

В.В. Давыдов ¹, И.В. Матвеева ¹, Л.Л. Сухова ²**ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ СПЕКТРА АЛЬДОКЕТОРЕДУКТАЗ КРОВИ КРЫС**¹ ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань, Россия² ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков НАМН Украины», Харьков, Украина

Целью работы явилось изучение спектра альдокеторедуктаз сыворотки крови крыс разного возраста. Исследования показали, что в неполовозрелом возрасте, а также при старении у животных выявляется определенное сходство в спектре альдокеторедуктаз крови. Аналогичная ситуация характерна для половозрелых крыс и животных пубертатного возраста. Возникновение этих изменений предполагает модуляцию роли восстановительного пути в утилизации карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в организме.

Ключевые слова: оксидативный стресс, альдокеторедуктазы, онтогенез

AGE PECULIARITIES IN THE CHANGE OF ALDOKETOREDUCTASE SPECTRUM IN RAT BLOODV.V. Davydov ¹, I.V. Matveeva ¹, L.L. Sukhova ²¹ Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan, Russia² Institute of Children's and Adolescents' Health of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

In order to reveal the causes of age-related changes in sensitivity of the organism to oxidative stress, the spectrum of aldoketoreductases in blood serum of rats of different ages was investigated. It was discovered that 0.5- and 24-month old rats have the similar spectrum of aldoketoreductase in the blood. There are only four electrophoretic fractions of aldoketoreductases in their spectrum. The share of 3rd fraction increases the spectrum of 1.5-, 2- and 3- month old rats. The pubertal rats contain additional 5th fraction in aldoketoreductase spectrum of the blood. This electrophoretic fraction has maximal electrophoretic mobility, but there is inconstancy in spectrum. There are 6 electrophoretic fractions of aldoketoreductases in the blood of 3-month old rats. Two of them with maximal electrophoretic mobility are absent in the spectrum of 0.5- and 24- month old rats. There are the same shares of 3rd and 4th fraction in the aldoketoreductase spectrum of the blood 12-month old rats, and 5th fraction there is inconstancy. The cause of age-related changes in the aldoketoreductase spectrum of blood may be coupled with existence of age-related differences in the gene expression of the encoded enzymes of aldoketoreductase family. Due to the fact that 0.5- (early childhood) and 24-month old (senescence) rats have similar aldoketoreductase spectrum of the blood, we propose that the cause of that phenomenon coupled with age-related changes in the production and secretion of sex steroids.

Key words: oxidative stress, aldoketoreductase, ontogenesis

ВВЕДЕНИЕ

Эндогенные альдегиды интенсивно образуются при усилении свободнорадикальных процессов в клетках. При этом они проявляют выраженные цитотоксические свойства и выступают в роли своеобразных мессенджеров повреждения клеток при оксидативном стрессе [10]. Поэтому в качестве одного из неспецифических подходов к их защите от свободнорадикального повреждения является повышение в них скорости катаболизма карбонильных продуктов обмена [3]. В клетках существует особая ферментативная система утилизации эндогенных альдегидов [1, 3, 7]. Одним из основных ее компонентов являются ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные превращения карбонильных продуктов свободнорадикального окисления. К ним относится целое семейство альдокеторедуктаз (альдегидредуктазы и альдозоредуктазы), участвующих в восстановлении цитотоксических альдегидов в малотоксические спирты [7, 8, 9].

В процессе онтогенеза происходит изменение чувствительности организма к оксидативному стрессу [4, 5, 6]. Следствием того становится формирование

возрастной патологии в пубертатном возрасте и при старении и др. Однако причины развития этого феномена до настоящего времени все еще далеки от окончательного понимания. Можно предположить, что причиной того является возрастное изменение скорости восстановления карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в тканях.

Ранее нами действительно было показано, что на этапе полового созревания и при старении у крыс изменяется альдегидредуктазная активность в тканях внутренних органов [2]. Мы предположили, что причиной возникновения подобного сдвига может быть возрастное изменение изоферментного спектра альдокеторедуктаз на разных этапах онтогенеза. Учитывая это, **целью** настоящего исследования явилось изучение спектра альдокеторедуктаз крови крыс разного возраста.

МЕТОДИКА

Исследования выполнены на 36 крысах-самцах линии Вистар шести возрастных групп: 1 – 0,5-месячные (неполовозрелые); 2 – 1,5-месячные (ранний пубертат); 3 – 2-месячные (поздний пубертат);

4 – 3-месячные (ранний половозрелый возраст); 5 – 12-месячные (взрослые половозрелые); 6 – 24-месячные (старые).

Опыты на животных выполняли в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, регламентированными «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными Приказом МЗ СССР № 742 от 13.11.84 г. «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и № 48 от 23.01.85 г. «О контроле за проведением работ с использованием экспериментальных животных».

Животных декапитировали под легким эфирным наркозом и собирали кровь. Из крови получали сыворотку, в которой проводили исследование спектра альдокеторедуктаз с помощью метода электрофореза на пластинках с агарозой. В работе использовали набор реактивов и пластинки для разделения белков крови Cormay Gel Protein 100 (Cormay).

На пластинку наносили по 5 мкл сыворотки крови. Фракционирование альдокеторедуктаз проводили в течение 30 минут при напряжении 100 в. В качестве электродного буфера использовали трис-барбиталовый буфер из набора пластинок.

Окрашивание пластинок после электрофореза проводили в течение 30 минут при 37 °С в специальном растворе (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, после чего добавляли 0,486 мл бензилового спирта в 0,75 мл метанола). Окрашенные пластинки тщательно отмывали, подсушивали на воздухе и подвергали денситометрии на денситометре DM 2120 (Беларусь).

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием непараметрического метода Wilcoxon – Mann – Whitney.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Было установлено, что в крови крыс разных возрастных групп выявляются 4 постоянные фракции альдокеторедуктаз (рис. 1). Фракция 4 занимает наибольшую долю в спектре. Фракции 5 и 6 обладают наибольшей электрофоретической подвижностью.

Причем в раннем неполовозрелом возрасте и у старых крыс они отсутствуют.

В процессе индивидуального развития у них происходит изменение альдокеторедуктазного спектра крови (рис. 2). У крыс 0,5- и 24-месячного возраста выявляется определенное сходство в его структуре. У них обнаруживаются только 4 электрофоретические фракции энзимов. У 1,5-, 2- и 3-месячных крыс возрастает доля фракции 3 в спектре. При этом у крыс пубертатного возраста (1,5 и 2 месяца) появляется еще и дополнительная фракция 5, которая обладает наибольшей электрофоретической подвижностью. Однако она выявляется не у всех исследованных животных этой возрастной группы. У 3-месячных крыс в крови обнаруживается 6 фракций альдокеторедуктаз, из которых 2 фракции с наибольшей электрофоретической подвижностью отсутствуют у крыс 0,5- и 24-месячного возраста. У 12-месячных животных фракции 3 и 4 имеют равную долю в спектре альдокеторедуктаз, а фракция 5 становится непостоянной.

Анализ полученных результатов указывает на то, что в процессе онтогенеза имеет место характерное изменение спектра альдокеторедуктаз крови. Его причиной могут быть возрастные различия в регуляции экспрессии генов отдельных ферментов этого семейства. Принимая во внимание тот факт, что в 0,5-месячном возрасте и при старении (24 месяца) имеется определенное сходство в структуре альдокеторедуктазного спектра крови, можно предположить, что причиной того являются возрастные особенности в продукции и секреции стероидных (половых) гормонов как природных регуляторов экспрессии генов.

Возрастная модуляция спектра альдокеторедуктаз способствует изменению роли восстановительного пути катаболизма цитотоксических карбонильных продуктов свободнорадикального окисления, т. к. отдельные представители этого семейства ферментов обладают различными каталитическими и регуляторными свойствами. При этом в детском возрасте и при старении формируются предпосылки для ограничения скорости утилизации альдегидов в клетках и особенно в условиях усиления их образования при оксидативном стрессе. В результате этого

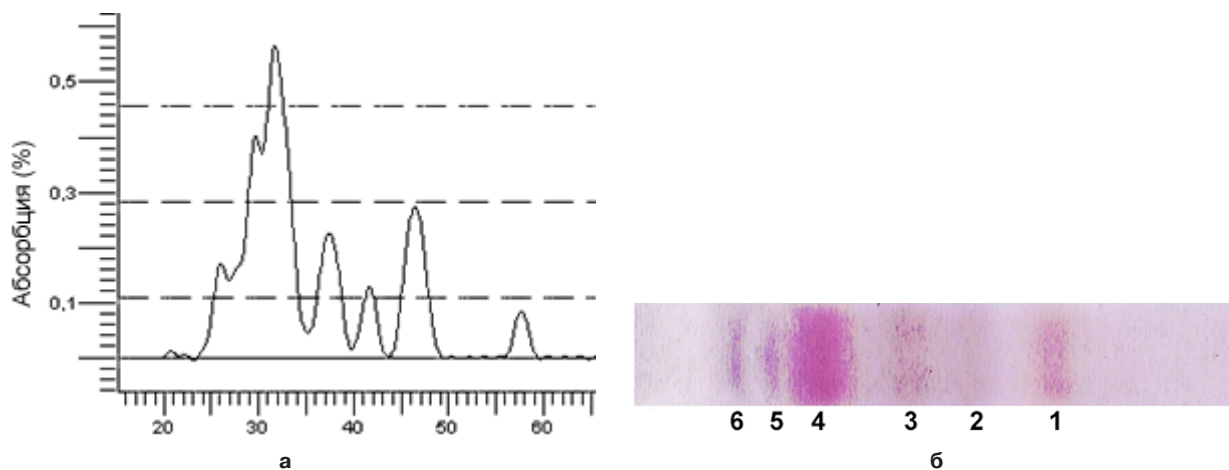


Рис. 1. Денситограмма (а) и фотография пластинки (б) с разделенными фракциями альдокеторедуктаз крови 3-месячной крысы (цифрами обозначены номера электрофоретических фракций).

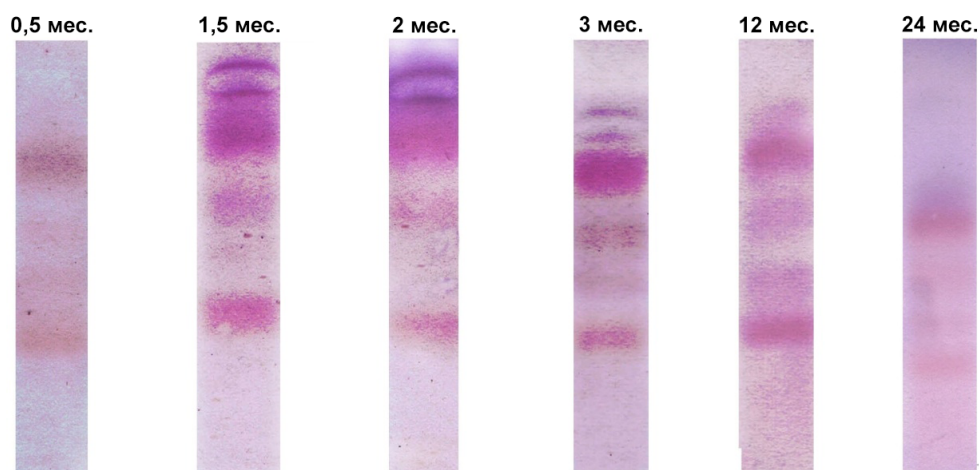


Рис. 2. Альдокеторедуктазный спектр крови крыс разного возраста.

может возрастет чувствительность организма к действию внешних факторов, реализующих свое негативное воздействие через формирование оксидативного стресса. Однако характер взаимосвязи между возрастными изменениями в продукции стероидных (половых) гормонов и структуре спектра альдокеторедуктаз крови требует дополнительного изучения.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Давыдов В.В., Божков А.И., Кульчицкий О.К. Физиологическая и патофизиологическая роль эндогенных альдегидов. – Saarbrücken: Palmarium Academic Publishing, 2012. – 240 с.

Davydov VV, Bozhkov AI, Kulchitskiy OK. (2012). Physiological and pathophysiological role of endogenous aldehydes [Fiziologicheskaya i patofiziologicheskaya rol' endogennykh al'degidov], 240.

2. Davydov VV, Hamdallah A, Grabovetskaya ER (2016). Age-dependent peculiarities modulation of activity of aldehyde scavenger enzymes in mitochondria of rat thigh muscle during stress. *Frontiers in Biology*, 11 (1), 28-31.

3. Davydov VV, Dobaeva NM, Bozhkov AI (2004). Possible role of aldehydes scavenger enzymes during aging. *Experimental Gerontology*, (39), 11-16.

4. Davydov VV, Shvets VN (2003). Age-dependent differences in the stimulation of lipid peroxidation in the heart of rats during immobilization stress. *Experimental Gerontology*, 38 (6), 693-698.

5. Volkova YV, Sukhova LL, Goloborodko AV, Davydov VV (2011). Activity of the first line antioxidant defense enzymes in the liver of pubertal rats during stress. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 5 (4), 389-391.

6. Li J, Holbrook NJ (2003). Common mechanisms for declines in oxidative stress tolerance and proliferation with aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 35 (3), 292-299.

7. O'Brein PJO, Siraki AG, Shangari N (2005). Aldehyde sources metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Critical Reviews in Toxicology*, (35), 609-662.

8. Srivastava S (2000). Metabolism of lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal [HNE] in rat erythrocytes: role of aldose reductase. *Free Radical Biology and Medicine*, 29 (13), 642-652.

9. Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A (2005). Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocrine Reviews*, 26 (3), 380-392.

10. Uchida K (2000). Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 28 (12), 1685-1696.

Сведения об авторах Information about the authors

Давыдов Вадим Вячеславович – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры биохимии ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Высоковольная, 9; e-mail: vaddavydov@mail.ru)

Davydov Vadim Vyacheslavovich – Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Biochemistry of Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov (390026, Ryazan, Vysokovolnaya str., 9; e-mail: vaddavydov@mail.ru)

Матвеева Ирина Васильевна – кандидат медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой биохимии ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России

Matveeva Irina Vasilyevna – Candidate of Medical Sciences, Docent, Head of the Department of Biochemistry of Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov

Сухова Лилия Леонидовна – младший научный сотрудник лаборатории возрастной эндокринологии и обмена веществ ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков НАМН Украины» (61000, Украина, г. Харьков, пр. Юбилейный, 52А; тел./факс: +380 (572) 62-41-17).

Sukhova Liliya Leonidovna – Junior Research Officer of the Laboratory of Age-Related Endocrinology and Metabolism of Institute of Children's and Adolescents' Health of National Academy of Medical Sciences of Ukraine (61000, Ukraine, Kharkov, Yubileyniy av., 52A; tel./fax: +380 (572) 62-41-17)