

Особенности каталитических и кинетических свойств альдегиддегидрогеназы в жизненно важных органах при экспериментальной термической травме

А.Г. Соловьева

ФГБУ «Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздрава России

Контактная информация: к.б.н. Соловьева Анна Геннадьевна, sannag5@mail.ru

Изучены каталитические и кинетические свойства альдегиддегидрогеназы (АлДГ) в различных органах при экспериментальной ожоговой травме. Крысам линии Wistar под эфирным наркозом наносили ожог кипятком (20%), экспозиция – 3 с. Животных выводили из эксперимента на 3-и, 7-е и 10-е сутки после травмы. Активность альдегиддегидрогеназы и концентрацию белка определяли в гомогенате тканей (печень, почки, сердце и легкие). Из первичных экспериментальных данных полной кинетической кривой зависимости продукта реакции от времени рассчитывали кинетические характеристики АлДГ (K_t , V_{max} , V_{max}/K_t). Установлено, что при термической травме происходит перераспределение общей активности альдегиддегидрогеназы между печенью, почками, сердцем и легкими по сравнению с контрольными животными: при ожоге наибольшая общая активность АлДГ наблюдается в почках, наименьшая – в легких (3-и, 7-е сутки после травмы). Выявлено уменьшение удельной активности альдегиддегидрогеназы в печени и легких (наиболее выраженное на 7-е сутки после термического повреждения), снижение коэффициента каталитической эффективности АлДГ и увеличение времени достижения $\frac{1}{2} V_{max}$ ферментативной реакции. Отмечено повышение удельной активности фермента в почках и сердце (максимальное – на 10-е сутки), обусловленное возрастанием коэффициента каталитической эффективности и сродством фермента к субстрату. Падение общей и удельной активности альдегиддегидрогеназы в печени на 3-и, 7-е и 10-е сутки после ожога свидетельствует о наибольшем повреждении данного органа при термической травме.

Ключевые слова: альдегиддегидрогеназа, экспериментальная термическая травма, органоспецифичность.

Введение

Проблема изучения каталитических свойств ферментов при термических поражениях не потеряла своей актуальности в современном техногенном мире. Ожоговая болезнь всегда сопровождается развитием интоксикации, обусловленной многочисленными неспецифическими токсическими метаболитами и биологически активными веществами [7, 8]. Окислительный стресс, возникающий при термическом поражении, приводит к накоплению высокотоксичных альдегидов,

которые образуют аддукты с белками, нуклеиновыми кислотами, вмешиваются в энергетический обмен, изменяют клеточные функции [10]. В повышенных концентрациях данные соединения вызывают ряд отрицательных эффектов: нарушают структуру и функции плазматических и внутриклеточных мембран, выступают в качестве ингибиторов активности многих ферментов сыворотки крови в результате прямого взаимодействия модифицируют белки тканей. Токсичные среднепочечные альдегиды (алканали, алкенали

и 4-гидроксиалкенами) генерализуются в течение липидной пероксидации, которая усиливается при термической травме [11, 12]. Большая часть продуктов перекисного окисления липидов приходится на долю малонового диальдегида (МДА), весьма активно реагирующего с аминокетонами белков и нуклеиновых кислот, образуя внутри- и межмолекулярные сшивки. МДА, встраиваясь в клеточные мембраны, образует основания Шиффа, нарушающие физико-химические свойства последних, особенно их эластичность и проницаемость [7]. Известно, что основным ферментом, участвующим в утилизации альдегидов, является альдегиддегидрогеназа (АлДГ), представленная во всех тканях [4]. Данные об изменении кинетических и каталитических свойств АлДГ при ожоговой травме немногочисленны. В связи с этим, исследование каталитических и кинетических свойств альдегиддегидрогеназы как одного из основных маркеров биотрансформации в норме и при термической травме является актуальным.

Целью работы являлось изучение каталитических и кинетических свойств альдегиддегидрогеназы в различных органах крыс при экспериментальном ожоге.

Материалы и методы

В эксперименте использованы самцы белых крыс Wistar (Филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России, Московская область), массой 180-250 г, содержавшиеся на стандартном рационе вивария и имевшие свободный доступ к воде. Животные были разделены на две группы: контрольную (интактные крысы, $n=10$) и опытную (крысы с ожогом, $n=10$). Животным опытной группы под эфирным наркозом наносили ожог кипятком на депилированную поверхность спины (20%), экспозиция – 3 с. [1]. Крыс выводили из эксперимента на 3-и, 7-е и 10-е сутки после травмы путем декапитации под эфирным наркозом. Внутренние органы (печень, почки, сердце и легкие) забирали для биохимических исследований. Использовали 10% гомогенат тканей на основе среды, содержащей 0,25 М раствор сахарозы, 0,01 М трис-НСl-буфер ($pH=7,5$) (1000 г, 10 мин, $t=0+2^{\circ}C$) [3]. Активность альдегиддегидрогеназы определяли по методу Б.М. Кершенгольц, Л.П. Ильиной с 5 мМ ацетальдегидом в качестве субстрата по наработке НАДН [6]. Концентрацию белка вычисляли по методу Лоури в модификации [13].

Из первичных экспериментальных данных полной кинетической кривой зависимости продукта реакции от времени (V от t), используя математический метод, рассчитывали следующие кинетические характеристики АлДГ: K_t , V_{max} , V_{max}/K_t (K_a), где: K_t – время достижения $\frac{1}{2} V_{max}$ ферментативной реакции (мин); V_{max} – максимальная скорость накопления продукта реакции (мкмоль/мин); V_{max}/K_t (K_a) – коэффициент каталитической эффективности ферментативной реакции (мкмоль/мин²) [5]. Учитывая, что с течением времени кинетическая характеристика фермента в надмолекулярной структуре может изменяться, был выбран диапазон времени на кинетической кривой, при котором имеет место преимущественно пропорциональное изменение скорости реакции от времени при сохранении насыщающих концентраций исходных субстратов, равный 60 сек.

Результаты исследований обрабатывали с использованием t -критерия Стьюдента [2]. Обработку данных осуществляли на компьютере с помощью программы Biostat. При расчете t -критерия Стьюдента

та применяли поправку Бонферрони, позволяющую устранить ошибку первого рода, возникающую при сравнении более чем двух выборок данным методом.

Результаты и их обсуждение

Полученные результаты показали, что общая активность альдегиддегидрогеназы в исследуемых органах здоровых крыс (в порядке ее уменьшения) распределяется следующим образом: печень → почки → сердце → легкие (рис.).

У крыс с термической травмой на 3-и и 7-е сутки после ожога наибольшая общая активность АлДГ регистрируется в почках, наименьшая – в легких. Распределение общей активности альдегиддегидрогеназы на 10-е сутки после термической травмы в исследуемых органах аналогично распределению фермента контрольной группы крыс.

При ожоге общая активность АлДГ (3-и, 7-е, 10-е сутки после травмы) в поч-

ках статистически значимо не отличается от активности фермента контрольной группы крыс, отмечена лишь тенденция к снижению общей активности альдегиддегидрогеназы на 3-и и 7-е сутки после поражения. В печени общая активность АлДГ статистически значимо уменьшается на 3-и сутки после ожога на 61,4% ($p=0,0207$), на 7-е сутки – на 79,2% ($p=0,0104$), на 10-е сутки – на 28,7% ($p=0,0361$) по сравнению с интактными животными. В легких общая активность альдегиддегидрогеназы также снижается на 47,4% ($p=0,0415$) (3-и сутки после травмы) и 52,6% ($p=0,0087$) (7-е сутки после ожога), оставаясь в пределах значений контрольной группы крыс на 10-е сутки при термической травме. В сердце общая активность АлДГ уменьшается на 3-и сутки после поражения на 33,3%; на 7-е и 10-е сутки после ожога не выявлено статистически значимых изменений активности фермента (рис.).

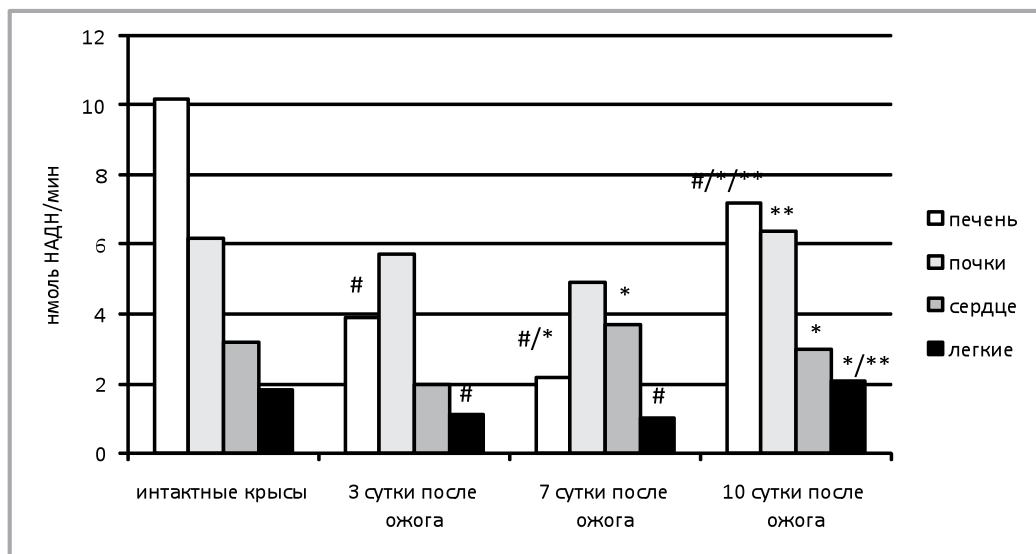


Рис. Общая активность альдегиддегидрогеназы в норме и при ожоге.

Примечание: # – статистически значимо по сравнению с контрольными крысами ($p \leq 0,05$); * – статистически значимо по сравнению с ожогом (3-и сутки); ** – статистически значимо по сравнению с ожогом (7-е сутки).

Перераспределение общей активности альдегиддегидрогеназы на 3-и и 7-е сутки после термической травмы сопровождается более значимым увеличением удельной активности фермента в почках и снижением удельной активности АлДГ в печени (табл. 1).

та каталитической эффективности в 2,4 раза ($p=0,0045$), а также статистически значимым снижением показателя K_t в 2,2 раза ($p=0,0032$), свидетельствуя о повышении сродства фермента к субстрату (табл. 2).

В сердце активность АлДГ на 3-и

Таблица 1

Удельная активность альдегиддегидрогеназы (нмоль НАДН/минхмг белка)
в органах контрольных животных и крыс с ожогом

Орган	Контрольные крысы	Крысы с ожогом		
		3-и сутки	7-е сутки	10-е сутки
Печень	51,39±1,75	22,49±1,30#	11,25±0,84#/*	30,10±3,46#/**
Сердце	15,55±1,43	13,00±2,13	16,20±1,89	26,45±1,67#/**
Почки	80,50±5,55	98,04±6,71#	87,05±8,27	117,10±9,25#/**
Легкие	22,61±2,10	14,46±1,79#	10,07±0,83#/*	22,10±1,20*/*

Примечание: # – статистически значимо по сравнению с контрольными крысами ($p\leq0,05$); * – статистически значимо по сравнению с ожогом (3-и сутки) ($p\leq0,05$); ** – статистически значимо по сравнению с ожогом (7-е сутки) ($p\leq0,05$).

Удельная активность альдегиддегидрогеназы в почках статистически значимо возрастает на 3-и сутки после ожога на 21,8% ($p=0,0246$), на 10-е сутки после поражения – на 45,5% ($p=0,0123$) по сравнению с активностью фермента контрольной группы животных. Следует отметить преобладание общей активности альдегиддегидрогеназы и повышение удельной активности фермента в почках во все исследуемые периоды, что свидетельствует о возрастании детоксикационной функции данного органа.

На 3-и сутки после поражения в почках уменьшается максимальная скорость накопления продукта альдегиддегидрогеназной реакции в 1,6 раза ($p=0,0217$) по сравнению с контрольными животными. Увеличение активности АлДГ в почках на 10-е сутки после ожога, вероятно, обусловлено возрастанием коэффициен-

и 7-е сутки после ожога находится в пределах значений контрольной группы животных. Статистически значимое повышение удельной активности фермента, следовательно, вовлечение в процесс биотрансформации альдегидов в данном органе выявлено лишь на 10-е сутки после травмы на 70,1% ($p=0,0024$). Рост активности альдегиддегидрогеназы именно в этот временной промежуток, вероятно, можно объяснить наступлением третьей фазы эндогенной интоксикации, которая характеризуется проникновением токсичных соединений в клетки особенно тех органов, которые не предназначены для осуществления детоксикации [7]. Кроме этого, на 10-е сутки в сердце возрастает сродство АлДГ к субстрату реакции: статистически значимо уменьшается время достижения $\frac{1}{2} V_{max}$ ферментативной реакции в 2,7 раза ($p=0,0038$), понижается

максимальная скорость накопления продукта альдегиддегидрогеназной реакции в 2,7 раза ($p=0,0064$) (табл. 2).

Известно, что тяжелая термическая травма осложняется ранним развитием синдрома полиорганной недостаточности [7]. Результаты проведенного исследования показали, что при ожоге удельная активность альдегиддегидрогеназы статистически значимо снижается только в печени и легких: на 3-и сутки после травмы – на 56,2% в печени ($p=0,0056$) и на 36,1% в легких ($p=0,0365$); на 7-е сутки – на 78,1% в печени ($p=0,0042$) и на 55,5% в легких ($p=0,0154$) и на 10-е сутки после поражения – на 41,4% в печени ($p=0,0116$). Падение удельной и общей активности альдегиддегидрогеназы в печени и легких у крыс с термической

травмой, возможно, связано с увеличением содержания высокотоксичных соединений, в частности – молекул средней молекулярной массы (МСМ). Видимо, МСМ, связываясь с ферментом, переводят его в новое конформационное состояние, которое характеризуется снижением сродства фермента к субстрату реакции [4]. Об этом косвенно может свидетельствовать и увеличение времени достижения половины $V_{\max}$ фермента у опытных животных (табл. 2). Время достижения $\frac{1}{2} V_{\max}$ ферментативной реакции в легких характеризуется повышением в 1,3 раза ($p=0,0187$) на 7-е сутки после травмы и снижением коэффициента каталитической эффективности АлДГ в 2 раза ($p=0,0327$). Из табл. 2 видно, что K_t печени на 3-и сутки после термической

Таблица 2

Кинетические характеристики альдегиддегидрогеназы
в органах контрольных крыс и животных с ожогом

Показатель		Интактные крысы	Крысы с ожогом		
			3-и сутки	7-е сутки	10-е сутки
K_t , мин	печень	1,14±0,06	3,96±0,08#	7,58±0,74#/*	2,00±0,08#/**
	легкие	1,58±0,20	1,80±0,05	2,00±0,01#/*	1,77±0,08
	почки	1,72±0,07	1,71±0,04	1,68±0,07	0,79±0,08#/**
	сердце	4,66±0,82	5,60±0,08	3,00±0,19*	1,72±0,05#/**
$V_{\max}$, мкмоль/мин	печень	0,55±0,03	1,41±0,09#	2,44±0,44#/*	0,42±0,04#/**
	легкие	0,13±0,02	0,11±0,03	0,10±0,01	0,31±0,05#/**
	почки	0,36±0,02	0,23±0,01#	0,31±0,06	0,30±0,02
	сердце	1,95±0,15	2,45±0,04#	1,03±0,08#/*	0,72±0,03#/**
K_a , мкмоль/мин ²	печень	0,51±0,04	0,38±0,03	0,32±0,03#	0,22±0,02#/**
	легкие	0,08±0,01	0,07±0,01	0,04±0,00#	0,18±0,01#/**
	почки	0,23±0,01	0,18±0,01	0,27±0,03*	0,54±0,01#/**
	сердце	0,41±0,06	0,45±0,01	0,34±0,04*	0,46±0,05

Примечание: # – статистически значимо по сравнению с контрольными крысами ($p \leq 0,05$); * – статистически значимо по сравнению с ожогом (3-и сутки) ($p \leq 0,05$); ** – статистически значимо по сравнению с ожогом (7-е сутки) ($p \leq 0,05$).

травмы статистически значимо увеличивается в 3,5 раза ($p=0,0023$), на 7-е сутки – в 6,6 раза ($p=0,0008$) и на 10-е сутки – в 1,7 раза ($p=0,0275$) по сравнению с контрольными животными, свидетельствуя о снижении сродства альдегиддегидрогеназы к субстрату реакции. Максимальное увеличение K_t наблюдается в печени и легких на 7-е сутки, вызывая наибольшее снижение удельной активности фермента. При термической травме во все исследуемые периоды после поражения в печени отмечается уменьшение коэффициента каталитической эффективности ферментативной реакции: на 3-и сутки – в 1,3 раза; на 7-е сутки – в 1,6 раза ($p=0,0271$); на 10-е сутки – в 2,3 раза ($p=0,0083$).

Уменьшение активности АлДГ ведет к накоплению большого количества альдегидов, которые, в свою очередь, токсичны для организма обожженных крыс и, ингибируя активность многих ферментов, снижают детоксикационную функцию печени – органа, являющегося основным местом нейтрализации ксенобиотиков. Предположительно, что понижение способности печени инактивировать токсические вещества при ожогах может быть одной из причин увеличения их количества в крови и способствовать развитию синдрома эндогенной интоксикации [7].

Согласно литературным данным, всякая ожоговая травма, даже не смертельная, вызывает ряд изменений печеночных клеток. При тяжелых ожогах, естественно, процесс этот затягивается еще больше [9]. В условиях функциональной и структурной неполноценности печеночных клеток любая дополнительная нагрузка – нарушения кровообращения и возникающая при этом гипоксия, перегрузка печени распадающимися

эритроцитами при переливании консервированной крови или на почве гемолиза при сепсисе – может способствовать усилению повреждения печеночных клеток [7]. В них возникает ряд структурных изменений. Повреждения при недостаточности механизмов компенсации завершаются тяжелыми нарушениями функции органа.

Заключение

Таким образом, термическая травма приводит к изменению удельной и перераспределению общей активности АлДГ. Характер возникающих изменений зависит от органа и определяется временем после ожога.

Показано, что при термической травме происходит изменение распределения общей активности альдегиддегидрогеназы в печени, почках, сердце и легких по сравнению с контрольными животными: при ожоге наибольшая общая активность АлДГ приходится на почки, наименьшая – на легкие (3-и и 7-е сутки после травмы).

При термической травме происходит разнонаправленное изменение удельной активности АлДГ: уменьшение – в печени и легких, увеличение – в почках и сердце. Наиболее статистически значимое понижение удельной активности альдегиддегидрогеназы в легких и печени наблюдается на 7-е сутки после повреждения, повышение в сердце и почках – на 10-е сутки, по сравнению с контрольными животными.

Снижение общей и удельной активности альдегиддегидрогеназы в печени на 3-и, 7-е и 10-е сутки после травмы свидетельствует о том, что при ожоге страдает в большей степени данный орган детоксикации. Установлено, что под влиянием термической травмы изменяются каталитические и кинетические характери-

стики альдегиддегидрогеназы, что важно учитывать при разработке методов борьбы с интоксикацией.

Список литературы

1. **Болтовская В.В.** Патоморфология раневого процесса в зоне глубокого ожога кожи в условиях применения низкоинтенсивного электромагнитного излучения // Автореф. дисс. канд. наук. ГОУ ВПО Саратовский государственный медицинский университет. Саратов. 2006. 21 с.
2. **Гланц С.** Медико-биологическая статистика (пер. с англ.). - М.: Практика. 1999. 459 с.
3. **Ещенко Н.Д.** Выделение митохондриальной и цитоплазматической фракций тканей для анализа активности ферментов. - В кн.: Методы биохимических исследований. - Ленинград: Издательство Ленинградского ун-та. 1982. С. 29-33.
4. **Зимин Ю.В., Соловьева А.Г.** Возможный механизм действия «термотоксинов» на кинетические свойства альдегиддегидрогеназы печени при экспериментальном термическом поражении // Вестник Российской военно-медицинской академии. Т. 29. 2010. № 1. С. 43-44.
5. **Зимин Ю.В., Соловьева А.Г., Уланова А.А.** Оценка кинетических параметров ферментов в гетерогенной надмолекулярной системе // Фундаментальные исследования. 2013. № 2. С. 68-71.
6. **Кершенгольц Б.М., Ильина Л.П.** Биологические аспекты алкогольных патологий и наркоманий. - Якутск: Издательство ЯГУ. 1998. 150 с.
7. **Козинец Г.П., Слесаренко С.В., Радзиховский А.П., Повстаной Н.Е., Шейман Б.С.** Ожоговая интоксикация. Патогенез, клиника, принципы лечения. - М.: МЕДпресс-информ. 2005. 321 с.
8. **Марусянов В.Е., Михайлович В.А., Доманская И.А.** Характеристика стадий эндогенной интоксикации // Эфферентная терапия. Т. 1. 1995. № 2. С. 26-30.
9. **Парамонов Б.А., Порембский Я.О., Яблонский В.Г.** Ожоги. Руководство для врачей. - СПб.: СпецЛит. 2000. 467 с.
10. **Lieber C.S.** Hepatic and other medical disorders of alcoholism: From pathogenesis to treatment // J. Stud. Alcohol. Vol. 59. 1998. № 1. P. 9-25.
11. **Reichard J.F., Vasiliou V., Petersen D.R.** Characterization of 4-hydroxy-2-nonenal metabolism in stellate cell lines derived from normal and cirrhotic rat liver // Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1487. 2000. № 2-3. P. 222-232.
12. **Townsend A.J., Leone-Kabler S., Haynes R.L.** Selective protection by stably transfected human ALDH3A1 (but not human ALDH1A1) against toxicity of aliphatic aldehydes in V79 cells // Chem. Biol. Interact. Vol. 130-132. 2001. № 1-3. P. 261-273.
13. **Waterborg J.H., Matthews H.R.** The Lowry method for protein quantitation // Methods Mol. Biol. Vol. 32. 1994. P. 1-4.

Features of the catalytic and kinetic properties of aldehyde dehydrogenase to the vital organs in experimental thermal injury

A.G. Solov`eva

The catalytic and kinetic properties of aldehyde dehydrogenase (ALDH) have been studied in the various organs of the experimental burns injury. The boiling water burn (20%) were caused to rats Wistar under ether anaesthesia, exposure – 3 sec. The animals were taken out of the experiment on the third, seventh and tenth day after the injury. Activity of aldehyde dehydrogenase and the concentration of the protein were determined in the homogenate of tissues (liver, kidney, heart and lungs). Of primary experimental data total kinetic curve of dependence of reaction product from the time were counted kinetic characteristics of ALDH (K_t , V_{max} , V_{max}/K_t). It was established that the thermal injury, the redistribution of overall aldehyde dehydrogenase activity between the liver, kidneys, heart and lungs is, in comparison with the control animals: when burning the highest total activity of ALDH is observed in the kidneys, the lowest - in the lungs (3, 7 days after the injury). Decrease of specific aldehyde dehydrogenase activity was revealed in the liver and the lungs (the most expressed on a 7 days after thermal damage), reduction in the rate of catalytic efficiency of ALDH and the increase in time of reaching $\frac{1}{2} V_{max}$ of enzymatic reaction. Increase of the specific activity of the enzyme was noted in the kidneys and the heart (the maximum of the 10-th day), due to the increase of the coefficient of catalytic efficiency and affinity of the enzyme to the substrate. The fall of general and specific activity of the aldehyde dehydrogenase in the liver to 3, 7 and 10 days after the burn indicates the greatest damage to the organ with thermal injury.

Key words: aldehyde dehydrogenase, experimental thermal injury, organ specific.