

АКТИВНІСТЬ АЛЬДЕГІДДЕГІДРОГЕНАЗИ В ТКАНИНАХ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЗМІНИ АНДРОГЕННОЇ НАСИЧЕНОСТІ*

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

Альдегіддегідрогенази (К.Ф. 1.2.1.3 і 1.2.1.4) — ферменти класу оксидоредуктаз, які каталізують окислення альдегідів до відповідних кислот і в якості коферменту використовують відновлений нікотинамід-аденіндинуклеотид (НАДН) або нікотинамід-аденіндинуклеотид фосфат (НАДФ). Дані ензими мають широкий спектр субстратів — ароматичних та аліфатичних альдегідів [1].

Альдегіди — високореактивні молекули, які утворюються в результаті різних фізіологічних процесів, включаючи біотрансформацію ендogenous сполук, таких як амінокислоти, нейротрансмітери, вуглеводи та ліпіди. Наявність у молекулі альдегідів електронегативної карбонільної групи, а у ненасичених альдегідів ще й активної групи при β -вуглецевому атомі, забезпечує високу реакційну здатність, яка є основою їх цитотоксичних і генотоксичних властивостей [1–3]. Альдегіди мають відносно тривалий час існування, тому здатні пошкоджувати не лише внутрішньоклітинні структури, але й шляхом дифузії і транспорту досягати більш віддалених мішеней [4].

При збільшенні внутрішньоклітинної концентрації ендogenous альдегідів виникають умови для порушення метаболізму за рахунок зміни швидкості ферментативних процесів, зниження рівня енергетичного забезпечення клітин і порушення регуляції обмінних процесів [5].

Генотоксичні властивості альдегідів зумовлені їх здатністю призводити до появи хромосомних аберацій, виникнення точкових мутацій, формування канцерогенних ефектів та ін. [1, 2]. Тому детоксикація альдегідів є необхідною умовою для нормального функціонування організму.

Надродина альдегіддегідрогеназ (АЛДГ) відіграє вирішальну роль у захисті клітини від цих токсичних речовин. Даний факт підтверджується тим, що мутації генів, які кодують АЛДГ, є молекулярною основою різних генетичних захворювань [4].

Класифікація АЛДГ базується на відмінностях хімічної структури та субстратної специфічності. На сьогоднішній день ізольовано більше 160 генів АЛДГ у різних видів, включаючи бактерії, лишайники, водорості, рослини та тварин. У еукаріот виділяють 19

*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 дослідження, є НАМН України.

Автори гарантують відповідальність за все, що опубліковано в статті.

Автори гарантують відсутність конфлікту інтересів та власної фінансової зацікавленості.

Рукопис надійшов до редакції 14.03.2016.

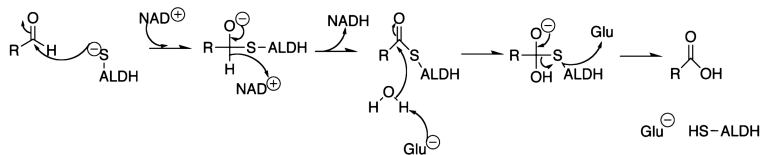


Рис. 1. Схема дезактивації молекули альдегіду альдегіддегідрогеназою.

генів АЛДГ. Усі АЛДГ розділяють на родини та підродини, які мають ідентичність нуклеотидної послідовності 60% і більше. Кожна з них є окремим кластером генів, що знаходяться поруч у певній хромосомній ділянці. У людини надродина АЛДГ включає 11 родин і 4 підродини з різною хромосомною локалізацією [6].

У більшості випадків молекула ферменту складається з 4 однакових субодиниць, кожна з яких містить 3 домени: НАД-зв'язуючий та каталітичний домени, а також місток, що їх з'єднує. Вони утворюють активний сайт, що зв'язує одну молекулу альдегіду і НАД. Зв'язування відбувається через залишки цистеїну та глутамінової кислоти в активному центрі ферменту (рис. 1). Сірка здійснює нуклеофільну атаку на вуглець карбонільної групи альдегіду. Водень, що виділяється, атакує НАД з утворенням НАДН та молекули води. При цьому вода активується глутаміновою кислотою, атакує вуглець карбонільної групи, витісняючи сірку, і повертає фермент у вихідний стан.

АЛДГ виконують цілий ряд важливих функцій в організмі. Зокрема, приймають участь у підтримці гомеостазу клітини, метаболізуючи ендо- та екзогенні альдегіди, впливають на процеси проліферації і диференціювання клітин, є частиною антиоксидантної системи. Виявлено також неферментативні властивості цих ензимів. На сьогоднішній день встановлено, що АЛДГ є маркерами стовбурових клітин і відіграють важливу роль в їх захисті та диференціюванні [4].

На тепер з літературних джерел практи-

чно нічого не відомо щодо коливання активності АЛДГ у процесі онтогенезу. Однак за результатами досліджень попередніх років нами була доведена модуляція активності даного ферменту в субклітинних фракціях тканин внутрішніх органів на етапі статевого дозрівання [7, 8]. Зокрема встановлено, що у щурів пубертатного віку активність АЛДГ у мітохондріальній фракції серця вища порівняно з дорослими статевозрілими тваринами. В аналогічній фракції печінки виявлено дещо складнішу закономірність зміни активності АЛДГ: у щурів раннього пубертатного віку її значення нижче, а у тварин у віці пізнього пубертату — вище, ніж у дорослих статевозрілих щурів. У той же час альдегіддегідрогеназна активність постмітохондріальної фракції як серця, так і печінки щурів пубертатного віку виявилась аналогічною до її активності у дорослих статевозрілих тварин.

У зв'язку з цим виникає питання щодо причетності тестостерону як ключового гормону в забезпеченні статевого дозрівання щурів чоловічої статі до модуляції активності АЛДГ. У літературі зустрічаються поодинокі дані щодо впливу статевих гормонів на експресію генів даних ензимів [9, 11]. З'ясування цих питань дозволить оцінити вплив тестостерону на особливості функціонування ферментів утилізації ендогенних альдегідів, зокрема АЛДГ.

Враховуючи вищезазначене, метою роботи стало вивчення активності АЛДГ у серці та печінці щурів різного віку за умов гіпоандрогенії та її модуляція при екзогенному введенні тестостерону.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження виконано на 80 щурах-самцях лінії Вістар 2- та 3-місячного віку. Тварин утримували в умовах віварію

на стандартному раціоні харчування. Для вивчення впливу тестостерону на активність АЛДГ відтворено модель гіпоандро-

генії шляхом кастрації щурів у 45-денному віці. Тварин вказаних вікових груп розподіляли на 3 підгрупи: 1 — кастровані щури; 2 — кастровані щури, яким внутрішньом'язово вводили розчин фармацевтичного препарату тестостерону пропіонату на стерильній рослинній олії в дозі 0,1 мг/100 г маси тіла; 3 — інтактні тварини того ж віку (контрольна група). Парентеральне введення екзогенного тестостерону здійснювалось одноразово за 2 доби до знеживлення тварин.

Щурів декапітували під легким ефірним наркозом відповідно до вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985). З грудної клітки та черевної порожнини видаляли серце та печінку і поміщали в охолоджений ізотонічний розчин хлористого натрію. Міокард і тканину печінки подрібнювали і гомогенізували в скляному гомогенізаторі Поттера-Ельвегейма. Готували 30 % гомогенати у 0,9 % розчині хлористого натрію. Отримані гомогенати центрифугували при 1000 об/хв протягом 3 хв у рефриже-

раторній центрифугі «РС-6». Супернатанти використовували в дослідженнях. Усі процедури проводили при 4–6 °С.

В отриманих гомогенатах міокарда та печінки визначали активність НАД-залежної АЛДГ з використанням глутарового альдегіду в якості субстрату [10]. 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. Для аналізу кореляційних зв'язків вираховували коефіцієнт кореляції Пірсона (r). Проводили регресійний аналіз. Розходження між даними вважали достовірними при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведення експериментальних досліджень у гомогенатах серця встановлено, що у кастрованих тварин 2-місячного віку зниження рівня тестостерону не вплинуло на середні показники активності АЛДГ порівняно з контрольною групою щурів, на відміну від 3-місячних щурів, коли виникала тенденція до її підвищення ($p_u \geq 0,05$) (табл.). Слід відмітити, що в результаті проведення регресійного аналізу у кастрованих тварин обох вікових груп виявлено взаємозв'язок з високим ступенем ймовірності між показниками активності АЛДГ у серці та рівнем тестостерону (АЛДГ = 139,8 Тс; $R^2 = 79,9\%$; $p < 0,01$ — для 2-місячних щурів і АЛДГ = 120,2 Тс; $R^2 = 76,4\%$; $p < 0,01$ — для 3-місячних щурів).

В результаті екзогенного введення тестостерону кастрованим тваринам обох вікових груп його концентрація в сироватці

крові підвищувалась як у 2-місячних щурів ($p_u < 0,01$), так і у тварин 3-місячного віку ($p_u < 0,01$) (див. табл.). У той же час середні показники активності АЛДГ у тварин молодшої вікової групи не змінювались, а у 3-місячних щурів — вони знижувались у 2 рази порівняно з кастрованими тваринами ($p_u < 0,01$).

Незважаючи на відсутність достовірних змін з боку середніх показників активності АЛДГ у серці кастрованих 2-місячних щурів, яким вводили тестостерон, регресійний аналіз підтвердив наявність тісного взаємозв'язку між даними показниками (АЛДГ = 21,0 Тс; $R^2 = 86,7\%$; $p < 0,01$). Рівняння регресії для 3-місячних кастрованих щурів, яким вводили тестостерон, має вигляд АЛДГ = 8,08 Тс; $R^2 = 68,3\%$ ($p < 0,01$).

Слід відмітити, що у 2-місячних тварин при введенні тестостерону активність АЛДГ

Альдегіддегідрогеназна активність у гомогенатах серця та печінки щурів різного віку за умов гіпоандрогенії та введення екзогенного тестостерону, ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$, Me)

Група, кількість тварин	Показники щурів віком 2 міс.			Показники щурів віком 3 міс.		
	Т, нмоль/л	АЛДГ, нмоль НАДН/мгбілка · хв		Т, нмоль/л	АЛДГ, нмоль НАДН/мгбілка · хв	
		Серце	Печінка		Серце	Печінка
Кастрація ($n = 8$)	$1,0 \pm 0,1^{1)}$ 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 + тестостерон ($n = 8$)	$6,1 \pm 0,7^{1)3)}$ 5,2	$136,0 \pm 17,9$ 115,4	$75,5 \pm 13,3$ 67,7	$6,3 \pm 0,5^*$ 5,8	$52,3 \pm 13,8^*$ 36,6	$76,0 \pm 5,9^{*2)}$ 71,1
Контроль ($n = 7$)	$3,1 \pm 0,7$ 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. * — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи 3-місячних кастрованих тварин, $p < 0,02$; ¹⁾ — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками 2-місячних тварин контрольної групи, $p < 0,03$; ²⁾ — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками 3-місячних тварин контрольної групи, $p < 0,01$; ³⁾ — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи 2-місячних кастрованих тварин, $p < 0,01$.

залишалась вищою у 2,6 рази порівняно з 3-місячними щурами ($p_u < 0,01$).

В результаті дослідження активності АЛДГ у гомогенатах печінки щурів різного віку за умов гіпоандрогенії та введення екзогенного тестостерону отримано наступні дані (див. табл.). Встановлено, що кастрація 2-місячних тварин не супроводжується зміною активності АЛДГ в печінці. Однак регресійний аналіз підтвердив наявність взаємозв'язку у тварин даної групи між показниками концентрації тестостерону та активності АЛДГ (АЛДГ = 76,4 Ts; $R^2 = 87,4\%$; $p < 0,01$). 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; $R^2 = 89,5\%$ ($p < 0,01$).

Слід відмітити вікові особливості активності АЛДГ. У тварин 2-місячного віку вона знаходиться на більш низькому рівні порівняно зі щурами у віці 3 місяців ($p_u < 0,01$). У гонадектомованих 2-місячних щурів активність АЛДГ нижча на 76% порівняно з кастрованими тваринами 3-місячного віку ($p_u < 0,001$).

Отримані результати експериментальних досліджень можуть свідчити про те, що одним із механізмів впливу тестостерону на окислювальний шлях метаболізму карбонільних продуктів у тканинах печінки є обмеження 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 ($r = -0,63$).

Висловлене припущення підтверджують і результати дослідження альдегіддегідрогеназної активності в гомогенатах печінки щурів різного віку за умов введення екзогенного тестостерону. Зокрема, в печінці кастрованих 3-місячних щурів на фоні введення гормону, що супроводжується підвищенням його рівня в крові, реєструється зниження ферментативної активності майже в 4 рази відносно кастрованих тварин ($p_u < 0,001$). У той же час введення тестостерону 2-місячним кастрованим щурам не супроводжується зміною активності АЛДГ у печінці. Однак регресійний аналіз з високим ступенем ймовірності підтверджує наявність взаємозв'язку між показниками рівня тестостерону та активності АЛДГ

у обох вікових групах кастрованих щурів з введеним тестостероном (АЛДГ = 11,1 Ts; $R^2 = 71,9\%$; $p < 0,01$ — для 2-місячних щурів і АЛДГ = 11,7 Ts; $R^2 = 93,2\%$; $p < 0,01$ — для 3-місячних щурів).

Отримані результати досліджень дозволяють припустити, що тестостерон приймає участь в утилізації ендогенних альдегідів за рахунок обмеження активності АЛДГ у серці та печінці. Подібні зміни є більш характерними для щурів 3-місячного віку. Приймаючи до уваги той факт, що АЛДГ

у тканинах представлені родиною окремих ізоферментів [1, 12], можна припустити, що причиною таких змін може бути участь тестостерону в якості регулятора експресії генів АЛДГ, в перерозподілі тканинного спектру ізоферментів. Наслідком цього стає перевага у спектрі ізоферментів з низькими каталітичними властивостями, тому під впливом тестостерону пригнічується процес утилізації альдегідів в окислювальних перетвореннях.

ВИСНОВКИ

1. За умов гіпоандрогенії альдегіддегідрогеназна активність у гомогенатах серця та печінки підвищується у 3-місячних тварин і не змінюється в молодшому віці.
2. Збільшення рівня тестостерону в крові кастрованих тварин шляхом введення екзогенного тестостерону супроводжується зниженням активності альдегіддегідрогенази в печінці та серці щурів 3-місячного віку, у тварин 2-місячного віку подібні зміни не виникають.
3. Підвищення рівня тестостерону зумовлює обмеження ролі окислювального шляху утилізації карбонільних продуктів за рахунок зниження активності альдегіддегідрогенази у тканинах внутрішніх органів щурів.

ЛІТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Davydov VV, Bozhkov AI, Kul'chickij OK. Fiziologicheskaja i patofiziologicheskaja rol' jendogennyh al'degidov, Saarbrucken, 2012: 240 p.
2. Davydov VV, Dobaeva NM, Bozhkov AI. *Exp Gerontol* 2004; 39:11-16.
3. Uchida K. *Free Radical Biol Med* 2000; 28(12):1685-1696.
4. Satori A, Marchitti, et al. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4(6):697-720.
5. Zolotuhina VN. *Probl Endokryn Patologii* 2003; 1:13-19.
6. Muzio G, et al. *Free Radical Biol Med* 2012; 52:735-746.
7. Suhova LL, Volkova JuV, Davydov VV. *Klinich ta Eksperym Patologija* 2014; 139(4):131-135.
8. Volkova JuV, Suhova LL, Davydov VV. *Medychna Himija* 2015; 17(1):47-50.
9. Crabb DW, Stewart MJ, Xiao Q. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19(6):1414-1419.
10. Pirozhkov SV, Panchenko LF. *Biohimija* 1988; 53(9):1443-1448.
11. Maly IP, Sasse D. *Histochemistry* 1988; 88:387-393.
12. Davydov VV, Bozhkov AI. *Zhurn NAMN Ukrainy* 2014; 20(1):25-34.

АКТИВНІСТЬ АЛЬДЕГІДДЕГІДРОГЕНАЗИ В ТКАНИНАХ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЗМІНИ АНДРОГЕННОЇ НАСИЧЕНОСТІ

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. Введення розчину тестостерону призводить до зниження активності цього ферменту та обмеження катаболізму карбонільних продуктів у окислювальному шляху їх утилізації.

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

АКТИВНОСТЬ АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ТКАНЯХ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕНИЯ АНДРОГЕННОЙ НАСЫЩЕННОСТИ

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. Введение раствора тестостерона приводит к снижению активности данного фермента и ограничению катаболизма карбонильных продуктов в окислительном пути их утилизации.

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

ALDEHYDE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN THE TISSUE OF INTERNAL ORGANS OF RATS UNDER CONDITIONS OF CHANGING ANDROGEN SATURATION

Yu. Volkova, E. Plekhova, L. Sukhova, O. Kozlova

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

An increased aldehyde dehydrogenase activity has been found in the liver and heart homogenates of 3-month-old rats under conditions of hypoandrogenia. Testosterone solution administration brings about a decrease in the enzyme activity and puts limitation on the catabolism of carbonyl products in oxidative way of their utilization.

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