

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского

Серия «Биология, химия». Том 24 (63). 2011. № 4. С. 3-10.

УДК [612.66+616-092.19]:577.15

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ КАТАБОЛИЗМА ЭНДОГЕННЫХ АЛЬДЕГИДОВ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ПЕЧЕНИ, СЕРДЦА И ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПУБЕРТАТНОГО ВОЗРАСТА

Бережная Е.А.¹, Сухова Л.Л.¹, Грабовецкая Е.Р.², Давыдов В.В.¹

¹ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков НАМН Украины», Харьков, Украина

²Харьковский национальный медицинский университет МОЗ Украины, Харьков, Украина
E-mail: ilais7@mail.ru, vaddavydov@mail.ru

Исследования показали, что у животных первого года жизни активность альдокеторедуктаз (альдегидредуктазы и альдозоредуктазы) в постмитохондриальной фракции мозга находится на одинаковом уровне, а активность альдегиддегидрогеназы ниже, чем у взрослых. Активность альдегиддегидрогеназы в печени и сердце крыс всех исследованных возрастных групп существенно не различается. В митохондриальной фракции животных пубертатного возраста активность данного фермента имеет тканеспецифические особенности. Высказывается предположение, что выявленные особенности возрастной динамики активности ферментов способствуют понижению устойчивости внутренних органов к оксидативному стрессу в пубертатном возрасте.

Ключевые слова: альдегиддегидрогеназа, альдозоредуктаза, альдегидредуктаза, пубертат, печень, сердце, мозг.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что в пубертатном возрасте повышается чувствительность тканей внутренних органов к оксидативному стрессу [1, 2]. Одним из последствий этого может быть повышение заболеваемости подростков патологией сердечнососудистой системы, желудочно-кишечного тракта, центральной нервной системы и др. [3–5]. По всей вероятности, особое значение в возникновении подобного феномена приобретает возрастная модуляция активности ферментов, катализирующих реакции катаболизма карбонильных продуктов свободнорадикального окисления, выступающих в роли своеобразных мессенджеров повреждения клеток [6, 7]. К числу подобных ферментов относятся альдегиддегидрогеназы и альдокеторедуктазы (альдегидредуктазы и альдозоредуктазы), катализирующие пути превращения карбонильных продуктов обмена в окислительно-восстановительных реакциях [8, 9]. Вместе с тем, до настоящего времени все еще отсутствуют четкие представления о динамике активности этих ферментов в субклеточных фракциях клеток тканей внутренних органов на этапе полового созревания. Учитывая это, целью работы

явилось изучение альдегиддегидрогеназной, альдозоредуктазной и альдегидредуктазной активности в субклеточных фракциях печени, сердца и головного мозга крыс пубертатного возраста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 57 крысах самцах линии Вистар четырех возрастных групп: 1 – 1,5-месячные (ранний пубертат), 2 – 2-месячные (поздний пубертат); 3 – 3-месячные (ранний половозрелый возраст) и 4 – 12-месячные (взрослые половозрелые), которых содержали на стандартном рационе питания вивария.

Эвтаназию проводили путем декапитации под легким эфирным наркозом. Извлекали печень, сердце и головной мозг. Помещали их в охлажденный изотонический раствор хлористого натрия. Навески тканей печени, миокарда и больших полушарий головного мозга измельчали ножницами и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвегейма в соотношении 1:10 (масса/объем) с раствором, содержащим 0,25 М сахарозы (печень, миокард) или 0,32 М сахарозы (мозг) и 0,01М Трис (рН 7,4). 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 работе в качестве постмитохондриальной (пмтх) фракции. Осадок проб миокарда и печени 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 печени, сердца и мозга определяли активность NAD-зависимой альдегиддегидрогеназы [10] и NADH-альдегидредуктазы с использованием глутарового альдегида в качестве субстрата [11], а также альдозоредуктазы [12]. Концентрацию белка в пробах измеряли по методу Лоури [13].

Результаты экспериментальных исследований подвергались статистической обработке по методу Wilcoxon-Mann-Whitney. Расхождения между данными считались достоверными при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из данных, представленных в Таблице 1, следует, что альдегиддегидрогеназная активность в постмитохондриальной фракции печени и сердца у 1,5-, 2- и 12-месячных крыс существенно не различается. В тоже время в печени и сердце 3-месячных животных ее величина оказывается на 27% и 26% соответственно ниже, чем у 12-месячных.

В митохондриальной фракции печени 3- и 12-месячных крыс альдегиддегидрогеназная активность одинакова, тогда как у 1,5-месячных животных ее величина на 26 % ниже, а у 2-месячных – на 127% выше, чем у 12-месячных крыс. В митохондриальной фракции миокарда 1,5-, 2- и 3-месячных животных альдегиддегидрогеназная активность выше на 319%, 85% и 190% соответственно, чем у 12-месячных крыс.

Возрастные сдвиги в величине альдегиддегидрогеназной активности в субклеточных фракциях печени и сердца, обуславливают появление изменений ее соотношения в постмитохондриальной и митохондриальной фракции исследованных органов. При этом, как следует из данных представленных на рисунке 1, в печени 1,5-месячных животных альдегиддегидрогеназная активность существенно преобладает в постмитохондриальной фракции. В 2-месячном возрасте резко повышается вклад митохондриальных ферментов в общую альдегиддегидрогеназную активность клеток печени. Однако к 12-месячному возрасту роль немитохондриальных энзимов альдегиддегидрогеназы снова постепенно повышается.

Таблица 1
Альдегиддегидрогеназная активность (нмоль/мг белка·мин) в субклеточных фракциях печени, сердца и головного мозга крыс разного возраста (Me±Se, n=5-8)

орган		возраст			
		1,5 мес	2 мес	3 мес	12 мес
печень	пмтх	11,5±0,6	9,5±0,9	9,1±0,5*	12,4±0,7
	мтх	2,1±0,2*	7,5±0,7*	4,4±0,5	3,3±0,2
сердце	пмтх	5,2±0,6	7,3±0,4	5,9±0,2*	8,0±0,7
	мтх	130,0±14,5*	57,1±6,4*	89,3±9,6*	30,8±3,3
мозг	пмтх	0,8±0,014	0,4±0,1	0,3±0,1	1,0±0,08

Примечание: * - $p < 0,05$ к интактным 12-месячным крысам.

(пмтх – постмитохондриальная фракция, мтх – митохондриальная фракция)

В отличие от печени, в сердечной мышце 1,5-месячных крыс основной вклад в альдегиддегидрогеназную активность кардиомиоцитов вносят митохондриальные альдегиддегидрогеназы. С увеличением возраста животных до 12 месяцев, повышается вклад немитохондриальных ферментов.

В постмитохондриальной фракции головного мозга животных 12-месячного возраста активность альдегиддегидрогеназы выше, чем у крыс младших возрастных групп. При этом у животных 2- и 3-месячного возраста ее величина на 56% и 72% соответственно ниже, чем у взрослых половозрелых крыс.

В Таблицах 2 и 3 представлены результаты исследований активности альдокеторедуктаз в постмитохондриальной фракции исследованных внутренних органов. Из них следует, что в процессе увеличения возраста крыс от 1,5 до 12 месяцев у них происходит изменение активности обоих исследованных энзимов в печени.

Как видно из Таблицы 2, в постмитохондриальной фракции печени животных пубертатного возраста (1,5 – 2 месяца) альдегидредуктазная активность выше, чем у взрослых половозрелых крыс. Аналогичная ситуация характерна и для альдозоредуктазной активности. При этом у животных, находящихся на стадии раннего (1,5 месяца) и позднего (2 месяца) пубертата величина альдегидредуктазной и альдозоредуктазной активности существенно не различаются.

Таблица 2
Альдегидредуктазная активность (нмоль/мг белка·мин) в
постмитохондриальной фракции печени, сердца и головного мозга крыс
разного возраста (Me±Se, n=5-8)

орган	возраст			
	1,5 мес	2 мес	3 мес	12 мес
печень	6,82±0,31*	10,15±0,99*	6,81±0,83	5,51±0,429
сердце	2,31±0,23	2,75±0,22	0,50±0,07*	3,60±0,40
мозг	1,0±0,2	1,0±0,2	0,7±0,1	1,1±0,3

Примечание: *- p < 0,05 к интактным 12-месячным крысам.

Таблица 3
Альдозоредуктазная активность (нмоль/мг белка·мин) в
постмитохондриальной фракции печени, сердца и головного мозга крыс
разного возраста (Me±Se, n=5-8)

орган	возраст			
	1,5 мес	2 мес	3 мес	12 мес
печень	6,60±0,18*	7,30±0,34*	8,42±0,66*	3,37±0,39
сердце	2,17±0,08*	2,00±0,12*	1,18±0,12	1,25±0,16
мозг	0,6±0,1	1,2±0,3	0,9±0,2	0,8±0,1

Примечание: *- p < 0,05 к интактным 12-месячным крысам.

Сравнительный анализ соотношения альдегидредуктазной и альдозоредуктазной активности (AP/АзР) указывает на то, что при увеличении возраста животных от 1,5 до 12 месяцев у них происходит постепенное повышение величины данного индекса (рис. 1).

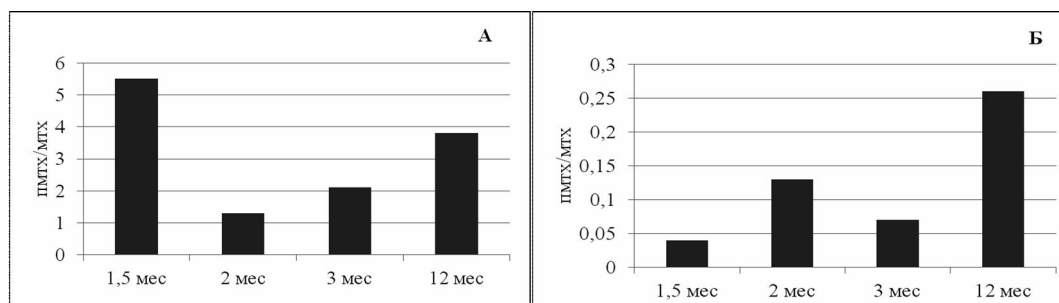


Рис. 1. Величина соотношения альдегидредуктазной активности в постмитохондриальной и митохондриальной фракциях (пмтх/мтх) печени (А) и сердца (Б) крыс разного возраста.

Альдегидредуктазная активность в сердце взрослых половозрелых крыс выше альдозоредуктазной активности, что не характерно для животных пубертатного возраста. При этом у 1,5- и 2-месячных крыс активность альдегидредуктазы в сердце

соответствует таковой у 12-месячных, тогда как альдозоредуктазная активность постмитохондриальной фракции сердца у них на 74 % и 61 % соответственно выше, чем у взрослых интактных животных. В этой связи у 12-месячных крыс происходит повышение индекса соотношения АР/АзР в постмитохондриальной фракции сердца, по сравнению с его величиной у крыс пубертатного возраста (рис. 2).

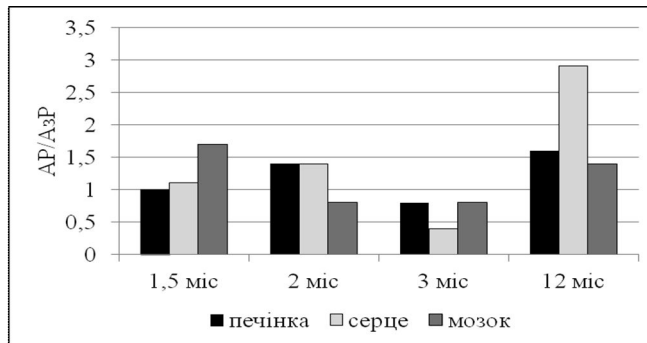


Рис. 2. Динамика изменения соотношения альдегидредуктазной и альдозоредуктазной активности (АР/АзР) в постмитохондриальной фракции печени, сердца и мозга крыс разного возраста

В отличие от печени и сердца, активность альдегидредуктазы и альдозоредуктазы в постмитохондриальной фракции мозга крыс первого года жизни находится на одинаковом уровне (табл. 2, 3).

Изучение базальной активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов у крыс первого года жизни позволило выявить некоторые тканеспецифические особенности ее возрастной динамики. Установлено, что в постмитохондриальной фракции печени крыс пубертатного возраста альдозоредуктазная и альдегидредуктазная активность имеют большую величину, чем у взрослых половозрелых животных, тогда как активность альдегиддегидрогеназы у них соответствует таковой у 12-месячных крыс. В тоже время альдегиддегидрогеназная активность митохондрий печени у 2-месячных животных более чем в два раза выше, чем у взрослых, а у 1,5-месячных крыс она значительно ниже, чем у 2- и 12-месячных.

Подобно тому, как и в печени, альдозоредуктазная активность постмитохондриальной фракции сердца крыс пубертатного возраста выше, чем у взрослых животных. При этом альдегидредуктазная и альдегиддегидрогеназная активность у них соответствует, а активность митохондриальных альдегиддегидрогеназ – даже значительно выше таковой у взрослых половозрелых крыс.

Сравнительный анализ полученных данных позволяет выявить тот факт, что изменения в активности альдокеторедуктаз у крыс первого года жизни сопровождаются постепенным повышением индекса АР/АзР в постмитохондриальной фракции печени и сердца. Его величина достигает своего максимального значения у 12-месячных животных. Причиной возникновения данного феномена могут быть возрастные особенности экспрессии генов альдозо- и альдегидредуктаз. Результаты проведенных исследований косвенно указывают на

преобладание в клетках печени и кардиомиоцитах животных, находящихся на этапе полового созревания, экспрессии генов альдозоредуктаз, тогда как к 12-месячному возрасту в них существенно повышается экспрессия альдегидредуктаз.

Помимо возрастных сдвигов в активности ферментов, катализирующих восстановительный путь катаболизма карбонильных метаболитов, в период развития животных от 1,5 до 12 месяцев у них происходит характерное изменение величины соотношения альдегиддегидрогеназной активности в субклеточных фракциях печени и сердца. Оно отражает повышение доли митохондриальных ферментов в общей альдегиддегидрогеназной активности клеток печени у 2-месячных животных, по сравнению с таковой у 1,5- и 12-месячных. В отличие от печени, максимальный вклад митохондриальных альдегиддегидрогеназ в общую альдегиддегидрогеназную активность кардиомиоцитов выявляется уже в раннем пубертатном возрасте. У взрослых животных многократно повышается доля немитохондриальных энзимов в общей альдегиддегидрогеназной активности кардиомиоцитов.

Все выше изложенное позволяет прийти к заключению о том, что внутриклеточное распределение альдегиддегидрогеназной активности в печени и сердце крыс раннего пубертатного возраста отличается от такового у животных в возрасте позднего пубертата и взрослых половозрелых крыс. В основе этого могут лежать особенности регуляции экспрессии генов изоферментов альдегиддегидрогеназ в периоде полового созревания за счет становления секреции гормонов целого ряда эндокринных желез на этом этапе онтогенеза.

Возрастные сдвиги в экспрессии генов альдокеторедуктаз, позволяют обеспечить достаточно высокий базальный уровень активности ферментов, катализирующих утилизацию эндогенных альдегидов в окислительно-восстановительных путях метаболизма в клетках печени и сердца в пубертатном возрасте. Однако относительно печени, это в большей мере касается животных, находящихся на поздней стадии полового созревания. Причиной является ограничение у крыс раннего пубертатного возраста альдегиддегидрогеназной активности в митохондриях гепатоцитов, что создает определенные предпосылки к ограничению в них скорости окисления эндогенных альдегидов. Вместе с тем следует заметить, что подобный возрастной сдвиг в определенной мере может компенсироваться переключением утилизации карбонильных продуктов свободнорадикального окисления на восстановительный путь катаболизма за счет повышения у 1,5-месячных животных активности альдокеторедуктаз.

Таким образом, в клетках печени и сердца животных пубертатного возраста формируются условия для эффективной утилизации карбонильных метаболитов в окислительно-восстановительных реакциях. Причиной того может быть модуляция экспрессии генов изоферментов альдегиддегидрогеназ и альдокеторедуктаз на этапе полового созревания.

В отличие от печени и сердца, в постмитохондриальной фракции мозга у крыс пубертатного возраста выявляется более низкий уровень альдегиддегидрогеназной активности, чем у взрослых животных. В то же время активность ферментов, катализирующих восстановительный путь утилизации эндогенных альдегидов

(альдегидредуктазы и альдозоредуктазы) в мозге крыс первого года жизни находится на одинаковом уровне.

Оценка возможных причин ограничения альдегиддегидрогеназной активности в постмитохондриальной фракции мозга, позволяет предположить их возникновение с возрастными различиями в структуре изоферментного спектра немитохондриальных альдегиддегидрогеназ в нервных клетках. По всей вероятности, через определенное время после завершения периода полового созревания в изоферментном спектре альдегиддегидрогеназ клеток больших полушарий головного мозга повышается экспрессия изоферментов с большей активностью. В этой связи в пубертатном возрасте, особенно в условиях стимуляции образования карбонильных продуктов свободнорадикального окисления при оксидативном стрессе, формируются предпосылки для ограничения скорости утилизации эндогенных альдегидов. Одним из последствий того может быть понижение устойчивости головного мозга к оксидативному стрессу на данном этапе онтогенеза [1, 2].

Выявленные особенности возрастной динамики активности энзимов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения эндогенных альдегидов, позволяют предположить вероятность их участия в понижении устойчивости головного мозга, не печени и сердца, к оксидативному стрессу в пубертатном возрасте. Однако следует иметь в виду, что реализация сдвига со стороны ферментативной активности в понижение скорости окисления эндогенных альдегидов *in situ* может предупреждаться за счет стимуляции других путей их катаболизма. Более того, в условиях оксидативного стресса в клетках могут возникать условия для компенсаторной активации альдегиддегидрогеназ и альдокеторедуктаз. В этой связи высказанное предположение требует серьезной экспериментальной проверки, чему и будут посвящены наши дальнейшие исследования.

ВЫВОДЫ

1. В виду высокого уровня базальной активности альдегиддегидрогеназ и альдокеторедуктаз в печени и сердце животных пубертатного возраста формируются условия для эффективной утилизации карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в окислительно-восстановительных реакциях.
2. У животных первого года жизни активность альдокеторедуктаз в постмитохондриальной фракции мозга находится на одинаковом уровне, а активность альдегиддегидрогеназы у крыс пубертатного возраста ниже, чем у взрослых крыс. Возрастное понижение альдегиддегидрогеназной активности способствует ограничению скорости окисления карбонильных продуктов обмена в мозге крыс пубертатного возраста и повышению его чувствительности к оксидативному стрессу.

Список литературы

1. Волкова Ю.В. Влияние иммобилизационного стресса на содержание продуктов свободнорадикального 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. Волкова Ю.В. Влияние иммобилизационного стресса на свободнорадикальное окисление белков и липидов в субклеточных фракциях печени крыс разного возраста / Ю.В. Волкова, В.В. Давыдов // Эксперимен. і клініч. Медицина. – 2009. – № 2. – С. 16–22.
3. Коренев Н.М. Механизмы формирования инвалидности у детей с патологией системы кровообращения / Н.М. Коренев, Л.Ф. Богмат, С.Р. Толмачева // Медико-соціальні аспекти реабілітації дітей-інвалідів: матеріали наук.-практ. конф. Харьков. – 2000. – С. 3–6.
4. Коренев М.М. Артериальная гипертензия у подростков / Н.М. Коренев // Прогнозування та профілактика артеріальної гіпертензії в дитячому та підлітковому віці: матеріали симп. – Харьков. – 2001. – С. 3–7.
5. Коренев М.М. Клініко-гемодинамічні показники формування церебральних порушень у підлітків з первинною артеріальною гіпертензією / М.М. Коренев, О.М. Носова // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2002. – № 2. – С. 15–18.
6. Spycher S. 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal induces transcription and expression of aldose reductase / S. Spycher // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – Vol. 226, № 2. – P. 512–516.
7. Koch Y.H. Aldehyde reductase gene expression by lipid peroxidation end products, MDA and HNE / Y.H. Koch, Y.S. Park, M. Takahashi // Free Radic. Res. – 2000. – Vol. 336. – P. 739–746.
8. Landahl R. Lipid aldehyde oxidation as a physiological role for class 3 aldehyde dehydrogenases / R. Landahl, D. Petersen // Biochem. Pharmacol. – 1991. – Vol. 41, № 11. – P. 1583–1587.
9. Aldose reductase-catalyzed reduction of aldehyde phospholipids / Srivastava S. [et al.] // J. Biochem. 2004. – Vol. 279, № 51. – P. 53395–53435.
10. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase attenuates hyperoxia-induced cell death through activation of ERK/MAPK and PI3K-Akt pathways in lung epithelial cells. / X. Dong, J. Guthrie, S. Mabry [et al.] // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2006. – P. 291.
11. Ellis E.M. Substrate specificity of an aflatoxin-metabolizing aldehyde reductase / E.M. Ellis, J.D. Hayes // Biochem J. 1995 December 1. – 312(Pt 2). – P. 535–541.
12. Aldose Reductase Induced by Hyperosmotic Stress Mediates Cardiomyocyte Apoptosis / A.S. Galvez, J.A. Ulloa, M. Chiong [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278, № 40. – P. 38484–38494.
13. Protein measurement with the Pholin phenol reagent / O.H. Lowry, Rosenbrough, A.L. Farr, R.I. Rendall // J.Biol.Chem. – 1955. – Vol. 193, No 1. – P.265–267

Бережна О.А. Активність ферментів катаболізму ендогенних альдегідів в субклітинних фракціях печінки, серця і головного мозку щурів пубертатного віку / О.А. Бережна, Л.Л. Сухова, Є.Р. Грабовецька, В.В. Давыдов // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2011. – Т. 24 (63), № 4. – С. 3-10.

Дослідження показали, що у тварин першого року життя активність альдокеторедуктаз (альдегідредуктази і альдозоредуктази) в постмітохондріальній фракції мозку знаходиться на однаковому рівні, а активність альдегіддегідрогенази нижча ніж у дорослих. Активність альдегіддегідрогенази в печінці і серці щурів всіх досліджених вікових груп істотно не розрізняється. У мітохондріальній фракції тварин пубертатного віку активність даного ензима має тканеспецифічні особливості. Висловлюється припущення, що виявлені особливості вікової динаміки активності ензимів сприяють пониженому стійкості внутрішніх органів до оксидативного стресу в пубертатному віці.

Ключові слова: альдегіддегідрогеназа, альдозоредуктаза, альдегідредуктаза, пубертат, печінка, серце, мозок.

Berezhnaya E.A. Activity of endogenous aldehydes catabolism enzymes in subcellular fractions of liver, heart and brain of rats at pubertal age / E.A. Berezhnaya, L.L. Sukhova, E.R. Grabovetskaya, V.V. Davydov // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2011. – Vol. 24 (63), No 4. – P. 3-10.

It has been found that the activity of aldoketoreductases in 1-year-old animals is the same in all age groups of rats, but Aldehyde dehydrogenase (AIDH) activity level is lower than such in subcellular fractions of adult rats. AIDH activity levels have not been significantly different in liver and heart of all studied groups. In mitochondrial fraction in pubertal age animals, AIDH activity had tissue-specific properties. It has been suggested that established peculiarities of age-related dynamics in enzymes activity promote to decrease in stability of the organs to oxidative stress at pubertal age.

Keywords: aldehyde dehydrogenase, aldose reductase, aldehyde reductase, liver, heart, brain.

Поступила в редакцію 10.11.2011 г.