

УДК 577.152.121: 612.111.

ТОПОХИМИЯ МЕМБРАННОЙ ФОРМЫ АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Зимин Ю.В., Соловьева А.Г.

*ФГБУ «ННИИТО» Минздравсоцразвития России,
Нижний Новгород, e-mail: info@nniito.sci-nnov.ru*

Исследовались активность и кинетические характеристики альдегиддегидрогеназы во фракциях эритроцитов крови человека. Выявлена топохимия надмолекулярных форм фермента. Показано, что наибольшая активность альдегиддегидрогеназы преобладает в «тенях» эритроцитов, которые представляют мембрану данных клеток. Установлено, что сродство к субстратам реакции и коэффициент каталитической эффективности мембраносвязанной альдегиддегидрогеназы выше, чем у фермента в матриксе и гемолизате эритроцитов. Результаты солюбилизации показали, что мембранная форма альдегиддегидрогеназы неоднородна и представлена лабильно- и прочносвязанной формами. По мере удаления части фермента с мембраны эритроцитов сродство альдегиддегидрогеназы к субстратам реакции в «тенях» эритроцитов возрастает. Полученные данные играют определяющее значение для регуляции данного фермента биотрансформации в клетке.

Ключевые слова: эритроцит, мембрана, альдегиддегидрогеназа, топохимия

THE TOPOCHEMISTRY OF MEMBRANA FORM OF ALDEHYDE DEHYDROGENASE OF ERYTHROCYTES OF HUMAN BLOOD

Zimin Y.V., Soloveva A.G.

*Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics,
Nizhny Novgorod, e-mail: info@nniito.sci-nnov.ru*

Activity and kinetic characteristics of aldehyde dehydrogenase in fractions of erythrocytes of human blood were analyzed. Topochemistry of supramolecular forms of the enzyme has been discovered. Conducted investigation showed that most activity of aldehyde dehydrogenase prevails in the «shadows» of erythrocytes, which are membrane cell data. An affinity for substrates of reaction and catalytic efficacy of membrane aldehyde dehydrogenase higher than enzyme in matrix and gemolizate of erythrocytes has been established. Results of solubilization showed that membrane form of aldehyde dehydrogenase is heterogeneous and represented active and connected forms. Removal of part of the enzyme from erythrocyte membrane, affinity of the aldehyde dehydrogenase for substrates of reaction in the «shadows» of erythrocytes grows. Received data play essential significance for the regulation of this enzyme of biotransformation in the cell.

Keywords: erythrocyte, membrane, aldehyde dehydrogenase, topochemistry

Хорошо известно, что практически все ферменты, в частности внутриклеточные, никогда не функционируют в условиях, отвечающих классической кинетике Михаэлиса-Ментен, так как они находятся в сложной гетерогенной системе клетки. Сегодня доказано, что ферменты большинства метаболических путей связаны с теми или иными мембранными структурами клетки. При этом ферменты, действующие в гетерогенном окружении, приобретают новые свойства, которые отсутствуют у тех же ферментов, когда они находятся в разбавленном растворе [4].

Одной из наиболее изученных клеточных моделей, в состав которой входят различные мультиэнзимные комплексы, является эритроцит. Данная клетка чрезвычайно интересна тем, что в ее ферментативном ансамбле присутствуют ферменты биотрансформации ксенобиотиков. Одним из таковых является альдегиддегидрогеназа (КФ 1.2.1.3., АлДГ). Особенности регуляции АлДГ эритроцита до сих пор в научной литературе представлены крайне фрагментарно, особенно это касается различных

молекулярных форм фермента [5, 6, 7, 8]. Остается невыясненной физиологическая роль взаимодействия АлДГ с мембраной эритроцитов.

Целью данной работы явилось выявление топохимии надмолекулярных форм альдегиддегидрогеназы эритроцитов крови человека.

Материал и методы исследования

Кровь для исследования брали у практически здоровых людей из локтевой вены с 4%-м раствором цитрата натрия (соотношение 9:1) с соблюдением всех необходимых правил в условиях медицинского стационара. Эритроциты осаждали (800g; 10 мин), промывали 5-кратным объемом 0,15M NaCl с 10mM трис-HCl (pH 7,4), гемолизировали, через 30 мин центрифугировали (16000g; 10 мин) [3]. Активность АлДГ определяли в «тенях» эритроцитов и супернатанте [2]. Солюбилизацию эритроцитарной АлДГ проводили путем однократного суспендирования «теней» эритроцитов в 0,15 M и 0,3 M растворах KCl. Определяли следующие кинетические характеристики альдегиддегидрогеназы: K_p , V_{max} , V_{max}/K_t (K_d) [1], где K_t – время достижения V_{max} ферментативной реакции (мин); V_{max} – максимальная скорость накопления продукта реакции при полном расходе субстрата (мкмоль/мин); V_{max}/K_t (K_d) – коэффициент

каталитической эффективности ферментативной реакции (мкмоль/мин²) [1]. Статистический анализ результатов исследований выполнен с использованием программы Statistica 6.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что активность фермента в «тенях» эритроцитов, которые представляют мембрану данных клеток, составила 51,3% от общей активности АлДГ в гемолизате клеток, а в матриксе эритроцитов – 45,2% (табл. 1).

Таблица 1

Распределение активности альдегиддегидрогеназы во фракциях эритроцитов крови человека (нмольНАДН/мин×мг белка)

Фракции эритроцита	Активность фермента
Гемолизат эритроцитов	195,93 ± 4,26
Матрикс эритроцитов	88,48 ± 2,64 <i>p</i> = 0,002
«Тени» эритроцитов	100,45 ± 1,54 <i>p</i> = 0,003

Учитывая, что активность альдегиддегидрогеназы во фракции «теней» эритроцитов выше, чем в матриксе, можно полагать,

что АлДГ – преимущественно мембранно-связанный фермент. Поэтому дальнейшие эксперименты с мембранной формой альдегиддегидрогеназы были посвящены определению прочности связи фермента с мембраной эритроцита.

Однократное воздействие на фрагменты мембран эритроцитов 0,15М раствором КСl приводит к статистически значимому снижению активности альдегиддегидрогеназы в «тенях» данных клеток на 39,5%, а также увеличению активности фермента на 53,3% в супернатанте, полученном после центрифугирования (табл. 2).

Однократная солюбилизация мембраносвязанной альдегиддегидрогеназы эритроцитов 0,3М раствором КСl вызывает статистически значимое увеличение активности АлДГ в супернатанте на 65,5% и уменьшение в «тенях» эритроцитов на 49,1% (см. табл. 2).

Полученные результаты исследования позволяют предположить, что альдегиддегидрогеназа находится в эритроцитах, как минимум в трех основных надмолекулярных формах (матриксная форма, лабильно связанная с мембраной форма АлДГ и прочносвязанная с мембраной эритроцитов форма фермента).

В табл. 3 представлена кинетическая характеристика альдегиддегидрогеназы различных фракций эритроцита.

Таблица 2

Активность альдегиддегидрогеназы после солюбилизации с мембраны эритроцитов под влиянием 0,15М и 0,3М КСl (нмольНАДН/мин·мг белка)

Условия эксперимента	Супернатант	«Тени» эритроцитов
До солюбилизации	-	100,45 ± 1,54
После солюбилизации 0,15М раствором КСl	189,53 ± 7,84 <i>p</i> = 0,009	60,73 ± 2,58 <i>p</i> = 0,019
После солюбилизации 0,3М раствором КСl	256,23 ± 6,91 <i>p</i> = 0,004	51,09 ± 1,77 <i>p</i> = 0,012

Таблица 3

Кинетическая характеристика альдегиддегидрогеназы различных фракций эритроцитов крови человека (*K_p*, *V_{max}*, *K_a*)

Фракции эритроцита	<i>K_t</i>	<i>V_{max}</i>	<i>K_a</i>
Гемолизат эритроцитов	1,20 ± 0,17	0,38 ± 0,06	0,32 ± 0,02
«Тени» эритроцитов	0,54 ± 0,08 <i>p</i> = 0,031	0,85 ± 0,08 <i>p</i> = 0,016	1,57 ± 0,06 <i>p</i> = 0,007
Матрикс эритроцитов	0,87 ± 0,04 <i>p</i> = 0,043	0,48 ± 0,02	0,55 ± 0,03 <i>p</i> = 0,038

Видно, что сродство к субстратам реакции (*K_p*) и коэффициент каталитической эффективности (*K_a*) мембраносвязанной АлДГ («тени» эритроцитов) выше, чем у альдегиддегидрогеназы в матриксе и гемолизате эритроцитов.

Использование КСl для солюбилизации АлДГ с мембраны эритроцитов позволи-

ло выявить определенную закономерность в изменении кинетической характеристики данного фермента. В частности, по мере удаления части АлДГ с мембраны эритроцитов, сродство фермента к субстратам реакции возрастает (табл. 4). При этом в супернатанте значение *K_p*, наоборот, возрастает.

Предполагается, что мембранная форма АлДГ неоднородна и представлена, как минимум, двумя формами фермента: ла-

бильно- и прочносвязанной, на что указывают данные по солюбилизации KCl (0,15M и 0,3M) (см. табл. 4).

Таблица 4

Кинетические характеристики альдегиддегидрогеназы после солюбилизации с мембраны эритроцитов под влиянием 0,15M и 0,3M KCl (K_t , V_{max} , K_a)

Фракции эритроцита		K_t	V_{max}	K_a
«Тени» эритроцитов	До солюбилизации	0,54 ± 0,08	0,85 ± 0,08	1,57 ± 0,06
	0,15M KCl	0,43 ± 0,05	0,94 ± 0,07	2,19 ± 0,08 $p = 0,021$
	0,3M KCl	0,36 ± 0,04	1,15 ± 0,09 $p = 0,016$	3,20 ± 0,07 $p = 0,007$
Супернатант	0,15M KCl	0,65 ± 0,04	0,66 ± 0,06	1,02 ± 0,05
	0,3M KCl	0,72 ± 0,05	0,64 ± 0,05	0,89 ± 0,04

Таким образом, можно полагать, что альдегиддегидрогеназа, вернее, ее различные надмолекулярные формы, имеют определенную топохимическую организацию в эритроцитах крови человека, что играет определяющее значение для регуляции данного фермента биотрансформации в клетке.

Список литературы

1. Зимин Ю. В. Системный кинетический анализ мультисубстратных комплексов клетки // Рук. деп. в ВИНТИ. – 1993. – № 1541, В93. – 6 с.
2. Кершенгольц Б.М., Ильина Л.П. Биологические аспекты алкогольных патологий и наркоманий. – Якутск: Изд-во ЯГУ, 1998. – 150 с.
3. Макаренко Е.В. АТФазная активность эритроцитов при хронических заболеваниях печени и желудка // Лабораторное дело. – 1987. – №2. – С. 14–17.
4. Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. – М.: Мир, 1986. – 374 с.
5. Comparative proteomics of erythrocyte aging in vivo and in vitro / G.J. Bosman, E. Lasonder, Y.A. Groenen-Dupp, F.L. Willekens, J.M. Werre, V.M. Novotná // J. Proteomics. – 2010. – Vol. 73, № 3. – P. 396–402.
6. Erythrocyte aldehyde dehydrogenase activity: lack of association with alcohol use and dependence or alcohol reactions in Australian twins / N.K. Hansell, D. Pang, A.C. Heath, N.G. Martin, J.B. Whitfield // Alcohol Alcohol. – 2005. – Vol. 40, № 5. – P. 343–348.
7. Henehan G.T., Tipton K.F. Steady-state kinetic analysis of aldehyde dehydrogenase from human erythrocytes // Biochem J. – 1992. – Vol. 1, № 287. – P. 145–150.
8. Biological markers of alcoholism with respect to genotypes of low-Km aldehyde dehydrogenase (ALDH2) in

Japanese subjects / F. Nomura, S. Itoga, M. Tamura, S. Harada, Y. Iizuka, T. Nakai // Alcohol Clin Exp Res. – 2000. – Vol. 24, №4. – P. 303–333.

References

1. Zimin Yu.V. VINITI, № 1541, Vol. 93, 6p.
2. Kershengolts B.M., Ilina L.P. Biologicheskie aspekty alkoholnykh patologiy i narkomaniy [Biological aspects of alcohol pathologies and narcomanias]. Yakutsk: Yakutskiy Gos. Univ., 1998, 150 p.
3. Makarenko E.V. Laboratornoe delo, 1987, no. 2, pp. 14–17.
4. Fridrikh P. Fermenty: chetvertichnaya struktura i nadmolekulyarnye komplekсы [Enzymes: quaternary structure and supramolecular complexes]. Moscow: Peace, 1986, 374 p.
5. Bosman G.J., Lasonder E., Groenen-Dupp Y.A., Willekens F.L., Werre J.M., Novotná V.M. J. Proteomics, 2010, Vol. 73, no. 3, P. 396–402.
6. Hansell N.K., Pang D., Heath A.C., Martin N.G., Whitfield J.B. Alcohol Alcohol., 2005, Vol. 40, no. 5, P. 343–348.
7. Henehan G.T., Tipton K.F. Biochem J., 1992, Vol. 1, no. 287, pp. 145–150.
8. Nomura F., Itoga S., Tamura M., Harada S., Iizuka Y., Nakai T. Alcohol Clin Exp Res., 2000, Vol. 24, no.4, pp. 303–333.

Рецензенты:

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;

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

Работа поступила в редакцию 09.04.2012