

## ••• БІОХІМІЯ ••• BIOCHEMISTRY •••

УДК: [612.66+616-092.19]:577.15

### **Особенности модуляции альдегиддегидрогеназной активности в печени и сердце крыс пубертатного возраста** **А.В.Гурьева, В.В.Давыдов, Е.Р.Грабовецкая**

ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков АМН Украины» (Харьков, Украина)  
vaddavydov@mail.ru

Показано, что под влиянием ряда факторов оксидативного стресса (изменение pH внутриклеточной среды, накопление в клетках прооксидантов, таких как перекись водорода, восстановленное железо и др.) изменяется активность альдегиддегидрогеназы в постмитохондриальной фракции сердца и печени крыс разного возраста. Установлено, что ферменты печени крыс пубертатного возраста проявляют большую чувствительность к ингибирующему эффекту ацидоза и меньшую к активирующему действию перекиси водорода, чем энзимы печени взрослых крыс. Активность постмитохондриальной фракции сердца у крыс раннего пубертатного возраста проявляет наибольшую чувствительность к ингибирующему эффекту ацидоза и наименьшую к активирующему действию перекиси водорода, по сравнению с животными других возрастных групп. Однако в позднем пубертате характер ответа альдегиддегидрогеназной активности сердца меняется, приближаясь к таковому у взрослых половозрелых животных.

**Ключевые слова:** оксидативный стресс, альдегиддегидрогеназа, перекись водорода, соль Мора, печень, сердце, пубертат.

### **Особливості модуляції альдегіддегідрогеназної активності в печінці та серці щурів пубертатного віку** **А.В.Гур'єва, В.В.Давидов, Є.Р.Грабовецька**

Було показано, що під впливом деяких факторів оксидативного стресу (зміна pH внутрішньоклітинного середовища, накопичення в клітинах прооксидантів, таких як перекис водню, відновлене залізо та ін.) змінюється активність альдегіддегідрогенази постмитохондриальної фракції серця та печінки щурів різного віку. Встановлено, що ферменти печінки щурів пубертатного віку проявляють більшу чутливість до інгібіторного ефекту ацидозу та меншу до активуючої дії перекису водню, ніж ферменти печінки дорослих щурів. Активність постмитохондриальної фракції серця у щурів раннього пубертатного віку найбільш чутлива до інгібіторного ефекту ацидозу та найменш чутлива до активуючої дії перекису водню порівняно з тваринами інших вікових груп. Проте в пізньому пубертаті характер відповіді альдегіддегідрогеназної активності серця змінюється, наближуючись до показників дорослих статевозрілих щурів.

**Ключові слова:** оксидативний стрес, альдегіддегідрогеназа, перекис водню, сіль Мора, печінка, серце, пубертат.

### **Specific features of aldehyde dehydrogenase activity modulation in liver and heart of pubertal age rats** **A.V.Guryeva, V.V.Davydov, E.R.Grabovetskaya**

It has been shown that some oxidative stress factors such as change of intracellular acidity, accumulation of hydrogen peroxide and ferrous irons lead to alterations of aldehyde dehydrogenase activity of postmitochondrial fractions in liver and heart of rats. It has been found that enzyme activity in liver of early pubertal age rats is more sensitive to inhibition by decreased acidity and less sensitive to activation by hydrogen peroxide than enzymes in liver of adult rats. The activity of aldehyde dehydrogenase in heart of early pubertal age rats shows the same direction of changes. But in later pubertal age enzyme activity is similar to the activity in liver and heart of adult sexually mature rats.

**Key words:** oxidative stress, aldehyde dehydrogenase, hydrogen peroxide, Mohr's salt, liver, heart, pubertal age.

### Введение

Важную роль в защите клеток от повреждения при оксидативном стрессе играют ферменты утилизации карбонильных продуктов свободнорадикального окисления (Srivastava et al., 2004; Xie et al., 2001; Choudhary et al., 2003; Xu et al., 2006). Можно думать о том, что с возрастной модуляцией их свойств связано повышение чувствительности тканей внутренних органов к оксидативному стрессу в пубертатном возрасте (Волкова, Давыдов, 2009а, б). Однако до настоящего времени в литературе все еще отсутствует информация по данному вопросу. Учитывая это и принимая во внимание особую роль альдегиддегидрогеназы в утилизации эндогенных альдегидов (Choudhary et al., 2005; Ohsawa et al., 2003), целью данного исследования явилось изучение особенностей модуляции данного энзима у животных пубертатного возраста под влиянием ряда факторов, возникающих в клетках в условиях оксидативного стресса.

### Объекты и методы исследований

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 сердце и печень, 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 минут при 1000 g. Супернатант повторно центрифугировали 20 минут при 10000 g. Полученную надосадочную жидкость декантировали и использовали в работе в качестве постмитохондриальной фракции. Все процедуры фракционирования проводили при 4–6°C.

В постмитохондриальной фракции печени и сердечной мышцы определяли активность NADH-зависимой альдегиддегидрогеназы с использованием глутарового альдегида в качестве субстрата (Пирожков, Панченко, 1988). В специальных исследованиях уменьшали величину pH реакционной смеси с 8,5 до 8,3 и 8,1, а также вносили в нее соль Мора и аскорбиновой кислоты в конечных концентрациях 0,0012 мМоль и 0,8 мМоль соответственно или перекись водорода в смеси с азидом натрия в конечных концентрациях 10 мМоль и 10 мМоль соответственно.

Концентрацию белка в постмитохондриальной фракции определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1955).

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

### Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что альдегиддегидрогеназная активность в постмитохондриальной фракции печени и сердца у 1,5-, 2- и 12-месячных крыс существенно не различается (табл. 1). В то же время в печени и сердце 3-месячных животных ее величина оказывается на 27% и 26% соответственно ниже, чем у 12-месячных.

**Таблица 1.**  
**Альдегиддегидрогеназная активность (нмоль НАДН/мг белка·мин) постмитохондриальной фракции печени и сердца крыс разного возраста (M±SE, n=6–7)**

Орган	Возраст, мес.			
	1,5	2,0	3,0	12,0
печень	11,5±0,6	9,5±0,9	9,1±0,5*	11,9±0,7
сердце	5,2±0,6	7,3±0,4	5,9±0,2*	8,0±0,7

Примечание: \* $p < 0,05$  по отношению к показателям 12-месячных животных.

Таким образом, альдегиддегидрогеназная активность постмитохондриальной фракции внутренних органов крыс, находящихся на этапе полового созревания, находится на уровне таковой у взрослых половозрелых животных. Это предполагает одинаковую базальную скорость утилизации эндогенных альдегидов в альдегиддегидрогеназной реакции в гепатоцитах и кардиомиоцитах животных пубертатного и взрослого половозрелого возраста. Однако в условиях увеличения внутриклеточной концентрации альдегидных продуктов свободнорадикального окисления при

оксидативном стрессе возникают метаболические предпосылки для модуляции активности альдегиддегидрогеназ под влиянием накапливающихся в клетках прооксидантов (перекиси водорода, восстановленного железа и др.), а также изменения ионного состава и pH внутриклеточной среды. Можно думать о том, что выраженность подобной модуляции имеет зависимый от возраста характер. Для проверки данного предположения далее было проведено изучение влияния ацидоза, а также внесения в реакционную смесь перекиси водорода и восстановленного железа в составе соли Мора на альдегиддегидрогеназную активность постмитохондриальной фракции печени и сердца крыс разного возраста.

Полученные результаты представлены на рис. 1. Из них следует, что при уменьшении pH реакционной смеси происходит зависящая от возраста модуляция альдегиддегидрогеназной активности в печени. При этом у 12-месячных крыс выявляется всего лишь тенденция к понижению активности ( $p > 0,05$ ). У 3-месячных животных при pH 8,3 активность понижается до 19% от ее исходной величины, а при pH 8,1 – вообще не определяется. У 2-месячных крыс понижение pH реакционной смеси уже до 8,3 сопровождается полным ингибированием альдегиддегидрогеназ в постмитохондриальной фракции печени, тогда как у 1,5-месячных животных – постепенным понижением ферментативной активности до 44% от ее величины при pH 8,5 (рис. 1А).

При добавлении в реакционную смесь (0,0012 мМ) соли Мора у 1,5- и 12-месячных животных происходит полное ингибирование альдегиддегидрогеназ. В то же время у 2- и 3-месячных крыс альдегиддегидрогеназная активность в постмитохондриальной фракции печени остается на ее исходном уровне (рис. 1В).

Внесение перекиси водорода в среду инкубации постмитохондриальной фракции печени сопровождается значительным повышением альдегиддегидрогеназной активности. В большей мере данный сдвиг проявляется у половозрелых животных, а в меньшей мере – у крыс пубертатного возраста (рис. 1Б).

Анализ полученных результатов свидетельствует об изменении характера ответа альдегиддегидрогеназ постмитохондриальной фракции печени на действие некоторых регуляторных факторов у крыс в возрасте от 1,5 до 12 месяцев. Так, ингибирующий эффект ацидоза в большей мере проявляется у 2-месячных, а в меньшей мере – у 12-месячных животных. В то же время у 2- и 3-месячных крыс не выявляется ингибирующего действия соли Мора, что характерно для альдегиддегидрогеназ из постмитохондриальной фракции печени 1,5- и 12-месячных животных. Неодинаково и проявление активирующего эффекта перекиси водорода, которое оказывается минимальным в пробах, полученных из печени крыс пубертатного возраста.

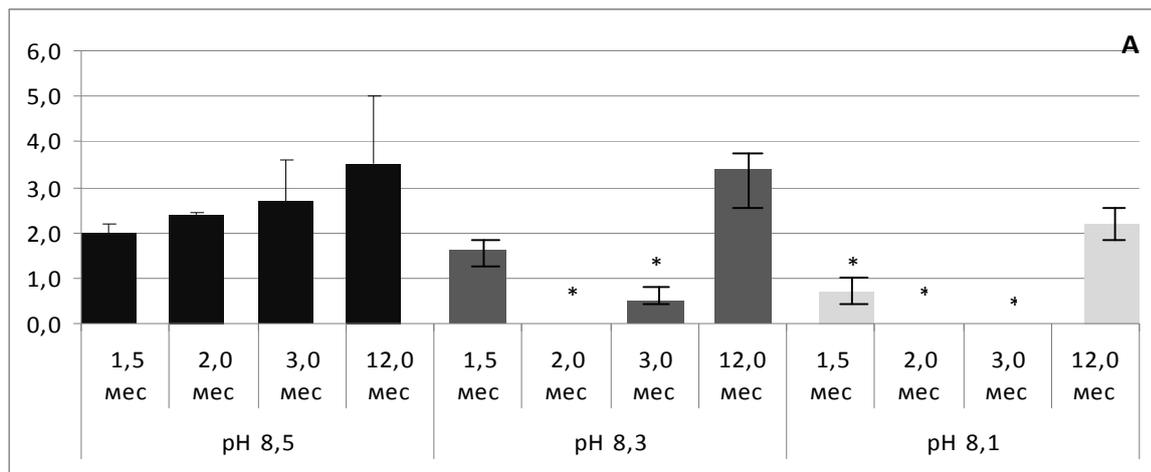
Резюмируя выше изложенное, можно прийти к заключению о том, что немитохондриальные альдегиддегидрогеназы печени крыс пубертатного возраста (1,5 и 2 месяца) проявляют большую чувствительность к ингибирующему эффекту ацидоза и меньшую чувствительность к активирующему действию перекиси водорода, чем соответствующие ферменты из печени взрослых половозрелых крыс.

В постмитохондриальной фракции сердца 1,5-месячных крыс, как следует из данных, представленных на рис. 2, при понижении pH реакционной смеси уже до 8,3 происходит полное ингибирование альдегиддегидрогеназной активности. В то же время у животных 2- и 12-месячного возраста подкисление реакционной смеси даже до 8,1 не сопровождается существенным изменением ее величины.

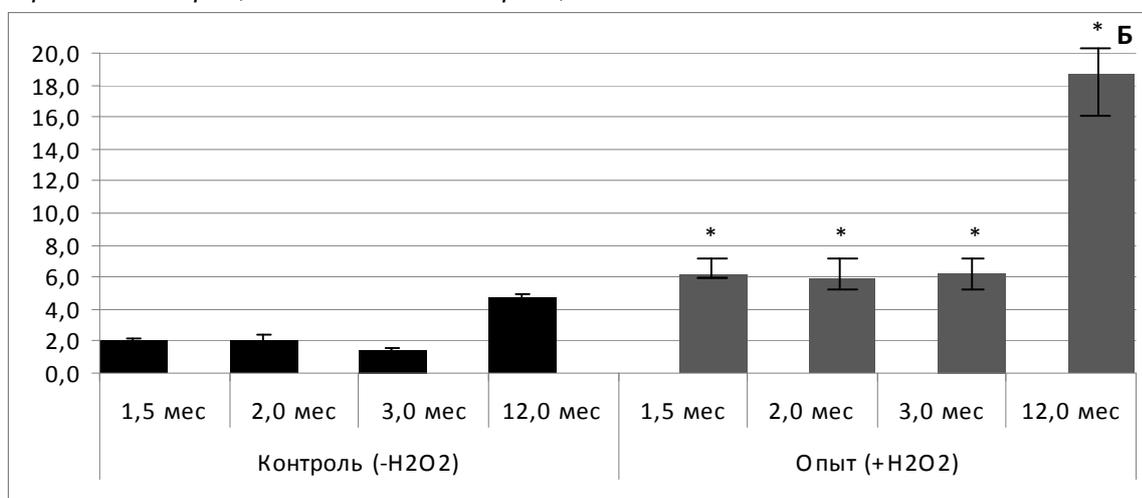
Под влиянием перекиси водорода происходит резкое повышение альдегиддегидрогеназной активности в постмитохондриальной фракции сердца. Как следует из данных, представленных на рис. 2, активирующий эффект в большей мере выражен у 12-месячных, а в меньшей мере – у 1,5-месячных крыс.

Результаты проведенных исследований указывают на то, что альдегиддегидрогеназная активность постмитохондриальной фракции сердца у крыс раннего пубертатного возраста проявляет наибольшую чувствительность к ингибирующему эффекту ацидоза и наименьшую чувствительность к активирующему действию перекиси водорода, чем у животных других возрастных групп. Однако в позднем пубертате характер ответа альдегиддегидрогеназной активности меняется, приближаясь к таковому у взрослых половозрелых животных.

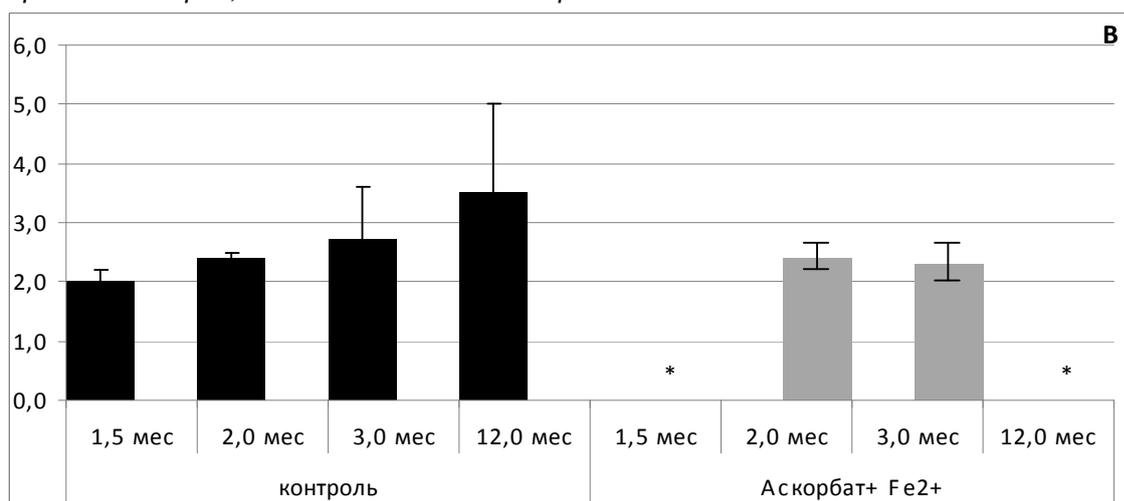
Оценивая характер полученных данных, можно прийти к выводу о том, что в раннем пубертатном возрасте в клетках печени и сердца повышается чувствительность немитохондриальных форм альдегиддегидрогеназ к ингибирующему эффекту ацидоза и ограничение проявления на них активирующего действия перекиси водорода, по сравнению с взрослыми половозрелыми животными. Аналогичная ситуация характерна и для альдегиддегидрогеназ печени крыс позднего пубертатного возраста, хотя в сердце у животных данной возрастной группы чувствительность ферментов к ингибирующему эффекту ацидоза приближается к таковой у взрослых половозрелых крыс.



Примечание: \* $p < 0,05$  по отношению к pH 8,5.



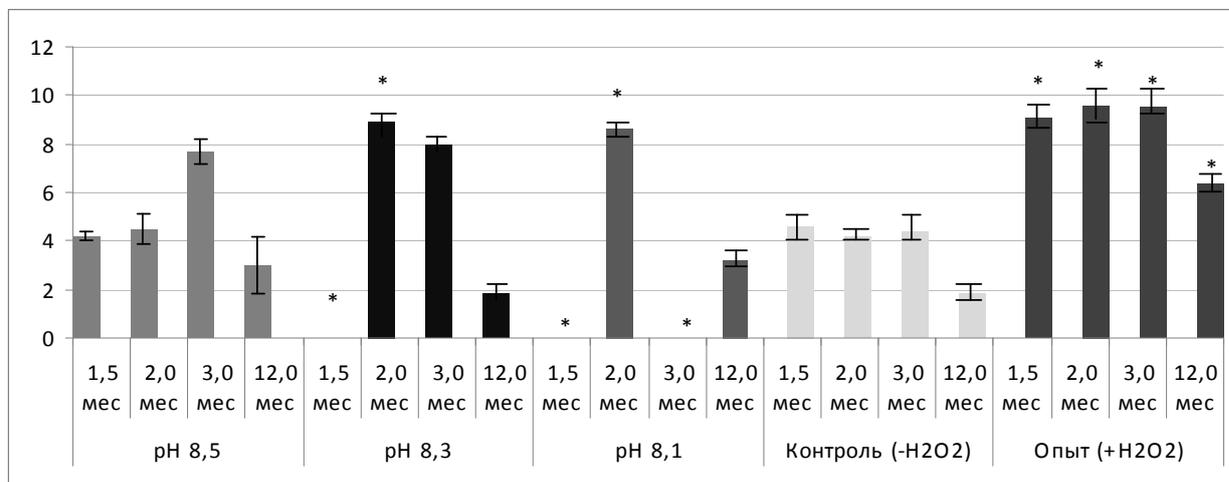
Примечание: \* $p < 0,05$  по отношению к контролю.



Примечание: \* $p < 0,05$  по отношению к контролю.

Рис. 1. Влияние pH среды (А), а также добавления в нее перекиси водорода (10 мМ) (Б) и соли Мора (0,0012 мМ) (В) на альдегиддегидрогеназную активность постмитохондриальной фракции печени крыс разного возраста; по оси ординат – активность фермента (нмоль НАДН/мг белка·мин)

Принимая во внимание характер полученных данных, можно предположить, что изменение ответа немитохондриальных альдегиддегидрогеназ на действие исследованных регуляторных факторов будет способствовать понижению эффективности окислительного катаболизма эндогенных альдегидов в клетках печени и сердца крыс пубертатного возраста в условиях стимуляции их образования при оксидативном стрессе.



Примечание: \* $p < 0,05$  по отношению к соответствующему контролю (pH 8,5;  $-H_2O_2$ ).

**Рис. 2.** Влияние pH среды и добавления в нее перекиси водорода (10 мМ) на альдегиддегидрогеназную активность постмитохондриальной фракции сердца крыс разного возраста, по оси ординат – активность фермента (нмоль НАДН/мг белка·мин)

Таким образом, несмотря на высокий базальный уровень альдегиддегидрогеназной активности, в печени и сердце животных пубертатного возраста при оксидативном стрессе формируются метаболические предпосылки для ограничения скорости утилизации карбонильных продуктов свободнорадикального окисления. Это, в свою очередь, способствует повышению их чувствительности к действию повреждающих факторов внешней среды, реализующих свой эффект через усиление прооксидантных воздействий на организм. Причиной возникновения подобного возрастного феномена могут быть возрастные различия в структуре изоферментного спектра немитохондриальных альдегиддегидрогеназ в тканях внутренних органов. Изучению этого вопроса будут посвящены наши дальнейшие исследования.

### Выводы

1. Альдегиддегидрогеназная активность постмитохондриальной фракции печени и сердца крыс пубертатного возраста соответствует ее величине у взрослых половозрелых животных.
2. В пубертатном возрасте альдегиддегидрогеназы постмитохондриальной фракции печени более чувствительны к ингибирующему эффекту ацидоза и менее чувствительны к активирующему действию перекиси водорода, чем у взрослых половозрелых крыс.
3. У крыс раннего пубертатного возраста альдегиддегидрогеназы постмитохондриальной фракции сердца проявляют наибольшую чувствительность к ингибирующему эффекту ацидоза и наименьшую чувствительность к активирующему действию перекиси водорода, чем у животных других возрастных групп.
4. В условиях оксидативного стресса у животных пубертатного возраста, несмотря на высокий базальный уровень альдегиддегидрогеназной активности, формируются предпосылки для ограничения скорости окисления эндогенных альдегидов.

### Список литературы

Волкова Ю.В., Давыдов В.В. Влияние иммобилизационного стресса на содержание продуктов свободнорадикального окисления липидов и белков в субклеточных фракциях мозга крыс разного возраста // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т.81, №2. – С. 45–49. /Volkova Yu.V., Davydov V.V. Vliyaniye immobilizatsionnogo stressa na sodержaniye produktov svobodnoradikal'nogo okisleniya lipidov i belkov v subkлетochnykh fraktsiyakh mozga kryс raznogo vozrasta // Ukr. biokhim. zhurn. – 2009. – Т.81, №2. – С. 45–49./

Волкова Ю.В., Давыдов В.В. Влияние иммобилизационного стресса на свободнорадикальное окисление белков и липидов в субклеточных фракциях печени крыс разного возраста // Эксперимен. і клініч. медицина. – 2009. – №2. – С. 16–22. /Volkova Yu.V., Davydov V.V. Vliyaniye immobilizatsionnogo stressa na svobodnoradikal'noye okisleniye belkov i lipidov v subkletochnykh fraktsiyakh pecheni krysv raznogo vozrasta // Eksperyment. i klinich. medytsyna. – 2009. – №2. – S. 16–22./

Пирожков С.В., Панченко Л.Ф. Роль альдегиддегидрогеназ в метаболизме малонового диальдегида в печени крыс // Биохимия. – 1988. – Т.53, №9. – С. 1443–1448. /Pirozhkov S.V., Panchenko L.F. Rol' al'degiddegidrogenaz v metabolizme malonovogo dial'degida v pecheni krysv // Biokhimiya. – 1988. – T.53, №9. – S. 1443–1448./

Choudhary S., Srivastava S., Xiao T. et al. Metabolism of lipid derived aldehyde, 4-hydroxynonenal in human lens epithelial cells and rat lens // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2003. – Vol.44. – P. 2675–2682.

Choudhary S., Xiao T., Vergara L.A. et al. Role of aldehyde dehydrogenase isozymes in the defense of rat lens and human lens epithelial cells against oxidative stress // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2005. – Vol.46, №1. – P. 259–267.

Lowry O.H., Rosenbrough K.J., Farr A.L., Rendall K.I. Protein measurement with the Pholin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1955. – Vol.193, №1. – P. 265–267.

Ohsawa I., Kamino K., Nagasaka K. et al. Genetic deficiency of a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases serum lipid peroxides in community-dwelling females // Journal of Human Genetics. – 2003. – Vol.48 – P. 404–409.

Srivastava S., Spite M., Trent J.O. et al. Aldose reductase-catalyzed reduction of aldehyde phospholipids // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol.279, №51. – P. 53395–53406.

Xie C., Lovell M.A., Xiong S. et al. Expression of glutathione-S-transferase isozyme in the SY5Y neuroblastoma cell line increases resistance to oxidative stress // Free Radic. Biol. Med. – 2001. – Vol.31, №1. – P. 73–81.

Xu D., Guthrie J.R., Mabry S. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase attenuates hyperoxia-induced cell death through activation of ERK/MAPK and PI3K-Akt pathways in lung epithelial cells // AJP – Lung Physiol. – 2006. – Vol.291, №5. – L. 966–975.

**Представлено: В.І.Жуков / Presented by: V.I.Zhukov**

**Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky**

*Подано до редакції / Received: 30.09.11*