

УДК: [612.66+616-092.19]:577.15

Влияние некоторых факторов на активность альдегиддегидрогеназы печени крыс пубертатного возраста в условиях иммобилизационного стресса

Ю.В.Волкова, Л.Л.Сухова, В.В.Давыдов

ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков НАМН Украины» (Харьков, Украина)
volkova1804.@mail.ru

Целью настоящего исследования является изучение влияния некоторых факторов на особенности модуляции альдегиддегидрогеназной активности в постмитохондриальной фракции печени крыс разного возраста, подвергнутых продолжительной иммобилизации. Установлено, что в пубертатном возрасте альдегиддегидрогеназы постмитохондриальной фракции печени более чувствительны к ингибирующему эффекту ацидоза и менее чувствительны к активирующему действию перекиси водорода. У крыс пубертатного возраста (1,5- и 2-месячные животные) при стрессе возникают сдвиги со стороны альдегиддегидрогеназной активности, которые формируют условия для понижения роли окислительного пути в утилизации эндогенных альдегидов в гепатоцитах.

Ключевые слова: альдегиддегидрогеназа, иммобилизационный стресс, печень, пубертат.

Вплив деяких факторів на активність альдегіддегідрогенази печінки щурів пубертатного віку в умовах іммобілізаційного стресу

Ю.В.Волкова, Л.Л.Сухова, В.В.Давыдов

Метою дослідження є вивчення впливу деяких факторів на особливості модуляції альдегіддегідрогеназної активності в постмитохондриальній фракції печінки щурів різного віку в умовах тривалої іммобілізації. Встановлено, що в пубертатному віці альдегіддегідрогенази постмитохондриальної фракції печінки більш чутливі до інгібуючого ефекту ацидозу і менш чутливі до активуючої дії перекису водню. У щурів пубертатного віку (1,5- і 2-місячні тварини) в умовах стресу виникають зміни з боку альдегіддегідрогеназної активності, які формують умови для зниження ролі окисного шляху в утилізації ендогенних альдегідів у гепатоцитах.

Ключові слова: альдегіддегідрогеназа, іммобілізаційний стрес, печінка, пубертат.

The influence of some factors on aldehyde dehydrogenase activity in the liver of rats of pubertal age under conditions of immobilization stress

Yu.V.Volkova, L.L.Sukhova, V.V.Davydov

The purpose of the present work is to study the influence of some factors on peculiarities of modulation of aldehyde dehydrogenase activity in the liver postmitochondrial fraction of rats of different age under conditions of prolonged immobilization stress. It has been revealed that in pubertal age aldehyde dehydrogenases of liver postmitochondrial fraction show higher sensitivity to the inhibitory effect of acidosis and lower sensitivity to the activation effect of hydrogen peroxide. In rats of pubertal age (1.5- and 2-month-old animals) at stress there occur changes in aldehyde dehydrogenase activity, which form conditions for the decrease of the role of oxidative way in the utilization of endogenous aldehydes in hepatocytes.

Key words: aldehyde dehydrogenase, immobilization stress, liver, pubertal age.

Введение

На этапе полового созревания повышается заболеваемость патологией желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой, центральной нервной, эндокринной и других систем организма (Коренев и др., 2000; Коренев, 2001; Коренев, Носова, 2002). Принимая во внимание важную роль стресса в этиологии этих заболеваний, можно предположить, что одной из причин подобного возрастного феномена является понижение устойчивости тканей внутренних органов к действию стрессоров в пубертатном возрасте.

К настоящему времени в литературе накопились многочисленные данные о том, что центральным неспецифическим звеном стрессорного повреждения внутренних органов является

стимуляция в них свободнорадикальных процессов (Меерсон, 1984; Davydov, Shvets, 2001; Nayanatara et al., 2005). Следствием его возникновения становится накопление в клетках цитотоксических карбонильных продуктов обмена, которые выступают в роли своеобразных мессенджеров повреждения (Uchida, 2000). Защита клеток от альтерации эндогенными альдегидами, как наиболее распространенными карбонильными веществами (Давыдов и др., 2012; O'Brein et al., 2005), обеспечивается целой группой ферментов (Давыдов и др., 2012; O'Brein et al., 2005; Esterbauer et al., 1985; Fritz, Petersen, 2013), к числу которых относятся альдегиддегидрогеназы (К.Ф. 1.2.1.3 и 1.2.1.4) (Muzio et al., 2012; Singh et al., 2013). От их активности и содержания в клетках зависит устойчивость последних к свободнорадикальному повреждению (Chen et al., 2008; Oshawa et al., 2003; Давыдов, Божков, 2014). Вместе с тем, до настоящего времени все еще отсутствуют четкие представления об участии альдегиддегидрогеназ в антистрессорной защите, а также об их значении в возрастном понижении чувствительности внутренних органов к альтерации при стрессе. Учитывая это, целью настоящего исследования стало изучение влияния некоторых факторов на особенности модуляции альдегиддегидрогеназной активности в постмитохондриальной фракции печени крыс разного возраста, подвергнутых продолжительной иммобилизации.

Материалы и методы исследований

Работа выполнена на 60 крысах самцах линии Вистар трех возрастных групп: 1 – 1,5-месячные (ранний пубертат), 2 – 2-месячные (поздний пубертат), 3 – 12-месячные (взрослые половозрелые). Животных каждой возрастной группы делили на 2 подгруппы: 1 – интактные и 2 – крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу. Для воспроизведения иммобилизационного стресса животных привязывали к неподвижной опоре на 5 часов в течение 2 дней.

Немедленно после окончания иммобилизации крысы подвергали декапитации под легким эфирным наркозом. Извлекали печень и помещали ее в охлажденный изотонический раствор хлористого натрия. Ткань печени отмывали от крови, 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 качестве постмитохондриальной фракции. Все процедуры фракционирования проводили при 4–6°C.

В выделенной фракции печени определяли активность НАД⁺-зависимой альдегиддегидрогеназы с использованием глутарового альдегида в качестве субстрата (Пирожков, Панченко, 1988). В специальных исследованиях для изучения свойств фермента в среде инкубации уменьшали значение pH с 8,5 до 8,3 и 8,1, а также вносили в нее перекись водорода в смеси с азидом натрия в конечных концентрациях 10 мМ. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Лоури. Результаты исследований подвергали статистической обработке с использованием непараметрического метода Wilcoxon-Mann-Whitney. Различия считали достоверными при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты указывают на то, что альдегиддегидрогеназная активность постмитохондриальной фракции печени крыс пубертатного возраста не отличается от таковой у взрослых половозрелых животных (табл. 1). Причем величина ферментативной активности у них остается неизменной даже после их продолжительной иммобилизации. Это может свидетельствовать о том, что в цитозоле гепатоцитов крыс пубертатного возраста существуют условия для эффективной утилизации карбонильных продуктов свободнорадикального окисления даже в условиях повышения скорости их образования при иммобилизационном стрессе. Вместе с тем следует иметь в виду, что активность ферментов измеряется в оптимальных для них условиях. При изменении же химического состава цитозоля клеток печени при стрессе эффективность окисления карбонильных продуктов свободнорадикального окисления *in situ* может существенно изменяться.

Учитывая это, было изучено влияние эффекта понижения pH реакционной смеси или внесения в нее перекиси водорода на альдегиддегидрогеназную активность постмитохондриальной фракции печени у животных разных возрастных групп. Выбор этих факторов обусловлен тем, что при стрессе в клетках тканей внутренних органов возникают явления метаболического ацидоза и происходит увеличение концентрации активных форм кислорода (Меерсон, 1984).

Таблиця 1.

Активність альдегіддегідрогенази в постмитохондриальній фракції печини крыс, нмоль НАДН₂/мг белка·мин

Подгруппы животных	Возрастные группы животных, мес.		
	1,5	2,0	12,0
Интактные	11,5 ± 0,6	9,5 ± 0,9	12,4 ± 0,7
Стресс	12,2 ± 0,8	12,2 ± 1,4	10,7 ± 0,1

Примечание. По результатам исследований на 5–8 животных.

Исследования показали (табл. 2), что у 12-месячных крыс выявляется слабая тенденция к понижению альдегіддегідрогеназної активності при понижении pH реакционной смеси в использованном диапазоне ($P > 0,05$). У 2-месячных крыс понижение pH реакционной смеси уже до 8,3 сопровождается полным ингибированием альдегіддегідрогеназы, тогда как у 1,5-месячных животных – постепенным понижением ферментативной активности до 44% от ее величины при pH 8,5.

Таблиця 2.

Влияние pH среды инкубации и добавления в нее перекиси водорода на альдегіддегідрогеназную активність постмитохондриальній фракції печини крыс разного возраста, нмоль НАДН₂/мг белка·мин ($M \pm SE$)

Возраст животных, мес.	pH			+H ₂ O ₂	
	8,5 (контроль)	8,3	8,1	Отсутствие (контроль)	+ 10 мМ
1,5	5,0 ± 0,2	3,9 ± 0,3	1,9 ± 0,4*	2,0 ± 0,1	6,2 ± 0,1*
2,0	6,0 ± 0,3	0*	0*	2,1 ± 0,1	5,9 ± 0,6*
12,0	8,7 ± 1,5	8,6 ± 1,6	5,6 ± 0,3	4,7 ± 0,2	18,7 ± 2,2*

Примечание. По результатам исследований на 5–8 животных.

* $p < 0,05$ по отношению к показателям в контроле.

Внесение перекиси водорода в среду инкубации постмитохондриальной фракции печени сопровождается повышением альдегіддегідрогеназної активності. В большей мере, этот сдвиг проявляется у половозрелых животных, а в меньшей мере – у крыс пубертатного возраста.

Анализ полученных результатов указывает на изменение характера ответа альдегіддегідрогеназ постмитохондриальной фракции печени крыс в возрасте от 1,5 до 12 месяцев, на действие ряда регуляторных факторов, возникающих в гепатоцитах при стрессе. При этом ингибирующий эффект ацидоза в большей мере проявляется у 2-месячных, а в меньшей мере – у 12-месячных животных. Неодинаково и проявление активирующего эффекта перекиси водорода на активность фермента, которое оказывается минимальным в пробах, полученных из печени крыс пубертатного возраста.

Возникающие сдвиги указывают на более высокую чувствительность цитозольных альдегіддегідрогеназ печени крыс пубертатного возраста (1,5 и 2 месяца) к ингибирующему эффекту ацидоза и, наоборот, менее высокую чувствительность к активирующему действию перекиси водорода, чем у взрослых половозрелых крыс. Все это может свидетельствовать о том, что даже в условиях поддержания стабильной базальной активности альдегіддегідрогеназ в клетках печени у животных пубертатного возраста при стрессе формируются предпосылки для снижения эффективности окисления карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в гепатоцитах. Подобного рода сдвиг предполагает вероятность возникновения стрессорного повреждения гепатоцитов и, как следствие того, нарушение специфических функций печени (антитоксической, белковообразовательной и др.).

Оценивая причины модуляции ответа альдегіддегідрогеназ печени на действие исследованных факторов, можно предположить важную роль в том возрастного изменения

изоферментного спектра цитозольных альдегиддегидрогеназ за счет модуляции регуляторного действия гормонов на синтез их отдельных представителей в клетках в пубертатном возрасте. Подобное было показано, в частности, в отношении другого фермента катаболизма карбонильных продуктов свободнорадикального окисления – альдегидредуктазы (Davydov, Grabovetskaya, 2014; Сухова и др., 2013).

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать заключение о том, что формирование иммобилизационного стресса у взрослых половозрелых животных не сопровождается модуляцией альдегиддегидрогеназной активности в постмитохондриальной фракции печени. В то же время у крыс, находящихся на этапе полового созревания, возникают определенные метаболические предпосылки к понижению роли альдегиддегидрогеназного пути в утилизации карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в цитозоле гепатоцитов. Это вносит определенный вклад в повышение чувствительности печени к действию повреждающих факторов стресса в пубертатном возрасте (Chen et al., 2008; Oshawa et al., 2003). Причиной возникновения подобного феномена могут быть возрастные изменения в структуре изоферментного спектра альдегиддегидрогеназ в гепатоцитах, за счет модуляции синтеза их определенных изоферментов в условиях изменения уровня гормональной секреции на этапе полового созревания. Однако данное предположение требует специальной проверки, чему будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Выводы

1. Активность альдегиддегидрогеназы постмитохондриальной фракции печени крыс пубертатного возраста аналогична таковой у взрослых половозрелых животных и не изменяется в условиях продолжительной иммобилизации.

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. На этапе полового созревания у крыс возникают условия для понижения роли окислительного пути в утилизации эндогенных альдегидов в гепатоцитах.

Список литературы

- Давыдов В.В., Божков А.И., Кульчицкий О.К. Физиологическая и патофизиологическая роль эндогенных альдегидов. – Saarbrücken: Palmarium Academic Publishing, 2012. – 240с. /Davydov V.V., Bozhkov A.I., Kul'chitskiy O.K. Fiziologicheskaya i patofiziologicheskaya rol' endogennykh al'degidov. – Saarbrücken: Palmarium Academic Publishing, 2012. – 240s./
- Давыдов В.В., Божков А.И. Карбонильный стресс как неспецифический фактор патогенеза (обзор литературы и собственных исследований) // Журнал НАМН Украины. – 2014. – Т.20, №1. – С. 25–34. /Davydov V.V., Bozhkov A.I. Karbonil'nyy stress kak nespetsificheskii faktor patogeneza (obzor literatury i sobstvennykh issledovaniy) // Zhurnal NAMN Ukrainy. – 2014. – T. 20, №1. – S. 25–34./
- Коренев Н.М. Артериальная гипертензия у подростков // Прогнозування та профілактика артеріальної гіпертензії в дитячому та підлітковому віці: Матеріали симпозиуму. – Х., 2001. – С. 3–7. /Korenev N.M. Arterial'naya gipertenziya u podrostkov // Prognozuvannya ta profilaktika arterial'noyi gipertenziyi v dytyachomu ta pidlitkovomu vitsi: Materialy sympoziumu. – Kharkiv, 2001. – S. 3–7./
- Коренев Н.М., Богмат Л.Ф., Толмачева С.Р. и др. Механизмы формирования инвалидности у детей с патологией системы кровообращения // Медико-соціальні аспекти реабілітації дітей-інвалідів: матеріали наук.-практ. конф. – Харків, 2000. – С. 3–6. /Korenev N.M., Bogmat L.F., Tolmacheva S.R. i dr. Mekhanizmy formirovaniya invalidnosti u detey s patologiei systemy krovoobrashcheniya // Mediko-sotsial'ni aspekty reabilitatsiyi ditey-invalidiv: materialy nauk.-prakt. konf. – Kharkiv, 2000. – S. 3–6./
- Коренев М.М., Носова О.М. Клініко-гемодинамічні показники формування церебральних порушень у підлітків з первинною артеріальною гіпертензією // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2002. – №2. – С. 15–18. /Korenev M.M., Nosova O.M. Kliniko-gemodynamichni pokaznyky formuvannya tserebral'nykh porushen' u pidlitkiv z pervynnoyu arterial'noyu gipertenziiyeyu // Pediatriya, akusherstvo ta ginekologiya. – 2002. – №2. – S. 15–18./
- Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. – М.: Медицина, 1984. – 270с. /Meyerson F.Z. Patogenez i preduprezhdeniye stressornykh i ishemiceskikh povrezhdeniy serdtsa. – M.: Meditsina, 1984. – 270s./
- 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 kryis // Biokhimiya. – 1988. – T.53, №9. – S. 1443–1448./
- Сухова Л.Л., Волкова Ю.В., Грабовецкая Е.Р., Давыдов В.В. Уровень тестостерона и альдокеторедуктазная активность крови, печени и сердца крыс разного возраста // Ученые записки

- Таврического национального университета им. В.И.Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Т.26 (65) – №3. – С. 189–195. /Sukhova L.L., Volkova Yu.V., Grabovetskaya Ye.R., Davydov V.V. Uroven' testosterona i al'doketoreduktaznaya aktivnost' krovi, pecheni i serdtsa kryz raznogo vozrasta // Uchenyye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta im. V.I. Vernadskogo. Seriya "Biologiya, khimiya". – 2013. – Т. 26 (65) – №3. – С. 189–195./
- Chen C.H., Budas G.R., Churchill E.N. et al. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart // *Science*. – 2008. – Vol.321, N5895. – P. 1493–1495.
- Davydov V.V., Grabovetskaya E.R. Interrelationship between testosterone level and aldo-keto reductase activity in the blood of different ages rats // *Advances in Biological Chemistry*. – 2014. – Vol.2, №3. – P. 40–44.
- Davydov V.V., Shvets V.N. Lipid peroxidation in the heart of adult and old rats during immobilization stress // *Exp. Gerontol.* – 2001. – Vol.36. – P. 1155–1160.
- Esterbauer H., Zollner H., Lang J. Metabolism of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by isolated hepatocytes and by liver cytosolic fractions // *Biochem. J.* – 1985. – Vol.228, №2. – P. 363–373.
- Fritz S.F., Petersen D.R. An overview of chemistry and biology of reactive aldehydes // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013. – Vol.59, №2. – P. 85–91.
- Muzio G., Maggiora M., Paiuzzi E. et al. Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation // *Free Radic. Biol. Med.* – 2012. – Vol.52, №3. – P. 735–746.
- Nayanatara A.K., Nagaraja H.S., Anupama B.K. The effect of repeated swimming stress on organ weights and lipid peroxidation in rats // *Thai J. Physiol. Sci.* – 2005. – Vol.18, №1. – P. 3–9.
- O'Brein P.J. O., Siraki A.G., Shangari N. Aldehyde sources metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health // *Critical Reviews in Toxicology*. – 2005. – Vol.35. – P. 609–662.
- Oshawa I., Nishimaki K., Yasuda C. et al. Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells // *J. Neurochem.* – 2003. – Vol.84, N5. – P. 1110–1117.
- Singh S., Brocker C., Koppaka V. et al. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013. – Vol.56. – P. 89–101.
- Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease // *Free Radical. Biol. Med.* – 2000. – Vol.28, N12. – P. 1685–1696.

Представлено: А.І.Божков / Presented by: A.I.Bozhkov

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

Подано до редакції / Received: 25.12.2014