

УДК: [612.66+616-092]: 577.15

Активность ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения альдегидов, в мозге крыс пубертатного возраста при стрессе
А.В.Редько

*Государственное учреждение «Институт охраны здоровья детей и подростков АМН Украины»
(Харьков, Украина)*

Исследована активность ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения альдегидов в мозге крыс пубертатного возраста при иммобилизационном стрессе. Установлено, что кратковременная иммобилизация сопровождается уменьшением активности альдегидредуктазы (АР) в постмитохондриальной фракции мозга крыс в возрасте позднего пубертата. В условиях продолжительного иммобилизационного стресса у 2-месячных крыс повышается активность альдегиддегидрогеназы (АлДГ) и АР в митохондриальной фракции, у 1,5-месячных животных активность АлДГ в постмитохондриальной фракции мозга, по сравнению с их исходной величиной.

Ключевые слова: *иммобилизационный стресс, пубертат, свободнорадикальное окисление, эндогенные альдегиды, альдегидредуктаза, альдегиддегидрогеназа.*

Активність ферментів, каталізуючих окисно-відновні перетворення альдегідів, в мозку щурів пубертатного віку при стресі
А.В.Редько

Досліджено активність ферментів, каталізуючих окисно-відновні перетворення альдегідів, в мозку щурів пубертатного віку при імобілізаційному стресі. Встановлено, що короткочасна імобілізація супроводжується зменшенням активності альдегидредуктази (АР) в постмитохондриальній фракції мозку щурів у віці пізнього пубертату. В умовах тривалого імобілізаційного стресу у 2-місячних щурів підвищується активність альдегиддегидрогенази (АлДГ) і АР в митохондриальній фракції, у 1,5-місячних тварин активність АлДГ в постмитохондриальній фракції мозку, порівняно з їх вихідною величиною.

Ключові слова: *імобілізаційний стрес, пубертат, вільнорадикальне окислення, ендогенні альдегіди, альдегидредуктаза, альдегиддегидрогеназа.*

Activity of the enzymes catalyzing redox aldehyde transformations in the brain of rats at pubertal age during stress
A.V.Redko

The activity of the enzymes catalyzing redox transformations of aldehydes in the brain of rats under immobilization stress has been studied. It has been established that short-time immobilization is accompanied by a decrease in aldehyde reductase activity in postmitochondrial fraction of rat brain at the age of late puberty. Under the conditions of prolonged immobilization stress in 2-month-old rats the activity of aldehyde dehydrogenase and aldehyde reductase has been increased in mitochondrial fraction of brain; in 1,5-month-old rats aldehyde dehydrogenase activity has been increased in postmitochondrial fraction of brain, as compared with its initial level.

Key words: *immobilization stress, puberty, free radical oxidation, endogenous aldehydes, aldehyde reductase, aldehyde dehydrogenase.*

Введение

Данные литературы указывают на то, что в пубертатном возрасте у подростков повышается распространенность невротических расстройств (Romeo, McEwen, 2006). Одной из основных причин этого может быть понижение их устойчивости к стрессу. Однако механизмы этого феномена до настоящего времени не изучены. Вместе с тем известно, что формирование стрессорного повреждения внутренних органов, помимо прочего, обусловлено повышением в них интенсивности свободнорадикальных процессов (Меерсон, 1984; Leeuwenburgh, Heinecke, 2001). В качестве важного фактора альтерации клеток в условиях стимуляции свободнорадикальных процессов служит накопление в них карбонильных промежуточных продуктов ПОЛ (Барабой, 1991; Ланкин, 1981), обладающих выраженным цитотоксическим действием. В этой связи, устойчивость к свободнорадикальному повреждению зависит от состояния внутриклеточных систем утилизации эндогенных альдегидов (Uchida, 2000). Тем не менее, значение ферментов катаболизма эндогенных

альдегидов в антистрессорной защите мозга и возрастные аспекты данного вопроса до настоящего времени не изучены. Учитывая это, целью настоящего исследования явилось определение активности ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения альдегидов в мозге крыс пубертатного возраста при иммобилизационном стрессе.

Материал и методы исследования

Работа выполнена на 72 крысах самцах линии Вистар трех возрастных групп: I – 1,5-месячные (ранний пубертат), II – 2-месячные (поздний пубертат) и III – 12-месячные (взрослые половозрелые). Животных указанных возрастных групп делили на 3 подгруппы: 1 – интактные, 2 – крысы, подвергнутые кратковременному иммобилизационному стрессу путем 30-минутной фиксации на спине, и 3 – животные, подвергнутые продолжительной иммобилизации, в процессе которой их привязывали к неподвижной опоре по 5 часов в день в течение 2 дней. Возникновение стресса контролировали по уровню катехоламинов в крови.

Немедленно после иммобилизации крыс декапитировали под легким эфирным наркозом. Извлекали мозг и помещали в охлажденный до 4°C физиологический раствор. Навеску мозга гомогенизировали со средой выделения, содержащей 320 мМ сахарозы, 10 мМ Трис и 1 мМ ЭДТА (pH 7,4), в гомогенизаторе Поттера–Эльвегейма в соотношении 1:10. Гомогенат фильтровали через 2 слоя марли в центрифужные пробирки и центрифугировали при 1000 g в течение 10 минут. Супернатант переливали в чистые пробирки и центрифугировали 20 минут при 10000 g. Полученную надосадочную жидкость использовали в качестве постмитохондриальной фракции, а осадок суспендировали в среде выделения и повторно центрифугировали в течение 20 минут при 10000 g. Осадок суспендировали с 1 мл среды выделения и использовали в качестве грубой митохондриальной фракции.

В пробах субклеточных фракций головного мозга определяли активность НАДН-зависимой альдегидредуктазы (АР; К.Ф. 1.1.1.1.) (Голубев, 1996) и NAD-зависимой альдегиддегидрогеназы (АлДГ; К.Ф. 1.2.1.3) (Кислова и др., 1995). В постмитохондриальной фракции мозга флуориметрически определяли содержание шиффовых оснований (Rice-Evans et al., 1991).

Содержание белка в пробах субклеточных фракций определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1955).

Полученные результаты подвергали статистической обработке при помощи непараметрического метода Wilcoxon-Mann-Whitney.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что в процессе восходящего онтогенеза от 1,5- до 12-месячного возраста в субклеточных фракциях мозга крыс происходит изменение активности ферментов утилизации эндогенных альдегидов в окислительно-восстановительных реакциях (табл. 1).

В митохондриальной фракции мозга 2-месячных крыс активность АР на 31% ниже, чем у взрослых животных. В тоже время у 1,5-месячных крыс она не отличается от таковой у 12-месячных животных. Активность АлДГ в митохондриальной фракции мозга крыс всех исследованных возрастных групп находится на одинаковом уровне.

В постмитохондриальной фракции мозга у 1,5-месячных животных активность АР и АлДГ выше на 109% и 127% соответственно, чем у 12-месячных крыс. При этом у 2-месячных животных активность АлДГ оказывается на 50% выше, а активность АР соответствует таковой у 1,5-месячных крыс.

Полученные результаты указывают на более высокую возрастную лабильность исследованных ферментов в постмитохондриальной, чем митохондриальной фракции мозга. Причем, характер модуляции ферментативной активности, происходящей в этой субклеточной фракции, указывает на то, что цитозольные системы утилизации эндогенных альдегидов в окислительно-восстановительных реакциях имеют большую мощность в клетках мозга крыс пубертатного возраста, чем у взрослых половозрелых животных. Подтверждением того служит более высокий уровень концентрации шиффовых оснований в постмитохондриальной фракции мозга взрослых, чем у 1,5- и 2-месячных животных (рис. 1).

Изменение базальной мощности систем катаболизма эндогенных альдегидов в процессе восходящего онтогенеза способствует модуляции защиты мозга от повреждающих факторов окислительного стресса. Учитывая это и принимая во внимание факт стимуляции свободнорадикальных процессов в тканях внутренних органов при стрессе (Davydov, Shvets, 2001; Nayanatara et al., 2005), далее была изучена активность АР и АлДГ в субклеточных фракциях мозга крыс разного возраста, подвергнутых иммобилизации разной продолжительности.

Таблица 1.
Активность ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения альдегидов, в субклеточных фракциях мозга крыс, подвергнутых кратковременной иммобилизации ($M \pm m$; $n=5-6$)

Возраст	1,5 мес.		2 мес.		12 мес.	
Экспериментальная группа	интакт.	стресс	интакт.	стресс	интакт.	стресс
митохондриальная фракция						
Альдегиддегидрогеназа (нмоль/мин·мг белка)	0,94±0,17	1,15±0,28	0,91±0,16	0,71±0,16	0,90±0,10	0,68±0,006
Альдегидредуктаза (нмоль/мин·мг белка)	27,73±4,60	32,52±4,68	15,93±0,092**	16,48±1,76	20,88±0,65	29,3±2,71*
постмитохондриальная фракция						
Альдегиддегидрогеназа (нмоль/мин·мг белка)	1,36±0,006	1,94±0,41	2,08±0,12**	2,34±0,17	0,60±0,003**	0,77±0,10
Альдегидредуктаза (нмоль/мин·мг белка)	11,37±1,81	6,92±1,04	16,51±1,70	10,77±1,44*	5,44±1,02	6,85±1,32

Примечание: * – $p < 0,05$ к интактным; ** – $p < 0,05$ к интактным 1,5 мес.

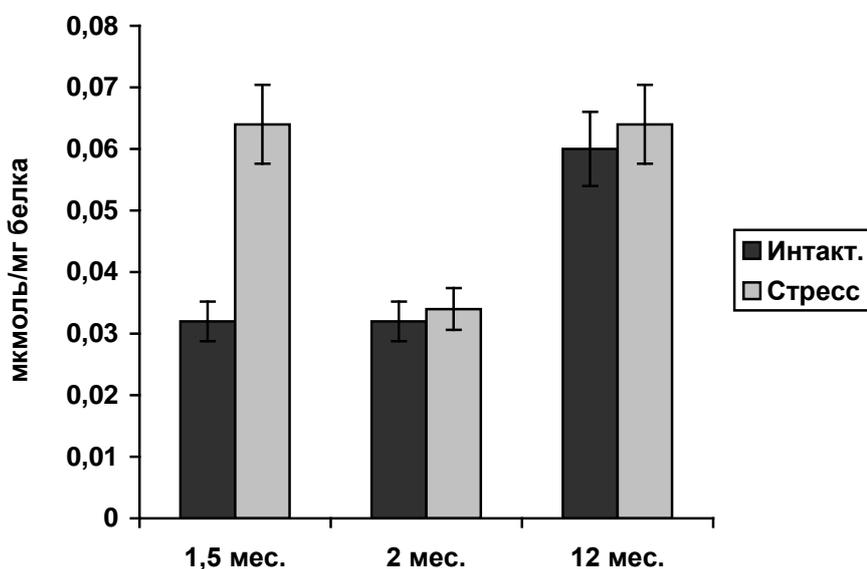


Рис. 1. Возрастные особенности изменения содержания шиффовых оснований в постмитохондриальной фракции мозга крыс, подвергнутых продолжительной иммобилизации

Проведенные исследования показали, что 30-минутная иммобилизация животных всех исследованных возрастных групп не сопровождается изменением активности NAD-зависимой АлДГ в митохондриальной и постмитохондриальной фракции мозга (табл. 1). В то же время, активность NADH-зависимой АР претерпевает зависимые от возраста изменения. У 12-месячных животных они проявляются в ее повышении в митохондриальной фракции на 40%, а у 2-месячных крыс ее

понижением в постмитохондриальной фракции на 35%, по сравнению с исходной величиной. Выявленная тенденция к формированию сдвига аналогичной направленности со стороны активности АР в постмитохондриальной фракции мозга возникает у 1,5-месячных животных.

Анализ полученных данных указывает на то, что при кратковременном иммобилизационном стрессе у крыс пубертатного возраста, в большей мере у 2-месячных животных, формируются условия для торможения окислительно-восстановительных превращений эндогенных альдегидов в цитозоле нервных клеток. Для митохондриальной фракции возникновение подобного сдвига не характерно. В отличие от крыс пубертатного возраста, при кратковременной иммобилизации взрослых половозрелых животных происходит повышение активности АР в митохондриальной фракции мозга, что в условиях стимуляции радикалообразования при стрессе (Leeuwenburgh, Heineske, 2001; Меерсон, 1984), несомненно, имеет адаптивный характер.

Таким образом, кратковременный иммобилизационный стресс у крыс пубертатного возраста, в большей мере у животных, находящихся в поздней стадии пубертата, сопровождается появлением сдвигов в активности ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения эндогенных альдегидов, способствующих их накоплению в нервных клетках и усилению повреждающего эффекта стресса на мозг. В подобной ситуации представляет интерес изучение эффектов более сильного стрессора на активность ферментов утилизации карбонильных продуктов обмена.

Из табл. 2 видно, что продолжительная иммобилизация сопровождается повышением активности АР и АлДГ в митохондриальной фракции мозга 2-месячных животных на 47% и 125% соответственно, по сравнению с ее исходной величиной. У взрослых животных при этом в митохондриальной фракции происходит повышение активности АлДГ на 89%, по сравнению с ее исходной величиной. В постмитохондриальной фракции мозга крыс, подвергнутых продолжительной иммобилизации, активность АР не изменяется и остается на исходном уровне. В то же время, активность АлДГ у 1,5-месячных животных возрастает на 53%, по сравнению с ее исходной величиной. У крыс других возрастных групп после продолжительной иммобилизации активность данного энзима не меняется.

Таблица 2.

Активность ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения альдегидов, в субклеточных фракциях мозга крыс, подвергнутых продолжительной иммобилизации ($M \pm m$; $n=5-6$)

Возраст	1,5 мес.		2 мес.		12 мес.	
	интакт.	стресс	интакт.	стресс	интакт.	стресс
митохондриальная фракция						
Альдегидде- гидрогеназа (нмоль/мин-мг белка)	0,94±0,17	1,70±0,38	0,91±0,16	2,05±0,20*	0,90±0,10	1,71±0,22*
Альдегид- редуктаза (нмоль/мин-мг белка)	27,73±4,60	36,76±8,10	15,93±0,92**	23,27±1,75*	20,88±0,65	19,13±4,34
постмитохондриальная фракция						
Альдегидде- гидрогеназа (нмоль/мин-мг белка)	1,36±0,06	2,08±0,24	2,08±0,12**	2,29±0,24	0,60±0,03**	0,47±0,07
Альдегид- редуктаза (нмоль/мин-мг белка)	11,37±1,81	10,20±1,13	16,51±1,70	16,52±5,07	5,44±1,02	8,03±2,56

Примечание: * – $p < 0,05$ к интактным; ** – $p < 0,05$ к интактным 1,5 мес.

Анализ полученных данных указывает на то, что при продолжительной иммобилизации в мозге крыс пубертатного возраста повышается активность ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения эндогенных альдегидов. Подобный сдвиг, по всей вероятности,

представляет собой компенсаторную реакцию, направленную на ограничение накопления цитотоксических карбонильных продуктов обмена в нервных клетках при стрессе. Однако его проявление у 1,5- и 2-месячных крыс имеет некоторые особенности: у 2-месячных животных при продолжительной иммобилизации возникает одновременная активация АР и АлДГ в митохондриальной фракции, а у 1,5-месячных крыс только повышение активности АлДГ в постмитохондриальной фракции мозга. Принимая во внимание характер возникающих сдвигов и учитывая роль митохондрий во внутриклеточном образовании эндогенных альдегидов, можно думать о том, что стрессорная модуляция ферментативной активности в периоде полового созревания способствует повышению эффективности утилизации цитотоксических карбонильных продуктов обмена в мозге, в большей мере у 2-месячных, чем у 1,5-месячных крыс. Подтверждением этого служат результаты определения содержания у них шиффовых оснований в постмитохондриальной фракции мозга (рис. 1).

Оценивая причины повышения активности АлДГ и АР в мозге крыс пубертатного возраста при продолжительной иммобилизации, можно предположить их взаимосвязь с субстратной индукцией синтеза данных энзимов под влиянием эндогенных альдегидов (Spycher et al., 1996; Koch et al., 2000; Zhu et al. 2006), накапливающихся в мозге при стрессе (Харченко, 2000).

Резюмируя выше изложенное, представляется возможным сделать заключение о том, что в периоде полового созревания мозг крыс обладает высокой базальной активностью ферментов, катализирующих превращения альдегидов в окислительно-восстановительных реакциях. Однако при кратковременной иммобилизации у животных пубертатного возраста происходит понижение активности АР, что предполагает уменьшение у них эффективности утилизации карбонильных продуктов метаболизма в нервных клетках. В условиях же продолжительного иммобилизационного стресса, в большей мере у 2-месячных, чем 1,5-месячных животных, возникает компенсаторная активация АлДГ и АР, которая предопределяет повышение эффективности защиты мозга от цитотоксического эффекта карбонильных продуктов обмена. Проявления стрессорной активации оксидоредуктаз, катализирующих окислительно-восстановительные превращения эндогенных альдегидов в периоде полового созревания, имеют возрастные особенности. По всей вероятности, они лежат в основе повышения чувствительности мозга к стрессу в периоде раннего пубертата. Однако механизмы их формирования остаются не ясными. Их изучению будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Выводы

1. Активность АлДГ и АР в постмитохондриальной фракции головного мозга крыс пубертатного возраста имеет большую величину, чем у взрослых половозрелых животных.
2. Кратковременная иммобилизация сопровождается уменьшением активности АР в постмитохондриальной фракции мозга крыс в возрасте позднего пубертата.
3. В условиях продолжительного иммобилизационного стресса у 2-месячных крыс повышается активность АлДГ и АР в митохондриальной фракции, а у 1,5-месячных животных активность АлДГ в постмитохондриальной фракции мозга, по сравнению с их исходной величиной.

Список литературы

- Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи совр. биологии. – 1991. – Т.111, №6. – С. 923–931.
- Голубев А.Г. Изнанка метаболизма // Биохимия. – 1996. – Т.61, №11. – С. 2018–2039.
- Кислова О.В., Виноградова Е.Г., Пхакадзе Г.А. Сравнительная характеристика мембранных форм альдегиддегидрогеназ // Укр. биохим. журн. – 1995. – №6. – С. 38–46.
- Ланкин В.З. Метаболизм липоперекисей в тканях млекопитающих // В кн.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. – М.: Наука, 1981. – С. 75–95.
- Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. – М.: Медицина, 1984. – С.270.
- Харченко Н.К. Альдегиддегидрогеназная активность и содержание дофамина в некоторых областях мозга крыс, предпочитающих и отвергающих алкоголь // Укр. біохімі. журн. – 2000. – Т.72, №2. – С. 75–84.
- Davydov V.V., Shvets V.N. Lipid peroxidation in the heart of adult and old rats during immobilization stress // Exp. Gerontol. – 2001. – Vol.36, №5. – P. 1155–1160.
- Koch Y.H., Park Y.S., Takahashi M. et al. Aldehyde reductase gene expression by lipid peroxidation end products, MDA and HNE // Free Radic. Res. – 2000. – Vol.33, №6. – P. 739–746.
- Leeuwenburgh C., Heinecke J.W. Oxidative stress and antioxidants in exercise // Current medical Chemistry. – 2001. – Vol.8. – P. 829–838.

-
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Rendall R.I. Protein measurement with the Pholin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1955. – Vol.193, №1. – P. 265–267.
- Nayanatara A.K., Nagaraja H.S., Anupama B.K. The effect of repeated swimming stress on organ weights and lipid peroxidation in rats // Thai journal of physiological sciences. – 2005. – Vol.18, №1. – P. 3–9.
- Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research. – London, 1991. – 346p.
- Romeo R.D., McEwen B.C. Stress and the adolescent brain // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2006. – Vol.1094. – P. 226–234.
- Spycher S., Tabataba-Vakili S., O'Donnell V.B. et al. 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal induces transcription and expression of aldose reductase // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – Vol.226, №2. – P. 512–516.
- Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases // Free Radical. Biol. Med. – 2000. – Vol.28, №12. – P. 1685–1696.
- Zhu H., Zhang L., Xi X. et al. 4-Hydroxy-2-nonenal upregulates endogenous antioxidants and phase 2 enzymes in rat H9c2 myocardial cells: protection against overt oxidative and electrophilic injury // Free Radic. Res. – 2006. – Vol.40, №8. – P. 875–884.

Представлено: В.І.Жуковим

Рекомендовано до друку: Н.І.Буланкіною

Подано до редакції: 2.09.2009

© А.В.Редько, 2009