УДК 612. 014.32: 577.152.121

МЕМБРАННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

Зимин Ю.В., Соловьева А.Г.

ФГБУ «ННИИТО» Минздравсоцразвития России, Нижний Новгород, e-mail: yuzimin@mail.ru

Цель исследования – изучение активности и кинетических свойств лактатдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы эритроцитов при термической травме. Отмечено, что при ожоге активность лактатдегидрогеназы статистически значимо увеличивается в 2 раза по сравнению со здоровыми людьми, активность альдегиддегидрогеназы снижается. Выявлено статистически значимое повышение максимальной скорости и каталитической эффективности лактатдегидрогеназы при термической травме. Каталитическая эффективность альдегиддегидрогеназы при ожоге существенно падает. Таким образом, исследуемые оксидоредуктазы взаимодействуют не только с мембраной эритроцитов, но и функционально связаны друг с другом единым для обеих реакций коферментом. Причем характер данного взаимодействия зависит от физико-химического состояния мембраны эритроцитов. Если целостность мембраны сохранена, то альдегиддегидрогеназа оказывает ингибирующее влияние на активность лактатдегидрогеназы. Если же мембрана эритроцитов повреждена, что имеет место в условиях окислительного стресса при термической травме, тогда лактатдегидрогеназа оказывает ингибирующее воздействие на альдегиддегидрогеназу.

Ключевые слова: лактатдегидрогеназа, альдегиддегидрогеназа, мембранная регуляция, эритроциты, термическая травма.

THE MEMBRANE REGULATION OF ENZYME OF ERYTHROCYTES OF HUMAN BLOOD DURING THERMAL INJURY

Zimin Y.V., Soloveva A.G.

Research Institute of Traumatology and Orthopedic, Nizhny Novgorod, e-mail: yuzimin@mail.ru

The purpose of research is studying of activity and kinetic properties of lactate dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase of red blood cells in thermal injury. It was noted that when the burning activity of lactate dehydrogenase statistically significantly increased in 2 times in comparison with healthy people, activity of aldehyde dehydrogenase reduced. It was revealed statistically significant increase in maximum speed and efficiency of the catalytic lactate dehydrogenase with thermal injury. Catalytic efficiency of aldehyde dehydrogenase during the burn is significantly low. Thus, the studied oxidoreductase interact not only with the membrane of the erythrocytes, but also functional and utilities are connected with each other the same for both reactions coenzyme. The nature of the interaction of interaction depends on physical-chemical state of erythrocyte membranes. If the integrity of the membranes retained, the aldehyde dehydrogenase has inhibitory effects on the activity of the lactate dehydrogenase. If the membrane of red blood cells is damaged, as is the case in the conditions of oxidative stress in the thermal injury, then lactate dehydrogenase has inhibitory effect on aldehyde dehydrogenase.

Keywords: lactate dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, membrane regulation, erythrocyte, thermal injury

Развитие медицинской энзимологии в XXI веке касается разработки нового направления супрамолекулярной регуляции свойств ферментов, связанных с мембранными структурами клеток [9, 12]. Данные исследования открывают широкие перспективы для создания новых эффективных надмолекулярных маркеров ранней диагностики различных патологических состояний человека. Характерно, что до сих пор, в силу экстремальных условий жизни человека в современном техногенном мире, актуальной остается проблема термических поражений [1]. Несомненно, что именно ранняя диагностика тяжести повреждения организма при ожоговой болезни позволит назначить своевременное лечение и провести эффективную профилактику возможных осложнений. Поэтому фундаментальные исследования в области медицинской энзимологии всецело направлены на выявление новых энзиматических маркеров диагностики тяжести патологического процесса при ожоговой болезни у человека.

Среди всего разнообразия различных ферментов, в частности эритроцитов, обращают на себя внимание два: лактатдегидрогеназа (ЛДГ), как один из основных ферментов гликолиза, и альдегиддегидрогеназа (АлДГ) – фермент биотрансформации ксенобиотиков альдегидной природы. Оба фермента взаимодействуют с мембраной эритроцитов, что позволяет рассматривать возможность их мембранной регуляции при различных состояниях организма, в частности при термическом поражении [7, 8].

Целью настоящего исследования явилось изучение активности и кинетических свойств ЛДГ и АлДГ мембран эритроцитов при термической травме у человека.

Материал и методы исследования

Исследования проводили на практически здоровых людях ($n = 15$) и пациентах с термической травмой ($n = 15$; площадь поражения – 20% поверхности тела, тяжесть – III А, Б степень). Кровь брали из локтевой вены, стабилизировали ее 4%-м раствором цитрата натрия (в соотношении 9:1) с соблюдением всех необходимых правил в условиях медицинско-

го стационара. Активность ЛДГ (с использованием в качестве субстрата молочной кислоты) и АлДГ (с использованием в качестве субстрата ацетальдегида) определяли в «тенях» эритроцитов [4, 5]. Для получения «теней» эритроциты осаждали (800 g; 10 мин), промывали 5-кратным объемом 0,15 М NaCl с 10 мМ трис-HCl (pH 7,4), гемолизировали, через 30 мин центрифугировали (16000g; 10 мин) [6]. Также определялись следующие кинетические показатели ферментов: Kt, Vmax и Ka [2], где Kt – интегративный показатель сродства фермента к субстратам реакции (мин); Vmax – максимальная скорость реакции фермента (мкмоль/мин); Ka (Vmax/Kt) – коэффициент каталитической эффективности ферментативной реакции (мкмоль/мин2). Статистический анализ результатов исследований выполнен с использованием программы Statistica 6.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что у здоровых людей в мембранах эритроцитов активность альдегиддегидрогеназы преобладает по сравнению с активностью лактатдегидрогеназы в 1,5 раза. Однако при термической травме имеет место противоположная картина, когда активность ЛДГ в «тенях» эритроцитов превышает активность альдегиддегидрогеназы в 2,7 раз (табл. 1). Отмечено, что при ожоге активность лактатдегидрогеназы статистически значимо увеличивается в 2 раза по сравнению со здоровыми людьми, активность альдегиддегидрогеназы снижается в 2 раза.

Таблица 1

Активность ферментов (нмоль НАДН/минЧбелка) в «тенях» эритроцитов при термической травме

Ферменты	ЛДГ	АлДГ
Здоровые люди	18,09 ± 0,95	27,73 ± 1,46
Больные с ожогом	36,17 ± 1,90* p = 0,0012	13,26 ± 0,70* p = 0,0023

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению со здоровыми людьми.

Для того чтобы представить возможный молекулярный механизм данных перестроек в активности ферментов, были изучены их кинетические характеристики. При рассмотрении кинетических показателей обращает на себя внимание то, что при термической травме сродство ЛДГ к субстратам реакции практически не изменяется, статистически значимо увеличивается только максимальная скорость реакции в 1,8 раза. Каталитическая эффективность фермента повышается (табл. 2).

Таблица 2

Кинетические свойства ферментов в «тенях» эритроцитов при термической травме

Ферменты	Кинетические показатели	ЛДГ	АлДГ
Здоровые люди	Kt, мин	2,62 ± 0,14	4,37 ± 0,23
	Vmax, (мкмоль/мин)	0,83 ± 0,04	1,81 ± 0,10
	Ka, (мкмоль/мин2)	0,32 ± 0,02	0,41 ± 0,02
Больные с ожогом	Kt, мин	2,60 ± 0,14	1,78 ± 0,09* p = 0,0042
	Vmax, (мкмоль/мин)	1,53 ± 0,08* p = 0,0054	0,49 ± 0,02* p = 0,0051
	Ka, (мкмоль/мин2)	0,58 ± 0,03* p = 0,0132	0,28 ± 0,01* p = 0,0063

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению со здоровыми людьми.

Для АлДГ при термической травме характерно, с одной стороны, увеличение сродства к субстратам реакции по сравнению со здоровыми людьми (Kt, статистически значимо снижается в 2,5 раза). С другой стороны, Vmax ферментативной реакции альдегиддегидрогеназы существенно падает в 4,4 раза. Закономерно, что каталитическая эффективность данного фермента при термической травме уменьшается в 1,5 раза по сравнению со здоровыми людьми (табл. 2).

Основываясь на данных литературы и ранее проведенных исследованиях, на первый план выходит объяснение полученных результатов с позиции регуляторного влияния мембраны на свойства ферментов эритроцитов [3, 10].

Предполагается, что АлДГ и ЛДГ оказывают влияние друг на друга при взаимодействии с мембраной эритроцита, которое можно выявить при рассмотрении кинетического взаимодействия ферментов. Видимо, в эритроцитах здоровых людей альдегиддегидрогеназа выступает в роли ингибитора ЛДГ по бесконкурентному кинетическому механизму. При этом мембрана эритроцитов

играет роль основного регулятора функционального взаимодействия ферментов друг с другом. При термической травме картина изменяется. В данном случае ЛДГ оказывает псевдоингибирующее воздействие на АлДГ эритроцитарной мембраны.

Таким образом, на основании проведенных кинетических исследований можно заключить, что ЛДГ и АлДГ эритроцитов взаимодействуют не только с мембраной эритроцитов, но и функционально связаны друг с другом единым для обеих реакций коферментом никотинамидадениндинуклеотидом (НАД). Причем характер данного взаимодействия зависит от физико-химического состояния мембраны эритроцитов. Если целостность мембраны сохранена, то АлДГ оказывает ингибирующее влияние на активность лактатдегидрогеназы. Если же мембрана эритроцитов повреждена, что имеет место в условиях окислительного стресса при термической травме, изменяются ее физико-химические свойства [11]. В результате такой перестройки мембраны характер функционального взаимодействия ферментов друг с другом нарушается. В итоге ЛДГ оказывает ингибирующее воздействие на АлДГ в поврежденных мембранах эритроцитов. Несомненно, что это только одно из множества возможных объяснений полученных результатов. Дальнейшие исследования прольют свет на особенности мембранной регуляции ферментов клеток не только в условиях физиологической нормы, но и при патологии, в частности термической травме.

Список литературы

1. Азолов В.В., Жегалов В.А., Пономарева Н.А. Проблемы специализированной помощи обожженным в России и пути их решения // Международный медицинский журнал. – 2003. – Т. 9, № 2. – С. 102–107.

2. Зимин Ю.В. Системный кинетический анализ мультиэнзимных комплексов клетки // Рук. деп. в ВИНИТИ. – 1993. – № 1541, В 93. – 6 с.

3. Зимин Ю.В., Соловьева А.Г. Топохимия мембранной формы альдегиддегидрогеназы эритроцитов крови человека // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 5. – С. 412–414.

4. Кершенгольц Б.М., Ильина Л.П. Биологические аспекты алкогольных патологий и наркоманий. – Якутск: Изд-во ЯГУ, 1998. – 150 с.

5. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: ВШ, 1980. – 272 с.

6. Макаренко Е.В. АТФазная активность эритроцитов при хронических заболеваниях печени и желудка // Лабораторное дело. – 1987. – № 2. – С. 14–17.

7. Campanella M.E., Chu H., Wandersee N.J., Peters L.L., Mohandas N., Gilligan D.M., Low P.S. Characterization of glycolytic enzyme interactions with murine erythrocyte membranes in wild-type and membrane protein knockout mice // BLOOD. – 2008. – Vol. 112, № 9. – P. 3900–3906.

8. Campanella M.E., Chu H., Low P.S. Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane // PNAS. – 2005. Vol. 102, № 7. – P. 2402–2407.

9. Franco T., Low P.S. Erythrocyte adducin: A structural regulator of the red blood cell Membrane // Transfus Clin Biol. – 2010. – Vol. 17, № 3. – P. 87–94.

10. Hansell N.K., Pang D., Heath A.C., Martin N.G., Whitfield J.B. Erythrocyte aldehyde dehydrogenase activity: lack of association with alcohol use and dependence or alcohol reactions in Australian twins // Alcohol Alcohol. – 2005. – Vol. 40, № 5. – P. 343–348.

11. Olszewska M., Wiatrow J., Bober J., Stachowska E.F, Goiembiewska E., Jakubowska K., Stacczyk-Dunaj M., Pietrzak-Nowacka M. Oxidative stress modulates the organization of erythrocyte membrane cytoskeleton // Postepy Hig Med Dosw. – 2012. – № 66. –P. 534–542.

12. Yong Keun Park, Catherine A.B., Thorsten A., Nir S.G., Safran S.A., Popescu G., Suresh S., Feld M.S. Metabolic remodeling of the human red blood cell membrane // PNAS. – 2010. – Vol. 107, № 4. – P. 1289–1294.

References

1. Azolov V.V., Zhegalov V.A., Ponomareva N.A. International medical journal, 2003, T. 9, no. 2, pp. 102–107.

2. Zimin Yu. V. VINITI, no. 1541, Vol. 93, 6 p.

3. Zimin Yu. V., Soloveva A.G. Fundamental research, 2012, no. 5, pp. 412–414.

4. Kershengolts B.M., Ilina L.P. Biologicheskie aspekty alkogolnykh patologiy I narkomaniy [Biological aspects of alcoholic pathologies and drug abuse]. Yakutsk: YakutskiiGos. Univ., 1998, 150 p.

5. Kochetov G.A. Prakticheskoe rukovodstvo po enzimologii [Practical handbook in enzimologiya]. Moscow: Higher school, 1980, 272 p.

6. Makarenko E.V. Laboratory work, 1987, no. 2, pp. 14–17.

7. Campanella M.E., Chu H., Wandersee N.J., Peters L.L., Mohandas N., Gilligan D.M., Low P.S. BLOOD, 2008, Vol. 112, no 9, pp. 3900–3906.

8. Campanella M.E., Chu H., Low P.S. PNAS, 2005, Vol. 102, no 7, pp. 2402–2407.

9. Franco T., Low P.S. Transfus Clin Biol., 2010, Vol. 17, no 3, pp. 87–94.

10. Hansell N.K., Pang D., Heath A.C., Martin N.G., Whitfield J.B. Alcohol Alcohol., 2005. Vol. 40, no. 5, pp. 343–348.

11. Olszewska M., Wiatrow J., Bober J., Stachowska E.F, Goiembiewska E., Jakubowska K., Stacczyk-Dunaj M., Pietrzak-Nowacka M. Postepy Hig Med Dosw., 2012, no. 66, pp. 534–542.

12. Yong Keun Park, Catherine A.B., Thorsten A., Nir S.G., Safran S.A., Popescu G., Suresh S., Feld M. S. PNAS, 2010, Vol. 107, no 4, pp. 1289–1294.

Рецензенты:

Корягин А.С., д.б.н., профессор кафедры физиологии и биохимии человека и животных ГОУ ВПО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород;

Веселов А.П., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии и физиологии растений, декан биологического факультета ГОУ ВПО «ННГУ им. Н.И.Лобачевского», г. Нижний Новгород.

Работа поступила в редакцию 09.11.2012.