

УДК [612.66+616-092.19]:577.15

*Л.Л. Сухова,
Ю.В. Волкова,
В.В. Давыдов*

ГУ "Институт охраны здоровья
детей и подростков НАМН
Украины", г. Харьков

АКТИВНОСТЬ АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СЕРДЦЕ КРЫС ПУБЕРТАТНОГО ВОЗРАСТА И ОСОБЕННОСТИ ЕЕ МОДУЛЯЦИИ ПРИ СТРЕССЕ

Ключевые слова: альдегиддегидрогеназа, иммобилизационный стресс, митохондрии, миокард, пубертат.

Резюме. Показано, что в митохондриальной фракции сердца крыс с увеличением их возраста происходит понижение активности альдегиддегидрогеназы, хотя в постмитохондриальной фракции она поддерживается на одинаковом уровне. При этом фермент из постмитохондриальной фракции миокарда 1,5-месячных животных проявляет наиболее высокую чувствительность к ингибирующему эффекту ацидоза и наименьшую - к активирующему действию перекиси водорода, чем у крыс других возрастных групп. В условиях продолжительной иммобилизации в постмитохондриальной фракции сердца у 1,5- и 2-месячных животных возникают разнонаправленные изменения со стороны альдегиддегидрогеназной активности, а в митохондриальной фракции она поддерживается на исходном уровне.

Введение

В подростковом возрасте повышается заболеваемость патологией сердечно-сосудистой системы [3, 5]. Одной из причин того может быть понижение устойчивости тканей внутренних органов к действию стрессоров на этапе полового созревания [1]. Однако причины этого возрастного феномена до настоящего времени остаются не изученными.

Данные литературы указывают на то, что важным неспецифическим звеном стрессорного повреждения сердца является стимуляция в нем свободнорадикальных процессов [4, 9, 11], которая сопровождается накоплением в миокарде цитотоксических карбонильных продуктов обмена. Наиболее широкое распространение среди них имеют альдегиды, которые в виду высокой реакционной способности и продолжительного времени жизни выступают в роли своеобразного мессенджера альтерации клеток [13].

Защита клеток от повреждения альдегидами обеспечивается ферментативной системой, в которую входят различные ферменты их катаболизма [2, 12]. Важное место среди них занимают альдегиддегидрогеназы (К.Ф. 1.2.1.3 и 1.2.1.4). К настоящему времени в литературе появились сведения о существовании определенной взаимосвязи между активностью альдегиддегидрогеназ и устойчивостью тканей к свободнорадикальному повреждению [7, 10]. Однако до настоящего времени все еще

отсутствуют представления о роли этих ферментов в антистрессорной защите и возрастном понижении чувствительности сердца к повреждающему действию стресса. Учитывая это, целью данного исследования явилось изучение особенностей модуляции активности альдегиддегидрогеназы в субклеточных фракциях сердца крыс разного возраста, подвергнутых иммобилизационному стрессу.

Материалы и методы

Работа выполнена на 57 крысах самцах линии Вистар трех возрастных групп: 1 - 1,5-месячные (ранний пубертат), 2 - 2-месячные (поздний пубертат) и 3 - 12-месячные (взрослые половозрелые), которых содержали на стандартном рационе питания вивария. Животных каждой возрастной группы делили на 2 подгруппы: 1 - интактные и 2 - крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу. Для воспроизведения иммобилизационного стресса животных привязывали к неподвижной опоре на 5 часов в день в течение 2 дней. Эффективность воспроизведения стресса оценивали по уровню адреналина в крови [8].

Животных подвергали декапитации под легким эфирным наркозом. Из грудной клетки извлекали сердце и помещали в охлажденный изотонический раствор хлористого натрия. Миокард измельчали ножницами и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвегейма в соотношении 1:10 (масса/объем) с

раствором, содержащим 0,25 М сахарозы. Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали 10 минут при 1000g. Супернатант повторно центрифугировали 20 минут при 10000 g. Полученную надосадочную жидкость декантировали и использовали в качестве постмитохондриальной фракции. Осадок суспендировали с 5 мл среды выделения и повторно центрифугировали в течение 20 минут при 10000 g. Надосадочную жидкость удаляли путем декантации, а образовавшийся осадок суспендировали с 1,5 мл среды выделения и использовали в работе в качестве митохондриальной фракции. Все процедуры фракционирования проводили при 4-6°C.

В выделенных субклеточных фракциях миокарда определяли активность NAD-зависимой альдегиддегидрогеназы с использованием глутарового альдегида в качестве субстрата [6]. В специальных исследованиях уменьшали величину рН реакционной смеси с 8,5 до 8,3 и 8,1, а также вносили в нее перекись водорода в смеси с азидом натрия в конечных концентрациях 10 мМ.

Концентрацию белка в пробах определяли по

методу Лоури.

Результаты исследований подвергали статистической обработке с использованием непараметрического метода Wilcoxon-Mann-Whitney.

Обсуждение результатов исследования

Из данных, представленных в таблицах 1 и 2 следует, что альдегиддегидрогеназная активность в постмитохондриальной фракции миокарда у 1,5-, 2- и 12-месячных крыс существенно не различается (табл. 1). В митохондриальной фракции миокарда 1,5- и 2-месячных животных активность фермента на 319 % и 85 % соответственно выше, чем у 12-месячных крыс (табл. 2). Обнаруженные сдвиги дополняются изменениями со стороны величины соотношения альдегиддегидрогеназной активности в постмитохондриальной и митохондриальной фракции миокарда. У крыс пубертатного возраста величина индекса соотношения активности фермента в постмитохондриальной и митохондриальной фракции оказывается существенно ниже, чем у 12-месячных.

Таблица 1

Альдегиддегидрогеназная активность (нмоль НАДН/мг белка·мин) в постмитохондриальной фракции сердца крыс разного возраста, подвергнутых продолжительной иммобилизации

Экспериментальная группа	Возраст (мес)		
	1,5	2,0	12,0
Интактные	5,2 ± 0,6	7,3 ± 0,4	8,0 ± 0,7
Стресс	*11,7 ± 0,7	*3,3 ± 0,6	7,8 ± 0,8

Примечание. * - достоверность статистических различий ($p < 0,05$) по отношению к показателям у интактных животных

Таблица 2

Альдегиддегидрогеназная активность (нмоль НАДН/мг белка·мин) в митохондриальной фракции сердца крыс разного возраста, подвергнутых продолжительной иммобилизации

Экспериментальная группа	Возраст (мес)		
	1,5	2,0	12,0
Интактные	* 130,0 ± 14,5	* 57,1 ± 6,4	30,8 ± 3,3
Стресс	173,6 ± 30,2	30,2 ± 7,9	29,2 ± 1,6

Примечание. * - достоверность статистических различий ($p < 0,05$) по отношению к показателям 12-месячных животных

В условиях продолжительной иммобилизации в постмитохондриальной фракции сердца 1,5-месячных животных происходит повышение альдегиддегидрогеназной активности на 125% по сравнению с ее исходным уровнем. В тоже вре-

мя у 2-месячных иммобилизованных животных она наоборот - понижается до 45% от ее исходной величины. В митохондриальной фракции сердца у животных пубертатного возраста, сдвиги аналогичной направленности имеют

характер всего лишь выраженной тенденции ($P > 0,05$). При этом в субклеточных фракциях миокарда взрослых животных в условиях продолжительной иммобилизации не происходит изменения альдегиддегидрогеназной активности.

Изменения со стороны альдегиддегидрогеназной активности при стрессе сопровождаются увеличением соотношения ее величины в постмитохондриальной и митохондриальной фракции сердца только у 1,5-месячных крыс. У них происходит увеличение данного показателя на 68 %, по сравнению с его исходным уровнем.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что альдегиддегидрогеназная активность постмитохондриальной фракции сердца крыс пубертатного возраста соответствует таковой у взрослых животных. Однако в условиях продолжительной иммобилизации у 1,5- и 2-месячных крыс происходит ее разнонаправленная модуляция. Это может указывать на то, что на позднем этапе полового созревания в сердце иммобилизованных животных возникают условия для ограничения скорости окислительных превращений эндогенных альдегидов в саркоплазме кардиомиоцитов.

Вместе с тем, несмотря на стрессорное ограничение активности немитохондриальных альдегиддегидрогеназ, в кардиомиоцитах иммобилизованных животных позднего пубертатного возраста, за счет поддержания высокой базальной активности митохондриальных энзимов,

могут поддерживаться условия для эффективной утилизации эндогенных альдегидов в окислительном пути их катаболизма.

Полученные данные экспериментальных исследований позволяют предполагать одинаковую скорость окисления эндогенных альдегидов в альдегиддегидрогеназной реакции в кардиомиоцитах животных пубертатного и взрослого половозрелого возраста. Однако в условиях изменения состава внутриклеточной среды при стрессе эффективность окисления карбонильных продуктов свободнорадикального окисления *in situ* может изменяться в зависимости от возраста характере. Известно, что при стрессе в миокарде возникают условия для формирования метаболического ацидоза и накопления активных форм кислорода [4]. Учитывая это, было изучено влияние эффекта понижения pH реакционной смеси и внесения в нее перекиси водорода на альдегиддегидрогеназную активность постмитохондриальной фракции миокарда животных разных возрастных групп. Исследования показали (табл. 3), что при понижении pH реакционной смеси уже до 8,3, фермент из постмитохондриальной фракции сердца 1,5-месячных крыс полностью теряет свою активность. В то же время у животных 2- и 12-месячного возраста подкисление реакционной смеси даже до 8,1 не сопровождается существенным изменением ее величины.

Таблица 3

Влияние pH среды и добавления в нее перекиси водорода на альдегиддегидрогеназную активность (нмоль НАДН/мг белка·мин) постмитохондриальной фракции сердца крыс разного возраста

Возраст животных (мес)	pH			+H ₂ O ₂	
	8,5 (контроль)	8,3	8,1	Отсутствие (контроль)	+ 10 мМ
1,5	4,2 ± 0,2	* 0	* 0	4,6 ± 0,8	* 9,1 ± 0,9
2,0	4,5 ± 0,6	* 8,9 ± 1,4	* 8,6 ± 0,7	4,2 ± 0,2	* 9,6 ± 1,4
12,0	3,0 ± 1,2	1,8 ± 0,4	3,2 ± 1,2	1,8 ± 0,2	* 6,4 ± 0,6

Примечание. * - достоверность статистических различий ($p < 0,05$) по отношению к показателям в контроле

Под влиянием перекиси водорода происходит резкое повышение альдегиддегидрогеназной активности в постмитохондриальной фракции сердца. Как следует из данных, представленных в таблице 3, активирующий эффект в большей мере выражен у 12-месячных, а в меньшей мере - у 1,5-месячных крыс.

Результаты проведенных исследований указывают на то, что альдегиддегидрогеназная активность постмитохондриальной фракции

сердца у крыс раннего пубертатного возраста проявляет наибольшую чувствительность к ингибирующему эффекту ацидоза и наименьшую чувствительность к активирующему действию перекиси водорода, чем у животных других возрастных групп. В позднем пубертатном возрасте характер ответа альдегиддегидрогеназной активности меняется, приближаясь к таковому у взрослых половозрелых животных. Причиной возрастной модуляции чувствительности альде-

гидрогеназной активности к регуляторному действию ацидоза и перекиси водорода могут быть особенности строения изоферментного спектра немитохондриальных альдегиддегидрогеназ в сердце на этапе полового созревания.

Таким образом, в раннем пубертатном возрасте в клетках сердца повышается чувствительность немитохондриальных форм альдегиддегидрогеназ к ингибирующему эффекту ацидоза и ограничение проявления на них активирующего действия перекиси водорода, по сравнению с взрослыми половозрелыми животными. Принимая во внимание характер полученных данных, можно предположить, что изменение ответа немитохондриальных альдегиддегидрогеназ на действие исследованных регуляторных факторов будет способствовать понижению эффективности окислительного катаболизма эндогенных альдегидов в кардиомиоцитах крыс пубертатного возраста в условиях стимуляции их образования при оксидативном стрессе. При этом возникающее в условиях иммобилизационного стресса повышение активности фермента в постмитохондриальной фракции сердца выступает в качестве своеобразного компенсаторного сдвига, направленного на предупреждение ограничения скорости утилизации эндогенных альдегидов при иммобилизационном стрессе. Однако насколько подобный сдвиг будет реализовываться в поддержание достаточной высокой эффективности окисления эндогенных альдегидов в условиях повышения скорости их образования при стрессе, требует специального изучения.

Выводы

1. Альдегиддегидрогеназная активность постмитохондриальной фракции сердца крыс пубертатного возраста аналогична таковой у взрослых половозрелых животных. В митохондриальной фракции сердца с увеличением возраста животных от 1,5 до 12 месяцев происходит постепенное понижение альдегиддегидрогеназной активности.

2. В постмитохондриальной фракции сердца у 1,5- и 2-месячных крыс в условиях продолжительной иммобилизации возникают разнонаправленные изменения со стороны альдегиддегидрогеназной активности, а в митохондриальной фракции она поддерживается на исходном уровне.

3. У крыс раннего пубертатного возраста альдегиддегидрогеназа постмитохондриальной фракции сердца проявляет наибольшую чувствительность к ингибирующему эффекту ацидоза и наименьшую чувствительность к активи-

рующему действию перекиси водорода, чем у животных других возрастных групп.

Литература. 1. Волкова Ю. В. Влияние иммобилизационного стресса на содержание продуктов свободно-радикального 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. Давыдов В. В., Божков А. И., Кульчицкий О. К. Физиологическая и патофизиологическая роль эндогенных альдегидов. - Saarbrücken: Palmarium Academic Publishing, 2012. - 240 с. 3. Корнев Н. М. Артериальная гипертензия у подростков / Н. М. Корнев // Прогнозування та профілактика артеріальної гіпертензії в дитячому та підлітковому віці: матеріали симп. - Х., 2001. - С. 3-7. 4. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца / Ф. З. Меерсон. - М.: Медицина, 1984. - 270 с. 5. Механизмы формирования инвалидности у детей с патологией системы кровообращения / Н. М. Корнев, Л. Ф. Богмат, С. Р. Толмачева [и др.] // Медико-соціальні аспекти реабілітації дітей-інвалідів: матеріали наук.-практ. конф. - Х., 2000. - С. 3-6. 6. Пирожков С. В., Панченко Л. Ф. Роль альдегиддегидрогеназ в метаболизме малонового диальдегида в печени крыс // Биохимия. - 1988. - Т. 53, № 9. - С. 1443 - 1448. 7. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart / C. H. Chen, G. R. Budas, E. N. Churchill [et al.] // Science. - 2008. - Vol. 321, N 5895. - P. 1455 - 1495. 8. Atrac C., Madnussen T. A. Procedure for the isolation of nor-adrenaline, adrenaline, dopamine, 5-hydroxytryptamine and histamine from the same tissues samples using a single column of strongly acid exchange resin / C. Atrac, T. A. Madnussen // Acta Pharmacol. Toxicol. - 1978. - Vol. 42. - P. 35 - 57. 9. Davydov V. V. Lipid peroxidation in the heart of adult and old rats during immobilization stress / V. V. Davydov, V. N. Shvets // Exp. Gerontol. - 2001. - Vol. 36. - P. 1155 - 1160. 10. Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells / I. Oshawa, K. Nishimaki, C. Yasuda [et al.] // J. Neurochem. - 2003. - Vol. 84, N 5. - P. 1110 - 1117. 11. Nayanatara A. K. The effect of repeated swimming stress on organ weights and lipid peroxidation in rats / A. K. Nayanatara, H. S. Nagaraja, B. K. Anupama // Thai J. Physiol. Sci. - 2005. - Vol. 18, № 1. - P. 3 - 9. 12. O'Brein P. J. O. Aldehyde sources metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health / P. J. O. O'Brein, A. G. Siraki, N. Shangari // Critical Reviews in Toxicology. - 2005. - Vol. 35. - P. 609 - 662. 13. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease / K. Uchida // Free Radical. Biol. Med. - 2000. - Vol. 28, N 12. - P. 1685 - 1696.

АКТИВНІСТЬ АЛЬДЕГІДДЕГІДРОГЕНАЗИ В СЕРДЦІ ЩУРІВ ПУБЕРТАТНОГО ВІКУ ТА ОСОБЛИВОСТІ ЇЇ МОДУЛЯЦІЇ ПРИ СТРЕСІ

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

Резюме. Показано, що в мітохондріальній фракції серця щурів із збільшенням віку відбувається зниження активності альдегиддегидрогенази, однак в постмитохондриальній фракції вона підтримується на однаковому рівні. При цьому фермент з постмитохондриальної фракції міокарда 1,5-місячних тварин проявляє найбільш високу чутливість до інгібувального ефекту ацидозу і найменшу - до активуючої дії перекиси водню, ніж у щурів інших вікових груп. В умовах тривалої імобілізації в постмитохондриальній фракції серця у 1,5- і 2-місячних тварин виникають різноспрямовані зміни з боку альдегиддегидрогеназної активності, а в мітохондріальній фракції вона підтримується на вихідному рівні.

Ключові слова: альдегиддегидрогеназа, імобілізаційний стрес, мітохондрії, міокард, пубертат.

ALDEHYDE DEHYDROGENASE ACTIVITY AND ITS MODULATION IN HEART OF RATS AT PUBERTAL AGE UNDER CONDITIONS OF STRESS

Yu. V. Volkova, L. L. Sukhova, V. V. Davydov

Abstract. The purpose of the present work was to study aldehyde dehydrogenase activity and its modulation in heart subcellular fractions of rats at pubertal age under conditions of immobilization stress. It has been shown that immobilization was accompanied by a change in mitochondrial fraction of heart. In 1,5-month-old rats the enzyme activity was higher than its value in 2- and 12- month-old rats. The enzyme activity in heart postmitochondrial fraction of rats at pubertal age was the same as the activity in adult rats. The enzyme in heart postmitochondrial fraction of 1,5-month-old rats was showing the highest sensitivity to the inhibitory effect of acidosis and the

smallest sensitivity to the activation effect of hydrogen peroxide. Under conditions of prolonged immobilization in heart postmitochondrial fractions of 1,5- and 2-month-old animals arise the opposite changes of aldehyde dehydrogenase activity.

Key words: aldehyde dehydrogenase, immobilization, mitochondria, myocardium, pubertal age.

Si "Institute of Children and Adolescent Health Care of NAMS of Ukraine", Kharkov

Clin. and experim. pathol. - 2014. - Vol.13, №4 (50).-P.131-135.

Надійшла до редакції 14.11.2014

Рецензент – проф. І.Ф. Мецишен

© Л.Л. Сухова, Ю.В. Волкова, В.В. Давыдов, 2014