

УДК [612.66+616-092.19]:577.15

УРОВЕНЬ ТЕСТОСТЕРОНА И АЛЬДОКЕТОРЕДУКТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ КРОВИ, ПЕЧЕНИ И СЕРДЦА КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Сухова Л.Л.¹, Волкова Ю.В.¹, Грабовецкая Е.Р.², Давыдов В.В.¹

¹ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков НАМН Украины», Харьков, Украина

²Харьковский национальный медицинский университет, Украина

E-mail: vaddavydov@mail.ru

В работе был изучен эффект тестостерона на альдокеторедуктазную активность печени и сердца крыс разного возраста. Исследования показали, что возрастное изменение уровня тестостерона в крови 3 месячных крыс не сопровождается изменением альдокеторедуктазной активности гомогенатов сердца и печени. После парентерального введения тестостерона повышение альдокеторедуктазной активности происходит только в гомогенатах печени 3 месячных крыс. В сердце 1,5- и 3-месячных животных при этом не происходит модуляции ферментативной активности. На основании данных о тканеспецифических особенностях структуры изоферментного спектра альдокеторедуктаз печени и сердца делается вывод о том, что тестостерон принимает участие в регуляции синтеза только определенных изоферментов альдокеторедуктаз печени.

Ключевые слова: тестостерон, альдокеторедуктаза, сердце, печень, пубертат.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее нами было установлено, что на этапе полового созревания возрастает чувствительность организма к оксидативному стрессу [1, 2]. Как следствие того в пубертатном возрасте повышается заболеваемость подростков патологией сердечно-сосудистой, центральной нервной и эндокринной систем, желудочно-кишечного тракта и др. [3, 4]. Одной из причин возникновения этого феномена может быть возрастная модуляция активности альдокеторедуктаз (альдегидредуктаз и альдозоредуктаз), как ферментов катализирующих восстановление цитотоксических карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в мало токсические алкополи [5 – 7]. Принимая во внимание тот факт, что на этапе полового созревания в организме происходит повышение продукции половых гормонов, можно предположить их участие в регуляции синтеза альдокеторедуктаз и, тем самым, изменении ответа организма на оксидативный стресс в процессе онтогенеза. Вместе с тем все еще отсутствуют четкие представления о влиянии половых гормонов на альдокеторедуктазную активность тканей внутренних органов в процессе индивидуального развития. Учитывая это, целью данной работы явилось изучение эффекта тестостерона на альдокеторедуктазную активность печени и сердца крыс разного возраста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 40 крысах самцах линии Вистар двух возрастных групп: 1 – 1,5-месячные (пубертат) и 2 – 3-месячные (ранний половозрелый возраст). Животных этих возрастов подразделяли на 2 подгруппы: 1 – крысы, которым в течение трех дней внутримышечно вводили раствор тестостерона на стерильном растительном масле в дозе 0,07 мг / 100 г массы и 2 – животные, которым внутримышечно вводили эквивалентный объем стерильного растительного масла (контрольная группа).

Эвтаназию проводили путем декапитации под легким эфирным наркозом. Собирали кровь, извлекали печень и сердце. Отмывали их от крови и готовили 30% гомогенаты на 0,01 М натрий-фосфатном буфере pH 7,0 при помощи стеклянного гомогенизатора Поттера-Эльвегейма с тефлоновым пестиком. Полученные гомогенаты центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3 минут на рефрижераторной центрифуге РС-6. Супернатанты использовали в исследованиях. Все процедуры проводили при 4 – 6 °С.

Для определения активности альдокеторедуктаз пробу гомогената вносили в кварцевую кювету спектрофотометра, содержащую (конечные концентрации) 0,1 М глицин-NaOH буфер (pH 10,0), 0,0005 М окисленного NAD и 0,05 М бензилового спирта [8].

Определение общего содержания тестостерона проводили с помощью иммуноферментного метода с использованием наборов фирмы Гранум.

В специальных экспериментах проводили фракционирование альдокеторедуктаз гомогенатов и крови интактных крыс при помощи метода 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 гомогената. Фракционирование альдокеторедуктаз проводили в течение 30 минут при напряжении 100 в. В качестве электродного буфера использовали трис-барбиталовый буфер из набора. Разделение альдокеторедуктаз проводили на приборе для электрофореза Solar (Белоруссия).

Окрашивание пластинок после электрофореза проводили в специальном окрашивающем растворе в течение 30 минут 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 (pH 10,0). Приготовленный раствор фильтровали, после чего в него дополнительно вносили 0,486 мл бензилового спирта, растворенного в 0,75 мл метанола [9].

Содержание белка в пробах определяли по методу O. Lowry et al. (1951).

Результаты экспериментальных исследований подвергались статистической обработке по методу Wilcoxon-Mann-Whitney. Различия между данными считались достоверными при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты соответствуют представлениям о том, что в пубертатном возрасте возрастает секреция тестостерона, уровень которого

достигает максимального значения на этапе половой зрелости (рис. 1). Вместе с тем, проведенные исследования не позволили обнаружить одновременного повышения альдокеторедуктазной активности ни в гомогенатах печени, ни в гомогенатах сердца (табл. 1). На это указывают результаты статистической обработки показателей ферментативной активности в гомогенатах печени и сердца 1,5- и 3-месячных крыс.

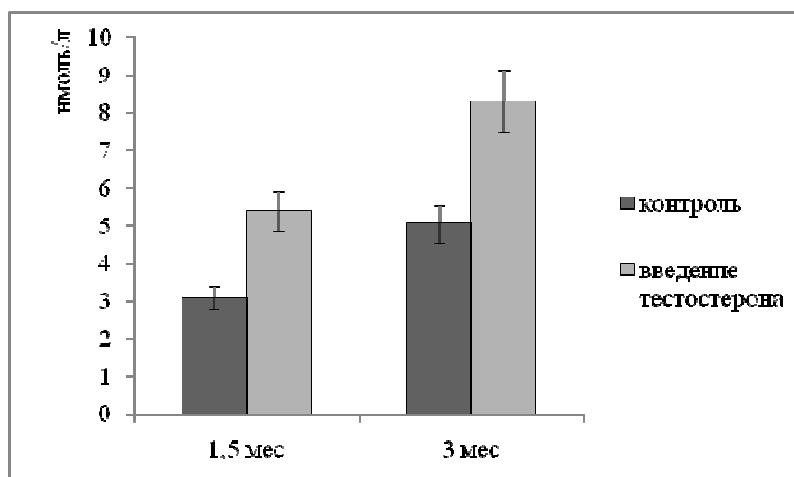


Рис. 1. Уровень тестостерона в крови крыс разного возраста и его изменение при парентеральном введении гормона

После парентерального введения тестостерона в гомогенатах сердца животных всех исследованных возрастных групп не выявлялось статистически достоверного изменения альдокеторедуктазной активности (табл.). В тоже время в гомогенатах печени крыс 3 месячного возраста после курса внутримышечного введения тестостерона происходило увеличение ферментативной активности на 80% по сравнению с ее уровнем у животных контрольной группы.

Таблица

Альдокеторедуктазная активность гомогенатов печени и сердца крыс разного возраста контрольной группы и после внутримышечного введения тестостерона, $\text{нмоль}/(\text{мин} \cdot \text{мг белка})$, $\text{Me} \pm \text{Se}$, $n=5$

орган	1,5 месяца		3 месяца	
	контроль	введение тестостерона	контроль	введение тестостерона
печень	$438,9 \pm 30,2$	$376,0 \pm 5,4$	$249,8 \pm 31,9$	$449,6 \pm 39,1^*$
сердце	$379,4 \pm 20,2$	$408,4 \pm 37,1$	$467,0 \pm 60,9$	$510,4 \pm 29,2$

Примечание: * - $P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой;

Таким образом, существенное увеличение уровня тестостерона в крови после его парентерального введения сопровождалось повышением альдокеторедуктазной активности только в печени крыс раннего половозрелого возраста. В сердце появлялась лишь тенденция к возникновению подобного сдвига. Все это свидетельствует о тканеспецифическом и возраст-зависимом эффекте тестостерона на продукцию альдокеторедуктаз в организме.

Известно, что альдокеторедуктазы в организме млекопитающих представлены множественными формами [10]. Принимая это во внимание, можно предположить существование тканеспецифических и возрастных особенностей в структуре их изоферментного спектра. И действительно проведенные нами исследования позволили установить специфические особенности строения спектра альдокеторедуктаз гомогенатов сердца и печени крыс [11].

Использование аналитического электрофореза позволило выявить в гомогенате печени крыс 4 фракции альдокеторедуктаз (рис. 2). Как следует из представленного рисунка, 3 и 4 фракции по своей электрофоретической подвижности близки к фракции 1 сыворотки крови.

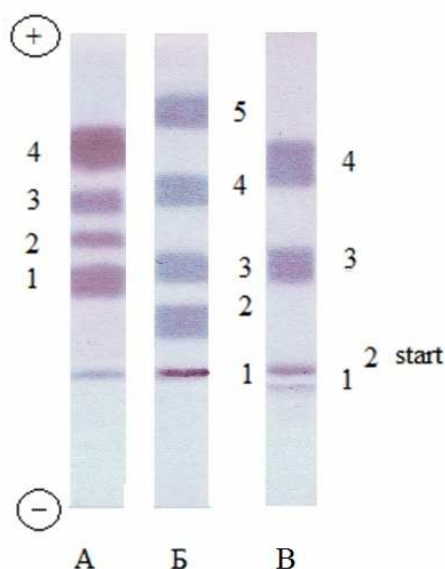


Рис. 2. Разделение альдокеторедуктаз сыворотки крови (А), гомогената сердца (Б) и печени (В) крыс в агарозном геле. Цифрами обозначена последовательность электрофоретических фракций на электрофореграмме.

При электрофоретическом исследовании гомогенатов сердца в них выявляется 4 отрицательно заряженные фракции альдокеторедуктаз (рис. 2) и одна, не обладающая электрофоретической подвижностью, остающаяся на линии старта. Фракции 2 и 3 приближаются по своей подвижности к фракции 1 сыворотки крови,

фракция 4 – близка по электрофоретической подвижности к 3 фракции, а 5 – к 4 фракции сыворотки крови.

Обращает на себя внимание тот факт, что у крыс обеих возрастных групп количество электрофоретических фракций альдокеторедуктаз в гомогенатах печени и сердца остается одинаковым.

Таким образом, изоферменты альдокеторедуктаз печени отличаются по электрофоретической подвижности от изоферментов сердца. В этой связи становится понятной причина тканеспецифического эффекта тестостерона. Очевидно, данный гормон выступает в качестве индуктора синтеза только определенных изоферментов альдокеторедуктаз, которые образуются в печени половозрелых крыс. Однако для окончательного решения вопроса о существовании возрастных и тканеспецифических особенностей регуляции синтеза изоферментов альдокеторедуктаз требуется проведение специальных экспериментов, чему будут посвящены наши дальнейшие исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Возрастное повышение уровня тестостерона в крови 3 месячных крыс не сопровождается параллельным изменением альдокеторедуктазной активности гомогенатов сердца и печени.
2. Парентеральное введение тестостерона сопровождается повышением альдокеторедуктазной активности в гомогенатах печени только у 3 месячных крыс и не сопровождается модуляцией ферментативной активности в сердце 1,5- и 3-месячных животных.
3. Изоферменты альдокеторедуктаз печени отличаются по электрофоретической подвижности от изоферментов альдокеторедуктаз сердца. Тестостерон принимает участие в регуляции синтеза определенных изоферментов альдокеторедуктаз печени.

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. Волкова Ю. В. Влияние иммобилизационного стресса на свободнорадикальное окисление белков и липидов в субклеточных фракциях печени крыс разного возраста / Ю. В. Волкова, В. В. Давыдов // Эксперимен. і клініч. медицина - 2009.- № 2.- С. 16-22.
3. Корнев Н. М. Артериальная гипертензия у подростков. Прогнозування та профілактика артеріальної гіпертензії в дитячому та підлітковому віці: матеріали симп. - Харьков. - 2001.- С. 3-7.
4. Корнев М. М. Клініко-гемодинамічні показники формування церебральних порушень у підлітків з первинною артеріальною гіпертензією / М. М. Корнев, О. М. Носова // Педіатрія, акушерство та гінекологія. - 2002. - 2.- С. 15-18.
5. Spycher S. 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal induces transcription and expression of aldose reductase / S. Spycher // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1996.- 226, 2.- P. 512-516.
6. Koch Y. H. Aldehyde reductase gene expression by lipid peroxidation end products, MDA and HNE / Y. H. Koch, Y. S. Park, M. Takahashi // Free Radic. Res. - 2000.- 336.- P. 739-746.
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. Bosron W. F. Triphosphate nucleotide-linked aldehyde reductases / W. F. Bosron, R. L. Paire // JBC. – 1972. – vol. 247, №14. – P. 4480–4485.
9. Nihmat A. Aldose reductase from human psoas muscle / A. Nihmat, T.G. Flynn // J. Biol. Chem. – 1989. – 264, № 5. – P. 2906–2911.
10. 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.
11. Сухова Л. Л. Альдокеторедуктазы печени и сердца интактных и иммобилизованных крыс разного возраста / Л. Л. Сухова, В. В. Давыдов // Проблемы старения и долголетия. – 2012. – Т. 21, №4. - С. 455-461.

Сухова Л.Л. Рівень тестостерону і альдокеторедуктазна активність крові, печінки та серця щурів різного віку / Л.Л. Сухова, Ю.В. Волкова, Є.Р. Грабовецька, В.В. Давидов // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2013. – Т. 26 (65), № 3. – С. 189-195.

В роботі було вивчено ефект тестостерону на альдокеторедуктазну активність печінки і серця щурів різного віку. Дослідження показали, що вікова зміна рівня тестостерону в крові 3-місячних щурів не супроводжується зміною альдокеторедуктазної активності гомогенатів серця і печінки. Після парентерального введення тестостерону підвищення альдокеторедуктазної активності відбувається лише в гомогенатах печінки 3-місячних щурів. У серці 1,5- і 3-місячних тварин при цьому не відбувається модуляції ферментативної активності. На підставі даних про тканиноспецифічні особливості структури ізоферментного спектру альдокеторедуктаз печінки і серця можна зробити висновок про те, що тестостерон бере участь в регуляції синтезу лише окремих ізоферментів альдокеторедуктаз печінки.

Ключові слова: тестостерон, альдокеторедуктаза, серце, печінка, пубертат.

TESTOSTERONE LEVEL AND ALDO-KETO REDUCTASE ACTIVITY OF BLOOD, LIVER AND HEART IN THE DIFFERENT AGES RATS

Sukhova L.L.¹, Volkova Y.V.¹, Grabovetskaya E.R.², Davydov V.V.¹

¹State Establishment “Institute for Children and Adolescent Health Care of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kharkov, Ukraine

²Kharkov National Medical University, Ukraine

E-mail: vaddavydov@mail.ru

It is known that susceptibility to oxidative stress is increased during puberty. It is followed by an increasing occurrence of the pathologies of cardiovascular, endocrine and central nervous system, gastrointestinal tract, etc. during this period of ontogenesis. One of the causes of this phenomenon may be age- modulation of aldo-keto reductases (aldehyde reductases and aldose reductases), which catalyze the reduction of cytotoxic carbonyl products of free radical oxidation [1 - 3]. During puberty, the production of sex hormones is increased. It can be assumed that they are involved in the regulation of aldo-keto reductase synthesis and thereby alter the body's response to oxidative stress during ontogenesis. The purpose of the work was to study the effect of testosterone on aldo-keto reductase activity in the liver and heart of rats at different ages.

Work has been carried out on male Wistar rats of two age groups (1,5 - and 3 -month-old animals). The rats of both ages were administered intramuscularly testosterone solution on sterile vegetable oil. The second (control) group of both ages was administered intramuscularly the equivalent volume of sterile vegetable oil. Aldo-keto reductase activity and testosterone level were determined in the homogenates of rat liver and heart. Aldo-keto reductase fractionation was performed in the blood homogenates of intact rats by analytical electrophoresis.

The obtained data suggest that age-related changes of testosterone levels in the blood of 3 month-old rats are not accompanied by a parallel change in aldo-keto reductase activity in the heart and liver homogenates. It is noted that parenteral administration of testosterone was accompanied by an increased aldo-keto reductase activity in liver homogenates of 3-month-old rats, and was not accompanied by a modulation of enzymatic activity in the heart of the 1,5 - and 3 -month-old animals. It is established that the aldo-keto reductase isoenzymes in the liver have different electrophoretic mobility than the aldo-keto reductase isoenzymes in the heart. We conclude that testosterone is involved in the regulation of the synthesis of certain aldo-keto reductase isozymes in the liver.

Keywords: testosterone, aldo-keto reductase, heart, liver, puberty

References

1. Volkova Y. V., Davydov V. V., The influence of stress on the content of free radical oxidation products in subcellular brain fractions in rats at pubertal age, *Ukr. Biochem. J.*, **81**, 45 (2009).
2. Volkova Y. V., Davydov V. V., Influence of immobilization stress on free radical protein and lipid oxidation in subcellular liver fractions in rats of different age groups, *Exper. Clin. Med.*, **2**, 16 (2009).
3. Korenev N. M., Arterial hypertension at adolescent. *Abstracts of Symposium "Prediction and prevention arterial hypertension in childhood and adolescence"* (Kharkov, 2001), p. 3.
4. Korenev N. M., Nosova E. M., Clinical and hemodynamic parameters of the cerebral vascular disorders formation at adolescents with primary arterial hypertension, *Pediatrics, obstetrics and gynecology*, **2**, 15 (2002).
5. Spycher S., 4-hydroxy-2,3-trans-nonanal induces transcription and expression of aldose reductase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**, 512 (1996).
6. Koch Y. H., Park Y. S., Takahashi M., Aldehyde reductase gene expression by lipid peroxidation end products, MDA and HNE, *Free Radic. Res.*, **336**, 739 (2000).
7. Davydov V. V., Dobaeva N. M., Bozhkov A. I., Possible role of aldehydes scavenger enzymes during aging, *Exp. Gerontol.*, **39**, 11 (2004).
8. Bosron W. F., Praire R. L., Triphosphate nucleotide-linked aldehyde reductases, *J. Biol. Chem.*, **247**, 4480 (1972).
9. Nihmat A., Flynn T.G., Aldose reductase from human psoas muscle, *J. Biol. Chem.*, **264**, 2906 (1989).
10. Davydov V. V., Bozhkov A. I., Kulchitsky O. K., *Physiological and pathophysiological role of endogenous aldehydes*, 240 p. (Palmarium Academic Publishing, Saarbrucken, 2012).
11. Sukhova L.L., Davydov V.V., Aldoketoreductases of liver and heart intact and immobilized rats with different age, *Problems of aging and longevity*, **21**, 455 (2012).

Поступила в редакцию 16.08.2013 г.