

*“Пробл. старения и долголетия”, 2009, 18, № 2. — С. 166–173*

УДК [612.66+616-092]:577.15

## **ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ УТИЛИЗАЦИИ АЛЬДЕГИДОВ В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА КРЫС ПРИ СТРЕССЕ**

**Е. Р. Грабовецкая, В. В. Давыдов\***

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина,  
61077 Харьков

\*Государственное учреждение “Институт охраны здоровья детей  
и подростков АМН Украины”, 61153 Харьков

С целью углубления представлений о механизмах возрастного изменения устойчивости сердца к стрессу исследована активность ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в митохондриальной фракции миокарда 48 крыс разного возраста, подвергнутых им мобилизационному стрессу. Показано, что стресс 12- и 24-месячных крыс не сопровождается изменением активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в митохондриях сердца. У 2-месячных животных при этом происходит снижение альдегиддегидрогеназной и повышение альдегидредуктазной активности, а у 1,5-месячных крыс — снижение альдегиддегидрогеназной и повышение глутатионтрансферазной активности. Стressорная модуляция активности исследованных ферментов не сопровождается параллельным изменением концентрации ТБК-реактивных продуктов в митохондриальной фракции миокарда.

В процессе онтогенеза изменяется устойчивость сердца к действию повреждающих факторов стресса [5, 9]. Однако механизм этого феномена до настоящего времени окончательно не изучен. Вместе с тем известно, что одним из центральных и неспецифических звеньев стрессорного повреждения миокарда является стимуляция свободнорадикальных процессов, возникающая в кардиомиоцитах за счет усиления радикалообразования в митохондриях [2, 7, 15, 16].

---

© Е. Р. Грабовецкая, В. В. Давыдов (davydov@kharkov.com), 2009.

В процессе свободнорадикального окисления образуются многочисленные цитотоксические карбонильные продукты обмена, к числу которых относятся эндогенные альдегиды [18]. Исследования последних лет позволили установить важную роль ферментов их утилизации в защите клеток от свободнорадикального повреждения [6,8,14]. Однако до настоящего времени все еще не установлена роль этих энзимов в антистрессорной защите миокарда. Отсутствуют и сведения об их участии в защите сердца от стрессорных повреждений на разных стадиях онтогенеза и при формировании возрастной патологии. Выяснение данных вопросов приобретает особую роль в познании тонких механизмов изменения устойчивости сердца к стрессу на разных этапах онтогенеза и разработке новых подходов к ее коррекции.

С учетом вышесказанного цель настоящего исследования — изучение активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в митохондриальной фракции миокарда крыс разного возраста, подвергнутых иммобилизационному стрессу.

**Материал и методы.** Работа выполнена на 48 крысах-самцах линии Вистар четырех возрастных групп, содержавшихся на стандартном рационе питания вивария: 1 — 1,5-месячные (ранний пубертат), 2 — 2-месячные (поздний пубертат), 3 — 12-месячные (взрослые половозрелые), 4 — 24-месячные (старые). В свою очередь, животных каждой возрастной группы подразделяли на 2 подгруппы: 1 — интактные и 2 — крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу. С этой целью животных привязывали к неподвижной опоре на 5 ч в день в течение 2 сут. Эффективность воспроизведения стресса оценивали по уровню 11-ОКС в крови [4].

Эвтаназию проводили непосредственно после прекращения иммобилизации путем декапитации под легким эфирным наркозом. 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 сахарозу (0,25 моль/л) и Трис (0,01 моль/л), pH 7,4. Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали 10 мин при 1000 g. Супернатант повторно центрифугировали 20 мин при 10000 g. Осадок промывали средой гомогенизации при том же режиме центрифugирования, супензировали в среде гомогенизации и использовали в качестве грубой митохондриальной фракции. Все процедуры проводили при 4–6 °C.

В митохондриальной фракции сердца определяли активность NADH-зависимой альдегидредуктазы (АР) [КФ1.1.1.21.] [19], NAD<sup>+</sup>-зависимой альдегиддегидрогеназы (АлДГ) [КФ1.2.1.4.] [3], глутатион-S-трансферазы (ГТ) [КФ 2.5.1.18.] [12], а также содержание карбонилированных белков (КБ) [1] и веществ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивные продукты — ТБК-РП) [13]. Концентрацию белка в пробах определяли методом Лоури.

Результаты исследований статистически обрабатывали с использованием непараметрического метода Вилкоксона — Манна — Уитни.

**Результаты и их обсуждение.** Проведенные исследования показали, что активность ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения эндогенных альдегидов (АлДГ и АР) в митохондриях миокарда крыс всех возрастных групп, превышает активность ГТ (таблица). При этом у животных 1,5-, 12- и 24-месячного возраста величина АР-активности значительно выше величины АлДГ-активности, тогда как у 2-месячных крыс она одинакова.

С возрастом ГТ-активность митохондрий постепенно снижается, достигая минимального значения при старении. При этом АР-активность у 1,5- и 24-месячных животных находится на одинаковом уровне и значительно превышает таковую у 2- и 12-месячных крыс. Максимальная величина АлДГ-активности выявляется в 2-месячном возрасте, а минимальная — у взрослых животных. С возрастом сдвиги активности исследованных энзимов сопровождаются постепенным повышением соотношения АлДГ- и ГТ-активности (АлДГ/ГТ) митохондрий миокарда (рис. 1).

При стрессе в митохондриальной фракции сердца крыс разных возрастных групп возникают разнонаправленные изменения активности ферментов метаболизма эндогенных альдегидов. У 1,5-месячных животных

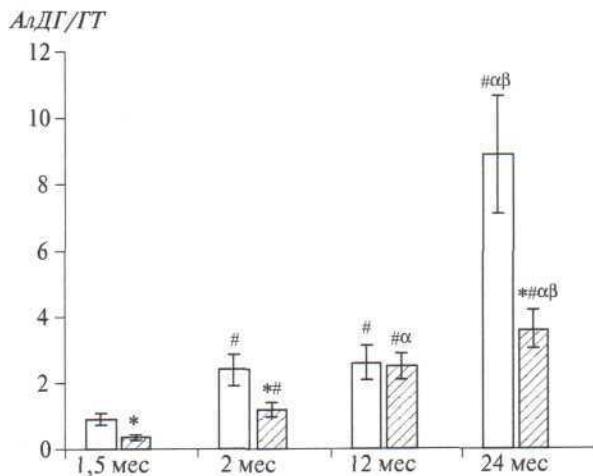


Рис. 1. АлДГ/ГТ в митохондриальной фракции миокарда крыс ( $n = 5-6$ ) разного возраста при иммобилизационном стрессе: светлые столбики — интактные, заштрихованные — стресс; \* —  $P < 0,05$  по сравнению с интактными, # —  $P < 0,05$  по сравнению с 1,5-месячными,  $\alpha$  —  $P < 0,05$  по сравнению с 2-месячными,  $\beta$  —  $P < 0,05$  по сравнению с 12-месячными.

**Активность ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в митохондриальной фракции миокарда крыс разного возраста при стрессе, нмоль/(мин·мг белка)**

Фермент	1,5-месячные		2-месячные		12-месячные		24-месячные	
	интактные	стресс	интактные	стресс	интактные	стресс	интактные	стресс
ГТ	1,3 ± 0,2	2,0 ± 0,2*	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,2	0,47 ± 0,05 <sup>#α</sup>	0,32 ± 0,05 <sup>#α</sup>	0,34 ± 0,10 <sup>#α</sup>	0,50 ± 0,10 <sup>#α</sup>
АР	7,2 ± 0,5	6,7 ± 1,0	1,7 ± 0,5*	9,0 ± 0,8**	1,7 ± 0,1*	2,1 ± 0,2 <sup>#α</sup>	5,6 ± 1,1 <sup>#β</sup>	9,0 ± 0,6** <sup>#β</sup>
АлДГ	1,5 ± 0,1	0,74 ± 0,04*	2,55 ± 0,11*	1,38 ± 0,27**	0,42 ± 0,08 <sup>#α</sup>	0,44 ± 0,08 <sup>#α</sup>	1,57 ± 0,32 <sup>#β</sup>	1,65 ± 0,08 <sup>#β</sup>

*Примечания:*\* —  $P<0,05$  по сравнению с интактными соответствующего возраста, \*\* —  $P<0,05$  по сравнению с 1,5-месячными соответствующего возраста, <sup>#</sup> —  $P<0,05$  по сравнению с 2-месячными соответствующего возраста, <sup>α</sup> —  $P<0,05$  по сравнению с 12-месячными соответствующего возраста.

при иммобилизации происходит повышение ГТ- и снижение АлДГ-активности (на 54 % и 51 %, соответственно) по сравнению с их исходным уровнем. Иммобилизация 2-месячных крыс сопровождается увеличением АР- и снижением АлДГ-активности (на 429 % и 46 %, соответственно) по сравнению с интактными животными. В то же время, у 12- и 24-месячных крыс после иммобилизации вообще не выявляется изменений активности исследованных энзимов в митохондриях, хотя у старых животных при этом формируется выраженная тенденция к их активации.

Результаты проведенных исследований указывают на особое значение окисительно-восстановительных путей в катаболизме карбонильных продуктов метаболизма в митохондриях миокарда. При этом, судя по величине ферментативной активности, основной вклад в утилизацию альдегидов вносит их восстановление в АР-реакции. В то же время, конъюгация альдегидов с глутатионом не играет в митохондриях той роли в обмене альдегидов, которая характерна для нее в цитозоле клеток [6, 17]. Более того, значение этого пути в митохондриях в процессе индивидуального развития постепенно снижается.

С возрастом происходит модуляция активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов. Одной из причин этого может быть изменение их изоферментного спектра за счет появления возрастных особенностей в экспрессии соответствующих генов.

Возрастная модуляция ферментативной активности способствует формированию сдвигов скорости катаболизма эндогенных альдегидов в сердце. При этом, как следует из представленных выше результатов, в митохондриях миокарда 1,5- и 24-месячных крыс возникают условия для эффективной утилизации карбонильных

продуктов обмена веществ. В то же время, у 12-месячных животных формируются предпосылки для снижения скорости катаболизма эндогенных альдегидов из-за частичного ингибиования ферментов, катализирующих их превращения.

При иммобилизационном стрессе у крыс разного возраста не изменяется активность ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в митохондриях миокарда. При этом у взрослых животных в условиях стрессорной стимуляции образования карбонильных продуктов обмена возникают предпосылки для их накопления в митохондриях. В то же время, у старых крыс в связи с большей величиной каталитической активности данных ферментов формируется более благоприятная ситуация с утилизацией эндогенных альдегидов, чем у взрослых животных.

У крыс пубертатного возраста при стрессе возникают разнонаправленные изменения активности исследованных энзимов в митохондриях. Вместе с тем, принимая во внимание роль редуктазного пути в катаболизме альдегидов, можно предположить стрессорную стимуляцию их утилизации в возрасте позднего пубертата.

Таким образом, с возрастом появляются особенности модуляции активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в митохондриях миокарда при стрессе, которые предопределяют формирование возрастных различий в стрессорном накоплении в них карбонильных продуктов метаболизма. Для проверки этого предположения в митохондриальной фракции сердечной мышцы иммобилизованных крыс разного возраста было проведено изучение концентрации ТБК-РП.

Исследования показали, что у старых животных при стрессе не изменяется содержание ТБК-РП, в то время как у взрослых крыс оно существенно снижается по сравнению с исходным уровнем (рис. 2). Максимальный же уровень накопления ТБК-РП в митохондриях миокарда при стрессе выявляется у 1,5-месячных животных: он в 1,7 раза выше, чем у 2-месячных.

Представленные выше данные позволяют прийти к однозначному заключению о том, что возрастные сдвиги ферментативной активности не находят реализации в изменении содержания эндогенных альдегидов в митохондриях миокарда при стрессе. Одной из причин этого может быть неодинаковый уровень стрессорной стимуляции свободнорадикальных процессов в сердце крыс разного возраста. Для проверки этого предположения в митохондриальной фракции миокарда иммобилизованных животных была изучена концентрация КБ-маркеров оксидативного стресса [10,11].

Исследования показали, что у крыс всех возрастных групп после иммобилизации происходит увеличение содержания КБ в митохондриях миокарда (см. рис. 2). Однако выраженность этого сдвига у них различается: у 1,5-месячных животных уровень их накопления имеет минимальную, а у 2-месячных — максимальную величину по сравнению с крысами других возрастных групп.

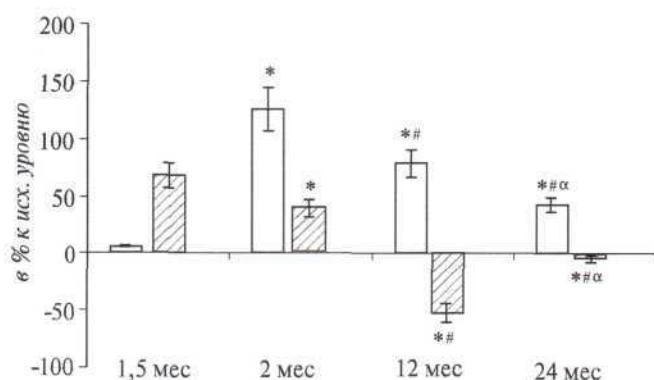


Рис. 2. Изменения концентрации КБ (светлые столбики) и ТБК-РП (заштрихованные столбики) в митохондриях сердца крыс разного возраста при иммобилизационном стрессе; \* —  $P<0,05$  по сравнению с 1,5-месячными, \*\* —  $P<0,05$  по сравнению с 2-месячными, \*\*\* —  $P<0,05$  по сравнению с 12-месячными.

Таким образом, минимальные проявления оксидативного стресса у 1,5-месячных иммобилизованных крыс со сравнительно высокой активностью ферментов катаболизма эндогенных альдегидов сопровождаются максимальным накоплением карбонильных продуктов в митохондриях. В то же время, у 2-месячных животных в условиях формирования выраженных проявлений оксидативного стресса уровень накопления карбонильных продуктов в митохондриях сердца при иммобилизации существенно ниже, чем у 1,5-месячных крыс. У взрослых животных, несмотря на сравнительно низкую активность ферментов катаболизма альдегидов и выраженные проявления оксидативного стресса при иммобилизации, снижается уровень ТБК-РП в митохондриях. Сходная по характеру (но выраженная в меньшей мере) ситуация возникает при стрессе и у старых животных.

Оценивая вероятные причины обнаруженных "несоответствий", следует иметь в виду, что концентрация метаболитов определяется не только скоростью их утилизации, но и синтеза. В этой связи представляется логичным предположение об особом значении процессов синтеза карбонильных продуктов обмена в изменении их содержания в митохондриях при стрессе. Большая интенсивность этих процессов в пубертатном возрасте может быть связана с возрастными различиями в жирно-кислотном составе фосфолипидов митохондриальных мембран [18]. Более того, снижение скорости образования карбонильных продуктов метаболизма в условиях стимуляции свободнорадикальных процессов при стрессе у взрослых и старых крыс, по-видимому, объясняет причину отсутствия у них сдвигов активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в митохондриях.

Вышеизложенное позволяет прийти к заключению о том, что ферментативная система утилизации эндогенных альдегидов играет неодинаковую роль в защите митохондрий миокарда от свободнорадикального повреждения при стрессе на разных этапах онтогенеза. У взрослых и старых крыс она ниже, чем у животных пубертатного возраста. Более того, катализическая мощность этой ферментативной системы у крыс, находящихся на разных стадиях пубертата, при стрессе тоже существенно различается. В раннем пубертатном возрасте формируются предпосылки для понижения эффективности ее функционирования. Следствием этого становится повышение чувствительности сердца 1,5-месячных животных к действию прооксидантных факторов стресса по сравнению с 2-месячными. Вместе с тем, механизмы формирования возрастных различий в проявлении защитной роли ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в митохондриях сердца при стрессе не ясны. Их изучение составит предмет наших дальнейших исследований.

Исследования выполнены при поддержке Министерства образования и науки Украины (грант М/348-2008).

### Литература

1. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков плазмы крови больных с психиатрическими расстройствами // Вопр. мед. химии. — 2000. — № 4. — С. 36–47.
2. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М.: Медицина, 1984. — 270 с.
3. Пирожков С. В., Панченко Л. Ф. Роль альдегиддегидрогеназ в метаболизме малонового диальдегида в печени крыс // Биохимия. — 1988. — 53, № 9. — С. 1443–1448.
4. Резников А. Г. Методы определения гормонов. — Киев: Наук. думка, 1980. — 536 с.
5. Фролькис В. В., Безруков В. В., Кульчицкий О. К. Старение и экспериментальная возрастная патология сердечно-сосудистой системы. — Киев: Наук. думка, 1994. — 320 с.
6. Chen J. J., Yu B. P. Detoxication of reactive aldehydes in mitochondria: effect of age and dietary restriction // Aging (Milano). — 1996. — 8, № 5. — P. 334–340.
7. Davydov V. V., Shvets V. N. Age-dependent differences in the stimulation of lipid peroxidation in the heart of rats during immobilization stress // Exp. Gerontol. — 2003. — 38, № 6. — P. 693–698.
8. Davydov V. V., Dobaeva N. M., Bozhkov A. N. Possible role of alteration of aldehyde's scavenger enzymes during aging // Exp. Gerontol. — 2004. — 39, № 1. — P. 11–16.
9. Lakatta E. G. Heart aging: a fly in the ointment // Circ. Res. — 2001. — 88. — P. 984–986.
10. Levine R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease // Free Radic. Biol. Med. — 2002. — 32, № 9. — P. 790–796.
11. Levine R. L., Stadtman E. R. Oxidative modification of proteins during aging // Exp. Gerontol. — 2001. — 36, № 9. — P. 1495–1502.
12. Mannervik B., Guthenberg C. Glutathione transferase // Methods Enzymology. — 1981. — 77. — P. 231–235.
13. Muller G., Fruhant A., Mathias B. Thiobarbiturase-positive Substanzen als Indikatoren der Lipid peroxidation // Z. Gezamte Med. — 1986. — 41, № 24. — S. 673–676.

14. *Muzio G., Trombetta A., Maggiora M. et al.* Arachidonic acid suppresses growth of human lung tumor A549 cells through down-regulation of ALDH3A1 expression // Free Radic. Biol. Med. — 2006. — **40**, № 11. — P. 1229–1238.
15. *Sahin E., Gumuslu S.* Immobilization stress in rat tissues: alteration of protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system // Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. — 2007. — **144**, № 4. — P. 324–347.
16. *Sahin E., Gumuslu S.* Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models // Exp. Pharmacol. Physiol. — 2007. — **34**, № 5–6. — P. 425–431.
17. *Singh S. P., Janecki A. J., Srivastava S. K. et al.* Membrane association of glutathione S-transferase mGSTA4-4, an enzyme that metabolizes lipid peroxidation products // J. Biol. Chem. — 2002. — **277**, № 6. — P. 4232–4239.
18. *Spiteller G.* Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases // Exp. Gerontol. — 2001. — **36**, № 9. — P. 1425–1457.
19. *Srivastava S., Liu S. Q., Conklin D. J. et al.* Involvement of aldose reductase in the metabolism of atherogenic aldehydes // Chem. Biol. Interact. — 2001. — **130–132**, № 1–3. — P. 563–571.

Поступила 24.10.2008

## AGE PECULIARITIES OF CHANGES IN THE ACTIVITY OF ALDEHYDE SCAVENGER ENZYMES IN THE HEART MITOCHONDRIA OF RATS DURING STRESS

E. R. Grabovetskaya, V. V. Davydov\*

V. N. Karazin Kharkov National University, 61077 Kharkov  
\*State Institution "Institute of Children and Adolescent Health  
AMS Ukraine", 61153 Kharkov

The activity of aldehyde scavenger enzymes in cardiac mitochondria of 48 rats of different age during immobilization stress was studied to improve knowledge about mechanisms of age changes of heart stability to stress. The results obtained showed that immobilization of 12- and 24-month-old rats was not accompanied by any changes in the activity of these enzymes in heart mitochondria. The immobilization of 2-month-old rats was accompanied by a decrease in aldehyde dehydrogenase activity and increase in aldehyde reductase activity, whereas the immobilization of 1.5-month-old rats was accompanied by a decrease of aldehyde dehydrogenase activity and increase of glutathione transferase activity. Stress-induced modulation of those enzymes was not accompanied by parallel changes in the concentration of TBA-reactive metabolites in the mitochondrial fraction of the myocardium.