

УДК 612.354.2.085:577.152.1:613.863+612.67
©Фомина, Давыдов

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ АЛЬДЕГИДРЕДУКТАЗЫ В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ КРЫС ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

Е.В. Фомина, В.В. Давыдов

Институт охраны здоровья детей и подростков АМН, Украина 61153, г. Харьков,
пр. 50-летия ВЛКСМ, 52А; тел.: +380 572624021;
эл. почта: davydov@kharkov.com

В работе были изучены особенности изменения активности альдегидредуктазы скелетной мышцы крыс 1,5-, 2-, 6-, 12- и 24-месячных возраста при иммобилизационном стрессе. Установлено, что животные 6- и 24-месячного возраста проявляли наибольшую чувствительность к действию проокислительных факторов иммобилизационного стресса. Это отражалось в накоплении диеновых конъюгатов и шиффовых оснований в мышечных клетках после 30-минутной иммобилизации у животных данных возрастных групп. Возникающий сдвиг сопровождался активацией альдегидредуктазы у 6-мес. крыс, в то время как у 24-мес. животных изменений активности фермента не обнаружено. Высказывается предположение о том, что возраст-зависимые изменения активности альдегидредуктазы являются одной из причин проявления различной чувствительности миоцитов к условиям формирующегося при иммобилизации оксидативного стресса на разных этапах онтогенеза.

Ключевые слова: альдегидредуктаза, скелетная мышца, иммобилизационный стресс, онтогенез.

ВВЕДЕНИЕ. Цитотоксические промежуточные продукты свободнорадикального окисления играют важную роль в повреждении тканей внутренних органов при оксидативном стрессе. Особое значение среди них имеют карбонильные соединения и, прежде всего, эндогенные альдегиды [1, 2], интенсивность утилизации которых оказывает существенное влияние на чувствительность клеток к свободнорадикальному повреждению [3, 4].

Одним из основных путей катаболизма эндогенных альдегидов является процесс их восстановления в альдегидредуктазной реакции [5, 6]. Вместе с тем, до настоящего времени все еще не установлены особенности функционирования альдегидредуктазы в разных тканях при состояниях, сопровождающихся возникновением в них оксидативного стресса. Нет также и данных о возрастных аспектах этого вопроса. Его выяснение позволит расширить существующие представления о механизмах свободнорадикального повреждения тканей и оценить вклад альдегидредуктазы в формирование возрастных особенностей проявления их чувствительности к действию повреждающих факторов оксидативного стресса. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение активности альдегидредуктазы в скелетной мышце крыс разного возраста при иммобилизационном стрессе.

АЛЬДЕГИДРЕДУКТАЗА МЫШЦ ПРИ СТРЕССЕ

МЕТОДИКА. Работа выполнена на 60 крысах самцах линии Wistar 1,5-, 2-, 6-, 12- и 24-месячного возраста. Всех животных делили на 2 подгруппы: 1 - интактные и 2 - крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу путём фиксации на спине в течение 30 минут. Эффективность воспроизведения стресса контролировали по уровню 11-оксикортикостероидов и в крови.

Животных декапитировали. После этого немедленно выделяли бедренную мышцу и гомогенизировали в среде выделения, содержащей 0,25 М сахарозы и 0,01 М трис (pH 7,4) в соотношении 1:3 (масса ткани : объём среды выделения). Приготовленные таким образом гомогенаты фильтровали через 2 слоя марли и центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость использовали в работе в качестве постмитохондриальной фракции. Все процедуры выделения проводили при 4°C.

Пробы постмитохондриальной фракции использовали для определения альдегидредуктазной активности [7]. Для этого 0,1 мл пробы вносили в спектрофотометрическую кювету, содержащую (конечные концентрации) 0,05 М калий фосфатного буфера (pH 6,0), 0,01 М пропионового или глутарового альдегида, а также 0,0001 М восстановленного NAD или NADPH. Скорость реакции измеряли по изменению оптической плотности при 340 нм и выражали в нмоль/мг белка в мин.

В специальных экспериментах выделенную бедренную мышцу замораживали в жидком азоте. Замороженные пробы экстрагировали смесью гептан : изопропанол (1:1) [8]. В гептановых экстрактах определяли содержание диеновых конъюгатов [8] и флуоресцирующих соединений типа шиффовых оснований [9].

Концентрацию белка в пробах определяли по методу Lowry [10]. Результаты исследований подвергали статистической обработке с использованием непараметрического метода Wilcoxon-Mann-Whitney.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Как видно из таблицы, в процессе онтогенеза происходит характерное изменение активности альдегидредуктазы в бедренной мышце крыс, которое проявляется в существенном понижении её величины у животных 2- и 6- месячного возраста, по сравнению с таковой у 1,5-месячных крыс. В 12-месячном возрасте активность альдегидредуктазы возрастает, достигает уровня активности у крыс 1,5-месячного возраста и остается на этом уровне до двухлетнего возраста.

Таблица. Альдегидредуктазная активность скелетной мышцы крыс разного возраста, подвергнутых 30-минутной иммобилизации.

Субстрат, кофермент	Возраст				
	1,5 мес	2 мес	6 мес	12 мес	24 мес
Интактные					
Пропиональ NADH	1,6 ± 0,4	0,4 ± 0,1 **	0,4 ± 0,04 **	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,12
Пропиональ NADPH	0,93 ± 0,40	0,3 ± 0,04 **	0,43 ± 0,03 **	1,52 ± 0,2	2,26 ± 0,4
Стресс					
Пропиональ NADH	1,4 ± 0,3	0,4 ± 0,03	1,4 ± 0,12 *	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,1
Пропиональ NADPH	0,94 ± 0,20	0,18 ± 0,01	0,71 ± 0,1 *	1,42 ± 0,2	1,42 ± 0,2

Примечание: активность выражена в нмоль/мг белка в мин. * - p<0,05 к интактным животным; ** - p<0,05 к 1,5 месячным интактным животным. В каждой группе использовалось по 5-6 крыс.

При иммобилизационном стрессе у 1,5-, 2-, 12- и 24-месячных крыс активность фермента не изменяется по сравнению с её исходным уровнем. В тоже

время у 6-месячных животных после 30-минутной иммобилизации активность NADH-зависимой альдегидредуктазы становится в 3,5 раза, а NADPH-зависимой альдегидредуктазы – в 1,7 раза соответственно больше, чем у интактных животных. Как видно из данных рисунка 1, тенденция к активации альдегидредуктазы в бедренной мышце у животных данной возрастной группы, подвергнутых иммобилизации, сохраняется и при определении ее активности с использованием в качестве субстрата глутарового альдегида.

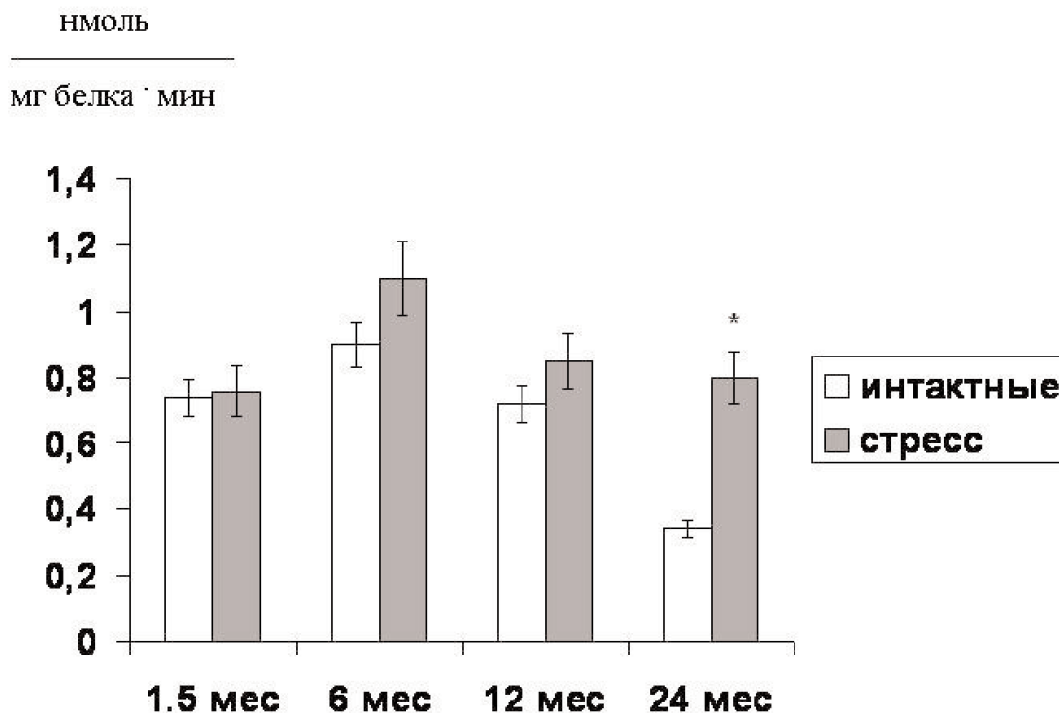


Рисунок 1.

Возрастные особенности изменения активности альдегидредуктазы мышц в реакции восстановления глутарового альдегида у крыс, подвергнутых 30-минутной иммобилизации.

* - $p < 0,05$ к интактным. В экспериментах использовалось по 5-6 крыс.

Принимая во внимание данные литературы об активирующем влиянии альдегидов на альдегидредуктазу [11], а также тот факт, что основным источником эндогенных альдегидов в клетках является процесс свободнорадикального окисления липидов [1, 2, 12, 13], интенсивность которого при стрессе существенно возрастает [14-16], можно предположить существование определенной взаимосвязи между уровнем стимуляции свободнорадикальных процессов в мышце при иммобилизационном стрессе и активацией альдегидредуктазы. Для проверки этого предположения далее было проведено изучение влияния 30-минутной иммобилизации на интенсивность свободнорадикального окисления липидов в мышце крыс разного возраста.

Проведенные исследования показали, что у 6-месячных животных в мышце после иммобилизации возникает выраженная тенденция к повышению содержания диеновых конъюгатов на 45% и шиффовых оснований – на 12% соответственно по сравнению с их исходным уровнем (рис. 2). Сдвиги аналогичной направленности возникают и у старых (24-месячных) крыс, у которых после 30-минутной иммобилизации содержание диеновых конъюгатов в бедренной мышце увеличивается на 117%, а шиффовых оснований – на 76% соответственно по сравнению с их исходным уровнем. В тоже время у животных других исследованных возрастных групп концентрация диеновых конъюгатов и флуоресцирующих соединений типа шиффовых оснований в мышце после иммобилизации не изменяется.

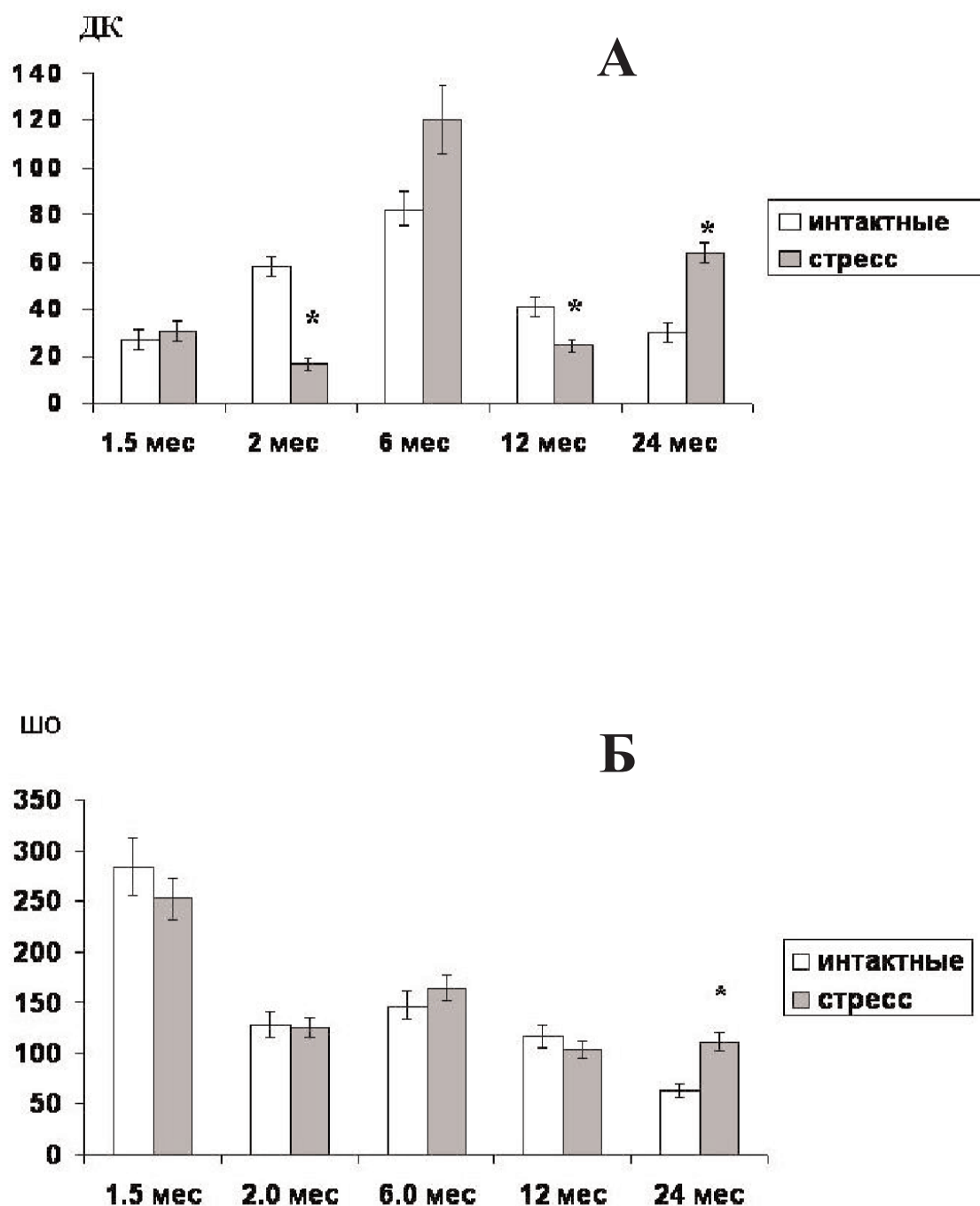


Рисунок 2.

Содержание диеновых конъюгатов (А) и шиффовых оснований (Б) в бедренной мышце крыс, подвергнутых 30-минутной иммобилизации.

Концентрация диеновых конъюгатов (ДК) в нмоль/г ткани; концентрация шиффовых оснований (ШО) – в единицах флуоресценции/200 мг ткани. * - $p < 0,05$ к интактным.

В экспериментах использовали по 5-6 крыс в каждой группе.

Полученные данные о накоплении продуктов свободнорадикального окисления липидов у 6-месячных крыс после 30-минутной иммобилизации, указывают на стимуляцию у них в мышечной ткани процесса перекисного окисления липидов, что, в свою очередь, предполагает накопление в ней карбонильных соединений, к числу которых относятся альдегиды. Последние

способствуют активации альдегидредуктазы и повышению скорости экспрессии её гена [11]. Возникновение подобного сдвига, по всей вероятности, представляет собой адаптивную реакцию, направленную на ограничение накопления в миоцитах эндогенных альдегидов в условиях формирующегося при иммобилизации в мышцах оксидативного стресса [14-16].

У старых (24-месячных) крыс после 30-минутной иммобилизации в мышцах тоже возникает состояние оксидативного стресса. Причем, судя по уровню накопления продуктов свободнорадикального окисления липидов, оно выражено в значительно большей мере, чем у 6-месячных животных. Однако возникающий сдвиг не сопровождается у них повышением активности альдегидредуктазы в бедренной мышце, при ее измерении с использованием пропионаля в качестве субстрата (табл.). Активация альдегидредуктазы у старых иммобилизованных крыс выявляется лишь при измерении активности в реакции восстановления глутарового альдегида (рис. 1).

Полученные результаты, по видимому, отражают нарушение регуляторных свойств альдегидредуктазы мышц в позднем онтогенезе. В основе их возникновения может лежать повышение уровня окислительной модификации полипептидной цепи молекулы фермента, за счет ограничения скорости утилизации карбонилированных белков протеасомами при старении [17, 18]. Окислительная модификация фермента способствует модуляции его каталитических и регуляторных свойств, что, по всей вероятности, и предопределяет изменение реакции альдегидредуктазы на активирующее действие альдегидов. Следствием возникновения подобного сдвига может быть ограничение роли альдегидредуктазного пути в защите мышечных клеток от проявления цитотоксического действия карбонильных продуктов метаболизма, интенсивно образующихся в них при оксидативном стрессе. Принимая во внимание особую роль этого пути в катаболизме эндогенных альдегидов [6, 13], можно думать о том, что понижение активирующего влияния альдегидов на альдегидредуктазу, выступает в роли одного из факторов, предопределяющих нарушение адаптивных свойств мышечной ткани при старении и, в том числе, повышение ее чувствительности к действию повреждающих факторов стресса [19, 20].

Резюмируя вышеизложенное, можно придти к заключению о том, что в процессе онтогенеза происходит изменение чувствительности ткани скелетной мускулатуры к возникновению оксидативного стресса под действием кратковременной иммобилизации. Наибольшую чувствительность к действию прооксидантных факторов иммобилизационного стресса проявляют животные 6- и 24-месячного возраста. Возникновение подобного сдвига у 6-месячных крыс, сопровождается параллельным повышением активности альдегидредуктазы, что, несомненно, имеет адаптивный характер и направлено на предупреждение повреждающего действия карбонильных продуктов метаболизма при иммобилизационном стрессе. В отличие от них, у старых животных при иммобилизации не возникает параллелизма в накоплении продуктов свободнорадикального окисления липидов и активации альдегидредуктазы. В основе появления этих возрастных различий могут лежать онтогенетические особенности посттрансляционной модификации молекулы энзима, обусловленные неодинаковым уровнем его свободнорадикального окисления.

Возрастные особенности в реализации регуляторных воздействий на альдегидредуктазу мышц при кратковременной иммобилизации могут вносить определенный вклад в изменение устойчивости мышечной ткани к действию повреждающих факторов стресса в процессе онтогенеза. В связи с этим определённые перспективы на пути создания новых подходов к коррекции адаптивных свойств мышечной ткани при стрессе приобретает направленная активация альдегидредуктазы и повышение интенсивности ее биосинтеза, особенно при старении. Изучению этого вопроса будут посвящены наши дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Van Kuijk F.J., Holte L.L., Dratz E.A. (1990) Biochim. Biophys. Acta, **1043**, 116-118.
2. Reinheckel T., Nack H., Lorenz S., Wiswedel I., Augustin W. (1998) Free Radic. Res., **29**(4), 297-305.
3. Sagara Y., Dargusch R., Chambers D. et al. (1998) Free Radic. Biol. Med., **24**, 1375-1389.
4. Keightley J.A., Shang L., Kinter M. (1998) Mol. Cell Proteomics., **12**, 1236-1245.
5. Spycher S.E., Tabataba-Vakili S., O'Donnell V.B. et al. (1997) FASEB J., **11**, 181-188.
6. Srivastava S., Chandra A., Ansari N.H., Srivastava S.K., Bhatnagar A. (1998) Biochem. J., **329**, 469-475.
7. Srivastava S., Liu S.Q., Conklin D.J. et al. (2001) Chem. Biol. Interact., **130-132**(1-3), 563-571.
8. Стальная И.Д. (1977) в кн.: *Современные методы в биохимии* (под ред. В.Н. Ореховича) Медицина, М, с. 66-68.
9. Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R. (1991) Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research, London, 346p.
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.I. (1951) J. Biol. Chem., **193**(1), 265-267.
11. Koh Y.H., Park Y.S., Takahashi M. et al. (2000) Free Radic. Res., **33**, 739-746.
12. Uchida K. (2000) Free Radical. Biol. Med., **28**(12), 1685-1696.
13. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. (1991) Free Radical. Biol. Med., **11**, 81-128.
14. Меерсон Ф.З. (1984) Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца, Медицина, М.
15. Kovacs P., Juranek I., Stankovicova T., Svec P. (1996) Pharmazie, **51**, 51-53.
16. Davydov V.V., Shvets V.N. (2001) Exp. Gerontol., **36**, 1155-1160.
17. Levine R.L., Stadtman E.R. (2001) Exp. Gerontol., **36**, 1495-1502.
18. Shacter E. (2000) Drug. Metab. Rev., **32**, 307-326.
19. Фролькис В.В., Мурадян Х.К. (1992) Старение, эволюция и продление жизни, Наукова думка, Киев.
20. Docherty I.R. (1990) Pharmacol. Rev., **42**, 103-126.

Поступила: 05.12.2004.

AGE-DEPENDENT PECULIARITIES OF ALDEHYDE REDUCTASE ACTIVITY
CHANGES IN THE SKELETAL MUSCLE OF RATS DURING IMMOBILIZATION STRESS

E.V. Fomina, V.V. Davydov

Laboratory of Age Endocrinology and Biochemistry of the Institute of Children and Adolescent Health Care of the AMS of Ukraine, pr. 50-letiya VLKSM, 52A, Kharkov, 61153 Ukraine;
e-mail: davydov@kharkov.com

A study of peculiarities of aldehyde reductase (AR) activity changes in the skeletal muscle from 1.5-, 2-, 6-, 12-, 24-months old rats during immobilization stress has been carried out. It has been shown that 6- and 24-month old rats demonstrate the highest sensitivity to influence of prooxidant factors of immobilization stress. This included accumulation of conjugated dienes and Schiff bases in the muscle cells 30 minutes after the immobilization of animals from investigated age groups. These changes have been accompanied by activation of AR in 6-months old rats, however, the 24-months old rats have not shown changes in the enzyme activity. It is suggested that that age-dependent activity changes in AR-activity are one of the causes underlying different sensitivity of muscle cells to the conditions of oxidative stress which is formed during immobilization at different ontogenesis stages.

Key words: aldehyde reductase, skeletal muscle, immobilization stress, ontogenesis.