

**УДК [612.66+616-092]: 577.15**

**АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ КАТАБОЛИЗМА КАРБОНИЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ  
ОБМЕНА В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫС  
ПУБЕРТАТНОГО ВОЗРАСТА**

*Редько А.В., Сухова Л.Л., Давыдов В.В.*

*ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков АМНУ», Харьков, Украина,  
e-mail: davydov@kharkov.com*

Целью работы явилось изучение активности ферментов катаболизма карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в субклеточных фракциях мозга и печени крыс на разных этапах восходящего онтогенеза. Показано, что в пубертатном возрасте в печени и на позднем этапе полового созревания в мозге понижается активность ферментов утилизации эндогенных альдегидов в их митохондриальной и постмитохондриальной фракции, что способствует повышению чувствительности мозга и печени к повреждающему эффекту оксидативного стресса.

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

**ВВЕДЕНИЕ**

В пубертатном возрасте повышается чувствительность организма к действию неблагоприятных факторов внешней среды. Следствием того становится широкое распространение в подростковом возрасте патологии сердечно-сосудистой и центральной нервной системы, пищеварительного тракта, эндокринных расстройств и др. [1 – 3]. Одной из причин формирования этого возрастного феномена может быть повышение чувствительности тканей внутренних органов на этапе полового созревания к их свободнорадикальному повреждению.

Важную роль в защите от оксидативного стресса играют ферменты катаболизма карбонильных продуктов свободнорадикального окисления [4 – 6]. В этой связи, возрастная модуляция их активности, может играть определенное значение в изменении чувствительности организма к действию неблагоприятных факторов внешней среды. Вместе с тем в периодической литературе все еще нет сведений о состоянии ферментативных систем, обеспечивающих утилизацию эндогенных альдегидов в тканях внутренних органов на этапе полового созревания. Учитывая это, целью работы явилось изучение активности ферментов катаболизма карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в субклеточных фракциях мозга и печени крыс на разных этапах восходящего онтогенеза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 30 intactных крысах самцах линии Вистар трех возрастных групп: I - 1,5-месячные (ранний пубертат), II - 2-месячные (поздний пубертат) и III - 12-месячные (взрослые половозрелые).

В процессе исследований животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Извлекали головной мозг и печень 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. Навеску печени гомогенизировали со средой выделения, содержащей 250 мМ сахарозы, 10 мМ Трис и 1 мМ ЭДТА (pH 7,4). Гомогенаты фильтровали через 2 слоя марли в центрифужные пробирки и центрифугировали при 1000g в течение 10 минут. Супернатант центрифугировали 20 минут при 10000g. Полученную надосадочную жидкость использовали в качестве постмитохондриальной фракции, а осадок суспензировали в среде выделения и повторно центрифугировали в течение 20 минут при 10000g. Осадок суспендировали с 1 мл среды выделения и использовали в качестве грубой митохондриальной фракции. Все процедуры фракционирования проводили при 4°C.

В пробах субклеточных фракций головного мозга и печени определяли активность NADH(NADPH)-зависимой альдегидредуктазы (АР; К.Ф. 1.1.1.1.) [7] и NAD- и NADP-зависимых альдегиддегидрогеназ (АлДГ; К.Ф. 1.2.1.3) [8] и глутатионтрансферазы (ГТ; К.Ф. 2.5.1.18) [9].

В пробах постмитохондриальной фракции мозга и печени измеряли содержание флюоресцирующих конечных продуктов свободнорадикального окисления типа шиффовых оснований [10]. Содержание белка в пробах субклеточных фракций определяли по методу Лоури.

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из результатов, представленных в таблице 1 следует, что активность NAD-АлДГ в постмитохондриальной фракции мозга крыс 2 месячного возраста на 53% превышает ее величину у 1,5 месячных животных. При этом активность данного фермента у крыс пубертатного возраста имеет значительно большую величину, чем у взрослых половозрелых (12-месячных) животных. Аналогичным образом активность NADH-АР и ГТ у взрослых крыс оказывается существенно ниже, чем у 1,5- и 2-месячных животных.

В митохондриальной фракции головного мозга 2 месячных крыс активность NADH-АР, NADPH-АР и ГТ на 43%, 65% и 55% соответственно ниже ее величины у 1,5-месячных животных. При этом активность всех исследованных ферментов в митохондриальной фракции 1,5-месячных крыс соответствует их величине у 12-месячных животных.

В постмитохондриальной фракции печени 2-месячных крыс активность NAD-АлДГ и NADPH-АР имеет величину на 32% и 61% соответственно ниже, чем у 1,5-

## АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ КАТАБОЛИЗМА КАРБОНИЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ

месячных (табл. 1, 2). При этом активность NADPH-AP у 1,5-месячных животных на 34%, а активность ГТ у 2 месячных крыс на 36 % соответственно ниже их величины у 12-месячных животных.

**Таблица 1.**  
**Активность ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения альдегидов в субклеточных фракциях мозга крыс (M±m; n= 5-6)**

	1,5 мес	2 мес	12 мес
Митохондриальная фракция			
NAD-АлДГ (нмоль/мин·мг белка)	0,94 ± 0,17	0,91 ± 0,16	0,9 ± 0,1
NADP-АлДГ (нмоль/мин·мг белка)	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,2	0,9 ± 0,2
NADH-AP (нмоль/мин·мг белка)	27,7 ± 4,6	*15,9 ± 0,1	20,9 ± 0,7
NADPH-AP (нмоль/мин·мг белка)	18,6 ± 6,3	*6,5 ± 1,4	17,3 ± 1,7
ГТ (нмоль/мин·мг белка)	7,5 ± 1,2	3,4 ± 1,1	4,9 ± 0,4
Постмитохондриальная фракция			
NAD-АлДГ (нмоль/мин·мг белка)	1,36 ± 0,01	*2,08 ± 0,12	*0,600 ± 0,003
NADP-АлДГ (нмоль/мин·мг белка)	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,2	0,9 ± 0,2
NADH-AP (нмоль/мин·мг белка)	11,4 ± 1,8	16,5 ± 1,7	*5,5 ± 1,2
NADPH-AP (нмоль/мин·мг белка)	5,3 ± 0,8	7,2 ± 0,8	7,0 ± 0,6
ГТ (нмоль/мин·мг белка)	22,2 ± 2,8	31,5 ± 5,2	10,5 ± 1,0

Примечание: \*- p < 0,05 к 1,5 месячным

В митохондриальной фракции печени 1,5 месячных крыс активность NAD- и NADP-АлДГ существенно ниже, чем у 2- и 12-месячных животных. При этом активность NADH-AP у 2-месячных крыс на 62% меньше, чем у 1,5-месячных и на 61% меньше чем у 12-месячных животных.

**Таблица 2.**  
**Активность ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения альдегидов в субклеточных фракциях печени крыс (M±m; n= 5-6)**

	1,5 мес	2 мес	12 мес
Митохондриальная фракция			
NAD-АлДГ (нмоль/мин·мг белка)	1,0 ± 0,3	2,8 ± 0,7	*8,3 ± 0,4
NADP-АлДГ (нмоль/мин·мг белка)	0,67 ± 0,2	*18,1 ± 3,0	*12,2 ± 2,5
NADH-AP (нмоль/мин·мг белка)	23,4 ± 4,3	*8,9 ± 1,5	22,8 ± 3,3
NADPH-AP (нмоль/мин·мг белка)	6,7 ± 2,2	4,5 ± 0,8	23,1 ± 0,4
ГТ (нмоль/мин·мг белка)	14,7 ± 1,5	12,4 ± 0,8	23,0 ± 7,4
Постмитохондриальная фракция			
NAD-АлДГ (нмоль/мин·мг белка)	8,0 ± 0,9	*5,4 ± 0,2	6,8 ± 0,8
NADP-АлДГ (нмоль/мин·мг белка)	7,0 ± 0,9	9,3 ± 0,9	8,5 ± 0,8
NADH-AP (нмоль/мин·мг белка)	130 ± 12	110 ± 12	127 ± 7
NADPH-AP (нмоль/мин·мг белка)	26,5 ± 2,6	*10,3 ± 1,4	*40,4 ± 2,3
ГТ (нмоль/мин·мг белка)	127 ± 19	105 ± 13	163 ± 10

Примечание: \*-  $p < 0,05$  к 1,5 месячным

Результаты проведенных исследований указывают на то, что величина суммарной активности ферментов утилизации альдегидов в постмитохондриальной фракции мозга крыс пубертатного возраста превышает таковую у взрослых животных. В большей мере это характерно для 2-, чем для 1,5-месячных крыс. Причиной возрастного повышения суммарной величины активности ферментов утилизации эндогенных альдегидов в постмитохондриальной фракции мозга является увеличение у них активности глутатионтрансферазы, а также активности АР и АлДГ за счет их NAD-зависимых ферментов.

Высокий уровень базальной активности исследованных энзимов свидетельствует о высокой мощности ферментативной системы утилизации эндогенных альдегидов в мозге на этапе полового созревания. Подтверждением того служат данные о низком содержании шиффовых оснований, как конечных продуктов превращения карбонильных продуктов свободнорадикального окисления, в постмитохондриальной фракции мозга 1,5- и 2-месячных крыс (рис. 1).

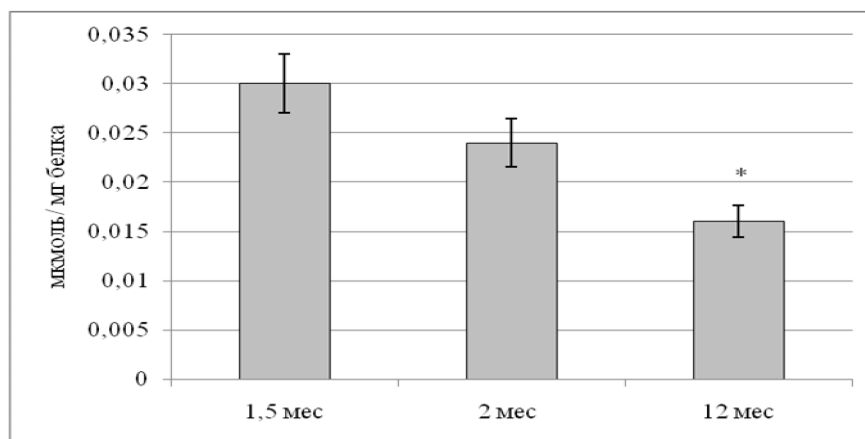


Рис. 1. Возрастные особенности изменения содержания шиффовых оснований в постмитохондриальной фракции мозга крыс.

Примечание: \*-  $p < 0,05$  к 1,5 месячным.

В митохондриальной фракции мозга животных пубертатного возраста возникает иная ситуация. Из представленных выше данных следует, что у 1,5-месячных крыс величина всех исследованных показателей находится на уровне 12-месячных животных, имея при этом определенную тенденцию к повышению. В тоже время для 2-месячных крыс характерно понижение суммарной активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов за счет уменьшения активности NAD(NADP)H-зависимых АР и глутатионтрансферазы. Подобного рода сдвиги в ферментативной активности способствуют существенному понижению мощности митохондриальной системы катаболизма эндогенных альдегидов в мозге крыс позднего пубертатного возраста.

Анализ полученных результатов позволяет прийти к заключению о том, что эффективность функционирования ферментных систем катаболизма эндогенных альдегидов в нервных клетках на раннем и позднем этапе полового созревания значительно различается. Для раннего пубертатного возраста характерна высокая мощность внутриклеточных систем защиты от цитотоксических карбонильных продуктов свободнорадикального окисления. В позднем пубертате понижается активность митохондриальных ферментов утилизации эндогенных альдегидов. В подобной ситуации компенсаторное значение приобретает повышение у них активности цитозольных ферментов утилизации альдегидов.

Модуляция митохондриальной ферментативной системы утилизации карбонильных продуктов обмена в мозге крыс позднего пубертатного возраста формирует у них предпосылки для торможения утилизации эндогенных альдегидов в мозге и, как следствие того, повышения его чувствительности к оксидативному стрессу. Причиной появления подобного сдвига могут быть возрастные особенности в скорости радикалообразования в митохондриях, а также эффективности функционирования систем антиоксидантной защиты нервных клеток.

В печени, в процессе восходящего онтогенеза также возникают характерные сдвиги стороны ферментативных систем утилизации эндогенных альдегидов. В постмитохондриальной фракции этого органа крыс пубертатного возраста понижена суммарная активность ферментов катаболизма карбонильных продуктов обмена, по сравнению с таковой у взрослых животных. В большей мере данный сдвиг проявляется у 2-, чем у 1,5-месячных месячных крыс. Его возникновение связано с понижением активности глутатионтрансферазы и NADPH-AP.

Низкая активность ферментов утилизации эндогенных альдегидов формирует условия для ограничения эффективности утилизации эндогенных альдегидов в цитозоле клеток печени крыс пубертатного возраста. Следствием того становится повышение концентрации у них шиффовых оснований в постмитохондриальной фракции печени (рис. 2).

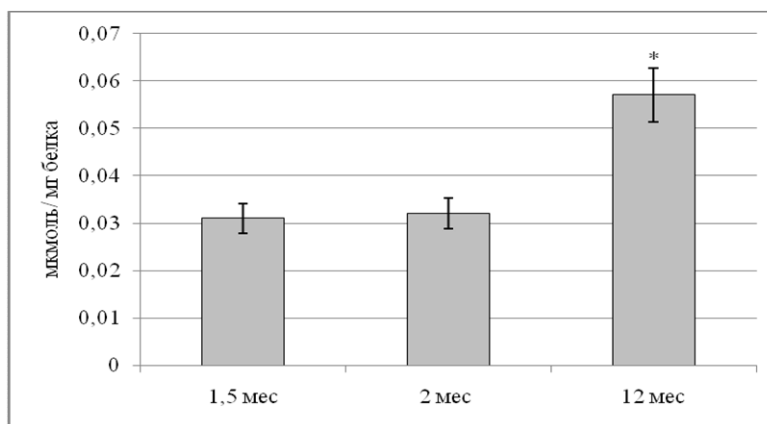


Рис. 2. Возрастные особенности изменения содержания шиффовых оснований в постмитохондриальной фракции печени крыс.

Примечание: \*-  $p < 0,05$  к 1,5 месячным.

В митохондриях печени схожие по направленности сдвиги выражены еще в большей мере. У крыс пубертатного возраста в митохондриальной фракции происходит одинаково выраженное понижение величины суммарной активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов. Причиной возникновения подобного сдвига у 1,5-месячных животных становится уменьшение активности АлДГ за счет обоих исследованных изоферментов, а у 2-месячных – снижение АР активности. Определенный вклад в понижение величины суммарной активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в митохондриальной фракции печени у 2-месячных крыс вносит уменьшение активности глутатионтрансферазы, по сравнению с ее величиной у 12-месячных животных.

Возрастные сдвиги в активности исследованных ферментов предопределяют ограничение скорости утилизации эндогенных альдегидов в митохондриальной фракции печени на этапе полового созревания. В совокупности с аналогичными изменениями в постмитохондриальной фракции они формируют предпосылки для понижения эффективности утилизации карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в клетках печени на данном этапе онтогенеза, что, в свою очередь, обуславливает повышение их чувствительности к повреждающему действию прооксидантных факторов.

Таким образом, в пубертатном возрасте в печени и на позднем этапе полового созревания в мозге возникают условия для понижения скорости утилизации карбонильных продуктов свободнорадикального окисления. Это, в свою очередь, формирует предпосылки для возрастного повышения их чувствительности к повреждающему воздействию внешних факторов, реализующих свой эффект через возникновение оксидативного стресса. Одной из вероятных причин появления этого сдвига может быть возрастное изменение изоферментного спектра ферментов катаболизма эндогенных альдегидов, обусловленное характерной для данного периода развития гормональной перестройкой в организме. Однако это предположение требует экспериментальной проверки.

### **ВЫВОДЫ**

1. В пубертатном возрасте в печени и на позднем этапе полового созревания в мозге понижается активность ферментов утилизации эндогенных альдегидов в их митохондриальной и постмитохондриальной фракции.
2. Ограничение активности ферментов утилизации эндогенных альдегидов способствует торможению катаболизма альдегидов и их накоплению в клетках мозга и печени крыс пубертатного возраста.
3. Понижение эффективности утилизации эндогенных альдегидов способствует повышению чувствительности мозга и печени к повреждающему эффекту оксидативного стресса в пубертатном возрасте.

Список литературы

1. Механизмы формирования инвалидности у детей с патологией системы кровообращения / Н.М. Корнев, Л.Ф. Богмат, С.Р. Толмачева [и др.] // Медико-социальні аспекти реабілітації дітей-інвалідів: Матеріали наук.-практ. конф. – Харків, 2000. – С. 3–6.
2. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца / Меерсон Ф.З. – М.: Медицина, 1984. – 270 с.
3. Механизм формування невротичних розладів у підлітків / Т.Ю. Проскурина, Т.М. Матковська, А.В. Голобородько [и др.] // Психічне здоров'я – 2007. – №3 (16). – С. 55.
4. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases / K. Uchida // Free Radical. Biol. Med. – 2000. – Vol. 28, V. № 12. – P.1685–1696.
5. Hayes J.D. Glutathione transferases / J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2005. – Vol. 45 – P. 51–88.
6. Davydov V.V. Possible role of aldehyde's scavenger enzymes during aging / V.V. Davydov, N.M. Dobaeva, A.I. Bozhkov // Exp. gerontol. – 2004. – Vol. 39. – P. 11–16.
7. Голубев А.Г. Изнанка метаболизма / А.Г. Голубев // Биохимия. – 1996. – Т. 61, № 11. – С. 2018–2039.
8. Кислова О.В. Сравнительная характеристика мембранных форм альдегиддегидрогеназ / О.В. Кислова, Е.Г. Виноградова, Г.А. Пхакадзе // Укр. биохим. журн. – 1995. – № 6. – С. 38–46.
9. Expression of glutathione-S-transferase isozyme in the SY5Y neuroblastoma cell line increases resistance to oxidative stress / C. Xie, M.A. Lovell, S. Xiong [et al.] // Free Radical. Biol. Med. – 2001. – 31, N 1. – P. 73–81.
10. Rice-Evans C.A. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research. / Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R. – London, 1991. – 346 p.

**Редько А.В. Активність ферментів катаболізму карбонільних продуктів обміну в субклітинних фракціях мозку і печінки шурів пубертатного віку / А.В. Редько, Л.Л. Сухова, В.В. Давидов // Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2009. – Т. 22 (61). – № 4. – С. 145-151.**

Метою роботи було вивчення активності ферментів катаболізму карбонільних продуктів вільнорадикального окислення в субклітинних фракціях мозку і печінки шурів на різних рівнях висхідного онтогенезу. Виявлено, що у пубертатному віці в печінці та на пізньому етапі статевої зрілості в мозку знижується активність ферментів утилізації ендогенних альдегідів в їх мітохондріальній та постмітохондріальній фракції, що сприяє підвищенню чутливості мозку і печінки до ушкоджуючого ефекту оксидативного стресу.

**Ключові слова:** пубертат, вільно радикальне окислення, ендогенні альдегіди, альдегідредуктаза, альдегіддегідрогеназа, глутатіонтрансфераза.

**Redko A.V Activity of the enzymes of carbonyle products catabolism in subcellular fractions of brain and liver of pubertal rats / A.V. Redko, L.L.Sukhova, V.V. Davydov // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2009. – V.22 (61). – № 4. – P. 145-151.**

The activity of the enzymes of carbonyle products of free radical oxidation catabolism in subcellular fractions of brain and liver of pubertal rats has been studied. It has been established that the activity of the enzymes of endogenous aldehydes utilization in mitochondrial and postmitochondrial fractions decreased in the liver of rats at pubertal age and in the brain of rats at the late stage of puberty. It facilitates an increase in the brain and liver sensibility to the damaging effect of oxidative stress.

**Keywords:** puberty, free radical oxidation, endogenous aldehydes, aldehyde reductase, aldehyde dehydrogenase, glutathione transferase.

*Поступила в редакцию 20.11.2009 г*