

УДК [612.66+616-092.19]:577.15

А.В. Гурьева, В.В. Давыдов, В.В. Руденко

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

АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ ПЕЧЕНИ И СЕРДЦА КРЫС ПУБЕРТАТНОГО ВОЗРАСТА

Исследована активность альдегиддегидрогеназы постмитохондриальной и митохондриальной фракций печени и сердца крыс разного возраста. Показано, что возрастные изменения активности фермента в меньшей мере проявляются в постмитохондриальной, чем в митохондриальной фракции. В пубертатном возрасте активность альдегиддегидрогеназы постмитохондриальной фракции печени и сердца находится на том же уровне, что и у половозрелых крыс. В митохондриальной фракции сердца с увеличением возраста животных она снижается, а в митохондриальной фракции печени на разных стадиях пубертата возникают разнонаправленные сдвиги с её стороны.

Ключевые слова: *альдегиддегидрогеназа, митохондрии, пубертат, печень, сердце.*

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 у подростков заболеваемости патологией сердечно-сосудистой системы, пищеварительного 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 (К.Ф. 1.2.1.3 и 1.2.1.4), катализирующие окисление цитотоксических альдегидов в карбоновые кислоты [8, 9]. Вместе с тем до настоящего времени всё ещё отсутствуют чёткие представления о динамике альдегиддегидрогеназной активности в субклеточных фракциях клеток тканей внутренних органов на этапе полового созревания. Целью данной работы явилось изучение альдегиддегидрогеназной активности в митохондриальной и постмитохондриальной фракции печени и сердца крыс пубертатного возраста.

Материал и методы. Исследование выполнено на 57 крысах-самцах линии Вистар

четырёх возрастных групп: 1-я – 1,5-месячные (ранний пубертат), 2-я – 2-месячные (поздний пубертат); 3-я – 3-месячные (ранний половозрелый возраст) и 4-я – 12-месячные (взрослые половозрелые). Крыс содержали на стандартном рационе питания вивария. В ходе исследования были соблюдены правила «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1986).

Эвтаназию проводили путём декапитации под лёгким эфирным наркозом. Извлекали сердце и печень и помещали в охлаждённый изотонический раствор хлористого натрия. Ткани миокарда и печени измельчали ножницами и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера–Эльвейгема в соотношении 1:10 (масса/объём) 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 15 мин при 10000 g. Надосадочную жидкость удаляли путём декантации, а образовавшийся осадок суспендировали с 1,5 мл среды выделения и ис-

© А.В. Гурьева, В.В. Давыдов, В.В. Руденко, 2012

пользовали в качестве митохондриальной фракции. Все процедуры фракционирования проводили при 4–6 °С.

В выделенных субклеточных фракциях печени и сердечной мышцы определяли активность NAD-зависимой альдегиддегидрогеназы с использованием глутарового альдегида в качестве субстрата [10]. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Лоури [11].

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

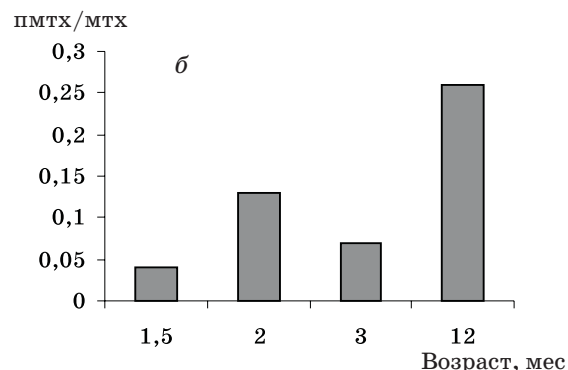
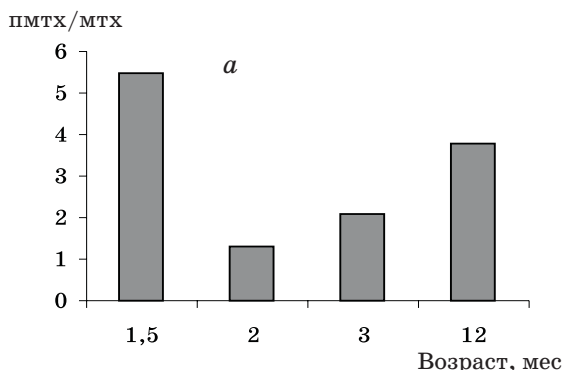
Результаты. Исследования показали, что альдегиддегидрогеназная активность в постмитохондриальной фракции печени выше, чем в митохондриальной. В митохондриальной фракции миокарда, наоборот, её величина значительно преобладает над таковой в постмитохондриальной фракции (рисунок, а).

На протяжении первого года жизни у животных возникают возрастные и тканеспецифические особенности со стороны альдегиддегидрогеназной активности в субклеточных фракциях исследованных внутренних органов. Как видно из данных таблицы, альдегиддегидрогеназная активность в постмитохондриальной фракции печени и

сердца у 1,5-, 2- и 12-месячных крыс существенно не различается. В то же время в печени и сердце 3-месячных животных её величина оказывается ниже на 27 и 26 % соответственно, чем у 12-месячных.

Альдегиддегидрогеназная активность в митохондриальной фракции печени 3- и 12-месячных крыс одинакова. В то же время у 1,5-месячных животных её 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.

Обнаруженные сдвиги сопровождаются изменениями соотношения альдегиддегидрогеназной активности в постмитохондриальной и митохондриальной фракции исследованных органов. При этом 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 (рисунок, б).



Величина соотношения альдегиддегидрогеназной активности в постмитохондриальной и митохондриальной фракциях печени (а) и сердца (б) крыс разного возраста (n=6–7)

Альдегиддегидрогеназная активность в субклеточных фракциях печени и сердца крыс разного возраста (n=6–7), (M±SE) нмоль НАДН/(мг белка·мин)

Орган	Субклеточная фракция	Возраст крыс, мес			
		1,5	2	3	12
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±0,6*	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

Примечания: 1. пмтх – постмитохондриальная фракция; мтх – митохондриальная фракция.
2. * p<0,05 по отношению к показателям 12-месячных животных.

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

Обсуждение результатов. Внутриклеточное распределение альдегиддегидрогеназной активности имеет тканеспецифические особенности. В клетках печени она более выражена в постмитохондриальной фракции, что, по всей вероятности, обусловлено преобладанием цитозольных форм альдегиддегидрогеназы над митохондриальными. В сердечной мышце, наоборот, существенно преобладают митохондриальные формы альдегиддегидрогеназы над цитоплазматическими.

В процессе онтогенеза у животных с увеличением возраста от 1,5 до 12 месяцев происходит изменение соотношения альдегиддегидрогеназной активности в субклеточных фракциях внутренних органов. Обращает на себя внимание тот факт, что в возрасте раннего пубертата величина этого показателя существенно отличается от таковой у животных всех других исследованных возрастных групп. В позднем пубертатном возрасте соотношение альдегиддегидрогеназной активности в субклеточных фракциях печени и сердца приближается к его величине у крыс в раннем половозрелом возрасте. У взрослых половозрелых животных в печени возрастает доля немитохондриальных ферментов в общей альдегиддегидрогеназной активности, хотя при этом и не достигает её значения у 1,5-месячных крыс, тогда как в сердце у них имеет место значительное повышение вклада немитохондриальных энзимов в общую альдегиддегидрогеназную активность кардиомиоцитов.

Полученные данные свидетельствуют о существовании возрастной динамики в соотношении различных классов альдегиддегидрогеназы в клетках печени и сердца на протяжении первого года жизни крыс. При этом для раннего пубертатного возраста характерны наиболее выраженные отличия в изоферментном составе альдегиддегидрогеназ как печени, так и сердца по отношению к другим возрастным группам животных.

Возрастные изменения во внутриклеточном распределении альдегиддегидрогеназной активности в субклеточных фракциях печени и сердца у крыс пубертатного

возраста не сопровождаются появлением однонаправленных сдвигов в величине альдегиддегидрогеназной активности по отношению к таковой у половозрелых животных. Так, в постмитохондриальной фракции обоих исследованных органов крыс, находящихся на стадии полового созревания, она поддерживается на уровне, что и у половозрелых животных. Более того, в митохондриальной фракции сердца 1,5- и 2-месячных крыс, а также печени 2-месячных животных альдегиддегидрогеназная активность существенно превышает таковую у взрослых половозрелых крыс.

На основании изложенного можно заключить, что внутриклеточное распределение альдегиддегидрогеназной активности в печени и сердце крыс раннего пубертатного возраста существенно отличается от такового у крыс в позднем пубертате и половозрелом возрасте. По всей вероятности, это связано с возрастными особенностями регуляции экспрессии генов изоферментов альдегиддегидрогеназ. Очевидно, в позднем пубертатном возрасте усиливается экспрессия определённых типов альдегиддегидрогеназ, одной из причин чего может быть становление секреции половых гормонов.

Изменения в соотношении разных классов альдегиддегидрогеназ в раннем пубертатном возрасте не сопровождаются уменьшением величины ферментативной активности в печени и сердце животных. Это предполагает возможность поддержания в гепатоцитах и кардиомиоцитах высокой базальной скорости утилизации эндогенных альдегидов в альдегиддегидрогеназной реакции. Однако в условиях увеличения внутриклеточной концентрации альдегидных продуктов свободнорадикального окисления при оксидативном стрессе возникают метаболические предпосылки для модуляции активности альдегиддегидрогеназ. Они могут быть связаны с накоплением в клетках активных форм кислорода, изменением ионного состава, а также рН внутриклеточной среды и т. д. Несомненно, что представители различных классов альдегиддегидрогеназ будут проявлять неодинаковую чувствительность к модулирующему действию всех этих регуляторных факторов. Поэтому при оксидативном стрессе *in situ*, особенно в раннем пубертатном возрасте, формируются условия для изменения эффективности утилизации эндогенных альдегидов в альдегиддегидрогеназной реакции. Выяснение этого вопроса позволит

внести ясность в представления о патогенетической роли альдегиддегидрогеназ в повышении чувствительности тканей внутренних органов к оксидативному стрессу в пубертатном возрасте. Его изучению будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Выводы

1. Величина альдегиддегидрогеназной активности в постмитохондриальной фракции печени больше, чем в митохондриальной. В сердце преобладает активность митохондриальных альдегиддегидрогеназ.

2. Возрастные изменения альдегиддегидрогеназной активности в меньшей мере проявляются в постмитохондриальной, чем в митохондриальной фракции. В пубертатном возрасте альдегиддегидрогеназная активность постмитохондриальной фракции печени и сердца находится на том же уровне, что и у половозрелых крыс.

3. В митохондриальной фракции сердца с увеличением возраста животных от 1,5 до

12 месяцев происходит постепенное понижение альдегиддегидрогеназной активности; в митохондриальной фракции печени на разных стадиях пубертата возникают разнонаправленные сдвиги в её активности.

4. Соотношение немитохондриальных и митохондриальных альдегиддегидрогеназ в клетках печени и сердца крыс раннего пубертатного возраста существенно отличается от такового у крыс позднего пубертатного и половозрелого возраста. При увеличении возраста животных от 2 до 12 месяцев происходит постепенное повышение доли немитохондриальных ферментов в альдегиддегидрогеназной активности клеток.

5. Изменение изоферментного спектра альдегиддегидрогеназ в раннем пубертатном возрасте предопределяет возникновение условий для модуляции скорости утилизации эндогенных альдегидов в условиях стимуляции свободнорадикальных процессов в клетках печени и сердца при оксидативном стрессе.

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. Корнев Н. М. Механизмы формирования инвалидности у детей с патологией системы кровообращения / Н. М. Корнев, Л. Ф. Богмат, С. Р. Толмачева [и др.] // Медико-соціальні аспекти реабілітації дітей-інвалідів: Матер. наук.-практ. конф. – Харків, 2000. – С. 3–6.
4. Корнев Н. М. Артериальная гипертензия у подростков / Н. М. Корнев // Прогнозування та профілактика артеріальної гіпертензії в дитячому та підлітковому віці: Матер. симпозиуму. – Харків, 2001. – С. 3–7.
5. Корнев М. М. Клініко-гемодинамічні показники формування церебральних порушень у підлітків з первинною артеріальною гіпертензією / М. М. Корнев, 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. 33, № 6. – P. 739–746.
8. Pietruszko R. Betaine aldehyde dehydrogenase from rat liver mitochondrial matrix / R. Pietruszko, M. Chern // Chem. Biol. Interact. – 2001. – Vol. 130–132, № 1–3. – P. 193–199.
9. 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.
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. Lowry O. H. Protein measurement with the Pholin phenol reagent / O. H. Lowry, A. L. Rozenbrough, R. I. Rendall [et al.] // J. Biol. Chem. – 1955. – Vol. 193, № 1. – P. 265–267.

Г.В. Гур'єва, В.В. Давидов, В.В. Руденко

АКТИВНІСТЬ АЛЬДЕГІДДЕГІДРОГЕНАЗИ В СУБКЛІТИННИХ ФРАКЦІЯХ ПЕЧІНКИ Й СЕРЦЯ ЩУРІВ ПУБЕРТАТНОГО ВІКУ

Вивчено активність альдегиддегидрогенази в постмитохондриальній і митохондриальній фракціях печінки й серця щурів різного віку. Виявлено, що вікові зміни в активності ферменту мен-

шою мірою проявляються в постмітохондріальній, ніж в мітохондріальній фракції. В пубертатному віці активність альдегіддегідрогенази в постмітохондріальній фракції печінки й серця щурів знаходиться на тому ж рівні, що й у статевозрілих щурів. У мітохондріальній фракції серця зі зростанням віку щурів вона знижується, а в мітохондріальній фракції печінки на різних етапах пубертату виникають різноспрямовані зрушення з її боку.

Ключові слова: *альдегіддегідрогеназа, мітохондрії, пубертат, печінка, серце.*

A.V. Guryeva, V.V. Davydov, V.V. Rudenko

ALDEHYDE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN SUBCELLULAR FRACTIONS OF PUBERTAL RATS LIVER AND HEART

The activity of aldehyde dehydrogenase in post mitochondrial and mitochondrial fractions of pubertal rat liver and heart was studied. It was established that age related changes in enzyme activity are less significant in post mitochondrial fraction than in mitochondrial one. In liver and heart of rats of pubertal age the activity of aldehyde dehydrogenase is the same as in sexually mature rats. In mitochondrial fraction of heart the age related decrease of activity was observed, while pubertate rat liver post mitochondrial fraction shows multidirectional changes of enzyme activity.

Key words: *aldehyde dehydrogenase, mitochondria, pubertal age, liver, heart.*

Поступила 09.09.11