

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА АЛЬДЕГИДОВ В СЕРДЦЕ КРЫС

Е.Р. Грабовецкая, В.В. Давыдов

ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков АМНУ», г. Харьков

Изучена активность ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в субклеточных фракциях миокарда крыс в процессе онтогенеза. Выявлено характерное распределение глутатионтрансферазной, альдегиддегидрогеназной и альдегидредуктазной активности в митохондриальной и постмитохондриальной фракции миокарда и установлены возрастные особенности их изменения. Характер возникающих сдвигов предопределяет высокую эффективность утилизации эндогенных альдегидов в сердце крыс в 24-месячном возрасте и ее ограничение в 1,5-месячном возрасте в цитозоле, а в 12-месячном – в митохондриях миокардиальных клеток.

Ключевые слова: онтогенез, митохондрии, цитозоль, глутатионтрансфераза, альдегиддегидрогеназа, альдегидредуктаза.

В процессе онтогенеза изменяется устойчивость сердца к стрессорным повреждениям, важную роль в формировании которых играет стимуляция свободнорадикального окисления в миокарде [1–6]. Рядом авторов установлено, что в процессе свободнорадикального окисления происходит образование широкого спектра карбонильных соединений, в том числе альдегидов, обладающих выраженным цитотоксическим и генотоксическим действием [7, 8]. Внутриклеточная утилизация эндогенных альдегидов происходит в ферментативных реакциях, которые катализируются альдегидредуктазами, альдегиддегидрогеназами и глутатионтрансферазами, и существенно влияет на чувствительность кардиомиоцитов к свободнорадикальному повреждению [9, 10]. Ввиду того, что названные ферменты участвуют в защите клеток от свободнорадикального повреждения, можно предположить существование взаимосвязи между устойчивостью сердца к стрессу и возрастным изменением эффективности их функционирования.

С целью расширения представлений о механизмах возрастного изменения устойчивости сердца к стрессу изучали активность ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в субклеточных фракциях миокарда крыс в процессе онтогенеза.

Материал и методы. Работа выполнена на 48 крысах-самцах линии Вистар четырех возрастных групп: 1,5-месячных (раннего пубертатного периода); 2-месячных (позднего пубертатного периода); 12-месячных (половозрелых) и 24-месячных (старых), которых содержали на стандартном рационе питания вивария. Эвтаназию осуществляли путем декапитации под легким эфирным наркозом. Извлекали сердце и помещали в ох-

лажденный изотонический раствор хлористого натрия. Ткань сердечной мышцы измельчали ножницами и помещали в стеклянный гомогенизатор 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 10 мин при 1000 g. Супернатант повторно центрифугировали 20 мин при 10000 g. Полученную надосадочную жидкость использовали в качестве постмитохондриальной фракции, а осадок повторно промывали средой гомогенизации при том же режиме центрифугирования. Отмытый осадок суспензировали в среде гомогенизации и использовали в качестве грубой митохондриальной фракции. Все процедуры проводили при температуре 4–6 °С. В митохондриальной и постмитохондриальной фракциях сердечной мышцы определяли активность NAD(P)H-зависимой альдегидредуктазы (КФ 1.1.1.21) [11], NAD(P)⁺-зависимой альдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.4) [12] и глутатион-S-трансферазы (КФ 2.5.1.18) [13]. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Лоури.

Результаты исследований подвергали статистической обработке с использованием непараметрического метода Вилкоксона–Манна–Уитни.

Результаты. В постмитохондриальной фракции миокарда у крыс всех возрастных групп из всех исследованных ферментов метаболизма альдегидов наибольшую активность проявляет глутатионтрансфераза. В процессе онтогенеза начиная с 1,5-месячного возраста глутатионтрансферазная ГТ-активность постепенно повышается и достигает максимального значения при старении (табл. 1).

Таблица 1. Активность ферментов утилизации альдегидов в постмитохондриальной фракции миокарда крыс разного возраста, ($M \pm t$) нмоль/мг белка мин

Альдегид	Крысы (n=5-6) в возрасте, мес			
	1,5	2	12	24
Альдегиддегидрогеназа				
NAD ⁺ -зависимая	1,19±0,07	0,97±0,07	1,17±0,11	1,21±0,15
NADP ⁺ -зависимая	0,21±0,02	0,38±0,04*	1,30±0,24*	0,77±0,06*
Альдегидредуктаза				
NADH-зависимая	0,28±0,04	0,30±0,05	0,82±0,22*	0,80±0,17*
NADPH-зависимая	0,95±0,07	0,09±0,02*	0,27±0,06*	0,41±0,08*
Глутатионтрансфераза	1,80±0,10	2,00±0,10	2,40±0,20*	5,20±0,40*

Примечание. * $p < 0,05$, по отношению к 1,5-месячным. Здесь и в табл. 2.

Сходная динамика активности характерна и для NADH-зависимой альдегидредуктазы постмитохондриальной фракции миокарда. Активность этого фермента оказывается минимальной в пубертатном возрасте. У 12-месячных животных она становится в 2,7 раза выше, чем у 2-месячных, к 24-месячному возрасту сохраняется на этом же уровне. В отличие от NADH-зависимого фермента активность NADPH-зависимой альдегидредуктазы оказывается максимальной у животных в раннем пубертатном возрасте. В 2-месячном возрасте она резко понижается, затем постепенно повышается вплоть до 24-месячного возраста, однако при этом остается вдвое меньшей, чем у 1,5-месячных животных.

Активность NAD⁺-зависимой альдегиддегидрогеназы в постмитохондриальной фракции миокарда в процессе онтогенеза не изменяется. В то же время активность NADP⁺-зависимой альдегиддегидрогеназы оказывается минимальной у 1,5-месячных крыс, с увеличением возраста она постепенно повышается, достигая максимального значения у взрослых животных, в дальнейшем, к 24-месячному возрасту, понижается и становится на 41 % ниже, чем у 12-месячных крыс.

В митохондриальной фракции миокарда у животных всех исследованных возрастных групп ГТ-активность более низкая, чем активность ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения

альдегидов (табл. 2). При этом у крыс 1,5-, 12- и 24-месячного возраста активность NADH-зависимой альдегидредуктазы значительно превышает активность NAD⁺-зависимой альдегиддегидрогеназы. Активность NADH-зависимой альдегидредуктазы максимальная в митохондриях миокарда у 1,5-месячных крыс. У 2-месячных животных она становится в 4,2 раза ниже, чем у 1,5-месячных. Активность NADH-зависимой альдегидредуктазы в митохондриях взрослых животных соответствует таковой 2-месячных крыс, однако к 24-месячному возрасту повышается и приближается к таковой у 1,5-месячных животных.

Обсуждение. Результаты проведенных исследований указывают на неодинаковую роль глутатионтрансферазы, альдегиддегидрогеназы и альдегидредуктазы в утилизации эндогенных альдегидов в цитозоле и митохондриях миокардиальных клеток. Судя по суммарной величине ГТ-активности в постмитохондриальной фракции, в цитозоле кардиомиоцитов формируются условия для преимущественного вовлечения альдегидов в реакцию конъюгации с глутатионом. Это укладывается в рамки существующих представлений о ведущей роли данного метаболического пути в утилизации эндогенных альдегидов в клетках [10, 14, 15]. В процессе онтогенеза значение этого пути повышается и достигает максимального уровня при старении.

Таблица 2. Активность ферментов утилизации альдегидов в митохондриальной фракции миокарда крыс разного возраста, ($M \pm t$) нмоль/мг белка мин

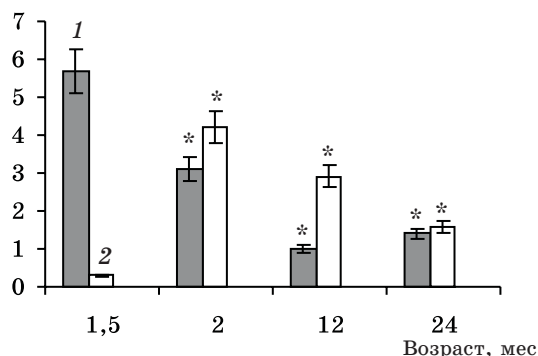
Альдегид	Крысы (n=5-6) в возрасте, мес			
	1,5	2	12	24
NADH-зависимая альдегидредуктаза	7,20±0,50	1,70±0,50*	1,70±0,10*	5,60±1,10
NAD ⁺ -зависимая альдегиддегидрогеназа	1,50±0,14	2,55±0,11*	0,42±0,08*	1,57±0,32
Глутатионтрансфераза	1,30±0,20	1,20±0,10	0,47±0,05*	0,30±0,10*

В митохондриях миокардиальных клеток глутатионтрансферазная реакция не играет той ведущей роли в катаболизме альдегидов, которая характерна для нее в цитозоле. В процессе онтогенеза значение этого пути постепенно уменьшается и становится минимальным при старении, когда ГТ-активность митохондриальной фракции миокарда достигает минимального уровня. Оценивая причины неодинакового вклада глутатионтрансферазного пути в утилизацию эндогенных альдегидов в цитозоле и митохондриях кардиомиоцитов, можно предположить его взаимосвязь с особенностями внутриклеточного распределения изоферментов глутатионтрансферазы, а также восстановленного глутатиона и ферментов глутатионредуктазной системы [16, 17].

Основной вклад в утилизацию эндогенных альдегидов в митохондриях вносят альдегидредуктаза и альдегиддегидрогеназа как энзимы, катализирующие их окислительно-восстановительные превращения. При этом, судя по активности данных ферментов, особое значение приобретают альдегидредуктазы, катализирующие восстановление альдегидов в спирты.

В процессе онтогенеза происходит изменение активности альдегиддегидрогеназы и альдегидредуктазы в митохондриях миокарда. Так, в 12-месячном возрасте возникает их частичное ингибирование. Однако и в этом случае активность альдегидредуктазы оказывается выше, чем последних. В раннем пубертатном возрасте и при старении активность альдегиддегидрогеназы и альдегидредуктазы в митохондриях оказывается максимальной. В постмитохондриальной фракции миокарда крыс разного возраста возникают разнонаправленные сдвиги со стороны активности альдегиддегидрогеназы и альдегидредуктазы. Однако при этом в процессе онтогенеза происходит постепенное повышение вклада NADP-зависимого фермента в альдегиддегидрогеназную активность и, наоборот, NADH-зависимого энзима в альдегидредуктазную активность постмитохондриальной фракции сердца (рисунок).

Возрастная модуляция активности глутатионтрансферазы, альдегидредуктазы и альдегиддегидрогеназы предполагает изменение скорости катаболизма эндогенных альдегидов в цитозоле и митохондриях миокардиальных клеток. В позднем онтогенезе, для которого характерна высокая концентрация альдегидов, формируются предпосылки для их эффективной утилизации в кардиомиоцитах. В то же время в раннем пубертатном возрасте возникают условия для ограничения скорости превращения эндоген-



Активность NAD- и NADP-зависимых альдегиддегидрогеназ (1), NADH- и NADPH-зависимых альдегидредуктаз (2) в постмитохондриальной фракции миокарда крыс разного возраста. * $p < 0,05$

ных альдегидов в цитозоле, в 12-месячном – в митохондриях миокардиальных клеток. При состояниях, сопровождающихся стимуляцией процессов свободнорадикального окисления (стресс, ишемия), это будет способствовать торможению метаболизма карбонильных продуктов обмена в миокардиальных клетках, следствием чего может быть усиление проявления их цитотоксического действия, а значит и увеличение чувствительности сердца к оксидативному стрессу. Выяснению роли возрастных сдвигов со стороны активности исследованных энзимов в изменении скорости утилизации эндогенных альдегидов в миокарде будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Выводы

1. Глутатионтрансфераза – наиболее активный фермент утилизации карбонильных продуктов метаболизма цитозоля, который обеспечивает основной путь утилизации альдегидов в кардиомиоцитах. В митохондриях активность глутатионтрансферазы ниже активности ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения альдегидов. Большая активность в митохондриях характерна для альдегидредуктазы. Ее значение в катаболизме альдегидов понижается только в 2-месячном возрасте.

2. Активность большинства ферментов, катализирующих превращения эндогенных альдегидов, в постмитохондриальной фракции миокарда повышается в процессе онтогенеза, становясь максимальной при старении. При этом возрастает доля NADP-зависимого энзима в альдегиддегидрогеназной и NADH-зависимого энзима в альдегидредуктазной активности постмитохондриальной фракции сердца.

3. Активность ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения альдегидов в митохондриальной фракции миокарда, понижается в 12-месячном возрасте и возрастает при старении.

Литература

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. Heart aging: a fly in the ointment. *Circ. Res.* 2001; 88: 984–986.
3. 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: 324–342.
4. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. М.: Медицина, 1984. 270 с.
5. 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: 425–431.
6. 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: 693–698.
7. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease. *Free Radical. Biol. Med.* 2000; 28, 12: 1685–96.
8. Spiteller G. Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Experim. Gerontol.* 2001; 36, 9: 1425–57.
9. 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: 11–16.
10. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol. Med.* 1991; 1, 1: 81–128.
11. 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: 563–571.
12. Пирожков С.В., Панченко Л.Ф. Роль альдегиддегидрогеназ в метаболизме малонового диальдегида в печени крыс. *Биохимия* 1988; 53, 9: 1443–48.
13. Mannervik B., Guthenberg C. Glutathione transferase. *Methods Enzymology* 1981; 77: 231–235.
14. Srivastava S., Chandra A., Wang L. et al. Metabolism of the Lipid Peroxidation Product, 4-Hydroxy-trans-2-nonenal, in Isolated Perfused Rat Heart. *J. Biol. Chem.* 1998; 273, 18: 10893–900.
15. Volkel W., Alvarez-Sanchez R., Weick I. et al. Glutathione conjugates of 4-Hydroxy-2(E)-nonenal as markers of hepatic oxidative stress-induced lipid peroxidation in rats. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 38, 11: 1526–36.
16. Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione transferases. *Ann. Rev. Toxicol.* 2005; 45: 51–88.
17. Колесниченко Л.С., Кулинский В.И. Глутатионтрансферазы. *Успехи соврем. биологии* 1989; 107, 2: 179–184.

ВІКОВА ДИНАМІКА АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ МЕТАБОЛІЗМУ АЛЬДЕГІДІВ У СЕРЦІ ЩУРІВ

Є.Р. Грабовецька, В.В. Давидов

Вивчено активність ферментів катаболізму ендогенних альдегідів у субклітинних фракціях міокарда щурів у процесі онтогенезу. Виявлено характерний розподіл глутатионтрансферазної, альдегіддегідрогеназної та альдегідредуктазної активності в мітохондріальній і постмітохондріальній фракції міокарда та встановлено вікові особливості їх зміни. Характер змін, що виникли, визначає високу ефективність утилізації ендогенних альдегідів у серці в 24-місячному віці та її обмеження в 1,5-місячному віці в цитозолі, а в 12-місячному – в мітохондріях міокардіальних клітин.

Ключові слова: онтогенез, мітохондрії, цитозоль, глутатионтрансфераза, альдегіддегідрогеназа, альдегідредуктаза.

AGE-RELATED DYNAMIC ACTIVITY OF ALDEHYDE'S SCAVENGER ENZYMES IN THE RAT'S HEART

E.R. Grabovetskaya, V.V. Davydov

This study was designed to estimate the activity of aldehyde's scavenger enzymes in subcellular fraction of the rat's heart in the process of ontogenesis. Our studies have shown peculiarities of subcellular distribution activity of glutathione transferase, aldehyde dehydrogenase and aldehyde reductase in myocardial cells as well as age-related changes. Such changes in enzyme activity promote high effective utilization of endogenous aldehyde in the myocardium of old rats and its decrease in cytosole of 1,5-months age rats and in mitochondria of 12-months age animals.

Key words: ontogenesis, mitochondria, cytosole, glutathione transferase, aldehyde dehydrogenase, aldehyde reductase.

Поступила 28.10.08