

УДК: [612.66+616-092]:577.15

**Активность ферментов катаболизма альдегидов в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы крыс разного возраста****Амжад Хамдаллах<sup>1</sup>, В.В.Давыдов<sup>2</sup>**<sup>1</sup>*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)*<sup>2</sup>*ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков НАМН Украины» (Харьков, Украина)*  
*vaddavydov@mail.ru*

Целью работы явилось сравнительное изучение активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы интактных и иммобилизованных крыс разного возраста. Исследования показали, что в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы взрослых и старых крыс в виду высокой базальной активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов формируются оптимальные условия для утилизации цитотоксических карбонильных продуктов обмена, которые сохраняются и в условиях продолжительного иммобилизационного стресса. У крыс пубертатного возраста, ввиду ограничения базальной мощности ферментативной системы катаболизма карбонильных продуктов свободнорадикального окисления, а также особенностей ее модуляции, при продолжительной иммобилизации, формируются предпосылки для накопления эндогенных альдегидов и стрессорного повреждения мышцы.

**Ключевые слова:** *скелетная мышца, альдегиды, глутатионтрансфераза, альдегиддегидрогеназа, альдегидредуктаза, постмитохондриальная фракция, онтогенез.*

**Активність ферментів катаболізму альдегідів в постмітохондріальній фракції стегового м'язу щурів різного віку****Амжад Хамдаллах, В.В.Давидов**

Метою роботи було порівняльне вивчення активності ферментів катаболізму ендogenous альдегідів у постмітохондріальній фракції стегового м'язу інтактних та іммобілізованих щурів різного віку. Дослідження показали, що в постмітохондріальній фракції стегового м'язу дорослих і старих щурів, у зв'язку з високою базальною активністю ферментів катаболізму ендogenous альдегідів, формуються оптимальні умови для утилізації цитотоксичних карбонільних продуктів обміну, які зберігаються і при тривалому іммобілізаційному стресі. У щурів пубертатного віку, у зв'язку з обмеженням базальної потужності ферментативної системи катаболізму карбонільних продуктів вільнорадикального окислення, а також особливостей її модуляції при тривалій іммобілізації, формуються передумови для накопичення ендogenous альдегідів і стресорного пошкодження м'язу.

**Ключові слова:** *скелетні м'язи, альдегіди, альдегиддегидрогеназа, альдегидредуктаза, глутатионтрансфераза, постмітохондріальна фракція, онтогенез.*

**Activity of aldehyde catabolism enzymes in postmitochondrial fraction of femoral muscle of rats of different ages****Amjad Hamdallah, V.V.Davydov**

The aim of this work is investigation of activity of endogenous aldehydes catabolism enzymes in postmitochondrial fraction of intact and immobilized rats of different age. We have revealed that optimal conditions for utilization of carbonyl products of free radical oxidation form in postmitochondrial fraction of femoral muscle in adult and old rats. It is a result of high basal activity enzymes of endogenous aldehydes catabolism. The same situation takes place during prolonged immobilized stress in adult and old rats. The restriction of basal activity of these enzymes and peculiarities in their modulation during prolonged immobilization lead to accumulation of endogenous aldehydes in muscle tissue and its stress injury at pubertal rats.

**Key words:** *skeletal muscle, aldehydes, aldehyde dehydrogenase, aldehyde reductase, glutathione transferase, postmitochondrial fraction, ontogenesis.*

**Введение**

В процессе онтогенеза изменяются структура и функциональная активность скелетной мускулатуры. В позднем онтогенезе подобные изменения приводят к развитию саркопении, которая

характеризуется уменьшением массы мышечной ткани и силы мышечного сокращения (Czarkowska-Paszek, Milczarczyk, 2006; Narici, Maffulli, 2010). Возникновение этого состояния при старении – одна из глобальных проблем пожилого населения, т.к. ее появление ограничивает мобильность человека и предопределяет возникновение целого ряда сопутствующих заболеваний, а значит, способствует снижению качества жизни и ускоряет наступление смерти (Rossi et al., 2008; Narici, Maffulli, 2010).

Согласно данным эпидемиологических исследований, проявления саркопении у человека возникают уже после 50 лет, а к 80 годам они в значительной мере выражены более чем у половины пожилых людей (Sakuma, Yamaguchi, 2010). Несмотря на столь широкое распространение этого состояния, механизмы его развития все еще далеки от понимания, что затрудняет разработку эффективных подходов к профилактике саркопении и ее лечению. Существует достаточно много причин, приводящих к развитию саркопении при старении (Boirie, 2009; Frontera et al., 2012). Особого упоминания среди них заслуживает оксидативный стресс (Chen et al., 2008; Hindle et al., 2010). Следует заметить, что в качестве своеобразного мессенджера повреждения при оксидативном стрессе выступают накапливающиеся при нем карбонильные продукты свободнорадикального окисления (Uchida, 2000). Именно они, образуя аддукты с белками, нуклеиновыми кислотами и аминокислотами, способны приводить к появлению характерных для саркопении сдвигов (дисфункции митохондрий, апоптозу, торможению ответа мышечной ткани на действие анаболиков и др.) (Boirie, 2009; Narici, Maffulli, 2010; Frontera et al., 2012). Принимая во внимание все выше изложенное, можно предположить, что возрастная устойчивость к развитию саркопении во многом будет зависеть от состояния внутриклеточных ферментативных систем катаболизма карбонильных продуктов метаболизма, связанного с функционированием альдегиддегидрогеназ (АлДГ), альдегидредуктаз (АлР) и глутатионтрансфераз (ГТ) (Davydov et al., 2004; Давыдов и др., 2012). Вместе с тем, до настоящего времени их изучению в скелетной мышце все еще не уделялось должного внимания. Не изучена и реакция со стороны активности этих ферментов на состояние, которые сопровождаются усилением свободнорадикальных процессов в тканях, в т.ч. при стрессе (Меерсон, 1984; Davydov, Shvets, 2003). Учитывая это, целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы интактных и иммобилизованных крыс разного возраста.

#### **Методика**

В работе использовали 50 крыс самцов линии Вистар. Животных делили на 3 возрастные группы: 1 – 1,5-месячные (крысы в возрасте полового созревания); 2 – 12-месячные (взрослые половозрелые); 3 – 24-месячные (старые). Животных каждой возрастной группы, в свою очередь, делили на 2 подгруппы: 1 – интактные и 2 – крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу. С целью воспроизведения иммобилизационного стресса животных привязывали к неподвижной опоре на 5 часов в день в течение 2 дней. Эффективность воспроизведения стресса оценивали по уровню адреналина в крови.

Крыс декапитировали, извлекали бедренную мышцу и немедленно помещали ее в охлажденный 0,9% раствор хлористого натрия. После отмывания от крови кусочки мышечной ткани тщательно измельчали ножницам. Навеску мышечной кашицы смешивали из расчета 1 : 3 (масса : объем) с солевой средой, содержащей 0,05 М трис, 0,005 М сульфата магния и 0,001 М ЭДТА (рН 7,4), и гомогенизировали в течение 3 минут в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвегейма с тефлоновым пестиком. Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали при 1000 g в течение 10 минут. Супернатант переносили в чистые центрифужные пробирки и центрифугировали при 10000 g в течение 20 минут. Надосадочную жидкость использовали в качестве постмитохондриальной фракции. Осадок дважды промывали в среде гомогенизации при 10000 g в течение 20 минут и использовали в качестве митохондриальной фракции. Все процедуры по фракционированию гомогената мышцы проводили при 4–5°C.

В постмитохондриальной фракции бедренной мышцы определяли активность АлДГ (Пирожков, Панченко, 1988), АлР (Srivastava et al., 2001) и ГТ (Mannervik, Guthenberg, 1981). Содержание белка в пробах определяли по методу Lowry et al. (1955).

Полученные результаты подвергали статистической обработке с использованием пакетов прикладных программ Excel и «SPSS Statistics 17,0», с помощью непараметрического метода Wilcoxon-Mann-Witney. Различия между данными считали достоверными при  $P < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что активность НАД-АлДГ в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы крыс 1,5-, 12- и 24-месячного возраста находится на одинаковом уровне (табл.). В тоже время, активность НАДФ-АлДГ у 12-месячных животных в 7,8 раз и 6 раз соответственно выше ее величины у 1,5-месячных и 24-месячных крыс.

Активность НАДН-АлР в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы крыс 1,5-, 12- и 24-месячного возраста находится на одинаковом уровне. Однако активность НАДФН-зависимого энзима становится в 3,5 раза выше, чем у 1,5-месячных животных. На аналогичном уровне активность НАДФН-АлР остается в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы 24-месячных крыс.

Активность ГТ в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы в процессе увеличения возраста животных повышается. При этом у взрослых животных она становится на 83% выше, чем у 1,5-месячных, а у старых – на 32% выше, чем у взрослых соответственно.

При оценке характера полученных данных обращает на себя внимание тот факт, что на протяжении всего исследованного периода онтогенеза поддерживается стабильная активность НАД(Н)-зависимых оксидоредуктаз, принимающих участие в утилизации эндогенных альдегидов в миоплазме клеток бедренной мышцы. В тоже время активность НАДФ(Н)-зависимых энзимов в 12-месячном возрасте повышается. Близкий уровень активности НАДФН-АлР сохраняется и у старых животных. У взрослых крыс одновременно с повышением активности пиридинзависимых дегидрогеназ, принимающих участие в утилизации эндогенных альдегидов, возрастает активность ГТ.

Результаты проведенных исследований указывают на то, что у взрослых животных в постмитохондриальной фракции скелетной мышцы повышается потенциальная мощность ферментативных систем, обеспечивающих катаболизм цитотоксических карбонильных продуктов свободнорадикального окисления. Схожая ситуация имеет место и у старых крыс. В то же время у животных пубертатного возраста базальная активность ферментов утилизации эндогенных альдегидов существенно ниже, чем у взрослых. На этом основании можно предположить, что в условиях усиления продукции эндогенных альдегидов при оксидативном стрессе именно у животных данной возрастной группы будут формироваться предпосылки для возникновения карбонильного стресса и, соответственно, повреждения мышечной ткани. Принимая во внимание тот факт, что оксидативный стресс у крыс возникает при их продолжительной иммобилизации (Меерсон, 1984; Davydov, Shvets, 2003), далее было проведено изучение активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы животных, подвергнутых иммобилизации.

Исследования показали, что при иммобилизации у 1,5-месячных крыс происходит понижение активности НАД-АлДГ и НАДН-АлР на 60% и 73% соответственно, по сравнению с их исходным уровнем (табл.). При этом активность НАДФ-АлДГ и НАДФН-АлР у них, наоборот, повышалась на 215% и 81% соответственно, по сравнению с ее исходной величиной. В тоже время активность ГТ оставалась у иммобилизованных животных данной возрастной группы неизменной.

У 12-месячных крыс при иммобилизационном стрессе не выявлялось статистически достоверного изменения активности пиридин-зависимых дегидрогеназ (АлДГ и АлР) и ГТ в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы.

У старых крыс продолжительная иммобилизация сопровождалась повышением активности НАД-АлДГ на 212% и наоборот – понижением активности НАДН-АлР – на 87% соответственно, по сравнению с их величиной у интактных животных. Одновременно с этим у них происходило повышение активности НАДФН-АлР на 91% по сравнению с его исходным уровнем, хотя активность НАДФ-АлДГ и ГТ у них не изменялась.

Полученные данные свидетельствуют о том, что иммобилизационный стресс сопровождается зависимой от возраста модуляцией активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов в миоплазме клеток бедренной мышцы. При этом большую лабильность проявляют пиридин-зависимые дегидрогеназы (АлДГ и АлР), чем ГТ.

Стрессорные изменения со стороны активности ферментов носят зависимый от возраста характер. У иммобилизованных крыс пубертатного возраста происходят разнонаправленные сдвиги со стороны НАД- и НАДФ-зависимых ферментов, которые сопровождаются понижением суммарной активности пиридин-зависимых дегидрогеназ (рис.). Можно думать о том, что подобного рода изменения со стороны ферментативной активности способствуют возникновению своеобразного напряжения в катаболизме эндогенных альдегидов в цитозоле мышечных клеток при

иммобилизационном стрессе. Их следствием может становиться ограничение скорости их утилизации и, соответственно, накопление цитотоксических карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в мышечных волокнах.

**Таблица.**  
**Активность ферментов катаболизма эндогенных альдегидов (в нмоль/мг белка · мин) в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы интактных и иммобилизованных крыс разного возраста (M± m; n=6)**

Фермент		1,5-месячные		12-месячные		24-месячные	
		интактные	иммобилиз.	интактные	иммобилиз.	интактные	иммобилиз.
А л д г	НАД	1,0 ± 0,1	* 0,4 ± 0,05	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,04	0,8 ± 0,1	* 2,5 ± 0,1
	НАДФ	0,26 ± 0,05	* 0,82 ± 0,04	** 2,04 ± 0,29	1,24 ± 0,10	0,34 ± 0,05	0,24 ± 0,05
А л р	НАДН	0,88 ± 0,11	* 0,24 ± 0,04	0,61 ± 0,20	0,24 ± 0,04	1,19 ± 0,10	* 0,15 ± 0,02
	НАДФН	0,16 ± 0,02	* 0,29 ± 0,04	** 0,56 ± 0,11	0,87 ± 0,20	** 0,47 ± 0,06	* 0,90 ± 0,15
ГТ		1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	** 2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,1	** 2,9 ± 0,2	2,4 ± 0,1

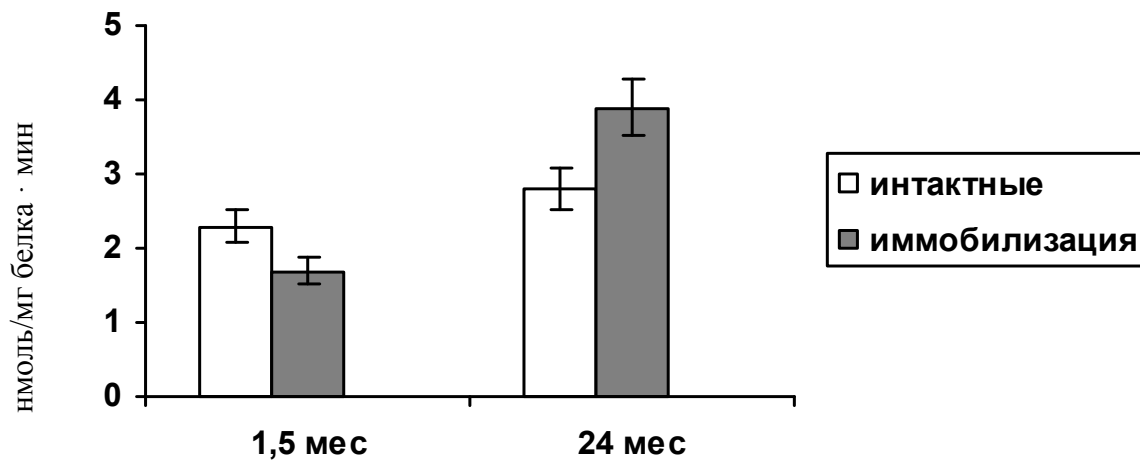
Примечание: \*\* – P<0,05 к интактным 1,5-месячным; \* – P<0,05 к интактным.

У старых животных, в отличие от крыс пубертатного возраста, после продолжительной иммобилизации модулируется активность НАД-зависимых дегидрогеназ и НАДФН-АлР, хотя активность ГТ остается неизменной. Характерно, что изменения со стороны активности НАД-АлДГ и НАД-АлР у них имеют значительно выраженный, но противоположный по направлению характер. При этом суммарная активность пиридинзависимых дегидрогеназ, катализирующих реакции катаболизма альдегидов, даже повышается (рис.). Принимая во внимание выше изложенное, можно предположить, что у старых животных при иммобилизационном стрессе происходит перестройка путей утилизации карбонильных продуктов свободнорадикального окисления, что может быть проявлением метаболической адаптации скелетной мышцы к действию продолжительного стрессора.

Продолжительная иммобилизация взрослых крыс не связана с изменением активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов. Принимая во внимание их высокую базальную величину, можно предположить, что в условиях повышенного синтеза карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в условиях продолжительной иммобилизации в мышце взрослых животных формируются условия для их эффективной утилизации.

Таким образом, в миоплазме клеток бедренной мышцы взрослых крыс за счет высокой базальной активности ферментов катаболизма эндогенных альдегидов формируются оптимальные условия для эффективной утилизации цитотоксических карбонильных продуктов обмена, которые поддерживаются и в условиях продолжительного иммобилизационного стресса. Сходная ситуация возникает и у старых животных. Однако у них при стрессе формируются предпосылки для изменения преимущественных путей катаболизма эндогенных альдегидов в миоплазме мышечных клеток, связанные с повышением их окислительных превращений в реакции, катализируемой НАД-зависимой альдегиддегидрогеназой. Учитывая полученные результаты, можно сделать заключение о том, что формирование саркопении в позднем онтогенезе не связано с возникновением возрастных нарушений в функционировании ферментов катаболизма карбонильных продуктов свободнорадикального окисления в миоплазме мышечных клеток.

У животных пубертатного возраста, ввиду ограничения базальной мощности ферментативной системы катаболизма карбонильных продуктов свободнорадикального окисления, а также появления особенностей в ее модуляции в миоплазме бедренной мышцы, при продолжительной иммобилизации, формируются предпосылки для накопления эндогенных альдегидов и, соответственно, стрессорного повреждения мышцы.



**Рис.** Изменение суммарной активности НАД(Н) и НАДФ(Н)-зависимых оксидоредуктаз (АлДГ + АлР) в постмитохондриальной фракции бедренной мышцы крыс 1,5- и 24-месячного возраста в условиях продолжительной иммобилизации (нмоль/мг белка · мин). В исследованиях использовалось по 6 крыс

Аналізуючи ситуацію з виникненням вікових різниць в проявленні базальної активності ферментів катаболізму ендогенних альдегідів і її модуляції при стресі, можна передположити їх взаємозв'язок з особливостями їх ендокринної регуляції, за рахунок змінення гормональної індукції синтезу ферментів цих ензимів на різних етапах онтогенезу і при іммобілізаційному стресі. Однак висказані передположення потребують спеціальної експериментальної перевірки, чому і будуть присвячені наші далішні дослідження.

#### 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., Kulchitskiy O.K. Fiziologicheskaya i patofiziologicheskaya rol' endogennykh al'degidov. – Saarbrücken: Palmarium Academic Publishing, 2012. – 240s./
- Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. – М.: Медицина, 1984. – 270с. /Meerson F.Z. Patogenez i preduprezhdeniye stressornykh i ishemicheskikh povrezhdeniy serdtsa. – М.: 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 krys // Biokhimiya. – 1988. – Т.53, №9. – С. 1443–1448./
- Boirie Y. Physiopathological mechanism of sarcopenia // J. Nutr. Health Aging. – 2009. – Vol.13, №8. – P. 717–723.
- Chen C.N., Brown-Borg H.M., Rakoczy S.G., Thompson L.V. Muscle disuse: adaptation of antioxidant systems is age dependent // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. – 2008. – Vol.63, №5. – P. 461–466.
- Czarkowska-Paczek B., Milczarczyk S. Age-related muscle mass loss // Przegl. Lek. – 2006. – Vol.63, №8. – P. 658–661.
- Davydov V.V., Dobaeva N.M., Bozhkov A.I. Possible role of aldehyde's scavenger enzymes during aging // Exp. Gerontol. – 2004. – Vol.39. – P. 11–16.
- Davydov V.V., Shvets V.N. Age-dependent differences in the stimulation of lipid peroxidation in the heart of rats during immobilization stress // Exp. Gerontol. – 2003. – Vol.38, №6. – P. 693–698.
- Frontera W.R., Zayas A.R., Rodriguez N. Aging of human muscle: understanding sarcopenia at the single muscle cell level // Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am. – 2012. – Vol.23, №1. – P. 201–207.

- 
- Hindle A.G., Lawler J.M., Campbell K.L., Horning M. Muscle aging and oxidative stress in wild-caught shrews // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* – 2010. – Vol.155, №4. – P. 427–234.
- Lowry O.H., Rosenbrough K.I., Farr A.L., Rendall K.I. Protein measurement with the Pholin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1955. – Vol.193, №1. – P. 265–267.
- Mannervik B., Guthenberg C. Glutathione transferase // *Methods Enzymology.* – 1981. – Vol.77. – P. 231–235.
- Narici M.V., Maffulli N. Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance // *Br. Med. Bull.* – 2010. – Vol.95. – P.139–159.
- Rossi P., Marzani B., Giardina S. et al. Human skeletal muscle aging and the oxidative system: cellular events // *Curr. Aging Sci.* – 2008. – Vol.1, №3. – P. 182–191.
- Sakuma K., Yamaguchi A. Molecular mechanisms in aging and current strategies to counteract sarcopenia // *Curr. Aging Sci.* – 2010. – Vol.3, №2. – P. 90–101.
- Srivastava S., Liu S.Q., Couklin D.J. et al. Involvement of aldose reductase in metabolism of atherogenic aldehyde // *Chem. Biol. Interact.* – 2001. – Vol.130–132, №1–3. – P. 563–571.
- Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease // *Free Radical. Biol. Med.* – 2000. – Vol.28, №12. – P. 1685–1696.

---

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

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

*Подано до редакції / Received: 01.11.2013*