УДК 533.92:537.525

ОРГАНОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

Соловьева А.Г.

ФГБУ «Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии», Нижний Новгород, e-mail: sannag5@mail.ru

Изучены каталитические и кинетические свойства алкогольдегидрогеназы (АДГ) в печени, почках, сердце и легких при экспериментальной термической травме. Исследования проведены на белых крысах линии Wistar. Животным под эфирным наркозом наносили ожог кипятком. В гомогенатах органов на 3, 7, 10 сутки после травмы определяли активность АДГ с использованием в качестве субстрата этилового спирта (прямая реакция) и ацетальдегида (обратная реакция), рассчитывали кинетические характеристики фермента. Полученные результаты свидетельствуют о перераспределении общей активности АДГ в прямой реакции при термической травме. Удельная активность АДГ в обратной реакции, также как и общая, статистически значимо уменьшается во всех органах на 3, 7, 10 сутки после ожога, при этом в печени и легких показано меньшее падение удельной активности фермента, по сравнению с почками и сердцем. Установлено, что статистически значимое изменение удельной активности АДГ в прямой реакции после травмы происходит лишь в печени и почках.

Ключевые слова: алкогольдегидрогеназа, каталитические и кинетические свойства, ожог, органоспецифичность.

ORGAN-SPECIFIC REGULATORY PROPERTIES OF ALCOHOL DEHYDROGENASE IN EXPERIMENTAL THERMAL LNJURY

Soloveva A.G.

Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Nizhny Novgorod, e-mail: sannag5@mail.ru

The catalytic and kinetic properties of alcohol dehydrogenase (ADH) were investigated in the liver, kidneys, heart and lungs with experimental thermal injury. The study was conducted on white rats Wistar. Animals under ether anaesthesia inflicted burns boiling water. ADH activity was determined using as a substrate ethyl alcohol (direct reaction) and acetaldehyde (reverse reaction) in organ homogenates on the 3rd, 7th and 10th day after the injury. Kinetic characteristics of the enzyme were expected. The obtained results indicate the redistribution of general activity of ADH in direct reaction when thermal injury. Specific and general ADH activity in the reverse reaction statistically significant decreases in all organs to 3, 7, 10 days after the burn, while in the liver and lungs was shown lesser incidence of specific activity of the enzyme, compared with the kidneys and heart. It was found that a statistically significant variation in the specific activity of ADH in direct reaction after the burn occurs only in the liver and kidneys.

Keywords: alcohol dehydrogenase, catalytic and kinetic properties, burn, organ-specificity.

Введение

Развивающаяся вследствие термических поражений ожоговая болезнь всегда сопровождается интоксикацией, обусловленной многочисленными неспецифическими токсическими метаболитами [2, 7]. Важнейшим защитным гомеостатическим барьером организма служит система биотрансформации, которая обеспечивает гидрофилизацию ксенобиотиков и эндотоксинов и осуществляется ферментами микросомального и немикросомального окисления. Немикросомальные энзимы – это алкогольдегидрогеназа (АДГ) и альдегиддегидрогеназа.

Главной функцией АДГ является поддержание равновесия во взаимопревращениях эндогенных альдегидов и спиртов. Одним из основных субстратов АДГ служит постоянно образующийся в организме из многочисленных предшественников ацетальдегид [1, 3, 4], который, повреждая ряд энзимов, надмолекулярных образований мембран, индуцирует разнообразные патологические процессы, в том числе модификацию аминогрупп белков с образованием ацетальдегидных аддуктов. АДГ участвует в метаболизме ретиноидов, оксижирных кислот, катаболизме нейромедиаторов, превращениях стероидных гормонов, процессах синтеза холестерина и желчных кислот, детоксикации продуктов перекисного окисления липидов [1]. Постоянно растет число ксенобиотиков, в обезвреживании которых АДГ принадлежит важная роль. При этом в определенных процессах АДГ, напротив, продуцирует повреждающие соединения. Таким образом, исследование регуляторных свойств АДГ в норме и при термической травме является актуальным.

Цель работы – изучение каталитических и кинетических свойств алкогольдегидрогеназы в различных органах крыс при экспериментальном ожоге.

Материалы и методы исследования

Исследования были проведены на белых крысах линии Wistar обоего пола массой 180-250 г. Животных разделили на две группы: интактная (контрольная, n=8) и опытная (n=10). Под эфирным наркозом крысам опытной группы наносили ожог кипятком на тщательно освобожденных от шерсти 20%-ах поверхности спины (экспозиция – 3 с), забивали путем декапитации на 3-и, 7-е и 10-е сутки после травмы. Исследования проводили в гомогенатах органов (печень, почки, сердце и легкие) [8]. Активность АДГ определяли с использованием в качестве субстрата этилового спирта (прямая реакция, АДГпр) и ацетальдегида (обратная реакция, АДГобр) по методу W. M. Keung et al. (1989) [9]. Концентрацию белка вычисляли по методу Лоури в модификации. Рассчитывали кинетические характеристики АДГ: Kt – время достижения ½Vmax ферментативной реакции (мин), где Vmax – максимальная скорость накопления продукта реакции (мкмоль/мин); K_a (Vmax/Kt) – коэффициент каталитической эффективности (мкмоль/мин^2) [5]. Результаты исследований обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента с помощью программы BIOSTAT.

Результаты и их обсуждение

Полученные результаты показали, что распределение общей активности АДГ в обратной реакции у интактных крыс и у опытных животных на 3-и и 7-е сутки уменьшается в ряду: печень → легкие → почки → сердце (рис. 1), что подтверждает литературные данные [10].

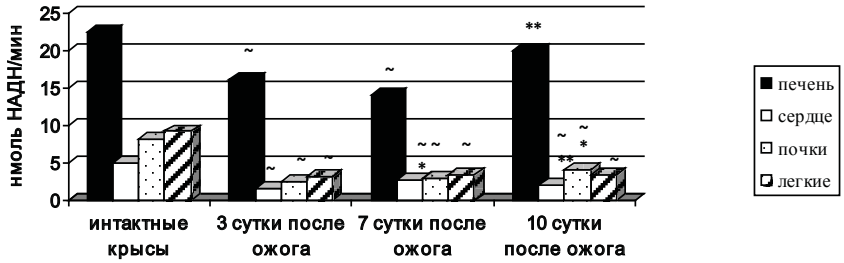

Рис. 1. Общая активность алкогольдегидрогеназы в обратной реакции в норме и при ожоге
~ – статистически значимо по сравнению с интактными крысами (p≤0,05);
** – статистически значимо по сравнению с 3-ми сутками (p≤0,05);*
*** – статистически значимо по сравнению с 7-ми сутками (p≤0,05).*

На 10-е сутки после ожога наблюдается перераспределение общей активности АДГобр (в порядке уменьшения): печень → почки → легкие → сердце. Преобладание АДГобр в почках по сравнению с легкими при термической травме, вероятно, обусловлено более выраженным падением удельной активности АДГобр в легких на 10-е сутки после поражения (табл. 1). Удельная активность, также как и общая, АДГобр статистически значимо уменьшается во всех органах и на всех исследуемых сутках после ожога по сравнению с интактными животными. В печени удельная активность снижается на 16,6% на 3-и сутки, 38,3% на 7-е и на 20,2% на 10-е сутки после травмы (табл. 1).

Таблица 1

Удельная активность АДГ (нмоль НАДН/мин×мг белка) в норме и при ожоге

Орган	Активность	Интактные крысы	Крысы с ожогом		
			3 сутки	7 сутки	10 сутки
Печень	АДГпр	47,39±2,55	34,72±1,02#	17,05±1,19 #/*	25,82±1,55 #/*/**
	АДГобр	107,90±3,03	89,95±5,49#	66,63±4,53#/*	86,12±3,24#/**
Сердце	АДГпр	17,40±1,95	11,49±2,80	8,52±0,32#	18,46±0,43 */**
	АДГобр	65,86±2,18	15,46±1,41#	25,48±2,72#/*	17,53±1,28#/**
Почки	АДГпр	15,25±1,04	32,61±2,85#	29,29±1,27#	49,48±1,14 #/*/**
	АДГобр	48,68±2,99	12,91±1,71#	14,91±0,98#	33,36±1,14#/*/**
Легкие	АДГпр	84,13±3,87	96,38±12,15	64,90±3,82#/*	72,80±2,75#
	АДГобр	122,10±8,85	50,44±4,77#	67,40±1,62#	60,47±1,49 #/*/**

Примечания: # – статистически значимо по сравнению с интактными крысами (p≤0,05); * – статистически значимо по сравнению с 3-ми сутками (p≤0,05); ** – статистически значимо по сравнению с 7-ми сутками (p≤0,05).

Максимальное снижение активности в печени, обусловленное статистически значимым выраженным увеличением Kt в 1,9 раз, наблюдается на 7-е сутки после ожога, в отличие от других органов с наибольшим падением активности фермента на 3-и сутки, свидетельствуя о том, что печень позднее реагирует на эндогенную интоксикацию. На 3-и и 10-е сутки после ожога Kt возрастает в 1,2 и 1,5 раза соответственно (табл. 2). В легких удельная активность АДГобр снижается на 58,7% на 3-и сутки, 44,8% на 7-е сутки и 50,5% на 10-е сутки после травмы. Из данных табл. 2 видно, что Kt для АДГобр в легких увеличивается в 3,7 раза на 3-и сутки и в 2,8 раз на 7-е и 10-е сутки. В сердце удельная активность АДГобр уменьшается в наибольшей степени (на 76,5%) на 3-и сутки, на 61,3% на 7-е сутки и на 73,4% на 10-е сутки после термической травмы. При этом Kt для АДГобр статистически значимо увеличивается на 3-и сутки в 1,3 раза и в 1,4 раза на 10-е сутки, что свидетельствует о снижении сродства фермента к субстрату. $К_а$ уменьшается в 3,9 раз на 3-и сутки и в 3,4 раза на 7-е и 10-е сутки после ожога (табл. 2).

Таблица 2

Кинетические характеристики АДГ у интактных крыс и крыс с ожогом

Показатель			Интактные крысы	Крысы с ожогом		
				3 сутки	7 сутки	10 сутки
Kt, мин	печень	АДГпр	1,45±0,12	1,77±0,08#	2,70±0,05#/*	2,17±0,11#/*/**
		АДГобр	2,76±0,06	7,45±0,33#	15,45±2,15#/*	9,44±1,05#/*/**
	сердце	АДГпр	3,25±0,18	3,40±0,05	4,71±0,82#/*	3,35±0,37
		АДГобр	0,96±0,04	1,27±0,07#	1,03±0,05*	1,30±0,07#/**
	почки	АДГпр	2,03±0,05	0,85±0,06#	1,23±0,09#/*	0,75±0,04#/**
		АДГобр	1,06±0,03	2,00±0,05#	1,51±0,13#/*	1,25±0,03#/*/**
	легкие	АДГпр	1,37±0,18	1,60±0,05	2,00±0,09#/*	2,00±0,02#/*
		АДГобр	0,61±0,04	2,25±0,12#	1,70±0,02#/*	1,70±0,05#/*
Ka, мкмоль/мин2	печень	АДГпр	0,97±0,04	0,24±0,01#	0,24±0,02#	0,80±0,08*
		АДГобр	1,21±0,08	0,87±0,01#	1,23±0,12*	0,82±0,05#/**
	сердце	АДГпр	0,34±0,02	0,28±0,01#	0,45±0,04#/*	0,39±0,04*
		АДГобр	0,82±0,06	0,21±0,02#	0,24±0,02#	0,24±0,03#
	почки	АДГпр	0,56±0,03	0,25±0,00#	0,31±0,03#	0,54±0,02*/**
		АДГобр	0,37±0,01	0,10±0,00#	0,67±0,02#/*	0,18±0,02#/*/**
	легкие	АДГпр	0,15±0,00	0,09±0,01#	0,06±0,00#/*	0,04±0,00#/*/**
		АДГобр	0,33±0,01	0,26±0,03	0,04±0,00 #/*	0,14±0,01 #/*/**

Примечания: # – статистически значимо по сравнению с интактными крысами ($p \leq 0,05$); * – статистически значимо по сравнению с 3-ми сутками ($p \leq 0,05$); ** – статистически значимо по сравнению с 7-ми сутками ($p \leq 0,05$).

Согласно литературным данным, с одной стороны, главной причиной патологических изменений миокарда является ожоговая интоксикация [7]. С другой стороны, поражения миокарда при термической травме лишены специфичности. Поводом для их появления является несоответствие между количеством притекающей к сердцу крови и функциональной потребностью в ней, что постоянно создается при ожоге, сопровождающемся рефлекторными нарушениями регуляции кровообращения.

В почках также происходит падение активности АДГобр (на 73,5% на 3-и сутки, на 69,4% на 7-е сутки, на 31,5% на 10-е сутки), которое сопровождается уменьшением сродства АДГ к субстрату и статистически значимым увеличением Kt в 1,9 раз на 3-и сутки, 1,4 раза на 7-е и в 1,2 раза на 10-е сутки после термической травмы. Ka снижается в 3,7 раза на 3-и, в 2,0 раза на 10-е сутки (табл. 2). В.А. Корячкин и др. (2002) высказали предположение, что нарушение функции почек при ожогах может иметь своей причиной воздействие токсических продуктов на их паренхиму и уменьшение притока крови к органу [6].

Полученные результаты говорят о пропорциональном изменении Kt и активности

АДГобр во всех исследуемых органах – чем больше увеличивается время достижения ½ Vmax, тем интенсивнее снижается активность фермента. Уменьшение активности АДГобр, вероятно, связано с изменением физиологических особенностей организма после ожога, развитием полиорганной недостаточности, которая, по мнению М.Я. Малаховой, сопровождает ожоговую травму и, возможно, именно обратная реакция алкогольдегидрогеназы наиболее чувствительна к недостаточности кровоснабжения и гипоксии в органах, а также к эндогенной интоксикации организма [7]. Понижение активности АДГобр при термической травме приводит к накоплению во всех исследуемых органах высокотоксичных альдегидов, ацеталей и кетонов. Особенно это характерно для почек, в которых при ожоге при снижении активности АДГобр статистически значимо возрастает активность АДГпр.

Распределение общей активности АДГ в прямой реакции у крыс контрольной группы соответствует литературным данным [10] и уменьшается в ряду: печень → легкие → почки → сердце (рис. 2). У животных с ожогом на 3-и и 7-е сутки после термической травмы наибольшая активность АДГпр регистрируется в легких, затем в почках, в печени и наименьшая в сердце. Преобладание активности фермента в легких по сравнению с другими органами сопровождается более высокими абсолютными значениями удельной активности в легких (табл. 1). На 10-е сутки после ожога активность АДГпр уменьшается в ряду: почки → печень→легкие → сердце. Данное распределение обусловлено нарушением функциональной активности почек из-за избыточного поступления в них токсических веществ и ростом каталитической активности АДГпр.

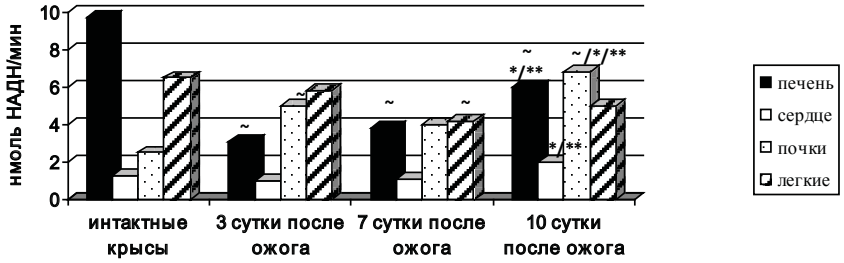

Рис. 2. Общая активность алкогольдегидрогеназы в прямой реакции в норме и при ожоге
~ – статистически значимо по сравнению с интактными крысами (p≤0,05);
** – статистически значимо по сравнению с 3-ми сутками (p≤0,05);*
*** – статистически значимо по сравнению с 7-ми сутками (p≤0,05).*

В печени крыс удельная активность АДГпр уменьшается на 26,7% на 3-и сутки, 64,0% на 7-е сутки и на 45,5% на 10-е сутки после ожога по сравнению с контрольной группой крыс, приводя к снижению детоксикационной функции данного органа. Снижение активности АДГ в печени обожженных крыс, вероятно, связано с трансформацией клеточных ультраструктур (митохондрий, рибосом, лизосом). Повреждение митохондрий клеток печени, разобщение в них фосфорилирования и дыхания, возникающие вследствие нарушений кровообращения при ожоге, а также действия токсических веществ, являются причиной изменения активности большинства ферментов данного органа [2, 7].

Кроме структурных и функциональных трансформаций в органах при ожоге, нарушение активности АДГпр происходит и за счет статистически значимых изменений кинетических параметров фермента. В печени выявлено уменьшение сродства АДГпр к субстрату (Kt увеличивается в 1,9 раз на 7-е сутки, в 1,5 раза на 10-е сутки), снижение K_a в 4,0 раза на 3-и и 7-е сутки после поражения. Повышение удельной активности АДГпр в почках (в 2,0 раза на 3-и сутки, в 1,9 и 3,2 раза на 7-е и 10-е сутки) обусловлено снижением Kt в 2,4 раза на 3-и сутки, 1,7 раз на 7-е, в 2,7 раз на 10-е сутки после термической травмы. В сердце удельная активность АДГпр снижается на 51,1% на 7-е сутки, при этом увеличивается Kt в 1,5 раза (табл. 1, 2). В легких активность АДГпр статистически значимо уменьшается на 22,9% на 7-е сутки, на 13,5% на 10-е сутки после ожога по сравнению с интактными животными на фоне роста Kt в 1,5 раза и уменьшения Ka в 2,5 и 3,75 раза на 7-е и 10-е сутки (табл. 2).

Вычисленное соотношение удельных активностей АДГпр/АДГобр у интактных крыс составило: в печени – 0,44, в сердце – 0,26, в почках – 0,31, в легких – 0,70. Полученное значение меньше единицы говорит о преобладании обратной реакции. При термической травме в печени отмечено снижение соотношения на всех исследуемых сутках после ожога, что свидетельствует о накоплении этанола. В сердце, почках и легких на 3-и, 7-е и 10-е сутки после поражения данное соотношение выше показателя интактных крыс, что приводит к повышению высокотоксичных альдегидов.

Таким образом, в печени и легких регистрируется меньшее падение активности АДГобр (< 60 %) на всех сутках после ожога, по сравнению с уменьшением активности в почках (> 60 %, кроме 10-х суток) и сердце (> 60 %). Показано, что статистически значимое изменение удельной активности АДГпр после термической травмы происходит лишь в органах, принимающих наибольшее участие в нейтрализации токсинов – в печени и почках.

Список литературы

1. Ашмарин И.П. Алкогольдегидрогеназа млекопитающих – объект молекулярной медицины // Успехи биологической химии. – 2003. – Т. 43. – С.3-18.

2. Бардахчьян Э.А., Харланова Н.Г. Структурно-функциональные изменения печени и мозга при эндотоксиновом шоке (ультраструктурное исследование) // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1997. – №1. – С.17-21.

3. Бардина Л.Р., Сатановская В.И., Пронько П.С., Кузьмич А.Б. Активность ферментов метаболизма этанола и ацетальдегида у крыс с различной изначальной чувствительностью к алкоголю // Украинский биохимический журнал. – 1997. – Т.69, №1. – С.94-98.

4. Давыдов В.В., Швец В.Н. Стимуляция катаболизма эндогенных альдегидов – новое направление в повышении устойчивости организма к стрессу // Украинский биохимический журнал. – 2010. – Т.82, №4 (приложение 2). – С.72.

5. Зимин Ю.В., Соловьева А.Г., Уланова А.А. Оценка кинетических параметров ферментов в гетерогенной надмолекулярной системе // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 2-1. – С. 68-71.

6. Корячкин В.А., Страшнов В.И., Чуфаров В.Н. Интенсивная терапия угрожающих состояний. – СПб.: Санкт-Петербург. мед. изд-во, 2002. – 288 с.

7. Малахова М.Я. Эндогенная интоксикация как отражение компенсаторной перестройки обменных процессов в организме // Эфферентная терапия. – 2000. – Т. 6, № 4. – С. 3–14.

8. Финдлей Дж., Эванз У. Биологические мембраны. Методы / пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – 424с.

9. Keung W.M., Ho Y.W., Fong W.P. Isolation and characterization of shrew liver alcohol dehydrogenase // Comp. Biochem. and Physiol. B. – 1989. – Vol. 93, № 1. – P. 169-173.

10. Riveros-Rosas H., Julian-Sanches A., Pina E. Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals // Archives of medical research. – 1997. – Vol. 28, № 4. – P. 453 – 471.