

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-

© Л. Л. Сухова, В. В. Давыдов, Ю. В. Волкова, 2013.

близма 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 бензилового 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), $M \pm m$

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.

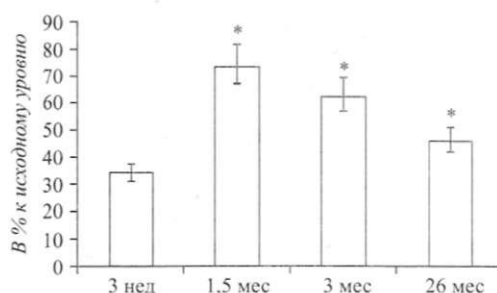


Рис. 1. Изменения уровня тестостерона в крови крыс после его внутримышечного введения; * — $P < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем.

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.

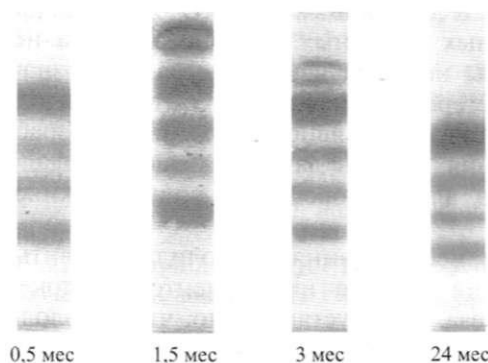


Рис. 2. Электрофореграммы фракций альдокеторедуктаз крови крыс разного возраста.

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 парентеральном 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. *Давыдов В. В., Божков А. И., Кульчицкий О. К.* Физиологическая и патологическая 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-nonanal 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-hydroxynonanal // 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.