPSS 10.0 for Windows.

Результати. Виявилось, що в самців щурів експресія цистатіонін-γ-ліази та вміст H_2S у міокарді вірогідно менші відповідно на 46,9 та 16,1 % ($p < 0,05$), ніж у самок. Поряд з цим у самців більша активність апоптозу, проліферації та поліплоїдизації порівняно з самками. Гонадектомія самців зменшує експресію цистатіонін-γ-ліази (на 47,0 %, $p < 0,05$), вміст H_2S у міокарді (на 22,2 %, $p < 0,05$), активність апоптозу, проліферації та поліплоїдизації в серці, тоді як кастрація самок викликала протилежні зміни щодо контролю. Гонадектомія тварин змінює вектор статевих відмінностей досліджуваних показників: у кастрованих самців експресія цистатіонін-γ-ліази, вміст H_2S у міокарді вірогідно більші, тоді як активність апоптозу, проліферації та поліплоїдизації менші, ніж у відповідної групи самок.

Висновки. Система цистатіонін-γ-ліаза/ H_2S у міокарді – важлива молекулярна мішень, через яку реалізується різноспрямований вплив статевих гормонів на вміст ДНК в ядрах клітин міокарда щурів.

Ключові слова:

клітинний цикл, ДНК, серце, експресія цистатіонін-γ-ліази, гідроген сульфід.

Запорізький

медичний

журнал. – 2017. –

Т. 19, № 6(105). –

С. 737–742

DOI:

10.14739/2310-1210.

2017.6.114693

E-mail:

anderneting@gmail.com

Влияние половых гормонов на содержание ДНК и экспрессию цистатионин-γ-лиазы в миокарде крыс

А. В. Мельник, Н. В. Заїчко, І. Л. Черешнюк, А. А. Ходаковський, О. А. Гайдук

Остаются неопределенными половые особенности функционирования системы цистатионин-γ-лиаза/гидроген сульфид в сердце и ее связь с содержанием ДНК в ядрах клеток миокарда в зависимости от уровня половых гормонов.

Цель работы – оценить влияние различного уровня половых гормонов на фрагментацию ДНК, показатели клеточного цикла, экспрессию цистатионин-γ-лиазы и содержание гидроген сульфида (H_2S) в сердце у самцов и самок крыс.

Материалы и методы. Опыты проведены на 40 белых лабораторных крысах обоего пола. Дефицит половых гормонов в организме крыс создавали с помощью кастрации (овариэктомия и тестэктомия соответственно самкам и самцам крыс) хирургическим методом. Содержание эстрадиола и тестостерона в плазме крови животных определяли иммуноферментным методом. Уровень ДНК в ядрах клеток миокарда исследовали методом проточной ДНК-цитометрии. Экспрессию гена цистатионин-γ-лиазы определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» (Real-time PCR). Содержание H_2S в сердце оценивали спектрофотометрическим методом. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартных методов с применением пакета прикладных программ MS Excel и Statistica SPSS 10.0 for Windows.

Результаты. Оказалось, что у самцов крыс экспрессия цистатионин-γ-лиазы и содержание H_2S в миокарде достоверно меньше соответственно на 46,9 и 16,1 % ($p < 0,05$), чем у самок. Наряду с этим у самцов больше активность апоптоза, пролиферации и полиплоидизации по сравнению с самками. Гонадэктомия самцов уменьшает экспрессию цистатионин-γ-лиазы (на 47,0 %, $p < 0,05$), содержание H_2S в миокарде (на 22,2 %, $p < 0,05$), активность апоптоза, пролиферации и полиплоидизации в сердце, тогда как кастрация самок вызывала противоположные изменения относительно контроля. Гонадэктомия животных меняет вектор половых различий исследуемых показателей: у кастрированных самок экспрессия цистатионин-γ-лиазы, содержание H_2S в миокарде достоверно больше, тогда как активность апоптоза, пролиферации и полиплоидизации меньше, чем в соответствующей группе самок.

Выводы. Система цистатионин-γ-лиаза/ H_2S в миокарде является важной молекулярной мишенью, через которую реализуется разнонаправленное влияние половых гормонов на содержание ДНК в ядрах клеток миокарда крыс.

Ключевые слова:

клеточный цикл, ДНК, сердце, экспрессия цистатионин-γ-лиазы, гидроген сульфид.

Запорожский

медицинский

журнал. – 2017. –

Т. 19, № 6(105). –

С. 737–742

Influence of sex hormones on DNA content and cystathionine-γ-lyase expression in rat myocardium

A.V. Melnik, N. V. Zaichko, I. L. Chereshnyuk, O. A. Khodakivskyi, O. A. Haiduk

Till now sexual features of cystathionine-γ-lyase/ H_2S system functioning in heart and its relationship to DNA content in myocardial cells nuclei depending on the level of sex hormones are not defined.

Key words:

cell cycle, DNA, heart, cystathionine-gamma-lyase expression, hydrogen sulfide.

The aim of this work was to evaluate the effect of sex hormones different levels on DNA fragmentation, indicators of cell cycle, cystathionine- γ -lyase expression and H_2S content in heart in male and female rats.

Materials and methods. The experiments were performed on 40 white laboratory rats of both sexes. Deficiency of sex hormones in the organism of rats was created by castration (ovariectomy and testectomy respectively to female and male rats) with surgical method. Estradiol and testosterone in blood plasma of the animals were determined by immunoenzyme method. DNA level in myocardial cells nuclei was determined by flow DNA cytometry. Cystathionine- γ -lyase gene expression was determined by real time polymerase chain reaction in (Real-time PCR). H_2S content in heart was evaluated by spectrophotometry. Statistical processing of the obtained results was performed using standard methods by applying the software package MS Excel and Statistica SPSS 10.0 for Windows.

Results. It has been found that in male rats expression of cystathionine- γ -lyase and H_2S content in myocardium were significantly lower, by 46.9 and 16.1 % ($P < 0.05$) respectively, than in female rats. Along with this, males had greater activity of apoptosis, proliferation and polyploidization compared to females. Gonadectomy in males reduced expression of cystathionine- γ -lyase (47.0 %, $P < 0.05$), content of H_2S in myocardium (by 22.2 %, $P < 0.05$), activity of apoptosis, proliferation and polyploidization in heart, whereas castration of females caused opposite changes in relation to the control group. Gonadectomy in the animals changed the vector of sex differences in the studied parameters: cystathionine- γ -lyase expression and H_2S content in myocardium of castrated males was significantly higher, whereas activity of apoptosis, proliferation, and polyploidization were less than in the relevant group of females.

Conclusions. System of cystathionine- γ -lyase/ H_2S in myocardium is an important molecular target through which multidirectional sex hormones influence on DNA content in the nuclei of myocardial cells of rats is implemented.

Стать – важливий фактор ризику серцево-судинної патології [1]. За результатами епідеміологічних досліджень встановлено, що поширеність ішемічної хвороби серця зростає з віком і до 55 років переважає в чоловічій популяції, а після – в жіночій [1,2]. Указані відмінності пов'язують із різними біологічними ефектами статевих гормонів: естрадіол володіє антиапоптичними та протизапальними ефектами, тоді як ефекти тестостерону є протилежними [3,4]. Однак молекулярні механізми впливу статевих гормонів на функціональний стан клітин серця та судин остаточно не з'ясовані.

В останні роки отримані переконливі докази, що до регуляції стану серцево-судинної системи залучений біологічно-активний метаболіт сірковмісних амінокислот – гідроген сульфід (H_2S) [5]. Синтез H_2S у міокарді відбувається в процесі метаболізму цистеїну переважно за участі піридоксальфосфатзалежного ензиму цистатіонін- γ -ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1) [5]. Показано, що H_2S виявляє цитопротекторні, антиоксидантні та протизапальні властивості [6], активує проліферацію гладеньких м'язів та ендотеліоцитів судин, причетний до регуляції апоптозу та клітинного циклу кардіоміоцитів [7,8]. Але статеві особливості функціонування системи ЦГЛ/ H_2S у міокарді, як і її зв'язок із клітинним циклом кардіоміоцитів залежно від рівня статевих гормонів, залишаються невизначеними.

Мета роботи

Оцінити вплив різного рівня статевих гормонів на фрагментацію ДНК, показники клітинного циклу, експресію цистатіонін- γ -ліази та вміст H_2S у серці в самців і самок щурів.

Матеріали і методи дослідження

Досліди здійснили на 40 білих лабораторних щурах обох статей масою 220–280 г, яких отримали з науково-експериментальної клініки Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова. Тварини перебували у стандартних умовах із природним світловим режимом день/ніч, воду та корм одержували *ad libitum*. Дослідження здійснили за загальними етичними

принципами експериментів на тваринах, що ухвалені Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001) та «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). До експерименту залучали статевозрілих самців і самок щурів (вік – 6–8 місяців)

Дефіцит статевих гормонів у організмі щурів створювали за допомогою кастрації (оваріектомія та тестектомія відповідно самкам, самцям щурів) під каліпсоловим наркозом (10 мг/кг) хірургічним методом через середній розтин передньої черевної стінки за методом Я. Д. Кіршенבלата [9,10]. Контрольним тваринам виконували розтин передньої черевної стінки з наступним пошаровим зашиванням рани («псевдооперовані»). Дослідження проводились через 21 день після кастрації. Тварин знеживлювали методом цервікальної дислокації. Всі маніпуляції здійснили у стандартних умовах із 9:00 до 10:00. Ефект гонадектомії оцінювали за рівнем статевих гормонів у крові, а в самок – ще й за допомогою вагінальних мазків. Плазму отримували центрифугуванням крові разом у пробірках з ЕДТА при 1500 об/хв протягом 20 хв. Аліквоти плазми крові відбирали в мікропробірки Ерпендорф і до аналізу зберігали при -20°C . Для визначення вмісту H_2S 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 г 15 хв та отримували супернатант, який відразу використовували для досліджень. Для визначення вмісту ДНК та експресії ЦГЛ у ділянці верхівки серця відрізали міокард товщиною 10–15 мм, поміщали в мікропробірки Ерпендорф із холодним 1,15 % розчином KCl і до аналізу зберігали при -20°C .

Вміст естрадіолу та тестостерону у плазмі крові тварин визначали імуноферментним методом стандартними наборами «DRG Estradiol Elisa» (DRG, USA) та «DSLActive Testosterone» (DSL, USA) згідно з інструкціями фірм-виробників. Показано, що кастрація самців супроводжується зниженням вмісту тестостерону на 94,6 % ($6,50 \pm 0,62$ нг/дл проти $120 \pm 7,45$ нг/дл у кон-

тролі, $p < 0,001$), а гонадектомія самок – зменшення рівня естрадіолу на $87,7\%$ ($0,72 \pm 0,02$ нг/дл проти $5,85 \pm 0,19$ нг/дл у контролі, $p < 0,001$) відносно контролю.

Вміст ДНК в ядрах клітин міокарда визначали методом проточної ДНК-цитометрії. Суспензії ядер із клітин міокарда шурів отримували за допомогою розчину для дослідження ядерної ДНК (CyStain DNA Step 1 фірми Partec, ФРН) відповідно до протоколу-інструкції виробника. Цей розчин дає можливість виконувати екстракцію ядер і маркувати ядерну ДНК діамідинофеніліндолом (DAPI). У процесі виготовлення нуклеарних суспензій використовувались одноразові фільтри CellTrics 50 мкм (Partec, ФРН).

Проточний аналіз виконували на багатфункціональному науково-дослідному проточному цитометрі «Partec PAS» фірми Partec (ФРН). Для збудження флуоресценції DAPI застосовувалось УФ-випромінювання. З кожного зразка нуклеарної суспензії аналізу підпадало 10 тисяч подій. Циклічний аналіз клітин виконувався засобами програмного забезпечення FloMax (Partec, ФРН) у повній цифровій відповідності згідно з математичною моделлю, де визначались: G0G1 (G1 %) – відсоткове співвідношення клітин фази G0G1 до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК = 2с); S (S %) – відсоткове співвідношення клітин у фазі синтезу ДНК до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК > 2с та < 4с); G2 + M (G2M %) – відсоткове співвідношення клітин у фазі G2 + M до всіх клітин клітинного циклу або клітин із вмістом ДНК = 4с (поліплоїдія). Визначення фрагментації ДНК (апоптоз) виконано шляхом виділення SUB-G0G1 ділянки на ДНК-гістограмах – RN2 перед піком G0G1, що вказує на ядра клітин із вмістом ДНК < 2с.

Рівень експресії гена ЦГЛ визначали методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) у режимі «реального часу» (Real-time PCR). Загальну РНК виділяли з тканини серця за допомогою комплексу реагентів «РИБО-золь-В» (AmpliSens, Російська Федерація). Для отримання кДНК використовували набір реагентів для реакції оберненої транскрипції (СИНТОЛ, Російська Федерація), що складався з 2,5 х реакційної суміші, 15 ОЕ/мл праймера оліго(dT)₁₅, 50 од/мкл оберненої транскриптази MMLV-RT, 5 од/мкл інгібітора РНКаз і деіонізуючої води, вільної від РНКаз. До суміші додавали 1–2 мкг тотальної РНК.

Визначення експресії гена ЦГЛ здійснили у присутності барвника SYBR Green I, із використанням детектувального ампліфікатора ДТ-Лайт («ДНК-Технологія», Російська Федерація) в реакційній суміші: 10 х буфер для ампліфікації з барвником SYBR Green I; 25 мМ хлорид магнію; 2,5 мМ дезоксинуклеотидтрифосфатів; специфічні праймери ЦГЛ 5'-GCTGAGAGCCTGGGAGGATA-3'; 5'-TCACTGATCCCGAGGGTAGCT-3' та 5 Е/мкл SynTag ДНК-полімерази. До суміші додавали 5 мкл зразка ДНК. Як референтний ген використовували ген β-актину: 5'-ACCCGCGAGTACAACCTTCTT-3'; 5'-TATCGTCATCCATGGCGAACT-3'. Для аналізу даних застосовували Ct метод: відносний рівень мРНК ЦГЛ/β-актину (у. о.) оцінювали за формулою $2^{-\Delta Ct}$, $\Delta Ct = Ct_{\text{ЦГЛ}} - Ct_{\beta\text{-актин}}$, де $Ct_{\text{ЦГЛ}}$ – величина порогового циклу ампліфікації кДНК цільового гена ЦГЛ; $Ct_{\beta\text{-актин}}$ – величина порогового циклу ампліфікації кДНК референтного гена β-актину.

Рівень H₂S у міокарді визначали за методикою [11].

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 H₂S спектрофотометричним методом за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілєндіаміном у присутності FeCl₃. Усі маніпуляції здійснили у стерильних герметизованих пластикових пробірках типу Eppendorf (для запобігання втрат H₂S). Вміст сульфід-аніона у пробі розраховували за калібрувальним графіком. Стандартом слугували водні розчини Na₂S·9H₂O (Sigma, США) з концентрацією 31,2–3120 мкМ.

Результати статистично опрацювали за допомогою стандартних методів із застосуванням пакета прикладних програм MS Excel і Statistica SPSS 10.0 for Windows. Результати представляли у вигляді середньої арифметичної та середньої помилки середньої ($M \pm m$). Вірогідність різниці між показниками оцінювали за параметричним t-критерієм Стюдента (при нормальному розподілі) та непараметричним U-критерієм Манна-Уїтні (при невідповідності нормальному розподілу). Для оцінювання зв'язків між показниками здійснили кореляційний аналіз за Пірсоном. Вірогідними вважали дані при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Спершу дослідили вплив кастрації на показники клітинного циклу в міокарді самців і самок шурів (табл. 1). У самців контрольної групи відносна кількість клітин у фазі синтезу ДНК і фазі G2+M (із вмістом ДНК = 4с) відповідно на 30,3 і 25,4 % ($p < 0,05$) більша порівняно з самками. Також у самців кількість клітин із фрагментованою ДНК (SUB-G0G1) на 17,2 % ($p < 0,05$) більша порівняно з самками. Кастрація тварин має різноспрямований вплив на показники клітинного циклу в міокарді самців і самок тварин. Зокрема, гонадектомія самців супроводжується зменшенням відносної кількості клітин у фазах S, G2+M та інтервалі SUB-G0G1 відповідно на 28,7; 23,3 та 12,7 % ($p < 0,05$) щодо контролю. Натомість оварієктомія самок викликає протилежні зміни: число клітин у фазах S, G2+M та інтервалі SUB-G0G1 збільшується на 80,8; 18,3 і 27,3 % ($p < 0,05$) щодо контролю. На тлі кастрації тварин виявляється зміна вектора статевих відмінностей показників клітинного циклу в міокарді: у групі кастрованих тварин у самців кількість клітин у фазах S, G2+M та інтервалі SUB-G0G1 на 48,6; 18,7 та 19,6 % ($p < 0,05$) менша, ніж у самок. Між рівнем тестостерону у плазмі крові та відносною кількістю клітин у фазах S, G2+M та інтервалі SUB-G0G1 виникають вірогідні прямі зв'язки ($r = 0,51\text{--}0,56$, $p < 0,05$), тоді як з рівнем естрадіолу – зворотних кореляції ($r = -0,54\text{--}0,58$), $p < 0,05$).

Далі оцінено вміст H₂S у міокарді самців і самок шурів контрольної групи та за умов кастрації (табл. 2). З'ясували, що в самців контрольної групи рівень H₂S у міокарді на 16,1 % ($p < 0,05$) менший, ніж у самок. Гонадектомія самців викликає зростання вмісту H₂S на 22,2 % ($p < 0,05$), а кастрація самок – зменшення на 16,4 % ($p < 0,05$) щодо контрольної групи. За цих умов змінюється спрямованість статевих відмінностей рівня H₂S у міокарді: у кастрованих самців цей показник на 22,7 % більший ($p < 0,05$), ніж у самок. Кореляційний аналіз виявив, що між вмістом H₂S

Таблиця 1. Вплив кастрації на показники клітинного циклу в міокарді самців і самок щурів ($M \pm m$, $n = 10$)

Показники клітинного циклу та фрагментації ДНК, %	Самці		Самки	
	Контроль	Кастрація	Контроль	Кастрація
G0G1	94,4 ± 0,33	94,9 ± 0,59	95,0 ± 0,30	94,6 ± 0,49
S	1,29 ± 0,07	0,92 ± 0,08*	0,99 ± 0,04†	1,79 ± 0,33**
G2+M, ДНК = 4с	4,59 ± 0,18	3,52 ± 0,30*	3,66 ± 0,09†	4,33 ± 0,13**
SUB-G0G1	15,0 ± 0,58	13,1 ± 0,60*	12,8 ± 0,21†	16,3 ± 0,65**

*: $p < 0,05$ ($|t| \geq 2,25$) щодо відповідного контролю; †: $p < 0,05$ ($|t| \geq 2,48$) між самцями та самками.

Таблиця 2. Вплив кастрації на вміст H_2S у міокарді самців і самок щурів ($M \pm m$, $n = 10$)

№ з/п	Групи тварин	H_2S , нмоль/мг протеїну	
		Самці	Самки
1	Контроль	2,61 ± 0,11	3,11 ± 0,10†
2	Кастрація	3,19 ± 0,14*	2,60 ± 0,08**

*: $p < 0,05$ ($|t| \geq 2,54$) щодо відповідного контролю; †: $p < 0,05$ ($|t| \geq 3,36$) між самцями та самками.

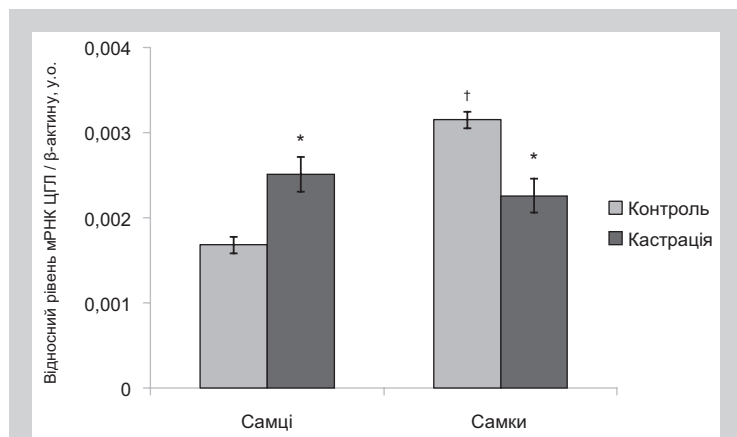


Рис. 1. Вплив кастрації на експресію ЦГЛ у міокарді самців і самок щурів.

*: $p < 0,05$ ($U \leq 19,5$) щодо відповідного контролю; †: $p < 0,05$ ($U = 1,5$) між самцями та самками.

у міокарді та рівнем тестостерону виникає зворотний зв'язок ($r = -0,43$, $p < 0,05$), тоді як з рівнем естрадіолу – прямий зв'язок ($r = 0,48$, $p < 0,05$). Також виникали зворотні зв'язки приблизно однакової сили між рівнем H_2S у міокарді та відносною кількістю клітин у фазах S, G2+M та інтервалі SUB-G0G1 у самців і самок (у самців $r = -(0,59-0,66)$, а у самок $r = -(0,57-0,63)$, $p < 0,05$).

Наприкінці дослідили відносний рівень мРНК ЦГЛ/β-актину в міокарді в самців і самок щурів та його зміни на тлі дефіциту статевих гормонів (рис. 1). Показано, що експресія ЦГЛ у самців вірогідно менша на 46,9 % ($p < 0,05$), порівняно з самками. Кастрація самців вірогідно збільшує відносний рівень мРНК ЦГЛ/β-актину в міокарді на 47,0 % ($p < 0,05$), тоді як гонадектомія самок супроводжується зменшенням цього показника на 28,1 % ($p < 0,05$) щодо контролю. У групі кастрованих тварин відсутні вірогідні відмінності між рівнем мРНК ЦГЛ/β-актину в самців і самок. Показник експресії ЦГЛ у міокарді виявляв зворотний зв'язок із рівнем тестостерону ($r = -0,47$, $p < 0,05$) і прямий – із рівнем естрадіолу ($r = 0,54$, $p < 0,05$). Між рівнем мРНК ЦГЛ/β-актину в міокарді та показниками клітинного циклу у фазах S, G2+M

та інтервалі SUB-G0G1 виникають вірогідні та обернені кореляції приблизно однакової сили в самців, самок (у самців $r = -(0,62-0,70)$, а в самок $r = -(0,59-0,68)$, $p < 0,05$).

Дослідження свідчать про наявність статевих особливостей фрагментації ДНК і клітинного циклу в міокарді щурів, що, ймовірно, є одним із визначальних чинників різної толерантності серця самців і самок до пошкодження. Так, у самців резистентність міокарда до патогенних чинників менша, ніж у самок. Доказом цього є такі особливості фрагментації ДНК і показників клітинного циклу в міокарді самців порівняно з самками:

- вища інтенсивність апоптозу (відсоток клітин в інтервалі SUB-G0G1) є доказом швидкої елімінації кардіоміоцитів;
- активніша поліплоїдизація (число клітин із кількістю ДНК = 4с) може бути одним із чинників більшої схильності міокарда до розвитку гіпертрофії;
- більший відсоток клітин у фазі синтезу ДНК може свідчити про інтенсивну проліферацію міофібробластів, що є предиктором високої чутливості серця до фіброгенезу.

Гонадектомія тварин змінює вектор статевих відмінностей показників вмісту ДНК в ядрах клітин серця. Так, у кастрованих самок зростає інтенсивність апоптозу, поліплоїдизації та проліферації, що свідчить про зменшення резистентності міокарда самок до патогенних чинників. Натомість, орхідектомія самців супроводжується протилежними змінами.

Виникає питання щодо молекулярних механізмів, що інтегровані до формування статевих особливостей перебігу клітинного циклу в міокарді тварин. Основним чинником цих відмінностей є різноспрямована дія статевих гормонів: естрогени володіють антиапоптичним ефектом, натомість тестостерон індукуює апоптоз [4]. Однак остаточні механізми впливу статевих гормонів на процеси апоптозу залишаються невизначеними. Невідомий також вплив естрадіолу та тестостерону на перебіг клітинного циклу в міокарді щурів.

У роботі показано, що естрогени стимулюють експресію ЦГЛ і збільшення вмісту H_2S у міокарді, натомість дія тестостерону є протилежною. Можна думати, що статеві відмінності системи ЦГЛ/ H_2S у міокарді є одним із факторів, що забезпечують особливості перебігу клітинного циклу в самців, самок щурів. Відомо, що H_2S має антиапоптичну дію, котра реалізується через різноманітні механізми:

- сульфгідрування NF-κβ викликає його транслокацію в ядро, що супроводжується зменшенням синтезу проапоптичного білка Bax, збільшенням синтезу антиапоптичного білка Bcl-2 та інгібіторних білків, які блокують апоптоз, опосередкований через рецептори TNFR 1 та Ар 3 [12, 13];
- сульфгідрування K^+_{ATP} -каналів призводить до фосфорилування протеїнази С, що активує Ca^{2+} -АТФ-азу саркоплазматичного ретикулума, що супроводжується зменшенням цитоплазматичної концентрації Ca^{2+} і стабілізацією мітохондріальної пори [14]. H_2S має здатність зменшувати активність поліплоїдизації кардіоміоцитів через індукцію трансформуючого фактора росту TGF-β, який збільшує експресію цикліназалежних кіназ Cdk-2, 4 [8, 15]. Також показано, що H_2S зменшує активність фіброгенезу, адже збільшує експресію TGF-β, що супроводжу-

ється активацією білків родини Smad, котрі пригнічують проліферацію фібробластів та їхню трансформацію в міофібробласти [16,17].

Отже, у самок резистентність міокарда до гіпоксично-ішемічного пошкодження є меншою, ніж у самців, адже естрогени збільшують експресію ЦГЛ, синтез H_2S у міокарді, що супроводжується зменшенням активності фіброгенезу, поліплоїдизації та апоптозу. Натомість низька резистентність міокарда самців до патогенних чинників асоціюється з тестостероном, який зменшує експресію ЦГЛ і синтез H_2S , що призводить до зростання активності фіброгенезу, поліплоїдизації та апоптозу. Однак, за даними деяких досліджень, застосування тестостерону, навпаки, має позитивний вплив на перебіг метаболічного синдрому в чоловіків, що пов'язують із його ліполітичним ефектом і здатністю відновлювати чутливість клітин до інсуліну. Тому це питання надалі потребує дослідження.

Висновки

1. У самців експресія цистатіонін- γ -ліази (рівень мРНК ЦГЛ/ β -актину) та вміст гідроген сульфід у міокарді вірогідно вищі, що асоціюється з більшою активністю апоптозу (кількість клітин у ділянці SUB-G0G1), проліферації (кількість клітин у фазі S) і поліплоїдизації в серці порівняно з самками.

2. Кастрація самців супроводжується зменшенням експресії цистатіонін- γ -ліази, вмісту гідроген сульфід у міокарді, активності апоптозу, проліферації та поліплоїдизації в серці, тоді як гонадектомія самок викликала протилежні зміни щодо контролю.

Перспективи подальших досліджень. Дані, що одержали, переконливо свідчать: система ЦГЛ/ H_2S у міокарді – потенційна молекулярна мішень для патогенетичної корекції статі-специфічних патологічних змін у серці в перспективі.

Список літератури

- [1] 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.
- [2] Ostadal B. Sex-based differences in cardiac ischaemic injury and protection: therapeutic implications / B. Ostadal, P. Ostadal // *Br J Pharmacol.* – 2014. – Vol. 171(3). – P. 541–554.
- [3] Sex-related resistance to myocardial ischemia-reperfusion injury is associated with high constitutive ARC expression / W. Bouma, M. Noma, S. Kanemoto et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2010. – Vol. 298(5). – P. 1510–1517.
- [4] Bhupathy P. Influence of sex hormones and phytoestrogens on heart disease in men and women / P. Bhupathy, C. D. Haines, L. A. Leinwand // *Womens Health (Lond).* – 2010. – Vol. 6(1). – P. 77–95.
- [5] Kimura H. Production and physiological effects of hydrogen sulfide / H. Kimura // *Antioxid Redox Signal.* – 2014. – Vol. 20(5). – P. 783–793.
- [6] Calvert J. W. Novel Insights Into Hydrogen Sulfide-Mediated Cytoprotection / J. W. Calvert, W. A. Coetzee, D. J. Lefer // *Antioxidants & Redox Signaling.* – 2010. – Vol. 12(10). – P. 1203–1217.
- [7] Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis / A. Papapetropoulos, A. Pyriochou, Z. Altaany et al. // *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* – 2009. – Vol. 106(51). – P. 21972–21977.
- [8] Skeletal muscle-derived progenitors capable of differentiating into cardiomyocytes proliferate through myostatin-independent TGF-beta family signaling / T. Nomura, T. Ueyama, E. Ashihara et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2008. – Vol. 365(4). – P. 863–869.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Carvedilol induces endogenous hydrogen sulfide tissue concentration changes in various mouse organs / B. Wiliński, J. Wiliński, E. Somogyi et al. // *Folia Biol (Krakow).* – 2011. – Vol. 59(3–4). – P. 151–155.
- [12] Hydrogen sulfide-linked sulphydration of NF- κ B mediates its antiapoptotic actions / N. Sen, B. D. Paul, M. M. Gadalla et al. // *Mol Cell.* – 2012. – Vol. 45(1). – P. 13–24.
- [13] Varfolomeev E. Roles of c-IAP proteins in TNF receptor family activation of NF- κ B signaling / E. Varfolomeev, T. Goncharov, D. Vucic // *Methods Mol Biol.* – 2015. – Vol. 1280. – P. 269–282.
- [14] Barr L. A. Discoveries of hydrogen sulfide as a novel cardiovascular therapeutic / L. A. Barr, J. W. Calvert // *Circ J.* – 2014. – Vol. 78(9). – P. 2111–2118.
- [15] Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo—an analysis based on cardiomyocyte nuclei / S. Walsh, A. Pontén, B. K. Fleischmann et al. // *Cardiovasc Res.* – 2010. – Vol. 86(3). – P. 365–373.
- [16] Hydrogen sulfide suppresses transforming growth factor- β 1-induced differentiation of human cardiac fibroblasts into myofibroblasts / Y. Zhang, J. Wang, H. Li et al. // *J. Sci China Life Sci.* – 2015. – Vol. 58(11). – P. 1126–1134.
- [17] Hydrogen Sulfide Donor GYY4137 Protects against Myocardial Fibrosis / G. Meng, J. Zhu, Y. Xiao et al. // *Oxid Med Cell Longev.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 691070.

References

- [1] Regitz-Zagrosek, V., Oertelt-Prigione, S., Seeland, U., & Hertz, R. (2010). Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. *Circ J*, 74(7), 1265–1273. doi: 10.1253/circj.CJ-10-0196.
- [2] Ostadal, B., & Ostadal, P. (2014). Sex-based differences in cardiac ischaemic injury and protection: therapeutic implications. *Br J Pharmacol*, 171(3), 541–554. doi: 10.1111/bph.12270.
- [3] Bouma, W., Noma, M., Kanemoto, S., Matsubara, M., Leshnowar, B. G., Hinmon, R., et al. (2010). Sex-related resistance to myocardial ischemia-reperfusion injury is associated with high constitutive ARC expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298(5), 1510–1517. doi: 10.1152/ajpheart.01021.2009.
- [4] Bhupathy, P., Haines, C. D., & Leinwand, L. A. (2010). Influence of sex hormones and phytoestrogens on heart disease in men and women. *Womens Health (Lond)*, 6(1), 77–95. doi: 10.2217/whe.09.80.
- [5] Kimura, H. (2014). Production and physiological effects of hydrogen sulfide. *Antioxid Redox Signal*, 20(5), 783–793. doi: 10.1089/ars.2013.5309.
- [6] Calvert, J. W., Coetzee, W. A., & Lefer, D. J. (2010). Novel Insights Into Hydrogen Sulfide-Mediated Cytoprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(10), 1203–1217. doi: 10.1089/ars.2009.2882.
- [7] Papapetropoulos, A., Pyriochou, A., Altaany, Z., Yang, G., Marazioti, A., Zhou, Z., et al. (2009). Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 106(51), 21972–21977. doi: 10.1073/pnas.0908047106.
- [8] Nomura, T., Ueyama, T., Ashihara, E., Tateishi, K., Asada, S., Nakajima, N., et al. (2008). Skeletal muscle-derived progenitors capable of differentiating into cardiomyocytes proliferate through myostatin-independent TGF-beta family signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 365(4), 863–869. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.11.087.
- [9] Aloisi, A. M., Ceccarelli, I., & Fiorenzani, P. (2003). Gonadectomy affects hormonal and behavioral responses to repetitive nociceptive stimulation in male rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1007, 232–237. doi: 10.1196/annals.1286.022.
- [10] Joshi, S. A., Shaikh, S., Ranpura, S., & Khole, V. V. (2003). Postnatal development and testosterone dependence of a rat epididymal protein identified by neonatal tolerization. *Reproduction*, 125(4), 3495–3507.
- [11] Wiliński, B., Wiliński, J., Somogyi, E., Piotrowska, J., Górska, M., & Macura, B. (2011). Carvedilol induces endogenous hydrogen sulfide tissue concentration changes in various mouse organs. *Folia Biol (Krakow)*, 59(3–4), 151–155. doi: 10.3409/fb59_3-4.151-155.
- [12] Sen, N., Paul, B. D., Gadalla, M. M., Mustafa, A. K., Sen, T., Xu, R., et al. (2012). Hydrogen sulfide-linked sulphydration of NF- κ B mediates its antiapoptotic actions. *Mol Cell*, 45(1), 13–24. doi: 10.1016/j.molcel.2011.10.021.
- [13] Varfolomeev, E., Goncharov, T., Vucic, D. (2015). Roles of c-IAP proteins in TNF receptor family activation of NF- κ B signaling. *Methods Mol Biol*, 1280, 269–282. doi: 10.1007/978-1-4939-2422-6_15.
- [14] Barr, L. A., & Calvert, J. W. (2014) Discoveries of hydrogen sulfide as a novel cardiovascular therapeutic. *Circ J*, 78(9), 2111–2118.
- [15] Walsh, S., Pontén, A., Fleischmann, B. K., & Jovinge, S. (2010). Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo—an analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovasc Res*, 86(3), 365–373. doi: 10.1093/cvr/cvq005.
- [16] Zhang, Y., Wang, J., Li, H., Yuan, L., Wang, L., Wu, B., & Ge, J. (2015). Hydrogen sulfide suppresses transforming growth factor- β 1-induced differentiation of human cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Sci China Life Sci*, 58(11), 1126–1134. doi: 10.1007/s11427-015-4904-6.

- [17] Meng, G., Zhu, J., Xiao, Y., Huang, Z., Zhang, Y., Tang, X., et al. (2015). Hydrogen Sulfide Donor GYY4137 Protects against Myocardial Fibrosis. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 691070. doi: 10.1155/2015/691070.
-

Відомості про авторів:

Мельник А. В., канд. мед. наук, доцент, каф. біологічної та загальної хімії, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна.

Заїчко Н. В., д-р мед. наук, доцент, зав. каф. біологічної та загальної хімії, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна.

Черешнюк І. Л., канд. мед. наук, старший науковий співробітник, науково-дослідний центр, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна.

Ходаківський О. А., д-р мед. наук, зав. навчально-науково-дослідної лабораторії з доклінічної оцінки нових лікарських засобів та біологічно-активних сполук «Фармадар», професор каф. фармакології, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна.

Гайдук О. А., доцент каф. інфекційних хвороб з курсом епідеміології, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна.

Сведения об авторах:

Мельник А. В., канд. мед. наук, доцент, каф. биологической и общей химии, Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Украина.

Заичко Н. В. д-р мед. наук, доцент, зав. каф. биологической и общей химии, Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Украина.

Черешнюк И. Л., канд. мед. наук, старший научный сотрудник, научно-исследовательский центр, Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Украина.

Ходаковский А. А., д-р мед. наук, зав. учебно-научно-исследовательской лабораторией по доклинической оценке новых лекарственных средств и биологически-активных соединений «Фармадар», профессор каф. фармакологии, Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Украина.

Гайдук Е. А., доцент каф. инфекционных болезней с курсом эпидемиологии, Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Украина.

Information about authors:

Melnik A. V., MD, PhD, Associate Professor, Department of Biological and General Chemistry, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.

Zaichko N. V., MD, PhD, DSci, Associate Professor, Head of Department of Biological and General Chemistry, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.

Chereshnyuk I. L., MD, PhD, Senior Researcher, Scientific Research Center, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.

Khodakivskiy O. A., MD, PhD, DSci, Head of the teaching and research laboratory for preclinical evaluation of new drugs and biologically active compounds "Pharmadar", Professor of the Department of Pharmacology, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.

Haiduk O. A., Associate Professor of Department of Infectious Diseases with course of Epidemiology, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of Interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 05.04.2017

Після доопрацювання / Revised: 04.06.2017

Прийнято до друку / Accepted: 13.07.2017