

(между *Lactobacillus* spp. и *E. faecalis*), что свидетельствует об их антагонистическом влиянии друг на друга. Полученные данные открывают новые перспективы в лечении нарушений микробиоценоза ротовой полости у больных паразитозами.

**Ключевые слова:** микрофлора ротовой полости, ассоциации микроорганизмов, корреляции

(between *Lactobacillus* spp. and *E. faecalis*) which indicated their antagonistic influence on each other. The results of this study open new prospects in the correction of disturbances of normal flora in patients with parasitic diseases of gastrointestinal tract.

**Key words:** microflora of oral cavity, microbial associations, correlation

Поступила 26.06.12

УДК [612.66+616-092.19]:577.15

*Л.Л. Сухова, В.В. Давыдов, Е.Р. Грабовецкая\*, А.О. Сыровая\**  
ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков НАМН Украины», г. Харьков  
\*Харьковский национальный медицинский университет

## ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА АЛЬДОКЕТОРЕДУКТАЗ КРОВИ КРЫС В ПРОЦЕССЕ ОНТОГЕНЕЗА

С помощью метода электрофореза исследован спектр альдокеторедуктаз сыворотки крови крыс на разных стадиях онтогенеза. В раннем неполовозрелом возрасте и при старении выявляется большое сходство в структуре спектра альдокеторедуктаз крови. В процессе онтогенеза происходит изменение соотношения между различными фракциями альдокеторедуктаз.

**Ключевые слова:** спектр альдокеторедуктаз, сыворотка крови, онтогенез.

В процессе онтогенеза происходит изменение чувствительности организма к действию неблагоприятных факторов внешней среды. На этапе полового созревания и при старении резистентность к стрессорам понижается [1–3] и, как следствие, увеличивается частота возникновения заболеваний стрессорной этиологии, которые приобретают характер возрастной патологии.

Важную роль в формировании стрессорных повреждений внутренних органов играет стимуляция свободнорадикальных процессов, которая предопределяет появление в них оксидативного стресса [4, 5]. Реализация альтерирующего эффекта этого состояния опосредуется через накопление в клетках карбонильных продуктов метаболизма, наиболее широкое распространение среди которых имеют альдегиды [6, 7]. Обладая высокой реакционной способностью, они проявляют выраженные цитотоксические и генотоксические свойства [6–9].

В процессе эволюции в клетках сформировалась специальная ферментативная система защиты от эндогенных альдегидов, которая обеспечивает их утилизацию в реакциях восстановления, окисления и конъюгации с глутатионом [9–11]. Особое значение среди них имеет восстановительный путь катаболизма. В процессе восстановления альдегиды

превращаются в малотоксические алкоholes. Данные катаболические реакции катализируют многочисленные ферменты, к которым относятся альдокеторедуктазы [12, 13]. Учитывая это, можно предположить, что изменение чувствительности организма к негативному действию стрессоров на определенных этапах онтогенеза, помимо прочего, может быть связано с ограничением катаболизма эндогенных альдегидов в восстановительном пути в результате возрастного изменения спектра альдокеторедуктаз.

Ранее нами было показано, что в пубертатном возрасте и при старении у крыс имеет место модуляция альдегидредуктазной и альдозоредуктазной активности в тканях внутренних органов [14, 15]. Анализируя причины возникновения этих сдвигов, мы предположили, что они связаны с возрастным изменением изоферментного спектра альдокеторедуктаз вследствие сдвигов в регуляции экспрессии генов различных представителей данного семейства энзимов на разных этапах онтогенеза. Целью настоящего исследования явилось изучение спектра альдокеторедуктаз крови крыс на разных стадиях онтогенеза.

**Материал и методы.** Исследования выполнены на 36 крысах-самцах линии Вистар шести возрастных групп по 6 в каждой: 1-я – 0,5-месячные (неполовозрелые); 2-я –

1,5-месячные (ранний пубертат); 3-я – 2-месячные (поздний пубертат); 4-я – 3-месячные (ранний половозрелый возраст); 5-я – 12-месячные (взрослые половозрелые) и 6-я – 24-месячные (старые). Животных содержали на стандартном рационе питания вивария. При проведении исследования руководствовались правилами «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1986).

Спектр альдокеторедуктаз сыворотки крови исследовали методом электрофореза на пластинках с агарозой. Использовали набор реактивов и пластинки для разделения белков крови Cormay Gel Protein 100 (Германия).

На пластинку наносили по 5 мкл сыворотки крови. Фракционирование альдокеторедуктаз проводили в течение 30 мин при напряжении 100 В, используя в качестве электродного буфера трис-барбиталовый буфер из набора пластинок. После электрофореза пластинки окрашивали в специальном растворе в течение 30 мин при +37 °С. Для приготовления раствора 30 мг NAD, 17,5 мг нитросинего тетразолия и 1 мг феназин-метасульфата 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 бензилового спирта в 0,75 мл метанола [16]. После окрашивания пластинки тщательно отмывали от окрашивающего раствора, подсушивали на воздухе и подвергали денситометрии. В работе использовали прибор для электрофореза «Solar» и денситометр DM 2120 (Беларусь).

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием непараметрического метода Вилкоксона–Манна–Уитни.

**Результаты и их обсуждение.** Исследования показали, что в крови крыс разного возраста выявляются четыре постоянные фракции альдокеторедуктаз (рис. 1). Фракция 4 занимает наибольшую долю в спектре. В то же время доля фракции 3 меньше, чем фракции 1. Фракции 5 и 6 имеют наибольшую электрофоретическую подвижность и отсутствуют в детском (неполовозрелом) возрасте и при старении.

В процессе онтогенеза происходит изменение спектра альдокеторедуктаз крови (рис. 2). При этом имеет место изменение как числа фракций в спектре, так и соотношения доли фракций в спектре. У крыс 0,5- и 24-месячного возраста имеется определенная аналогия структуры альдегидредуктазного спектра крови (таблица). У животных этих возрастных групп при электрофорезе выявляются только четыре электрофоретические фракции энзимов.

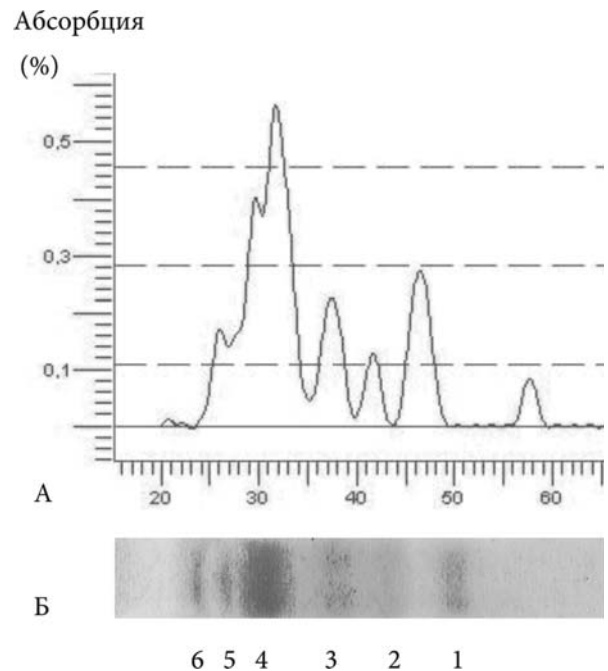


Рис. 1. Денситограмма (А) и фотография пластинки (Б) с разделёнными фракциями альдокеторедуктаз крови 3-месячных крыс. Цифрами обозначены номера фракций на электрофорерограмме (Б)

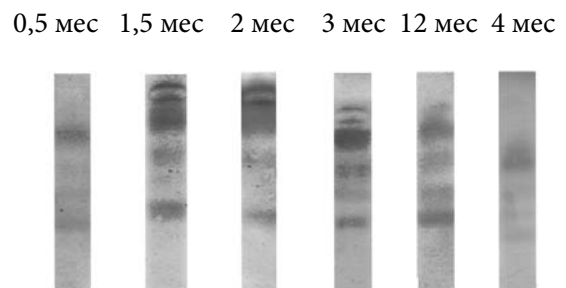


Рис. 2. Фотография пластинок с разделёнными фракциями альдокеторедуктаз крови крыс разного возраста

В пубертатном возрасте у 1,5- и 2-месячных крыс возрастает доля фракции 3 в спектре альдокеторедуктаз. Аналогичная ситуация сохраняется и у 3-месячных животных. У крыс пубертатного возраста появляется ещё и дополнительная фракция 5, она обладает наибольшей электрофоретической подвижностью, однако она непостоянна и выявляется не у всех исследованных животных данной возрастной группы.

У 3-месячных крыс в крови обнаруживается шесть фракций альдокеторедуктаз, из которых две с наибольшей электрофоретической по-

Спектр альдокеторедуктаз сыворотки крови крыс разного возраста  
(в % от суммы)

Возраст, мес	Электрофоретическая фракция						
	старт	1	2	3	4	5	6
0,5	9,2	28,7	15,0	5,0	42,0	-	-
1,5	2,6	18,6	7,5	11,9	37,1	22,0	-
2,0	5,3	18,7	7,9	14,4	26,4	27,0	-
3,0	3,2	16,0	5,3	13,3	39,8	15,2	7,1
12,0	5,5	19,2	11,9	14,4	29,1	19,9	-
24,0	8,4	13,9	17,3	21,8	38,4	-	-

Примечание. Указаны средние значения из 3 – 5 исследований.

движностью отсутствуют у крыс 0,5- и 24-месячного возраста. У 12-месячных животных доля фракций 3 и 4 в спектре альдокеторедуктаз близка, а фракция 5 становится непостоянной.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессе онтогенеза происходит изменение спектра альдокеторедуктаз крови и что на определённых этапах индивидуального развития в организме появляются особенности в регуляции экспрессии генов ферментов, катализирующих восстановительный путь утилизации эндогенных альдегидов. Характерно, что в раннем неполовозрелом возрасте (0,5 месяца) и при старении (24 месяца) имеет место большое сходство в структуре спектра альдокеторедуктаз крови. Определённую роль в этом, по всей вероятности, играют возрастные особенности функционирования эндокринной системы, так как гормоны выступают в качестве природных регуляторов экспрессии генов. Следует заметить, что в раннем периоде постнатального развития и при старении существует определенное сходство в состоянии системы эндокринной регуляции: для детского (неполовозрелого) возраста характерна её функциональная незрелость, а для позднего онтогенеза – проявления её инволюции.

Изменение спектра альдокеторедуктаз создаёт предпосылки для модуляции роли восстановительного пути в утилизации эндогенных альдегидов в организме. Учитывая роль последнего в обезвреживании цитотоксических карбонильных продуктов свободнорадикального окисления, можно предположить, что в детском возрасте и при старении возникают условия для ограничения эффективности утилизации карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в клетках, особенно в условиях, связанных с усилением их образования. Это, в свою очередь, способствует повышению восприимчивости организма к действию неблагоприятных внешних факторов, реализующих своё негативное воздействие через

формирование оксидативного стресса.

Вместе с тем, характер взаимосвязи между состоянием эндокринной регуляции и спектром альдокеторедуктаз организма остаётся неясным. Его выяснение открывает определённые перспективы разработки новых подходов к профилактике возрастной патологии, связанных с направленным воздействием на восстановительный путь катаболизма эндогенных альдегидов.

#### Выводы

1. В крови крыс разного возраста выявляется четыре постоянные электрофоретические фракции альдокеторедуктаз.
2. В процессе онтогенеза на его определённых этапах появляются две дополнительные фракции альдокеторедуктаз с более высокой электрофоретической подвижностью, а также изменяется соотношение между различными фракциями.
3. В 0,5-месячном и 24-месячном возрасте у крыс выявляется большое сходство в структуре спектра альдокеторедуктаз крови.
4. Возрастное изменение спектра альдокеторедуктаз способствует изменению вклада восстановительного пути в катаболизм карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в организме крыс.

#### Список литературы

1. Волкова Ю.В. Влияние иммобилизационного стресса на содержание продуктов свободнорадикального окисления липидов и белков в субклеточных фракциях мозга крыс разного возраста / Ю.В. Волкова, В.В. Давыдов // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81, № 2. – С. 45–49.
2. Activity of the first line antioxidant defense enzymes in the liver of pubertal rats during stress / Yu.V. Volkova, L.L. Sukhova, V.V. Davydov, A.V. Goloborodko // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry – 2011. – Vol. 5, №. 4. – P. 389–391.
3. Davydov V.V. Lipid peroxidation in the heart

- of adult and old rats during immobilization stress / V.V. Davydov, V.N. Shvets // *Exp. Gerontol.* – 2001. – Vol. 36, № 5. – P. 1155–1160.
4. Зенков Н.К. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньшикова. – М.: Наука. Интерпериодика, 2001. – 340 с.
  5. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца / Ф.З. Меерсон. – М.: Медицина, 1984. – 270 с.
  6. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease / K. Uchida // *Free Radical. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 28, № 12. – P. 1685–1696.
  7. Davydov V.V. Possible role of aldehyde's scavenger enzymes during aging / V.V. Davydov, N.M. Dobaeva, A.I. Bozhkov // *Exp. Gerontol.* – 2004. – Vol. 39. – P. 11–16.
  8. Interstrand DNA cross-links induced by  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aldehyde-derived from lipid peroxidation and environmental sources / M.P. Stone, Y.-J. Cho, H. Huang [et al.] // *Acc. Chem. Res.* – 2008. – Vol. 41, № 7. – P. 793 – 804.
  9. Давыдов В.В. Физиологическая и патофизиологическая роль эндогенных альдегидов. / В.В. Давыдов, А.И. Божков, О.К. Кульчицкий. – Saarbrücken: Palmarium Academic Publishing, 2012. – 240 с.
  10. Metabolism of the Lipid Peroxidation Product, 4-Hydroxy-trans-2-nonenal, in Isolated Perfused Rat Heart / S. Srivastava, A. Chandra, L.F. Wang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, № 18. – P. 10893–10900.
  11. O'Brein P.J.O. Aldehyde sources metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health / P.J.O. O'Brein, A.G. Siraki, N. Shangari // *Critical Reviews in Toxicology.* – 2005. – Vol. 35. – P. 609–662.
  12. Kawasaki N. Aldose reductase and aldehyde reductase from mammals / N. Kawasaki, T. Tanimoto, A. Tanaka // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1989. – Vol. 996, № 1–2. – P. 30–36.
  13. Identification of cardiac oxidoreductase (s) involved in the metabolism of the lipid peroxidation-derived aldehyde 4-hydroxynonenal / S. Srivastava, A. Chandra, N.H. Ansari [et al.] // *Biochem. J.* – 1998. – Vol. 329. – P. 469–475.
  14. Грабовецкая Е.Р. Активность энзимов утилизации альдегидов в сердце крыс разного возраста при иммобилизационном стрессе / Е.Р. Грабовецкая, В.В. Давыдов // *Укр. біохім. журн.* – 2009. – Т. 81, № 1. – С. 99–104.
  15. Фомина Е.В. Альдегидредуктазная активность печени крыс разного возраста при иммобилизационном стрессе / Е.В. Фомина, В.В. Давыдов // *Проблемы старения и долголетия.* – 2004. – Т. 13, № 4. – С. 510–517.
  16. Nihmat A. M. Aldose reductase from human psoas muscle / A.M. Nihmat, T.G. Flynn // *J. Biol. Chem.* – 1989. – 264, № 5. – P. 2906–2911.

*Л.Л. Сухова, В.В. Давыдов,  
Е.Р. Грабовецкая, Г.О. Сирова*

#### **ЗМІНА СПЕКТРА АЛЬДОКЕТОРЕДУКТАЗ КРОВІ ЩУРІВ В ПРОЦЕСІ ОНТОГЕНЕЗУ**

За допомогою методу електрофорезу досліджений спектр альдокеторедуктаз сироватки крові щурів на різних стадіях онтогенезу. У ранньому нестатевозрілому віці і при старінні виявляється велика схожість у структурі спектра альдокеторедуктаз крові. В процесі онтогенезу відбувається зміна співвідношення між різними фракціями альдокеторедуктаз.

**Ключові слова:** спектр альдокеторедуктаз сироватка, крові, онтогенез.

*L.L. Sukhova, V.V. Davydov,  
E.R. Grabovetskaya, A.O. Syrovaya*

#### **CHANGE OF ALDOKETOREDUCTASE SPECTRUM IN THE BLOOD OF RATS DURING ONTOGENESIS**

Spectrum of aldoketoreductases in serum of blood of rats was investigated at the different stages of ontogenesis using method of electrophoresis. It has been shown the same changes in the structure of aldoketoreductase spectrum in blood in early immature age and at aging. There are changes between different factions of aldoketoreductase in the process of ontogenesis.

**Key words:** spectrum aldoketoreductase, blood serum, ontogenesis.

**Поступила 10.09.12**