

БИОЛОГИЯ СТАРЕНИЯ

"Пробл. старения и долголетия", 2013, 22, № 4. — С. 340–346

УДК [612.66+616-092.19]:577.15

Л. Л. Сухова, В. В. Давыдов, Ю. В. Волкова

*Государственное учреждение "Институт охраны здоровья детей
и подростков НАМН Украины", 61153 Харьков*

УРОВЕНЬ ТЕСТОСТЕРОНА И АЛЬДОКЕТОРЕДУКТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ КРОВИ У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Принимая во внимание особую роль альдокеторедуктаз в защите клеток от оксидативного стресса и модуляции устойчивости организма к действию его повреждающих факторов в пубертатном возрасте, в работе было предпринято изучение влияния тестостерона на альдокеторедуктазную активность крови у крыс, находящихся на разных этапах онтогенеза. Установлено, что повышение уровня тестостерона в крови крыс от 1,5- до 26-месячного возраста сопровождается увеличением ее альдокеторедуктазной активности и модуляцией структуры изоферментного спектра альдокеторедуктаз. При внутримышечном введении тестостерона животным пубертатного и раннего половозрелого возраста происходит увеличение альдокеторедуктазной активности крови, что не характерно для молодых неполовозрелых и старых животных. На основании полученных результатов высказывается предположение о том, что тестостерон принимает участие в регуляции синтеза отдельных изоферментов альдокеторедуктаз.

Ключевые слова: тестостерон, альдокеторедуктазы, кровь, онтогенез.

Ранее нами было показано, что в пубертатном возрасте повышается чувствительность организма к оксидативному стрессу [1, 2]. Следствием того становится рост заболеваемости подростков болезнями сердечно-сосудистой и центральной нервной системы, желудочно-кишечного тракта и др. [4, 5]. Особое значение в возникновении подобного феномена может иметь возрастная модуляция активности ферментов ката-

болизма карбонильных продуктов свободнорадикального окисления [7, 8, 10], выступающих в роли своеобразных мессенджеров повреждения клеток [12]. К их числу относятся альдокеторедуктазы (альдегид- и альдозоредуктазы), катализирующие реакции восстановления эндогенных альдегидов в мало токсические алкоголи [3, 11]. Принимая во внимание факт повышения продукции половых гормонов в организме на этапе полового созревания, можно предположить участие тестостерона в регуляции синтеза альдокеторедуктаз и модуляцию данного эффекта в организме на разных этапах онтогенеза. Вместе с тем, до настоящего времени все еще отсутствуют четкие представления о влиянии данного гормона на альдокеторедуктазную активность крови в процессе онтогенеза. Учитывая это, целью данной работы явилось изучение влияния тестостерона на альдокеторедуктазную активность крови у крыс, находящихся на разных этапах онтогенеза.

Материал и методы. Работа выполнена на 40 крысах-самцах линии Вистар четырех возрастных групп: 1 — 3-недельные (неполовозрелые), 2 — 1,5-месячные (пубертат), 3 — 3-месячные (ранний половозрелый возраст) и 4 — 24–26-месячные (старые). Животных этих групп подразделяли на 2 подгруппы: 1 — крысы, которым в течение трех дней внутримышечно вводили раствор тестостерона на стерильном растительном масле из расчета 0,07 мг/100 г массы тела; 2 — крысы, которым внутримышечно вводили эквивалентный объем стерильного растительного масла (контрольная группа).

Эвтаназию проводили путем декапитации под легким эфирным наркозом. В сыворотке крови измеряли альдокеторедуктазную активность по *W. F. Bosron* и *R. L. Prairie* [6]. Концентрацию тестостерона определяли с помощью иммуноферментного метода с использованием наборов фирмы Гранум (Украина).

Фракционирование альдокеторедуктаз сыворотки крови определяли методом аналитического электрофореза на пластинках с агарозой. Для этой цели использовали набор реактивов и пластинки для разделения белков *Cormay Gel Protein 100* (*Cormay*, Польша). На пластинку наносили по 5 мкл сыворотки крови. Фракционирование альдокеторедуктаз проводили в течение 30 мин при напряжении 100 В. Разделение сывороточных альдокеторедуктаз проводили на приборе для электрофореза *Solar* (Белоруссия).

Окрашивание пластинок после электрофореза проводили в специальном окрашивающем растворе в течение 30 мин при 37 °С. Для его приготовления 30 мг *NAD*, 17,5 мг нитросинего тетразолия и 1 мг феназинметасульфата растворяли в 45 мл 0,1 М глицин-NaOH буфера (рН 10,0). Приготовленный раствор фильтровали, после чего в него дополнительно вносили 0,486 мл бензильного спирта, растворенного в 0,75 мл метанола [9]. После окрашивания пластинки тщательно отмывали от раствора, подсушивали на воздухе и подвергали сканированию на денситометре *DM 2120* (*Solar*).

Достоверность различий между группами определяли по методу Вилкоксона — Манна — Уитни.

Результаты и их обсуждение. Проведенные исследования показали, что от 1,5- до 26-месячного возраста у животных контрольной группы происходит постепенное повышение уровня тестостерона в крови, достигая максимума в 26-месячном возрасте. Аналогичная динамика выявляется и в отношении общей альдокеторедуктазной активности крови (таблица).

Влияние внутримышечного введения тестостерона на альдокеторедуктазную активность сыворотки крови у крыс разного возраста, нмоль/(мин·мг белка), $M \pm t$

Группа	Контроль	Введение тестостерона
3 недели	378 ± 41	346 ± 12
1,5 месяца	358 ± 40	579 ± 33*
3 месяца	506 ± 28 [#]	646 ± 52*
26 месяцев	653 ± 37 [#]	544 ± 37

Примечания: в каждой группе по 5 животных; * — $P < 0,05$ по сравнению с контролем, [#] — $P < 0,05$ по сравнению с 1,5-месячными крысами.

Внутримышечное введение тестостерона животным разного возраста сопровождается повышением его концентрации в крови. Однако у неполовозрелых крыс при этом не выявляется статистически достоверного повышения уровня данного гормона в крови. С увеличением возраста у животных от 1,5- до 26 мес уменьшается выраженность повышения концентрации данного гормона в крови (рис. 1). При этом у крыс 1,5- и 3-месячного возраста увеличивается альдокеторедуктазная активность крови — на 62 % и 28 %, соответственно, по сравнению с животными контрольной группы. У неполовозрелых и старых крыс введение тестостерона не сопровождается ростом альдокеторедуктазной активности крови.

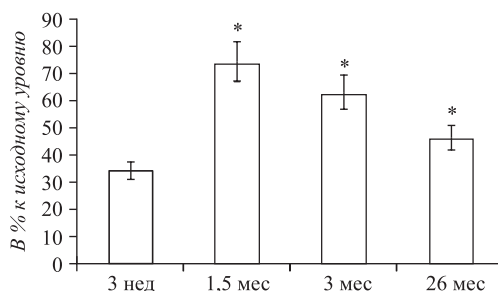


Рис. 1. Изменения уровня тестостерона в крови крыс после его внутримышечного введения; * — $P < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем.

Исследование спектра альдокеторедуктаз позволило выявить в крови крыс 4 их постоянные фракции. Фракция 4 занимает наибольшую долю в спектре. Фракции 5 и 6 имеют наибольшую электрофоретическую подвижность, но они не постоянны.

В процессе онтогенеза происходит изменение спектра альдокеторедуктаз крови (рис. 2). У неполовозрелых и старых крыс имеется определенная аналогия в структуре альдегидредуктазного спектра крови — при электрофорезе выявляются только 4 постоянные электрофоретические фракции изоферментов.

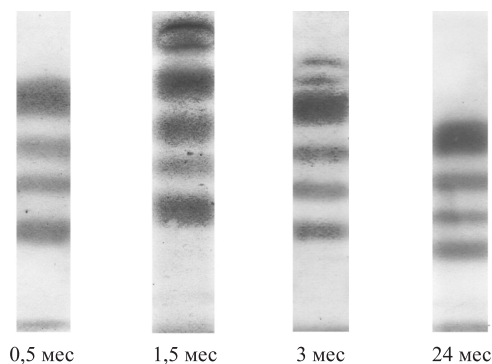


Рис. 2. Электрофореграммы фракций альдокеторедуктаз крови крыс разного возраста.

В пубертатном возрасте и у животных раннего половозрелого возраста увеличивается доля 3 фракции в спектре альдокеторедуктаз. В нем также появляются две дополнительные фракции с максимальной подвижностью в электрическом поле.

Результаты проведенных исследований указывают на то, что с увеличением возраста крыс от 1,5 до 26 мес происходит постепенное повышение альдокеторедуктазной активности крови. В этой связи на этапе полового созревания, для которого характерен минимальный уровень ферментативной активности, возникают условия для ограничения эффективности утилизации цитотоксических карбонильных продуктов обмена. Следствием этого в пубертатном возрасте может быть повышение чувствительности организма к повреждающим эффектам оксидативного стресса.

Анализ полученных данных позволяет выявить определенный параллелизм между возрастной динамикой величины альдокеторедуктазной активности крови и концентрацией в ней тестостерона. Подобный факт позволяет предположить участие этого гормона в регуляции синтеза альдокеторедуктаз, а значит, и его особую роль в изменении резистентности организма к оксидативному стрессу на этапе полового созревания. Для проверки высказанного предположения были проведены эксперименты с введением животным экзогенного тестостерона.

Исследования показали, что введение одинаковой дозы гормона в расчете на массу тела сопровождается в неодинаковой мере выраженным подъемом его концентрации в крови крыс разных возрастных групп. В большей мере он проявляется у животных 1,5- и 3-месячного возраста и практически отсутствует у неполовозрелых крыс. Можно

предположить, что причиной возникновения подобных возрастных различий является неодинаковая эффективность утилизации и элиминации тестостерона из организма на разных этапах развития.

Увеличение концентрации тестостерона в крови при его парентальном введении сопровождается повышением альдокеторедуктазной активности у 1,5- и 3-месячных крыс. В то же время, у старых и молодых неполовозрелых животных подобного сдвига не возникает. Полученные результаты не позволяют прийти к однозначному заключению об участии тестостерона в регуляции синтеза альдокеторедуктаз крови, т. к. эффект гормона имеет явно выраженный возрастзависимый характер. Для выяснения причин данного феномена далее было проведено изучение спектра альдокеторедуктаз крови у животных разных возрастных групп.

Проведенные исследования позволили выявить характерные возрастные изменения спектра изоферментов альдокеторедуктаз крыс в процессе онтогенеза. Было установлено, что у молодых неполовозрелых и старых животных имеет место определенное сходство спектра альдокеторедуктаз. Аналогичная ситуация выявлялась и у крыс, находящихся на этапе полового созревания и животных раннего половозрелого возраста. Различия между ними заключались в появлении у 1,5- и 3-месячных крыс двух дополнительных фракций альдокеторедуктаз с максимальной электрофоретической подвижностью, а также в повышении у них доли 3 фракции в изоферментном спектре, что не характерно для неполовозрелых и старых животных.

Принимая во внимание существование возрастных различий в изоферментном спектре альдокеторедуктаз, а также полученные нами данные о взаимосвязи изменений уровня тестостерона с общей альдокеторедуктазной активностью крови, можно предположить, что данный гормон выступает в роли индуктора синтеза только определенных фракций изоферментов альдокеторедуктаз (постоянной 3, или же непостоянных 5 и 6 фракций). Это, в свою очередь, вносит ясность в понимание причин возрастного изменения спектра альдокеторедуктаз крови в процессе онтогенеза. Регулируя скорость биосинтеза определенных представителей альдокеторедуктаз, тестостерон предопределяет структуру изоферментного спектра, что формирует предпосылки для возрастного изменения чувствительности организма к повреждающим эффектам оксидативного стресса. Вместе с тем, высказанные предположения требуют специальной экспериментальной проверки, чему и будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Список использованной литературы

1. Волкова Ю. В., Давыдов В. В. Влияние иммобилизационного стресса на свободнорадикальное окисление белков и липидов в субклеточных фракциях печени крыс разного возраста // Эксперим. і клін. мед. — 2009. — № 2. — С. 16–22.
2. Волкова Ю. В., Давыдов В. В. Влияние иммобилизационного стресса на содержание продуктов свободнорадикального окисления липидов и белков

- в субклеточных фракциях мозга крыс разного возраста // Укр. біохім. журн. — 2009. — **81**, № 2. — С. 45–49.
3. *Давидов В. В., Божков А. И., Кульчицкий О. К.* Физиологическая и патофизиологическая роль эндогенных альдегидов. — Saarbrücken: Palmarium Acad. Pub., 2012. — 240 с.
 4. *Корнев Н. М.* Артериальная гипертензия у подростков // 36 доп. симп. "Прогнозування та профілактика артеріальної гіпертензії в дитячому та підлітковому віці". — Харків, 2001. — С. 3–7.
 5. *Корнев М. М., Носова О. М.* Клініко-гемодинамічні показники формування церебральних порушень у підлітків з первинною артеріальною гіпертензією // Педіатрія, акушерство та гінекологія. — 2002. — **2**. — С. 15–18.
 6. *Bosron W. F., Praire R. L.* Triphosphate nucleotide-linked aldehyde reductases // J. Biol. Chem. — 1972. — **247**, № 14. — P. 4480–4485.
 7. *Davydov V. V., Dobaeva N. M., Bozhkov A. I.* Possible role of aldehyde's scavenger enzymes during aging // Exp. Gerontol. — 2004. — **39**. — P. 11–16.
 8. *Koch Y. H., Park Y. S., Takahashi M.* Aldehyde reductase gene expression by lipid peroxidation end products, MDA and HNE // Free Radic. Res. — 2000. — **336**. — P. 739–746.
 9. *Nihmat A., Flynn T. G.* Aldose reductase from human psoas muscle // J. Biol. Chem. — 1989. — **264**, № 5. — P. 2906–2911.
 10. *Spycher S.* 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal induces transcription and expression of aldose reductase // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1996. — **226**, № 2. — P. 512–516.
 11. *Srivastava S., Chandra A., Ansari N. H.* et al. Identification of cardiac oxidoreductase (s) involved in the metabolism of the lipid peroxidation-derived aldehyde 4-hydroxynonenal // Biochem. J. — 1998. — **329**. — P. 469–475.
 12. *Uchida K.* Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease // Free Radical. Biol. Med. — 2000. — **28**, № 12. — P. 1685–1696.

Поступила 7.10.2013

РІВЕНЬ ТЕСТОСТЕРОНУ І АЛЬДОКЕТОРЕДУКТАЗНА АКТИВНІСТЬ КРОВІ У ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

Л. Л. Сухова, В. В. Давидов, Ю. В. Волкова

Державна установа "Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України", 61153 Харків

Беручи до уваги особливу роль альдокеторедуктаз у захисті клітин від оксидативного стресу і модуляції стійкості організму до дії ушкоджуючих чинників у пубертатному віці, в роботі було вивчено вплив тестостерону на альдокеторедуктазну активність крові у щурів, що знаходяться на різних етапах онтогенезу. Встановлено, що підвищення рівня тестостерону в крові щурів від 1,5- до 26-місячного віку супроводжується збільшенням її альдокеторедуктазної активності і модуляцією структури ізоферментного спектру альдокеторедуктаз. При внутрішньом'язевому введенні тестостерону тваринам пубертатного і раннього статевозрілого віку відбувається збільшення альдокеторедуктазної активності крові, що не характерно для молодих статево незрілих і ста-

рих тварин. На підставі отриманих результатів можна зробити припущення про те, що тестостерон бере участь в регуляції синтезу окремих ізоферментів альдокеторедуктаз.

TESTOSTERONE LEVEL AND ALDO-KETO REDUCTASE ACTIVITY OF THE BLOOD IN THE RATS OF VARIOUS AGE

L. L. Sukhova, V. V. Davydov, Yu. V. Volkova

State Institution "Institute of Children and Adolescent Health Care NAMS Ukraine", 61153 Kharkov

In view of special role of aldo-keto reductases in cell protection against oxidative stress and in modulation of organism's resistance to the effects of its damaging factors during adolescence a study was made of the effects of testosterone on blood aldo-keto reductase activity in rats at different stages of ontogenesis. An increase of blood testosterone in rats aged 1.5–26 mo. was found to be accompanied by an increase of aldo-keto reductase activity and modulation in the structure of isozyme spectrum of aldo-keto reductases. Intramuscular administration of testosterone to rats of pubertal and early pubertal age increased blood aldo-keto reductase activity, which is not typical for immature and aged animals. The data obtained suggest that testosterone is involved in the regulation of synthesis of separate aldo-keto reductase isozymes.

Сведения об авторах

Лаборатория возрастной эндокринологии и обмена веществ

В. В. Давыдов — зав. лаб., д.м.н., профессор (vaddavydov@mail.ru)

Ю. В. Волкова — н.с., к.б.н.

Л. Л. Сухова — м.н.с., к.и.н.