

АКТИВНОСТЬ ЭНЗИМОВ УТИЛИЗАЦИИ АЛЬДЕГИДОВ В СЕРДЦЕ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

Е. Р. ГРАБОВЕЦКАЯ¹, В. В. ДАВЫДОВ²

¹НИИ биологии Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина, Украина;

²ГУ Институт охраны здоровья детей и подростков АМНУ, Харьков, Украина;
e-mail: davydov@kharkov.com

С целью углубления представлений о механизмах возрастного изменения устойчивости сердца к стрессу, было предпринято исследование активности энзимов катаболизма эндогенных альдегидов в постмитохондриальной фракции миокарда крыс разного возраста, подвергнутых иммобилизации. Результаты исследований показали, что двухдневная иммобилизация крыс 1,5-, 2- и 12-месячного возраста сопровождается понижением активности отдельных энзимов, катализирующих окислительно-восстановительное превращение альдегидов (альдегидредуктазы и альдегид-дегидрогеназы) в постмитохондриальной фракции миокарда. Одновременно происходит повышение активности глутатионтрансферазы у 1,5-месячных крыс и NADH-зависимой альдегидредуктазы у старых животных. Возникающие изменения способствуют понижению скорости утилизации эндогенных альдегидов в сердце животных пубертатного возраста при стрессе.

Ключевые слова: миокард, онтогенез, стресс, альдегиды, альдегиддегидрогеназа, альдегидредуктаза, глутатионтрансфераза.

В процессе онтогенеза изменяется устойчивость организма к действию стрессорных факторов, одним из проявлений которого является повышение с возрастом организма чувствительности сердца к стрессу и патологии сердечно-сосудистой системы [1,2]. Вместе с тем, механизмы ее формирования до настоящего времени окончательно не изучены.

Согласно современным представлениям, одним из центральных и неспецифических звеньев патогенеза стрессорного повреждения миокарда является стимуляция в нем процессов свободнорадикального окисления [3–6], что сопровождается увеличением образования и накопления в клетках карбонильных продуктов обмена, обладающих выраженным цитотоксическим и генотоксическим действием. Широкое распространение среди них имеют алифатические альдегиды, которые играют важную роль в реализации повреждающего эффекта оксидативного стресса [7–10]. В этой связи устойчивость клеток к свободнорадикальному повреждению, помимо прочего, зависит от их способности утилизировать эндогенные альдегиды [9, 11–13].

Катаболизм альдегидов происходит в энзиматических реакциях, которые катализируются альдегидредуктазами (АР), альдегиддегид-

рогеназами (АлДГ) и глутатионтрансферазами (ГТ) [9,10]. Вместе с тем, до настоящего времени все еще не установлена роль этих энзимов в антистрессорной защите сердца. Отсутствуют сведения об участии данных энзимов в защите миокарда от действия повреждающих факторов стресса на разных стадиях онтогенеза и формировании возрастной патологии. Учитывая это, с целью расширения представлений о механизмах возрастного изменения устойчивости сердца к стрессу в настоящем исследовании было предпринято изучение активности энзимов катаболизма эндогенных альдегидов в постмитохондриальной фракции миокарда крыс разного возраста, подвергнутых иммобилизации.

Материалы и методы

Работа выполнена на 48 крысах самцах линии Вистар четырех возрастных групп: 1,5-месячные (ранний пубертат), 2-месячные (поздний пубертат), 12-месячные (взрослые половозрелые) и 24-месячные (старые), которых содержали на стандартном рационе питания вивария. Животных каждой возрастной группы делили на 2 подгруппы: интактные (контрольные) и крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу путем привязывания к неподвижной опоре на 5 часов в день в тече-

ние 2-х дней. Эффективность воспроизведения стресса оценивали по уровню 11-оксикортикостероидов в крови [14].

Эвтаназию проводили непосредственно после прекращения иммобилизации путем декапитации под легким эфирным наркозом. Сердце извлекали и помещали в охлажденный изотонический раствор хлористого натрия. Ткань сердечной мышцы измельчали ножницами и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвегейма в соотношении 1 : 10 (масса/объем) с раствором, содержащим 0,25 М сахарозы и 0,01 М трис (рН 7,4). Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали 20 мин при 10000 g. Полученную надосадочную жидкость использовали в работе в качестве постмитохондриальной фракции. Все процедуры проводили при 4–6 °С.

В постмитохондриальной фракции сердечной мышцы определяли активность альдегидредуктазы [1.1.1.1.] по скорости окисления восстановленного коэнзима (NADH или NADPH) при восстановлении пропионового альдегида [15], альдегид-дегидрогеназы (NAD⁺) [1.2.1.3.] и альдегид-дегидрогеназы (NADP⁺) [1.2.1.4.] по скорости восстановления соответствующего окисленного энзима при окислении пропионового альдегида [16] и глутатионтрансферазы [2.5.1.18.] в реакции с динитрохлорбензолом [17].

В специальных экспериментах в постмитохондриальной фракции миокарда исследовали содержание веществ, дающих положительную реакцию с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивные вещества) [18].

Концентрацию протеина в пробах определяли по методу Лоури [19].

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

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что в процессе онтогенеза происходит постепенное повышение общей глутатионтрансферазной активности в постмитохондриальной фракции миокарда (табл. 1). Так, у 12-и и 24-месячных крыс она становится выше на 33 и 188% соответственно по сравнению с 1,5-месячными животными. После иммобилизационного стресса у 1,5-месячных крыс происходит повышение активности глутатионтрансферазы на 56% по сравнению с ее исходным уровнем. В то же время у животных других возрастных групп активность данного энзима в постмитохондриальной фракции миокарда не изменяется.

Таблица 1. Активность глутатионтрансферазы (нмоль восстановленного глутатиона/мин на 1 мг протеина) в постмитохондриальной фракции миокарда крыс разного возраста в условиях стресса ($M \pm m$; $n = 5-6$)

Возраст животных	Активность энзима у крыс:	
	интактных	после стресса
1,5 месяца	1,8 ± 0,1	2,8 ± 0,2*
2 месяца	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,2
12 месяцев	2,4 ± 0,2**	2,2 ± 0,2
24 месяца	5,2 ± 0,4**	5,1 ± 0,3

Тут и в таблице 2 $P < 0,05$ * – по отношению к интактным, а ** – по отношению к 1,5-месячным интактным животным.

Характерные изменения в процессе входящего онтогенеза происходят и в базальной активности энзимов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения альдегидов. Как видно из данных табл. 2, активность NADH-зависимой АР у крыс 1,5- и 2-месячного возраста находится на одинаковом уровне, у 12-месячных животных она на 193% превышает таковую у 1,5-месячных крыс и соответствует ее величине у 24-месячных животных. Активность NADPH-зависимой АР у 2-месячных крыс имеет существенно меньшую величину, чем у 1,5-месячных. В период от 2-х до 24-месячного возраста происходит ее постепенное повышение. Однако у старых (24-месячных) животных она остается на 57% ниже, чем у 1,5-месячных.

Активность NAD⁺-зависимой АлДГ в постмитохондриальной фракции миокарда в процессе онтогенеза не изменяется. В то же время активность NADP⁺-зависимого энзима имеет характерную возрастную динамику: наибольшая его величина в постмитохондриальной фракции миокарда выявляется в 12-месячном возрасте, тогда как в пубертатном возрасте и при старении она существенно ниже.

Иммобилизация сопровождается зависимым от возраста изменением активности энзимов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения альдегидов. По сравнению с исходным уровнем у 1,5-месячных животных происходит понижение активности NADPH-зависимой АР и NAD⁺-зависимой АлДГ в постмитохондриальной фракции на 39 и 46% соответственно, а у 2-месячных крыс приводит к уменьшению активности NADH-зависимой АР, а также NAD⁺-зависимой и NADP⁺-зависимой АлДГ на 57, 29 и

45% соответственно. Формирование иммобилизационного стресса у 12-месячных крыс сопровождается понижением активности NAD⁺-зависимой АлДГ на 38%, а у 24-месячных животных уменьшением активности NADP⁺-зависимой АлДГ на 58% и, наоборот, повышением активности NADH-зависимой АР на 144% соответственно по сравнению с их исходной величиной.

Различия в величине базальной активности исследованных энзимов соответствуют существующим представлениям о преимущественном пути утилизации карбонильных продуктов метаболизма в тканях внутренних органов в глутатионтрансферазной реакции [10,11]. Следующим по мощности путем катаболизма альдегидов в цитозоле клеток миокарда, судя по каталитической активности, является путь, связанный с их окислением в карбоновые кислоты в реакции, катализируемой NAD⁺-зависимой АлДГ.

В процессе онтогенеза возникают разнонаправленные изменения в активности энзимов катаболизма эндогенных альдегидов в постмитохондриальной фракции миокарда. При этом активность NAD⁺-зависимой АлДГ у крыс всех исследованных возрастных групп остается одинаковой, а активность ГТ, NADH-зависимой АР и NADP⁺-зависимой АлДГ постепенно повышается в период 1,5–12-месячного возраста. В то же время в процессе восходящего онтогенеза происходят разнонаправленные изменения активности NADPH-зависимой АР.

Анализ возникающих изменений энзиматической активности с возрастом у животных с учетом вклада отдельных энзимов в утилизацию эндогенных альдегидов позволяет предполагать высокую эффективность этого процесса в цитозоле кардиомиоцитов при старении и, наоборот, сравнительно низкую в пубертатном возрасте. Подобного рода изменения формируют предпосылки к появлению возрастных особенностей катаболизма альдегидов в сердце в условиях повышения в нем скорости их образования при стрессе. Вместе с тем, сопутствующие стрессу метаболические сдвиги (ацидоз, накопление активных форм кислорода, повышение концентрации Ca²⁺ в цитоплазме, активация факторов транскрипции и пр.) [4] способствуют изменению каталитических свойств этих энзимов в клетках миокарда, что предполагает модуляцию скорости распада эндогенных альдегидов в сердце и изменение его устойчивости к стрессу.

Проведенные в этом направлении исследования показали, что иммобилизационный

Таблица 2. Активность энзимов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения альдегидов в постмитохондриальной фракции миокарда крыс разного возраста в условиях стресса (M ± m, n = 5–6)

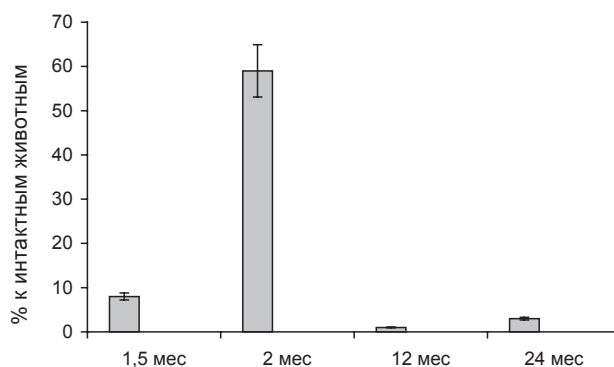
Энзим	Возраст подопытных животных:							
	1,5 месяца		2 месяца		12 месяцев		24 месяца	
	контроль (интактные)	после стресса	до стресса	после стресса	до стресса	после стресса	до стресса	после стресса
Альдегидредуктаза (NADH), нмоль NADH/мг протеина в мин	0,28 ± 0,04	0,35 ± 0,03	0,30 ± 0,05	0,13 ± 0,02*	0,82 ± 0,22**	0,76 ± 0,14	0,80 ± 0,17**	1,95 ± 0,25*
Альдегидредуктаза (NADPH), нмоль NADPH/мг протеина в мин	0,95 ± 0,07	0,58 ± 0,07*	0,09 ± 0,02**	0,12 ± 0,01	0,27 ± 0,06**	0,14 ± 0,02	0,41 ± 0,08**	0,36 ± 0,06
Альдегиддегидрогеназа (NAD ⁺), нмоль NAD ⁺ /мг протеина в мин	1,19 ± 0,07	0,64 ± 0,07*	0,97 ± 0,07	0,69 ± 0,06*	1,17 ± 0,11	0,73 ± 0,06*	1,21 ± 0,15	1,40 ± 0,09
Альдегиддегидрогеназа (NADP ⁺), нмоль NADP ⁺ /мг протеина в мин	0,21 ± 0,02	0,32 ± 0,05	0,38 ± 0,04**	0,21 ± 0,01*	1,30 ± 0,24**	1,44 ± 0,25	0,77 ± 0,06**	0,32 ± 0,06*

стресс действительно сопровождается изменением активности энзимов катаболизма альдегидов в постмитохондриальной фракции миокарда. В большинстве своем они проявляются в ее понижении по сравнению с исходным уровнем. При этом только у 1,5-месячных крыс иммобилизация приводит к повышению в сердце активности глутатионтрансферазы и у старых животных — к повышению активности NADH-зависимой АР.

В то же время у 2-месячных крыс после иммобилизации в постмитохондриальной фракции миокарда происходит понижение активности энзимов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения альдегидов, и среди них NAD⁺-зависимой и NADP⁺-зависимой АлДГ, а также и NADH-зависимой АР. У 1,5-месячных крыс при стрессе понижается активность NADPH-зависимой АР и NAD⁺-зависимой АлДГ, у 12-месячных — только NAD⁺-зависимой АлДГ, а у старых 24-месячных животных — NADP⁺-зависимой АлДГ.

Все это указывает на то, что чувствительность энзимов постмитохондриальной фракции миокарда к модулирующему влиянию стрессорных факторов у крыс пубертатного возраста выше, чем у животных старших возрастных групп. По всей вероятности, активация ГТ, как энзима, катализирующего утилизацию эндогенных альдегидов в основном пути их превращения, в определенной мере компенсирует ограничение использования альдегидов в реакциях их окисления и восстановления за счет понижения активности NADPH-зависимой АР и NAD⁺-зависимой АлДГ. В то же время уменьшение активности отдельных изоэнзимов АР и АлДГ у крыс в возрасте позднего пубертата способствует уменьшению скорости катаболизма эндогенных альдегидов в миокарде в условиях иммобилизационного стресса. Это, несомненно, будет способствовать накоплению альдегидов в цитоплазме кардиомиоцитов и, тем самым, повреждению миокарда при стрессе. Подтверждением данного предположения служат результаты исследования изменений уровня ТБК-реактивных веществ в постмитохондриальной фракции миокарда крыс разного возраста, подвергнутых иммобилизационному стрессу (рисунок).

Так, в отличие от крыс пубертатного возраста, у взрослых половозрелых животных после двухдневной иммобилизации не возникают существенные изменения в активности энзимов метаболизма эндогенных альдегидов в сердце. Единственный сдвиг в активности



Изменение содержания ТБК-реактивных веществ в постмитохондриальной фракции миокарда крыс разного возраста в условиях стресса в % к интактным крысам каждой возрастной группы (результаты исследований на 5–6 крысах).

NAD⁺-зависимой АлДГ, по всей вероятности, не вносит существенного вклада в изменение скорости катаболизма эндогенных альдегидов (табл. 2). Его появление отражает лишь стрессорную модуляцию активности этого энзима, обусловленную очевидно свободнорадикальным окислением его полипептидной цепи в условиях стрессорной стимуляции свободнорадикальных процессов в кардиомиоцитах.

Подобно 12-месячным крысам, у старых животных при иммобилизации происходит понижение активности только одного энзима — NADP⁺-зависимой АлДГ. Вместе с тем, высокая активность ГТ и активация NADH-зависимой АР способствуют у них эффективной утилизации эндогенных альдегидов в клетках миокарда в условиях стресса.

Резюмируя изложенное выше, можно прийти к заключению о том, что в пубертатном возрасте в сердце крыс под действием стресса возникают изменения активности энзимов утилизации эндогенных альдегидов, что способствует накоплению этих метаболитов в клетках миокарда. Обладая выраженным цитотоксическим эффектом, эти метаболиты вызывают повреждение миокарда.

Повреждение миокарда при стрессе является одним из проявлений повышения чувствительности сердца к неблагоприятным внешним воздействиям в период полового созревания и одной из причин роста сердечно-сосудистых заболеваний на данном этапе индивидуального развития [20, 21]. Однако механизмы возникновения возрастных особенностей стрессорной модуляции активности энзимов метаболизма эндогенных альдегидов

остаються не изученными. Их выяснение будет способствовать разработке нового направления в лечении и профилактике стрессорных поражений миокарда и поэтому является целью нашей дальнейшей работы.

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

АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ УТИЛІЗАЦІЇ АЛЬДЕГІДІВ У СЕРЦІ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ПІД ЧАС ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ

Є. Р. Грабовецька¹, В. В. Давидов²

¹НДІ біології Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна, Харків;

²ДУ Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків АМН України, Харків;
e-mail: davydov@kharkov.com

З метою поглиблення уявлень щодо механізму змін стійкості серця до стресу залежно від віку організму досліджено активність ензимів катаболізму ендogenous альдегідів у постмітохондріальній фракції міокарда щурів різного віку, яких піддавали іммобілізації. Визначено, що дводенна іммобілізація щурів 1,5-, 2- та 12-місячного віку супроводжується інгібуванням окремих ензимів, які каталізують окисно-відновні перетворення альдегідів (альдегідредуктази та альдегід-дегідрогенази) в постмітохондріальній фракції міокарда. Одночасно відбувається підвищення глутатіон-трансферазної активності в 1,5-місячних щурів і активності NADH-залежної альдегідредуктази – у старих тварин. Такі зміни сприяють обмеженню утилізації ендogenous альдегідів у серці тварин пубертатного віку, яких піддавали іммобілізаційному стресу.

Ключові слова: міокард, онтогенез, стрес, альдегіди, альдегід-дегідрогеназа, альдегідредуктаза, глутатіонтрансфераза.

ACTIVITY OF ALDEHYDE SCAVENGER ENZYMES IN THE HEART RATS OF DIFFERENT AGE DURING IMMOBILIZED STRESS

E. R. Grabovetskaya¹, V. V. Davydov²

¹Karazin National University, Kharkov, Ukraine;

²S. I. Institute of Children and Adolescent
Health Care, Academy of Medical of
Sciences of Ukraine, Kharkov;
e-mail: davydov@kharkov.com

Summary

This study was made to determine the activity of aldehyde scavenger enzymes in the heart's post mitochondrial fraction of rats of different age during immobilization stress. Our study demonstrated, that immobilization of 1.5-, 2- and 12- month rats was accompanied by inhibiting activity of aldehyde dehydrogenase and aldehyde reductase. At the same time we observed an increase in glutathione transferase activity in immobilized 1.5-month-old rats and that in reductase activity in 24-month-old rats. The revealed changes can lead to a decrease in the rate of endogenous aldehyde utilization in the heart during stress at puberty.

Key words: myocardium, ontogenesis, stress, aldehyde, aldehyde dehydrogenase, aldehyde reductase, glutathione transferase.

1. Фролькис В. В., Безруков В. В., Кульчицкий О. К. Старение и экспериментальная возрастная патология сердечно-сосудистой системы. – К.: Наук. думка, 1994. – 320 с.
2. Lakatta E. G. // Circ.Res. – 2001. – **88**. – P. 984–986.
3. Sahin E., Gumuslu S. // Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. – 2007. – **144**, N 4. – P. 324–347.
4. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. – М.: Медицина, 1984. – 270 с.
5. Sahin E., Gumuslu S. // Exp. Pharmacol. Physiol. – 2007. – **34**, N 5–6. – P. 425–431.

6. Davydov V. V., Shvets V. N. // Exp. Gerontol. – 2003. – **38**, N 6. – P. 693–698.
7. Uchida K. // Free Radical. Biol. Med. – 2000. – **28**, N 12. – P. 1685–1696.
8. Spitteller G. // Experim. Gerontology. – 2001. – **36**, N 9. – P. 1425–1457.
9. Davydov V. V., Dobaeva N. M., Bozhkov A. N. // Ibid. – 2004. – **39**, N 1. – P. 11–16.
10. Esterbauer H., Schaur R. J., Zollner H. // Free Radic. Biol. Med. – 1991. – **11**, N 1. – P. 81–128.
11. Chen J. J., Yu B. P. // Aging. – 1996. – N 8. – P. 334–340.
12. Muzio G., Trombetta A., Maggiora M. et al. // Free Radic. Biol. Med. – 2006. – **40**, N 11. – P. 1229–1238.
13. Lassen N., Pappa A., Black Q. W. J. et al. // Ibid. – **41**, N 9. – P. 1459–1469.
14. Резников А. Г. Методы определения гормонов. – К.: Наук. думка, 1980. – 536 с.
15. Srivastava S., Liu S. Q., Conklin D. J. et al. // Chem. Biol. Interact. – 2001. – **130–132**, N 1–3. – P. 563–571.
16. Пирожков С. В., Панченко Л. Ф. // Биохимия. – 1988. – **53**, N 9. – С. 1443–1448.
17. Mannervik B., Guthenberg C. // Methods Enzymology. – 1981. – **77**. – P. 231–235.
18. Muller G., Fruhant A., Mathias B. // Z. gesamte. um. Med. und Grenzgeb. – 1986. – **41**, N 24. – S. 673–676.
19. Lowry O. H., Rosenbrough K. J., Farr A. L., Rendall R. I. // J. Biol. Chem. – 1955. – **193**, N 1. – P. 265–267.
20. Коренев М. М., Носова О. М. // Педиатрія, акушерство та гінекологія. – 2002. – № 2. – С. 15–18.
21. Коренев Н. М., Богмат Л. Ф., Савво И. Д. и др. // Вісн. Вінницького держ. мед. університету. – 2003. – № 2. – С. 870–872.

Получено 24.10.2008