

СТАТЕВА ДЕТЕРМІНАЦІЯ СИНТЕЗУ ВАЗОАКТИВНИХ МОЛЕКУЛ ЯК ПРЕДИКТОР ГЕНДЕРНИХ ВІДМІННОСТЕЙ ГАСТРОТОКСИЧНОСТІ ДИКЛОФЕНАКУ У ЩУРІВ

Волощук Н.І.

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова

Вступ. Розлади мікроциркуляції, що є наслідком порушень поступателіального рівня захисту слизової ШКТ, займають провідне місце в патогенезі НПЗЗ-індукованої гастротоксичності і виникають внаслідок гіперпродукції вазоконстрикторних та зменшенням вмісту вазодилатуючих молекул. Серед цих в літературі описані простагландини (Pgl₂, Pgf₂₆), вільні радикали кисню, оксид азоту, а також, гідроген сульфід [8, 9, 10, 12, 14]. В наших попередніх дослідженнях було показано, що тип та рівень статевих гормонів зумовлює різну здатність організмів самців і самок «опиратись» пошкодуючій дії токсикантів, в тому числі і НПЗЗ [3, 4]. При цьому естрогени у самок проявляють захисну дію на шлунок і нирки, натомість тестостерону притаманний протилежний ефект. Однак питання щодо існування статевих відмінностей у продукції вазоактивних молекул та їх внесок в реалізацію гендерних відмінностей у гастротоксичності цього класу лікарських засобів залишається відкритим.

Метою нашої роботи було дослідити наявність гендерних відмінностей активності ферментів-продуцентів деяких вазоактивних молекул – простагландин-Н-синтази, NO-синтази, цистатіонін-γ-ліази в основних органах-мішенях небажаної дії НПЗЗ - слизовій оболонці шлунку (СОШ) щурів обох статей, їх зміни за умов впливу диклофенаку натрію, а також оцінити характер статевих відмінностей у вазорелаксуючому ефекті H₂S і модуляцію його під впливом досліджуваного НПЗЗ.

Матеріали та методи дослідження. Досліди проведені на 102 самках та самцях статевозрілих щурів популяції Вістар масою 250-300 г. Всі етапи досліджень виконані згідно Міжнародних вимог про гуманне поводження з тваринами, дотримуючись правил «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою». Під час експериментів щурів утримували в стандартних умовах (12 годинним світло-тіньовим режимом та вільним доступом до води та їжі) і на раціоні віварію ВНМУ ім. М.І. Пирогова.

В дослідженнях *in vivo* щурі були розділені на групи: 1 група – інтактні тварини, щурам 2-ї групи вводили, диклофенак натрію («Вольтарен», Novartis), 10 мг/кг внутрішньошлунково 1 раз на добу, 7 днів. Група контрольних тварин (група №3) отримувала еквівалентну кількість розчинника за аналогічних режимів

введення. Евтаназія тварин здійснювалась дислокацією шийних хребців під кетаміновим наркозом (10 мг/кг). В гомогенатах слизової оболонки шлунку оцінювали продукцію простагландинів на основі визначення сумарної активності простагландин-Н-синтази (PGH-синтази), яку визначали спектрофотометричним методом за накопиченням окисленої форми донору електронів адреналіну [6]. Дослідження продукції ферменту, який продукує іншу вазоактивну речовину – оксид азоту в СОШ щурів різної статі проводили за методикою [5], яка дозволяє оцінити сумарну активність NO-синтаз (eNOS та iNOS) за кількістю утвореного нітрит-аніону (NO₂⁻). Вміст H₂S в сироватці крові визначали спектрофотометричним методом, заснованим на утворенні тіоніну в реакції між сульфід-аніоном та пара-фенілендіаміном гідрохлориду у кислому середовищі в присутності іонів заліза (III) [2]. Активність цистатіонін-γ-ліази як основного фермента-продуцента гідроген сульфиду в ШКТ в постядерних гомогенатах слизової оболонки шлунка щурів визначали за за приростом сульфід-аніону, вміст якого визначали за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном [7].

В дослідах *in vitro* тензометрично реєстрували зміни тонуусу ізольованих препаратів мезентеріальної артерії щурів в режимі, що наближався до ізометричного за допомогою емнісних датчиків напруження за загальноприйнятою методикою [1]. Реєстрацію скорочувальної активності проводили за допомогою аналогово-цифрового перетворювача Lab-Trax 4/16 («World Precision Instruments», США), з'єданого з персональним комп'ютером. Стимуляцію скорочень інтактних сегментів препаратів судин проводили гіперкалієвим розчином Кребса протягом 30 хв. Для оцінки гідроген сульфід-стимульованого розслаблення, мезентеріальну артерію перфузували розчинами, що містили фенілефрин (10⁻⁶М) та гідроген сульфід в різних концентраціях (10⁻²-10⁻⁶М), протягом 15 хв кожний, після чого реєстрували зміни ізометричного напруження. З метою встановлення впливу диклофенаку на H₂S-стимульоване розслаблення мезентеріальної артерії, останню попередньо інкубували протягом 60 хв. з диклофенаком (50 мкМ). Розрахунки середньої ефективної концентрації (EC₅₀) проводили шляхом апроксимації S-подібними кривими отриманих експериментальних значень. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної

програми "MS Excel XP". Достовірною вважа- лась різниця за $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Результати проведених досліджень засвідчили, що самки щурів відрізняються більшою активністю простагландинсинтетази в СОШ, ніж самці (табл. 1). Так, якщо активність PGH-синтази в СОШ самців становила $0,37 \pm 0,03$ нмоль/хв. на 1мг білка, то у самок цей показник перевищував на 37,8%. 7-ми денне введення диклофенаку натрію при- водило до суттєвого зменшення активності

PGH-синтази у тварин обох статей, однак більш значне падіння (на 26,3% проти 20,8%) було зареєстровано у самців. Переважання впливу НПЗЗ на активність PGH-синтази у осіб чоловічої статі, на перший погляд, може протирічити отриманим нами раніше даним щодо більш ви- разної фармакологічної активності цього препара- ту у самок [3], однак слід врахувати, що умов- на ЦОГ-1, яка превалює в СОШ, практично не залучена до реалізації протизапального та зне- болюючого ефектів диклофенаку.

Таблиця 1. Вплив диклофенаку на активність PGH-синтази та сумарну активність NO-синтаз в слизовій оболонці шлунку у самців та самок щурів ($M \pm m$, $n=7-10$)

№ з/п	Групи щурів	PGH-синтетаза (нмоль/хв. на 1мг білка)		NO-синтаза (пмоль/хв. на 1мг білка)	
		Самці	Самки	Самці	Самки
1	Інтактні	$0,37 \pm 0,03^*$	$0,51 \pm 0,03$	$1,50 \pm 0,17^*$	$1,97 \pm 0,09$
Диклофенак (10 мг/кг в/шл)					
2	Контроль	$0,38 \pm 0,02^*$	$0,53 \pm 0,03$	$1,54 \pm 0,11^*$	$2,00 \pm 0,14$
3	Диклофенак	$0,28 \pm 0,02^{*#}$	$0,42 \pm 0,04^{\#}$	$1,09 \pm 0,10^{*#}$	$1,59 \pm 0,08^{\#}$

Примітки: 1. * - статистично вірогідні відмінності між самцями та самками; 2. # - статистично вірогідні відмінності відносно контролю у тварин відповідної статі.

Нами було також показано, що активність NO-синтази в СОШ у самок щурів також була вірогідно вищою в порівнянні з самцями. Так, активність цього ферменту у самок становила $1,97 \pm 0,09$ пмоль/хв. на 1мг білка, що було на 31,3% більше, ніж у самців. Введення диклофенаку натрію приводило до вірогідного зменшення активності цього ферменту у тварин обох статей, причому виразність падіння була більшою у самців (на 29,2%) проти 20,5% у самок. Отримані нами дані про активність NO-синтази в СОШ інтактних шу- рів обох статей, за умов введення диклофенаку цілком співставляються із результатами, які ми отримали при дослідженні вмісту метаболітів оксиду азоту (нітратів та нітритів) в цьо-

му головному органі-мішені небажаної дії НПЗЗ за аналогічних умов [3, 4].

При дослідженні впливу статі на продукцію гідроген сульфід у інтактних щурів та за умов введення диклофенаку натрію було встановле- но, що самки щурів істотно відрізняються від самців за вмістом гідроген сульфід у сироватці крові, причому концентрація H_2S у самок на 19,1% перевищувала таку у самців (табл. 2). При введенні диклофенаку вміст H_2S в сироватці крові самців і самок знижувався на 24,0 та 11,8%, відповідно. Встановлені нами статеві відмінності у вмісті гідроген сульфід у сироватці крові на тлі введення цього НПЗЗ не лише зберігались, але і поглиблювались і становили 36,4%.

Таблиця 2. Вплив диклофенаку на вміст гідроген сульфід у сироватці крові та активність цистатіонін-γ-ліази в слизовій оболонці шлунку у самців та самок щурів ($M \pm m$, $n=7$)

№ з/п	Групи щурів	Гідроген сульфід (мкмоль/л)		Цистатіонін-γ-ліаза (нмоль/хв. на 1мг білка)	
		Самці	Самки	Самці	Самки
1	Інтактні	$73,7 \pm 4,36^*$	$87,8 \pm 4,68$	$0,137 \pm 0,014^*$	$0,187 \pm 0,011$
Диклофенак (10 мг/кг в/шл)					
2	Контроль	$73,9 \pm 3,12^*$	$86,9 \pm 4,99$	$0,138 \pm 0,010^*$	$0,189 \pm 0,013$
3	Диклофенак	$56,2 \pm 6,60^{*#}$	$76,6 \pm 4,34$	$0,096 \pm 0,008^{*#}$	$0,147 \pm 0,008^{\#}$

Примітки: 1. * - статистично вірогідні відмінності між самцями та самками; 2. # - статистично вірогідні відмінності відносно контролю у тварин відповідної статі.

Для встановлення можливої причини ген- дерних відмінностей в рівні гідроген сульфід, ми оцінили продукцію цього вазоактивного медіатора в організмі тварин різної статі шля- хом визначення активності основного фермен- ту-продуценту H_2S – ЦГЛ в гомогенаті СОШ самців і самок щурів. Виявилось, що у інта- ктних щурів активність цього ферменту в СОШ самок була на 36,5% вищою порівняно з сам- цями (табл. 2). Ймовірно, причиною існування виявлених нами гендерних відмінностей є причетність статевих гормонів до регуляції експресії H_2S -продукуючих ферментів, або до

модуляції їх активності. Так, у роботі [13] по- казано, що в нирках щурів і людей тестостерон знижував експресію та активність цистатіонін-β-синтази, що дає певні докази гормональної детермінації секс-залежних відмінностей в ак- тивності усіх H_2S -продукуючих ферментів.

Диклофенак викликав статистично достовір- не зниження активності ЦГЛ в шлунку тварин, в більшій мірі у самців ніж у самок (на 30,4% про- ти 22,2%). Депримує вплив диклофенаку натрію на систему продукції гідроген сульфід, на нашу думку, може бути наслідком прямого ензимотоксичного впливу диклофенаку натрію

або його метаболітів. Не виключається також їх вплив на експресію генів, причетних до синтезу H₂S-продукуючих ферментів [11]. З іншого боку, вплив НПЗЗ на систему утворення гідроген сульфиду, можливо, опосередковується через підвищення продукції активних форм кисню, вміст яких зростає в шлунку під впливом диклофенаку натрію, а також зменшення ендогенного синтезу оксиду азоту, що було нами встановлено в попередніх дослідженнях [3].

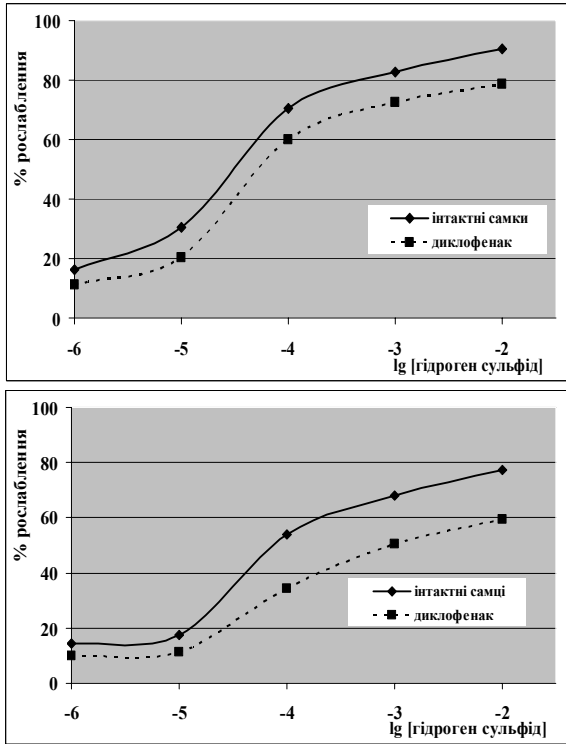


Рис. 1. Дозозалежність H₂S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів мезентеріальної артерії самок і самців щурів під дією диклофенаку натрію

Нами було також показано, що самці та самки щурів відрізняються не тільки зі продукцією та вмістом гідроген сульфиду в крові, але і за ступенем чутливості до цієї вазоактивної молекули. Результати дослідження статевих відмінностей H₂S-індукованої релаксації мезентеріальної артерії у інтактних щурів, а також за умов дії диклофенаку натрію показали, що судин сам-

ців і самок, піддані передскороченню фенілефріном, демонстрували різний ступінь зменшення ізометричного напруження в присутності донору гідроген сульфиду Na₂S*9H₂O в діапазоні концентрацій від 10⁻⁶ до 10⁻²М (рис. 1). При цьому фрагменти судин самок більш виразно реагували на вазорелаксант, ніж самців. Так, в концентрації 10⁻⁶М H₂S викликав незначне розслаблення фрагментів мезентеріальної судини (в середньому на 9,8 та 11,3% у самців і самок відповідно). При збільшенні концентрації гідроген сульфиду з 10⁻⁵М до 10⁻³М відмічалось дозозалежне посилення вазорелаксації досліджуваних фрагментів судин у тварин обох статей, яке сягало максимальних величин в концентрації H₂S 10⁻²М (в середньому 59,4 та 78,8% для мезентеріальної артерії самців і самок, відповідно). При порівнянні ефективних концентрацій (EC₅₀) гідроген сульфиду для мезентеріальної артерії у тварин різної статі показало, що цей параметр у самців щурів перевершувала такий у самок в 1,51 рази, що свідчить про меншу чутливість досліджуваних судин самців до релаксуючої дії H₂S (табл. 3).

По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H₂S (М) у суперфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів досліджуваних судин під впливом зростаючих концентрацій H₂S. За 100% прийнятий рівень H₂S-стимульованого розслаблення досліджуваних кільцевих фрагментів судин, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення. Наведені усереднені дані 5 дослідів і значення похибок середнього.

Преінкубація кільцеподібних фрагментів мезентеріальної артерії з диклофенаком суттєво зменшувала H₂S-індуковану релаксацію стінок цих судин у тварин обох статей, про що свідчить зміщення кривої «доза-ефект» праворуч. Слід відмітити, що в більшій мірі цей ефект був виражений у самців. EC₅₀ H₂S при додаванні диклофенаку в інкубаційну суміш приводила до підвищення показників EC₅₀ H₂S, в середньому на 26,6%, тоді як у самок це зростання було вірогідно меншим і становило в середньому лише 15,3%.

Таблиця 3. Зміни H₂S-індукованого розслаблення мезентеріальної артерій у самців і самок інтактних щурів та за умов дії диклофенаку (M±m)

Умови дослідіу	EC ₅₀ , мМ	
	Самці (n=5)	Самки (n=5)
Інтактні	58,27±4,12	38,65±3,18*
Диклофенак (50 мкМ)	73,75±4,49#	44,56±3,56*

Примітки: 1. Знаком * позначені вірогідні відмінності між самцями і самками; 2. Знаком # позначені вірогідні відмінності відносно інтактних тварин

Отже, нами було досліджено деякі молекулярні механізми, які детермінують статеві відмінності в гастротоксичності нестероїдних протизапальних засобів. Їх реалізація, як показали наші результати, забезпечується різною продукцією вазоактивних молекул: простагландинів, оксиду азоту та гідроген сульфиду, що синтезу-

ються в слизовій оболонці шлунку у секспецифічний спосіб. На користь цього свідчить вірогідно більша сумарна активність простагландин-Н-синтази, NO-синтази та цистатіонін-γ-ліази в СОШ самок щурів в порівнянні з самцями, що зумовлює більшу «опірність» цього органу-мішені небажаної дії НПЗЗ до впливу по-

шкоджуючих чинників у тварин жіночої статі. Наші дослідження показали, що диклофенак натрію знижував активність простагландин-Н-синтази, NO-синтази та цистатіонін-γ-ліази в СОШ як у самок, так і самців, хоча його дія була більш виразною у особин чоловічої статі. Дослідження *in vitro* показали, що ізольовані фрагменти мезентеріальної артерії самок більш виразно реагували на H₂S-індуковану релаксацію, ніж самців. Передінкубація досліджуваних судин з диклофенаком зменшувала H₂S-індуковану релаксацію у тварин обох статей, в більшій мірі у самців.

Висновок: Таким чином, гендерні відмінності базальної продукції простагландинів,

оксиду азоту та гідроген сульфід, чутливості фрагментів судин до гідроген сульфід, а також секс-специфічний характер їх змін за умов введення диклофенаку є важливим елементом диференційованої чутливості чоловічого та жіночого організму до гастротоксичної дії НПЗЗ.

Перспективи подальших досліджень. Подальше вивчення ролі статевих чинників в реалізації побічних ефектів НПЗЗ дозволить визначити відповідні коректори можливих небажаних ефектів за умов використання цих препаратів, що буде сприяти розвитку персоналізованої фармакотерапії препаратами цієї групи у осіб обох статей.

ЛІТЕРАТУРА:

1. А. с. 1028315 СССР, МКИ А 61 В 5/10. Устройство для исследования реакций мышц / И.А. Назарук, С.А. Бернштейн, А.И.Соловьев [и др.] (СССР). – № 1028315 А 61 В 5/10; заявл. 23.11.81; опубл. 15.07.83, Бюл. № 26.
 2. Визначення вмісту гідроген сульфід у сироватці крові / Н. В. Заїчко, Н. О. Пентюк, Л. О. Пентюк [та ін.] // Вісник наукових досліджень. – 2009. – №1. – С.29-32.
 3. Волощук Н.І. Залежність фармакологічного ефекту та гастротоксичності нестероїдних протизапальних препаратів від рівня статевих гормонів у щурів / Н. І. Волощук // Фармакологія та лікарська токсикологія – 2009. – №6 (13). – С. 32-39.
 4. Волощук Н.І. Статеві гормони як модулятори стану захисних систем слизової оболонки шлунку щурів / Н. І. Волощук // Медична хімія. – 2009. – Т.11. – №3. – С. 43-47.
 5. Гула Н.М. Вплив N-стеароїлетаноламіну на NO-синтазний шлях генерації оксиду азоту в аорті та серці щурів із стрептозотозиніндукованим діабетом / Н. М. Гула, Г. В. Косякова, А. Г. Бердишев // Укр. біохім. журн. – 2007. – Т.79, № 5. – С. 153-158.
 6. Мевх А.Т. Изучение эндопероксидпростагландин-синтезы микросомной фракции тромбоцитов человека / А. Т. Мевх, В. В. Басевич, С. Д. Варфоломеев // Биохимия. - 1982. - т.47, №10. - С.1635-1639.
 7. Мельник А.В. Активність ензимів синтезу гідроген-сульфід у нирках щурів / А. В. Мельник, О. О. Пентюк // Укр. біохімічний журнал – 2009. – Т.81, №4. – С.12-22.
 8. Насонов Е.Л. НПВП при ревматических заболеваниях / Е. Л. Насонов // Ревматология. - 2002. - №1. – С.38-44.
 9. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation / T. Brzozowski, P.C. Konturek, S.J. Konturek [et al.] // Journal of physiology and pharmacology. - 2005. - Vol.56, Supp 5. – P.33-55.
 10. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation / R.C. Zanardo, V.Brancalone, E. Distrutti, [et al.] // The FASEB Journal. – 2006. - Vol. 20. – E1411 – E1420.
 11. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by non steroidal anti-inflammatory drugs. / S. Fiorucci, E. Antonelli, E. Distrutti et al. // Gastroenterology. – 2005. – Vol.129. – P. 1210–1224.
 12. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // Pharmacological reports. – 2007. – Vol.59. – P.4-24.
 13. Testosterone regulation of renal cystathionine beta-synthase: implications for sex-dependent differences in plasma homocysteine levels / V. Vitvitsky, A. Prudova, S. Stabler et al. // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2007. – Vol. 293. – N2. – P.594-600.
 14. Whittle B.J. Cyclooxygenase and nitric oxide systems in the gut as therapeutic targets for safer antiinflammatory drugs / B. J. Whittle // Curr. Opin. Pharmacol. – 2004. – Vol. 4. – P. 538-545.
- Волощук Н.І.** Статеві детермінація синтезу вазоактивних молекул як предиктор гендерних відмінностей гастротоксичності диклофенаку у щурів // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 12-15.
- В роботі встановлено вірогідно більша активність простагландин-Н-синтази, NO-синтази та цистатіонін-γ-ліази в СОШ самок щурів в порівнянні з самцями, що зумовлює більшу «опірність» тварин жіночої статі до гастротоксичної дії НПЗЗ. Дослідження *in vitro* показали, що ізольовані фрагменти мезентеріальної артерії самок більш виразно реагували на H₂S-індуковану релаксацію, ніж самців. Диклофенак натрію знижував активність вазодилатуючих молекул в СОШ та зменшував H₂S-індуковану релаксацію у тварин обох статей, в більшій мірі у самців.
- Ключові слова:** гендерні відмінності, диклофенак, гастротоксичність, простагландин-Н-синтаза, NO-синтаза, гідроген сульфід.
- Волощук Н.І.** Половая детерминация синтеза вазоактивных молекул как предиктор гендерных различий гастротоксичности диклофенака у крыс // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 12-15.
- В работе установлена более высокая активность простагландин-Н-синтазы, NO-синтазы и цистатионин-γ-лиазы в СОЖ самок крыс по сравнению с самцами, что обуславливает более высокую «стойкость» особей женского пола к гастротоксичности НПВС. Исследования *in vitro* показали, что изолированные фрагменты мезентеральной артерии самок более выразительно реагировали на H₂S-индуцированную релаксацию, чем самцов. Диклофенак натрия снижал активность вазодилатирующих молекул в СОЖ и уменьшал H₂S-индуцированную релаксацию у животных обоего пола, в большей мере у самцов.
- Ключевые слова:** гендерные различия, диклофенак, гастротоксичность, простагландин-Н-синтаза, NO-синтаза, гидроген сульфид.
- Voloshchuk N.I.** Sexual determination of the synthesis of vasoactive molecules as a predictor of gender differences of gastrototoxicity of diclophenac in rats // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 12-15.
- In vivo* experiments showed the predominance of activity of vasodilating enzymes (prostaglandin-H-syntase, NO-syntase, cystathionine γ-lyase) in stomach mucous of females rats. In experiments *in vitro* it was established, that the isolated fragments of mesenteric artery of female rats has more reaction to the H₂S-induced relaxation, than males. Introduction of diclophenac reduced activity of investigated enzymes and reduced vasorelaxing properties of H₂S at animals of both sexes, but more in males.
- Key words:** gender differences, rats, diclophenac, prostaglandin-H-syntase, NO-syntase, hydrogen sulfide.

Надійшло 11.12.2012 р.
Рецензент: проф. Н.К.Казімірко