

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ВПЛИВ ТЕСТОСТЕРОНУ НА АЛЬДЕГІДДЕГІДРОГЕНАЗНУ АКТИВНІСТЬ ТКАНИН ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ*

Волкова Ю. В., Плехова О. І., Сухова Л. Л., Козлова О. С.

*ДУ «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України», м. Харків
volkova1804@mail.ru, sukhova@inbox.ru*

Пубертат є одним з найбільш складних і відповідальних періодів онтогенезу, під час якого організм поступово досягає ознак статевої зрілості внаслідок нейрогормональної перебудови. Процеси статевого розвитку організму генетично детерміновані, але водночас вони знаходяться під впливом ендогенних та несприятливих факторів середовища. Зокрема, численні дослідження останніх десятиліть дають можливість стверджувати, що в періоді статевого дозрівання змінюється стійкість організму до стресу [1–3]. Саме це може служити однією з причин значного поширення в пубертатному віці серцево-судинних захворювань, неврозів, патології шлунково-кишкового тракту [4, 5].

Відомо, що в результаті впливу стресу на організм у клітинах виникає стан оксидативного стресу, який являє собою порушення рівноваги між антиоксидантами та

прооксидантами в бік останніх [6, 7]. Наслідком стимуляції вільнорадикальних процесів стає накопичення в клітинах продуктів вільнорадикального окислення, в тому числі і цитотоксичних альдегідів, що підтверджено рядом експериментальних робіт [8–10]. Альдегіди здатні пошкоджувати не лише внутрішньоклітинні структури, але й шляхом дифузії і транспорту досягати більш віддалених мішеней [11]. Їх детоксикація є не лише необхідною умовою для нормального функціонування організму, а й важливим шляхом захисту організму від дії пошкоджуючих ефектів оксидативного стресу. Доведено, що активність ензимів відновного шляху утилізації ендогенних альдегідів та антиоксидантних ферментів змінюється за умов стресу в пубертатному віці [12–15]. Для більш глибокого розуміння процесів, що відбуваються в клітинах при стресі, доречним

*Роботу виконано згідно з науковою тематикою ДУ «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України» «Вивчити гормональну регуляцію альдегіддегідрогеназ та її роль в модуляції чутливості тканин внутрішніх органів до стресу на етапі статевого дозрівання», (№ держреєстрації 0114U001017)

Установою, що фінансує, є НАМН України.

Автори гарантують відповідальність за все, що опубліковано в статті.

Автори гарантують відсутність конфлікту інтересів та власної фінансової зацікавленості при виконанні роботи та написанні статті.

Рукопис надійшов до редакції 15.06.2016.

є вивчення зміни активності ферментів окислювального шляху утилізації карбонільних продуктів. Особливу роль серед них відіграють альдегіддегідрогенази (К.Ф. 1.2.1.3 і 1.2.1.4) [16, 17], які каталізують окислення альдегідів до відповідних карбонових кислот. Відомо, що активність та вміст даного ферменту в клітинах певною мірою впливає на їх стійкість до вільнорадикального пошкодження [18].

У зв'язку зі становленням репродуктивної системи та гормональною перебудовою організму у підлітковому віці, зацікавлює вплив статевих гормонів на зміну активності ферментативної системи окислення карбонільних продуктів вільнорадикально-

го окислення. Зокрема, викликає інтерес вплив тестостерону (Ts) як ключового гормону в забезпеченні статевого дозрівання чоловічої статі на модуляцію активності альдегіддегідрогенази (АЛДГ) як одного з основних ферментів, що каталізують окислення ендогенних альдегідів. У літературі зустрічаються поодинокі дані щодо ролі гормонів статевих залоз на експресію генів альдегіддегідрогенази [19], хоч детальні уявлення стосовно даного питання відсутні.

Враховуючи це, метою роботи стало вивчення впливу тестостерону на активність альдегіддегідрогенази у серці та печінці кастрованих щурів за умов іммобілізаційного стресу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження виконано на 80 щурах-самцях лінії Вістар 2-місячного (пізній пубертат) та 3-місячного віку (рання статевая зрілість) [20]. Тварин утримували в умовах віварію на стандартному раціоні харчування відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001). Для вивчення впливу тестостерону на активність АЛДГ відтворено модель гіпоандрогенії шляхом кастрації щурів у 45-денному віці. Тварин вказаних вікових груп розподіляли на 4 підгрупи: 1 — кастровані щури; 2 — кастровані щури, які знаходились в умовах іммобілізаційного стресу; 3 — кастровані щури, яким внутрішньом'язово вводили розчин фармацевтичного препарату тестостерону пропіонату на стерильній рослинній олії в дозі 0,1 мг/100 г маси тіла та додатково іммобілізували; 4 — інтактні тварини того ж віку (контрольна група). Парентеральне введення екзогенного тестостерону здійснювалось одноразово за 2 доби до забою тварин. Для відтворення іммобілізаційного стресу щурів прив'язували до нерухомої опори на п'ять годин щодня протягом двох діб [20].

Щурів декапітували під легким ефірним наркозом відповідно до вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

З грудної клітки та черевної порожнини видаляли серце та печінку і поміщали в охолоджений ізотонічний розчин хлористого натрію. Міокард і тканину печінки подрібнювали та гомогенізували в скляному гомогенізаторі Поттера-Ельвегейма. Готували 30 % гомогенати у 0,9 % розчині хлористого натрію. Отримані гомогенати центрифугували при 1000 об/хв протягом 3 хвилин у рефрижераторній центрифугі РС-6. Супернатанти використовували в дослідженнях. Усі процедури проводили при 4–6 °С.

В отриманих гомогенатах міокарда і печінки визначали активність НАД-залежної АЛДГ з використанням глутарового альдегіду в якості субстрату [21]. Концентрацію білка в пробах визначали за методом O. Lowry et al. (1951). Концентрацію тестостерону в сироватці крові визначали імуноферментним методом з використанням комерційних наборів реактивів ТОВ «НВЛ Гранум» (Україна, Харків).

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням пакету статистичних програм Microsoft Excel та «SPSS Statistics 17.0». Отримані дані представлені як середнє арифметичне, статистична похибка середнього арифметичного та медіана ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$; Me). Оцінку розбіжностей між групами проводили за допомогою U-критерію Уїлкоксона (p_u). Для ана-

лізу кореляційних зв'язків вираховували коефіцієнт кореляції Пірсона (r). Проводили регресійний аналіз, де R^2 — частина вибірки

у відсотках, яку охоплює рівняння регресії. Розходження між даними вважали достовірними при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За результатами попередніх досліджень встановлено певну залежність між активністю АЛДГ і рівнем тестостерону в серці кастрованих щурів 2- та 3-місячного віку [22]. В умовах гіпоандрогенії активність ензиму підвищується у 3-місячних тварин і не змінюється в молодшому віці (табл.).

Відомо, що карбонільні продукти вільнорадикального окислення інтенсивно утворюються в процесі оксидативного стресу, який є наслідком дії цілого ряду факторів, в тому числі стресу іммобілізації [8]. В результаті проведених досліджень встановлено, що внаслідок дії іммобілізаційного стресу на кастрованих щурів обох вікових груп активність АЛДГ у 2-місячних щурів не змінювалась, а у 3-місячних тварин — збільшувалась в 1,6 рази порівняно з кастрованими щурами відповідного віку ($p_u < 0,02$). Тобто, можна говорити про компенсаторне підвищення активності АЛДГ у кастрова-

них тварин 3-місячного віку у відповідь на дію іммобілізаційного стресу. Слід зазначити, що рівень тестостерону при цьому не змінювався у жодної з досліджуваних груп тварин і залишався зниженим порівняно зі щурами контрольної групи відповідного віку ($p_u < 0,02$ — для 2-місячних та $p_u < 0,01$ — для 3-місячних тварин) (див. табл.).

В ході регресійного аналізу з високим ступенем імовірності встановлено наявність тісного взаємозв'язку між показниками активності АЛДГ у серці та рівнем тестостерону у іммобілізованих щурів обох вікових груп (АЛДГ = 89,7 Ts; $R^2 = 75,1\%$; $p_u < 0,01$ — для 2-місячних щурів і АЛДГ = 243,2 Ts; $R^2 = 83,8\%$; $p_u < 0,01$ — для 3-місячних щурів).

Варто зазначити, що активність досліджуваного ензиму в умовах стресу в 1,7 рази вища у тварин 3-місячного віку порівняно з 2-місячними щурами ($p_u < 0,05$).

Т а б л и ц я

Альдегіддегідрогеназна активність у гомогенатах серця та печінки щурів різного віку, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$, Me, $n = 8$

Експериментальна група	2 місяці			3 місяці		
	Ts, нмоль/л	АЛДГ, нмоль НАДН/(мгбілка · хв)		Ts, нмоль/л	АЛДГ, нмоль НАДН/(мгбілка · хв)	
		Серце	Печінка		Серце	Печінка
Кастрація	$1,0 \pm 0,1^{1)}$ 0,9	$137,3 \pm 27,9$ 130,1	$72,7 \pm 17,7$ 58,9	$0,7 \pm 0,1^{2)}$ 0,8	$108,9 \pm 13,6$ 105,1	$300,9 \pm 44,8^{2), 3)}$ 300,1
Кастрація + стрес	$1,0 \pm 0,2^{1)}$ 0,9	$105,3 \pm 18,7$ 112,4	$162,0 \pm 25,9^{3)}$ 150,6	$0,8 \pm 0,1^{2)}$ 0,8	$177,9 \pm 22,8^*$ 176,8	$113,4 \pm 18,1^*$ 86,7
Кастрація + стрес + тестостерон	$3,0 \pm 0,7^{3), 4)}$ 2,3	$99,4 \pm 13,8$ 92,6	$120,6 \pm 31,5$ 105,2	$4,4 \pm 0,8^{**}$ 5,5	$108,6 \pm 13,3^{**}$ 98,2	$140,6 \pm 17,5$ 147,5
Контроль	$3,1 \pm 0,7$ 2,3	$112,5 \pm 17,5$ 122,0	$80,9 \pm 19,8$ 81,0	$4,9 \pm 1,2$ 5,5	$82,1 \pm 7,2$ 79,5	$108,8 \pm 7,2$ 102,9

П р и м і т к а. * — $p < 0,02$ по відношенню до групи 3-місячних кастрованих тварин; ** — $p < 0,02$ по відношенню до групи 3-місячних кастрованих та стресованих тварин; ¹⁾ — $p < 0,03$ по відношенню до групи 2-місячних тварин контрольної групи; ²⁾ — $p < 0,01$ по відношенню до групи 3-місячних тварин контрольної групи; ³⁾ — $p < 0,03$ по відношенню до групи 2-місячних кастрованих тварин; ⁴⁾ — $p < 0,03$ по відношенню до групи 2-місячних кастрованих та стресованих тварин.

Таке збільшення активності АЛДГ може бути пов'язане з більш високою чутливістю міокарда до пошкодження при стресі, а за умов підвищення каталітичної активності АЛДГ формуються передумови для захисту серцевого м'яза від вільнорадикального пошкодження при стресі. Для 2-місячного віку подібний механізм захисту міокарда від стресорного пошкодження не є характерним. Очевидно, цей механізм відіграє певну роль у підвищенні чутливості серця до ушкоджуючої дії стресу на етапі статевого дозрівання.

При екзогенному введенні тестостерону та за умов дії стресу активність АЛДГ у серці 2-місячних тварин не змінювалась. Однак введення тестостерону 3-місячним щурам, які додатково знаходились в умовах іммобілізаційного стресу, призводило до блокування активності АЛДГ порівняно зі стресованими 3-місячними щурами ($p_u < 0,02$). Тобто можна говорити про зворотну залежність між концентрацією тестостерону та активністю АЛДГ у серці 3-місячних тварин.

Результати дослідження активності альдегіддегідрогенази в гомогенаті печінки щурів різного віку за умов стресу та введення екзогенного тестостерону наведено в таблиці. Встановлено, що моделювання гіпогонадізму у 2-місячних тварин не супроводжується зміною активності АЛДГ у печінці. Однак регресійний аналіз підтвердив наявність взаємозв'язку у тварин даної групи між показниками концентрації тестостерону та активності АЛДГ у печінці (АЛДГ = 76,4 Ts; $R^2 = 87,4\%$; $p_u < 0,01$). У той же час у 3-місячних кастрованих щурів ферментативна активність збільшується в 2,8 рази відносно тварин контрольної групи ($p_u < 0,002$). Рівняння регресії, що описує взаємозв'язок досліджуваних параметрів у 3-місячних кастрованих щурів, має вигляд — АЛДГ = 430,8 Ts; $R^2 = 89,5\%$ ($p_u < 0,01$).

Зважаючи на отримані результати експериментальних досліджень можна припустити, що одним із механізмів впливу тестостерону на окислювальний шлях метаболізму карбонільних продуктів вільнорадикального окислення в тканинах печінки є обме-

ження активності АЛДГ. Дане припущення підтверджує проведений кореляційний аналіз, в результаті якого виявлено негативний зв'язок середньої сили між концентрацією тестостерону в сироватці крові та активністю АЛДГ у печінці щурів 3-місячного віку ($r = -0,63$).

В результаті вивчення активності АЛДГ печінки щурів різного віку в умовах іммобілізаційного стресу встановлено, що у кастрованих щурів 2-місячного віку активність ферменту в умовах стресу зростає більше ніж удвічі порівняно з кастрованими тваринами ($p_u < 0,01$). В той же час у печінці кастрованих щурів 3-місячного віку при стресі реєструється зниження активності досліджуваного ензиму на 62% порівняно з кастрованими тваринами цього віку ($p_u < 0,007$). Різнострамовані зміни активності АЛДГ у печінці кастрованих щурів 2- та 3-місячного віку дозволяють зробити припущення про існування тканиноспецифічних особливостей регуляції активності досліджуваного ензиму за умовами стресу на різних етапах онтогенезу. Слід зазначити, що в ході регресійного аналізу встановлено наявність взаємозв'язку між показниками рівня тестостерону та активності АЛДГ у печінці іммобілізованих щурів обох вікових груп (АЛДГ = 139,8 Ts; $R^2 = 79,9\%$; $p_u < 0,01$ — для 2-місячних щурів і АЛДГ = 122,1 Ts; $R^2 = 75,9\%$; $p_u < 0,01$ — для 3-місячних щурів).

В умовах іммобілізаційного стресу на фоні введення тестостерону альдегіддегідрогеназна активність печінки як у 2-, так і в 3-місячних щурів залишалася незмінною відносно стресованих щурів того ж віку.

Таким чином, отримані результати експериментальних досліджень свідчать про те, що одним із механізмів впливу тестостерону на окислювальний шлях метаболізму ендогенних альдегідів у тканинах печінки та серця є обмеження активності АЛДГ. Можна припустити, що тестостерон, впливаючи на експресію генів АЛДГ з низькими каталітичними властивостями, пригнічує тим самим процес утилізації карбонільних продуктів у окислювальних перетвореннях.

ВИСНОВКИ

1. Внаслідок впливу стресу на тлі гіпоандрогенії реєструються різноспрямовані зміни активності альдегіддегідрогенази, які мають тканиноспецифічний та залежний від віку характер.
2. Вплив тестостерону на індукцію аль-

дегіддегідрогеназ в умовах стресу відмічається лише в серці 3-місячних кастрованих щурів, де спостерігається обмеження ферментативної активності за умов екзогенного введення даного гормону.

ЛІТЕРАТУРА
(REFERENCES)

1. Romeo RD, et al. *Psychoneuroendocrinology* 2014; 42:146-152. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.01.016>
2. Toledo-Rodriguez M, et al. *Neurobiol Learn Memory* 2012; 98:93-101. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2012.05.006>
3. Toledo-Rodriguez M, Sandi C. *Front Behav Neurosci* 2011; 5(17):1-10.
4. Korenjev MM, Kamarchuk LV, Kvarachelija TM. *Ukr Zhurn Dytjachoi' Endokrynologii'* 2014; 1(9):22-26.
5. Korenjev MM, Nosova OM. *Pediatrica, Akusherstvo ta Ginekologija* 2002; 2:15-18.
6. Davydov VV, Bozhkov AI. *Zhurn NAMN Ukrainy* 2014; 20(1):25-34.
7. Shvec' VM. *Visn Zaporiz Nac Un-tu* 2014; 2:202-217.
8. Davydov VV, Bozhkov AI, Kul'chickij OK. *Fiziologicheskaja i patofiziologicheskaja rol' jendogenykh al'degidov, Saarbrucken*, 2012: 240 p.
9. Ramana KV, Srivastava S, Singha SS. *Oxidative Med Cell Long* 2013; 2013:438-440.
10. Halder SR, Bhattacharyya M. *J Exp Integr Med* 2014; 4(3):151-164. doi: <http://dx.doi.org/10.5455/jeim.210414.rw.007>
11. Satori A, Marchitti, et al. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4(6):697-720. doi: <http://dx.doi.org/10.1517/17425255.4.6.697>
12. Suhova LL. *Uchenye zapiski Tavricheskogo Nac Un-ta im. Vernads'kogo VI*. 2013; 26 (3):189-195.
13. Suhova LL, Davydov VV, Volkova JuV. *Problemy Starenija i Dolgoletija* 2013; 22(4):340-346.
14. Davydov VV, Grabovetskaya ER. *Advanc Biol Chem* 2014; 2(3):40-44.
15. Davydov VV, Bozhkov AI, Grabovetskaya ER. *Am J Biomed Life Sci* 2014; 2(1):1-4.
16. Muzio G, Maggiora M, Paiuzzi E. *Free Radic Biol Med* 2012; 52(3):735-746. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.033>
17. Singh S, Bocker C, Koppaka V. *Free Radic Biol Med* 2013; 56:89-101. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.010>
18. Chen CH, et al. *Science* 2008; 321(5895):1493-1495. doi: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1158554>
19. Maly IP, Sasse D. *Histochemistry* 1988; 88:387-393.
20. Suhova LL, Gur'eva AV, Berezhnaja EA, Davydov VV. *Biomed Himija* 2012; 58(6):691-701.
21. Pirozhkov SV, Panchenko LF. *Biohimija* 1988; 53(9):1443-1448.
22. Volkova JuV, Plehova OI, Suhova LL, Kozlova OS. *Probl Endokryn Patologii'* 2016; 2(56):54-59.

ВПЛИВ ТЕСТОСТЕРОНУ НА АЛЬДЕГІДДЕГІДРОГЕНАЗНУ АКТИВНІСТЬ ТКАНИН ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ

Волкова Ю. В., Плехова О. І., Сухова Л. Л., Козлова О. С.

*ДУ «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України», м. Харків
volkova1804@mail.ru*

Доведено, що в умовах гіпоандрогенії підвищується активність альдегіддегідрогенази у гомогенатах серця і печінки 3-місячних щурів. Внаслідок впливу стресу на тлі гіпоандрогенії рееструються різноспрямовані зміни активності альдегіддегідрогенази, які мають тканинспецифічний та залежний від віку характер. Вплив тестостерону на індукцію альдегіддегідрогеназ в умовах стресу відмічається лише в серці 3-місячних кастрованих щурів, де спостерігається обмеження ферментативної активності за умов екзогенного введення даного гормону.

К л ю ч о в і с л о в а : альдегіддегідрогеназа, тестостерон, стрес, печінка, серце, щури.

ВЛИЯНИЕ ТЕСТОСТЕРОНА НА АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ТКАНЕЙ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА

Волкова Ю. В., Плехова Е. И., Сухова Л. Л., Козлова О. С.

*ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков НАМН Украины», г. Харьков
volkova1804@mail.ru*

Доказано, что в условиях гипоандрогении повышается активность альдегиддегидрогеназы в гомогенатах сердца и печени 3-месячных крыс. В результате влияния стресса на фоне гипоандрогении отмечаются разнонаправленные изменения активности альдегиддегидрогеназы, которые имеют тканеспецифический и возрастзависимый характер. Влияние тестостерона на индукцию альдегиддегидрогеназ в условиях стресса отмечается лишь в сердце 3-месячных кастрированных крыс, где наблюдается ограничение ферментативной активности при условии экзогенного введения гормона.

К л ю ч е в ы е с л о в а : альдегиддегидрогеназа, тестостерон, стресс, печень, сердце, крысы.

THE EFFECT OF TESTOSTERONE ON THE ALDEHYDE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN RATS INTERNAL TISSUE UNDER CONDITIONS OF IMMOBILIZATION STRESS

Yu. V. Volkova, E. I. Plekhova, L. L. Sukhova, O. S. Kozlova

*SI «Institute for Children and Adolescents Health Care of the NAMS of Ukraine», Kharkiv
volkova1804@mail.ru*

It has been shown that under conditions of androgen deficiency increased activity of aldehyde dehydrogenase in liver and heart homogenates of 3-month-old rats. After the effects of stress on the background androgen deficiency observed various changes of aldehyde dehydrogenase activity. They have tissue-specific and age-related character. Only in the heart of 3-month-old castrated rats observed effect of testosterone on aldehyde dehydrogenase induction under stress. Here there is inhibition of enzyme activity under conditions of administration of testosterone.

K e y w o r d s : aldehyde dehydrogenase, testosterone, stress, liver, heart, rats.