

*А.В. ГУРЬЕВА, В.В. ДАВЫДОВ, Е.Р. ГРАБОВЕЦКАЯ*  
*ГУ “Институт охраны здоровья детей и подростков АМН Украины”, г.Харьков*

## **Альдегиддегидрогеназная активность печени и сердца крыс пубертатного возраста, подвергнутых иммобилизационному стрессу**

Данные литературы свидетельствуют о том, что в подростковом возрасте повышается заболеваемость патологией сердечно-сосудистой, центральной нервной, эндокринной и других систем организма [2–4]. Принимая во внимание важное значение стресса в этиологии подобных заболеваний [1, 11, 17], можно думать о том, что одной из существенных причин этого возрастного феномена может быть снижение устойчивости тканей внутренних органов к действию стрессоров на этапе полового созревания.

Важным неспецифическим звеном стрессорного повреждения внутренних органов является стимуляция в них свободнорадикальных процессов [5, 6, 10, 16]. Сопровождающее ее накопление цитотоксических карбонильных продуктов выступает в роли своеобразного мессенджера повреждения [8, 10].

Особую роль в защите клеток от эндогенных альдегидов, как наиболее распространенных в организме животных карбонильных веществ

[13, 18], займають ферменти їх катаболізму [12, 15, 16], к числу которых относятся альдегіддегідрогеназы (К.Ф. 1.2.1.3 и 1.2.1.4). В литературе имеются сведения о том, что существует определенная взаимосвязь между активностью альдегіддегідрогеназ и их устойчивостью к свободнорадикальному повреждению [9, 15]. До настоящего времени все еще отсутствуют четкие представления об участии данных энзимов в антистрессорной защите, а также их значении в возрастном снижении чувствительности внутренних органов к повреждающему действию стресса. Учитывая это, целью настоящего исследования стало изучение особенностей модуляции альдегіддегідрогеназной активности в субклеточных фракциях печени и сердца крыс разного возраста, подвергнутых продолжительной иммобилизации.

**Материалы и методы исследований.** Работа выполнена на 57 крысах-самцах линии Вистар трех возрастных групп: 1–1,5-месячные (ранний пубертат), 2–2-месячные (поздний пубертат) и 4–12-месячные (взрослые половозрелые), которых содержали на стандартном рационе питания вивария. В свою очередь, животных каждой возрастной группы делили на две подгруппы: 1 — интактные; 2 — крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу. С целью воспроизведения иммобилизационного стресса животных привязывали к неподвижной опоре на 5 ч в день в течение 2 дней. Эффективность воспроизведения стресса оценивали по уровню адреналина в крови [7].

Эвтаназия проводилась путем декапитации под легким эфирным наркозом. Извлекали сердце и печень и помещали их в охлажденный изотонический раствор хлористого натрия. Ткани миокарда и печени 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 мин при 1000 g. Супернатант повторно центрифугировали 20 мин при 10000 g. Полученную надосадочную жидкость декантировали и использовали в работе в качестве постмитохондриальной фракции. Осадок суспендировали с 5 мл среды выделения и повторно центрифугировали в течение 20 мин 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 и сердечной мышцы определяли активность NAD-зависимой альдегіддегідрогеназы с использованием глутарового альдегида в качестве субстрата [19]. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Лоури [14].

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

**Результаты исследований и их обсуждение.** На протяжении первого года жизни у животных возникают возрастные и тканеспецифические особенности проявления альдегіддегідрогеназной активности в субклеточных фракциях исследованных внутренних органов. Альдегіддегідрогеназная активность в постмитохондриальной фракции печени и сердца у 1,5-, 2- и 12-месячных крыс существенно не отличается (табл. 1).

В митохондриальной фракции печени у 1,5-месячных животных альдегіддегідрогеназная активность на 36% ниже, а у 2-месячных — на 127% выше, чем у 12-месячных крыс. В митохондриальной фракции миокарда 1,5- и 2-месячных животных альдегіддегідрогеназная активность выше на 319 и 85% соответственно, чем у 12-месячных крыс (табл. 2).

Обнаруженные сдвиги дополняются изменениями соотношения альдегіддегідрогеназной активности в постмитохондриальной и ми-

тохондриальной фракции исследованных органов. При этом в печени 1,5-месячных животных альдегиддегидрогеназная активность существенно преобладает в постмитохондриальной фракции (рис. 1). 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 НАДН/мг белка · мин) в субклеточных фракциях печени крыс разного возраста, подвергнутых продолжительной иммобилизации ( $M \pm SE$ ,  $n = 5-8$ )

Группа	Субклеточная фракция	Возраст, мес.		
		1,5	2,0	12,0
Интакт	пмтх	11,5±0,6	9,5±0,9	12,4±0,7
	мтх	2,1±0,2*	7,5±0,7*	3,3±0,2
Стресс	пмтх	12,2±0,8	12,2±1,4	10,7±0,1
	мтх	2,1±0,3	4,4±0,7**	2,8±0,1

Примечание: \* $p < 0,05$  по отношению к показателям 12-месячных животных; \*\*  $p < 0,05$  по отношению к показателям интактных животных той же возрастной группы; пмтх — постмитохондриальная фракция; мтх — митохондриальная фракция

Таблица 2

Альдегиддегидрогеназная активность (нмоль НАДН/мг белка · мин) в субклеточных фракциях сердца крыс разного возраста, подвергнутых продолжительной иммобилизации ( $M \pm SE$ ,  $n = 5-8$ )

Группа	Субклеточная фракция	Возраст, мес.		
		1,5	2,0	12,0
Интакт	пмтх	5,2±0,6	7,3±0,4	8,0±0,7
	мтх	130,0±14,5*	57,1±6,4*	30,8±3,3
Стресс	пмтх	11,7±0,7**	3,3±0,6**	7,8±0,8
	мтх	173,6±30,2	30,2±7,9	29,2±1,6

Примечание: обозначения те же, что в табл. 1

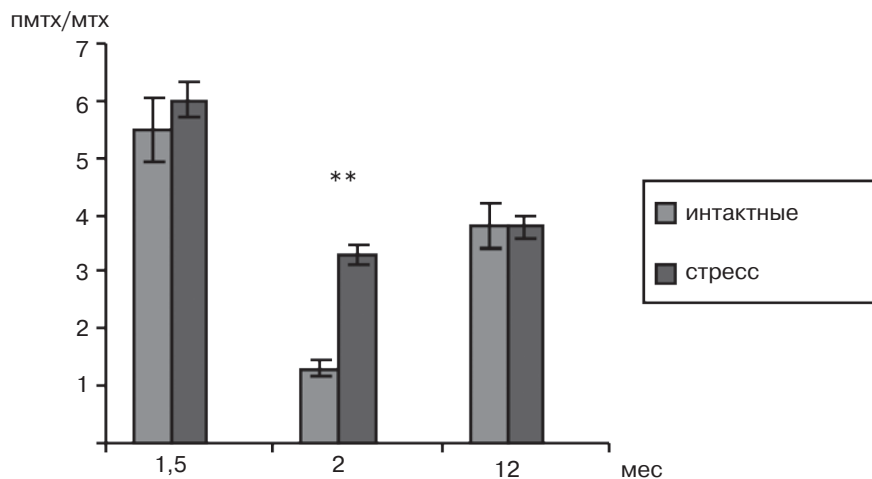


Рис. 1. Соотношение альдегиддегидрогеназной активности в постмитохондриальной и митохондриальной фракциях (постМТ/МТ) печени интактных и иммобилизованных крыс разного возраста (по результатам исследований на 5–7 крысах) (\*\*  $p < 0,05$  по отношению к показателям интактных животных той же возрастной группы)

Была исследована альдегиддегидрогеназная активность в митохондриальной и постмитохондриальной фракции печени и сердца крыс разного возраста, подвергнутых продолжительной иммобилизации. Исследования показали, что у животных исследованных возрастных групп иммобилизационный стресс не сопровождался изменением этого показателя. В митохондриях печени альдегиддегидрогеназная активность изменялась при стрессе только у 2-месячных крыс. После продолжительной иммобилизации у них происходило ее снижение на 41% по сравнению с таковой у интактных животных данной возрастной группы. Одновременно с этим у 2-месячных стрессированных крыс вдвое увеличивалось соотношение альдегиддегидрогеназной активности в постмитохондриальной и митохондриальной фракции (рис. 1).

В постмитохондриальной фракции сердца 1,5-месячных животных после продолжительной иммобилизации происходило повышение альдегиддегидрогеназной активности на 125% по сравнению с ее исходным уровнем. В то же время у 2-месячных иммобилизованных животных она наоборот — снижалась до 45% ее исходного значения. В митохондриальной фракции сердца у 1,5- и 2-месячных животных сдвиги аналогичной направленности имели всего лишь характер выраженной тенденции ( $p > 0,05$ ) (см. табл. 2).

Изменения со стороны альдегиддегидрогеназной активности при стрессе сопровождалось увеличением соотношения ее значения в постмитохондриальной и митохондриальной фракции сердца только у 1,5-месячных крыс (рис. 2). У них происходило увеличение данного показателя на 68% по сравнению с его исходным уровнем. У 2- и 12-месячных животных продолжительная иммобилизация не сопровождалась изменением соотношения альдегиддегидрогеназной активности в исследованных субклеточных фракциях кардиомиоцитов.

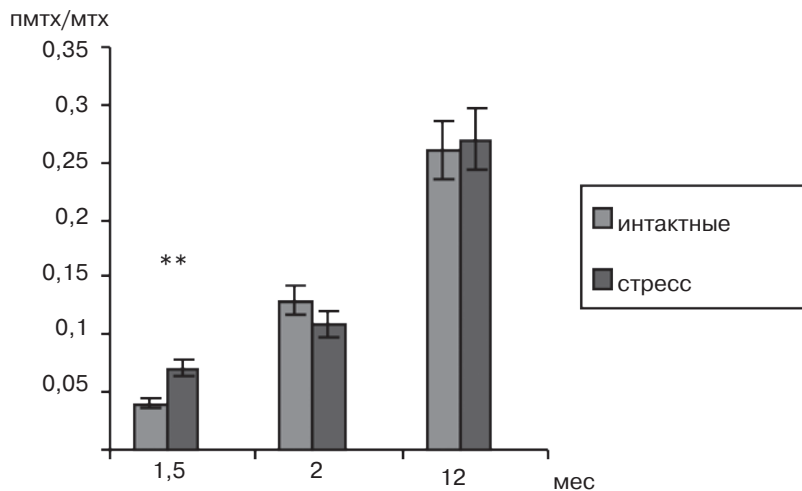


Рис. 2. Соотношение альдегиддегидрогеназной активности в постмитохондриальной и митохондриальной фракциях (постМТ/МТ) сердца интактных и иммобилизованных крыс разного возраста (по результатам исследований на 5–7 крысах) (\*\*  $p < 0,05$  по отношению к показателям интактных животных той же возрастной группы)

Проведенные исследования показали, что альдегиддегидрогеназная активность постмитохондриальной фракции печени крыс пубертатного возраста аналогична таковой у взрослых половозрелых животных. Причем ее значение у животных данных возрастных групп не изменяется и после их продолжительной иммобилизации.

В отличие от альдегиддегидрогеназы постмитохондриальной фракции, активность митохондриальных энзимов изменяется с возрастом крыс. Например, базальный уровень альдегиддегидрогеназной активности

в митохондриальній фракції печені 1,5-місячних тварин нижче, ніж у 2- і 12-місячних. При стресі її значення у 2-місячних крыс стає нижче вихідного рівня, а у 1,5-місячних — залишається на рівні такої у інтактних тварин даної вікової групи. При цьому у 2-місячних крыс зростає частка немитохондриальних ферментів в альдегіддегідрогеназній активності клітин печені.

Аналіз отриманих результатів дозволяє висловити припущення про те, що у крыс пубертатного віку виникають передумови для обмеження катаболізму цитотоксичних продуктів вільнорадикального окислення в митохондріях печені в умовах підвищення швидкості їх утворення при стресі. В ранньому пубертатному віку це пов'язано з низьким базальним рівнем ферментативної активності в митохондріях, а в пізньому — з високою чутливістю митохондриальних альдегіддегідрогеназ до дії інгібувальних факторів, виникаючих в клітинах печені при окислювальному стресі.

Подібно печені, альдегіддегідрогеназна активність постмитохондриальної фракції серця крыс пубертатного віку відповідає такій у дорослих статевозрілих тварин. Однак в умовах тривалої іммобілізації у 1,5- і 2-місячних крыс виникає її різнонаправлена модуляція. При цьому у 2-місячних тварин вона значно знижується порівняно з вихідним рівнем. Все це вказує на те, що на пізньому етапі статевого дозрівання і в ранньому періоді статевих зрілості в серці іммобілізованих тварин виникають умови для обмеження швидкості окислювального перетворення ендогенних альдегідів в саркоплазмі кардіоцитів.

Відносно активності альдегіддегідрогеназ митохондрій міокарда встановлено цілий ряд особливостей. Показано, зокрема, що у крыс 1,5- і 2-місячного віку активність суттєво вища, ніж у 12-місячних тварин. Після іммобілізаційного стресу у крыс пубертатного віку не відбувається її модуляція.

Отримані дані дозволяють думати про те, що, незважаючи на стресорне обмеження активності немитохондриальних альдегіддегідрогеназ у 2-місячних крыс, в кардіоцитах іммобілізованих тварин пубертатного віку, за рахунок підтримання високої базальної активності митохондриальних ферментів, формуються умови для ефективного використання ендогенних альдегідів в окислювальному шляху їх катаболізму.

Таким чином, слід зауважити, що формування іммобілізаційного стресу у дорослих статевозрілих тварин не супроводжується модуляцією альдегіддегідрогеназної активності в субклітинних фракціях печені і серця. В той же час у крыс пубертатного віку при стресі виникають тканинспецифічні зміщення в активності альдегіддегідрогеназ митохондриальної і постмитохондриальної фракцій. При цьому висока лабільність щодо факторів, виникаючих в клітинах в умовах тривалої іммобілізації, характерна для альдегіддегідрогеназ митохондриальної фракції печені і постмитохондриальної фракції серця. Причини цього можуть бути пов'язані з відмінностями в ізоферментному спектрі альдегіддегідрогеназ в гепатоцитах і кардіоцитах. Важливе значення в виникненні вікових і тканинспецифічних особливостей структури ізоферментного спектра в тканинах внутрішніх органів, по всій ймовірності, може мати регуляторне впливання статевих гормонів на експресію генів ізоферментів альдегіддегідрогеназ. В умовах тривалого іммобілізаційного стресу особливу роль набувають регуляторні впливання на синтез ізоферментів глюкокортикоїдних гормонів і катехоламінів.

Всесторонній аналіз результатів проведених досліджень дозволяє прийти до висновку про існування тканинспецифічних особливостей

тей вовлечения карбонильных продуктов метаболизма в окислительный путь их превращений в клетках печени и сердца при иммобилизационном стрессе на этапе полового созревания. При этом в митохондриях печени снижается роль альдегиддегидрогеназного пути в защите гепатоцитов от действия цитотоксических продуктов свободнорадикального окисления, хотя в цитоплазме она остается на исходном уровне. В сердце — наоборот, формируются предпосылки для ограничения использования эндогенных альдегидов в альдегиддегидрогеназной реакции в саркоплазме кардиомиоцитов при стрессе, хотя в митохондриях поддерживаются условия для их эффективного использования в окислительном пути катаболизма.

Принимая во внимание особое значение митохондриальных альдегиддегидрогеназ в защите клеток от цитотоксического действия карбонильных продуктов свободнорадикального окисления, можно думать, что снижение альдегиддегидрогеназной активности митохондрий вносит определенный вклад в повышение чувствительности печени к действию повреждающих факторов стресса в пубертатном возрасте. В то же время модуляция активности немитохондриальных альдегиддегидрогеназ в миокарде, по всей вероятности, не имеет решающего значения в повышении чувствительности сердца к стрессу на этапе полового созревания. Определенное значение в этом может приобретать возрастная модуляция активности ферментов, катализирующих другие пути катаболизма карбонильных продуктов свободнорадикального окисления (альдегидредуктаз и глутатионтрансфераз). Этот вопрос будет рассмотрен в наших дальнейших исследованиях.

**Выводы.** Альдегиддегидрогеназная активность постмитохондриальной фракции печени и 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 снижение альдегиддегидрогеназной активности. В митохондриальной фракции печени у 1,5-месячных животных ее значение ниже, а у 2-месячных — выше, чем у 12-месячных крыс. Альдегиддегидрогеназная активность постмитохондриальной фракции печени у крыс пубертатного возраста в условиях продолжительной иммобилизации не изменяется. В митохондриальной фракции печени у 2-месячных иммобилизованных животных она существенно снижается, а у 1,5-месячных — остается на исходном уровне. В постмитохондриальной фракции сердца 2-месячных иммобилизованных крыс происходит снижение альдегиддегидрогеназной активности, а в митохондриальной фракции миокарда у 1,5- и 2-месячных иммобилизованных животных она поддерживается на исходном уровне. Снижение альдегиддегидрогеназной активности митохондрий способствует повышению чувствительности печени к действию повреждающих факторов стресса в пубертатном возрасте.

*Рекомендовано до друку комісією з біоетики*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

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. *Механізми формування* инвалидности у детей с патологией системы кровообращения / Н.М. Коренев, Л.Ф. Богмат, С.Р. Толмачева и др. // Медико-соціальні аспекти реабілітації дітей-інвалідів: мат. наук.-практ. конф. — Харків, 2000. — С. 3–6.
3. Коренев Н.М. Артериальная гипертензия у подростков / Н.М. Коренев // Прогнозування та профілактика артеріальної гіпертензії в дитячому та підлітковому віці: мат. симп. — Харків, 2001. — С. 3–7.
4. 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.
5. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца / Ф.З. Меерсон. — М.:

Медицина, 1984. — 270 с. 6. *Прилипко Л.Л.* Роль процессов перекисного окисления липидов в повреждении мембранных структур мозга при стрессе и гипероксии: автореф. дисс. д-ра. биол. наук : спец. 03.00.04 “Биохимия” / Л.Л. Прилипко; МГУ. — М., 1983. — 46 с. 7. *Atrac C., Madnussun T.* Procedure for the isolation of noradrenaline, adrenaline, dopamine, 5-hydroxytryptamine and histamine from the same tissues samples using a single column of strongly acid exchange resin / C. Atrac, T. Madnussun // *Acta Pharmacol. Toxicol.* — 1978. — Vol. 42. — P. 35–57. 8. *Awashi Y.* Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases / Y. Awashi // *Free Radic. Biol. Med.* — 2004. — Vol. 37, № 5. — P. 607–619. 9. *Chen C.* Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart / C. Chen // *Science.* — 2008. — Vol. 321, № 5895. — P. 1493–1495. 10. *Cheng J.* Transfection of mGSTA4 in HL-60 cells protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by inhibiting JNK-mediated signaling / J. Cheng // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2001. — Vol. 392. — P. 197–207. 11. *Grabovetskaya E.* Aldehyde reductase activity in the heart of pubertal rats during stress / E. Grabovetskaya // 2nd International Scientific Interdisciplinary Congress for medical students and young doctors : the materials cong. — Kharkiv, 2009. — P. 29–30. 12. *Grant A.* Expression of rat aldehyde reductase AKR7A1: influence of age and sex and tissue-specific inducibility / A. Grant et al. // *Biochem. Pharmacol.* — 2001. — Vol. 62, № 11. — P. 1511–1519. 13. *Li J., Holbrook N.* Common mechanisms for declines in oxidative stress tolerance and proliferation with aging / J. Li, N. Holbrook // *Free Radical. Biol. Med.* — 2003. — Vol. 35, № 3. — P. 292–299. 14. *Lowry O., Rozenbrough A., Rendall R.* / O. Lowry, A. Rozenbrough, R. Rendall // *J. Biol. Chem.* — 1955. — Vol. 193, № 1. — P. 265–267. 15. *Oshawa I.* Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells / I. Oshawa // *J. Neurochem.* — 2003. — Vol. 84, № 5. — P. 1110–1117. 16. *Roth G.* Changes in tissue responsiveness to hormones and neurotransmitters during aging / G. Roth // *Exp. Gerontol.* — 1995. — Vol. 30, № 3–4. — P. 361–368. 17. *Valko M.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko et al. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* — 2007. — Vol. 39, № 1. — P. 44–84. 18. *Uchida K.* Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease / K. Uchida // *Free Radical. Biol. Med.* — 2000. — Vol. 28, № 12. — P. 1685–1696. 19. *Xu D.* Mitochondrial aldehyde dehydrogenase attenuates hyperoxia-induced cell death through activation of ERK/MAPK and PI3K-Akt pathways in lung epithelial cells / D. Xu, J. Guthrie, S. Mabry // *AJP — Lung Physiol.* — 2006. — Vol. 291. — P. 5.

Стаття надійшла до редколегії 5.01.12

### **АЛЬДЕГІДДЕГІДРОГЕНАЗНА АКТИВНІСТЬ ПЕЧІНКИ ТА СЕРЦЯ ЩУРІВ ПУБЕРТАТНОГО ВІКУ, ЩО ЗАЗНАЛИ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ**

**А.В. ГУР'ЄВА, В.В. ДАВИДОВ, Є.Р. ГРАБОВЕЦЬКА**

Показано, що під впливом іммобілізаційного стресу змінюється активність альдегіддегідрогенази субклітинних фракцій печінки та серця щурів пубертатного віку. В мітохондріальній фракції серця зі збільшенням віку тварин активність ферменту знижується. В мітохондріальній фракції печінки у 1,5-місячних тварин її значення нижче, а у 2-місячних — вище, ніж у 12-місячних щурів. Альдегіддегідрогеназна активність постмітохондріальної фракції печінки щурів пубертатного віку не змінюється. В мітохондріальній фракції печінки у 2-місячних тварин вона знижується, а у 1,5-місячних — залишається на тому ж рівні. В постмітохондріальній фракції серця 2-місячних тварин активність ферменту знижується, а в мітохондріальній фракції вона підтримується на початковому рівні. Зниження активності альдегіддегідрогенази мітохондрій сприяє підвищенню чутливості печінки до дії факторів стресу в пубертатному віці.

**Ключові слова:** альдегіддегідрогеназа, іммобілізаційний стрес, мітохондрії, пубертат.

### **INFLUENCE OF IMMOBILIZATION STRESS ON ALDEHYDE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN LIVER AND HEART OF PUBERTAL AGE RATS**

**A. GURYEVA, V. DAVYDOV, E. GRABOVETSKAYA**

It was shown that immobilization causes changes in aldehyde dehydrogenase activity in subcellular fractions of liver and heart of pubertal age rats. Decreasing of aldehyde dehydrogenase activity was observed in mitochondrial fraction of the heart with age. In mitochondrial fraction of liver of 1,5-month old rats enzyme activity is lower than its

value of 12,0-months old rats, but the activity of 2,0-months old rats is higher than the activity of 12,0-months old rats. Enzyme activity of post mitochondrial fraction of liver in pubertal age rats is the same as the activity in adult rats. In mitochondrial fraction of liver of 2,0-months old rats decrease of enzyme activity is observed, but its level in liver of 1,5-months old rats is the same as of 12,0-months old rats. Decrease of aldehyde dehydrogenase activity is accompanied by increased susceptibility of liver to oxidative stress factors in pubertal age.

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