

УДК 577.15:615.5

ИНТЕНСИВНОСТЬ ПЕРЕАМИНИРОВАНИЯ С АСПАРТАТА НА α -КЕТОГЛУТАРАТ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ВЛИЯНИИ 2-МЕТИЛ-4-ХЛОРФЕНОКСИ- γ -МАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ

В. Н. Никандров

Белорусский научно-исследовательский ветеринарный институт, Минск,
п/о Кунцевщина

(Поступила в редакцию 8.VI 1973 г.)

Введение белым крысам 1570 мг/кг 2-метил-4-хлорфенокси- γ -масляной кислоты сопровождается торможением активности связанной формы аспаратаминотрансферазы (L-аспартат-2-оксоглутаратаминотрансферазы, КФ 2.6.1.1, АСТ) в печени и скелетных мышцах. Общая активность фермента в скелетных мышцах возрастает во все интервалы времени за счет активации свободной формы АСТ.

785 мг/кг препарата интенсифицируют трансаминирование в головном мозгу и мышцах в первые часы после затравок, но угнетают его к шестому часу вследствие подавления активности связанной формы АСТ, а в мышцах — и свободной формы.

В печени обнаружено лишь перераспределение отдельных форм фермента.

В современном растениеводстве широко применяются гербициды — производные ароматических оксикислот, к числу которых относится 2-метил-4-хлорфенокси- γ -масляная кислота. Непрерывное увеличение производства этого ценного гербицида и широкое его применение могут обусловить отравление им человека и животных.

Показано [1—4], что 2-метил-4-хлорфенокси- γ -масляная кислота вызывает нарушение энергетического обмена в клетках и изменения гормонального баланса в организме животных. Для этого соединения более характерен разобщающий эффект относительно окислительного фосфорилирования при умеренном торможении дыхания. Однако особенности действия этого гербицида на основные энергообразующие системы изучен весьма недостаточно.

В связи с этим и в целях возможного изыскания эффективных средств терапии отравлений задачей нашего исследования явилось изучение влияния 2-метил-4-хлорфенокси- γ -масляной кислоты в относительно небольших дозах на общую активность АСТ, а также на активность ее свободной и связанной форм — фермента, регулирующего поступление ряда промежуточных продуктов в цикл трикарбоновых кислот и обмен глутамата — одного из основных энергосубстратов мозга.

Методика

На 64 гетерозиготных половозрелых белых крысах линии Вистар изучали влияние однократных затравок 2-метил-4-хлорфенокси- γ -масляной кислотой в дозах 1570 и 785 мг/кг. Выбор указанных доз обусловлен тем, что 1570 мг/кг для изучаемого препарата составляет по токсичности ЛД₁₆, являющуюся дозой, уже вызывающей изменения в обмене веществ при однократном введении препарата, но практически не приводящей к гибели животных [5]; 785 мг/кг составляет 1/2 ЛД₁₆.

В опытах первой и второй серий использовали по четыре группы животных (три опытные и контрольная) из расчета восемь крыс в группе. Животным опытных групп препарат вводили однократно в желудок в виде 40%-ного раствора, а крысам контрольной группы — дистиллированную воду в соответствующем количестве. Через 1 (первая опытная), 3 (вторая опытная) и 6 ч (третья опытная группа) после затравок крыс декапитировали.

Выбор органов для исследования обусловлен барьерной функцией печени, различием действия на мышечную ткань изучаемого соединения и других препаратов этой группы, а также важностью процессов трансаминирования для обмена в головном мозгу, координирующего функции отдельных органов и систем и обеспечивающего их коммуникацию.

Извлекали головной мозг, печень, икроножные мышцы, отмывали их в охлажденном до 0—4° С 0,25 М растворе сахарозы и гомогенизировали в 9-кратном объеме этого раствора. Скелетные мышцы предварительно измельчали в мясорубке Латапи, гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера со стеклянным пестиком. Гомогенаты делили на две части, к одной добавляли коммерческий препарат тритона X-100 в конечной концентрации 1%, а ко второй — раствор сахарозы в соответствующем количестве. Затем гомогенаты разводили 0,25 М раствором сахарозы в соотношении 1 : 40 и по 0,2 мл гомогенатов использовали для определения активности АСТ [6, 7] при температуре 30° С. Активность выражали в микромолях пирувата в пересчете на 1 г ткани. Для расчета удельной активности, которую выражали в микромолях пирувата за 1 мин в пересчете на 1 мг белка, в гомогенатах определяли содержание белков [8]. Результаты обработаны статистически методами оценки пределов варьирования и однофакторного дисперсионного анализа [9].

Результаты и обсуждение

При введении 1570 мг/кг препарата наблюдается некоторая тенденция к повышению общей активности АСТ в головном мозгу в течение первых 3 ч (табл. 1) в основном за счет такой же направленности сдвигов активности свободной формы фермента, через 6 ч общая активность снижается. Активность связанной формы АСТ угнетается, начиная с третьего часа.

В печени вследствие повышения активности свободной формы АСТ интенсивность ферментативного трансаминирования также проявляет известную тенденцию к увеличению. Через 3 ч после затравок этот эффект связан с повышением активности связанной формы, тогда как через 1 и 6 ч последняя подавляется. В соматических мышцах из-за активации свободной формы АСТ, проявившейся на протяжении 6 ч, увеличивается скорость трансаминирования с аспартата на α -кетоглутарат на фоне резкого (более чем в семь раз) угнетения активности связанной формы.

В меньшей дозе препарат в головном мозгу интенсифицирует трансаминирование в первый час вследствие аналогичной направленности сдвигов активности обеих форм фермента и угнетает общую активность через 6 ч в связи с уменьшением активности связанной формы АСТ (табл. 2). В печени общая активность изменяется мало, но начиная с третьего часа обнаруживается перераспределение между формами фермента: уменьшается активность связанной формы и повышается — свободной. Изменения в икроножной мышце характеризуются повышением общей активности АСТ через 3 ч и угнетением через 6 ч вследствие аналогичной направленности изменения активности свободной формы. Связанная форма АСТ угнетается начиная с третьего часа.

Изменения удельной активности мы не рассматривали, поскольку они были однотипны с изложенными.

Наблюдавшееся в некоторых случаях перераспределение между формами фермента обусловлено, видимо, изменениями физико-химических свойств мембран субцеллюлярных частиц, прежде всего митохондрий. Эти изменения могут предопределять либо солибилизацию только непрочно связанной АСТ, прикрепленной в дискретных субъединицах к наружной поверхности мембран, либо глубокие нарушения структуры пограничных мембран и выход фермента, интегрированного в них.

Подавление интенсивности трансаминирования в головном мозгу (обе дозы), печени и мышцах (785 мг/кг) приводит к ослабленному вовлечению α -кетоглутарата и аспартата в этот процесс. Последний момент можно интерпретировать следующим образом. В связи с известной [10] конкуренцией цитратного цикла и трансаминирования за некоторые субстраты подобный эффект может быть обусловлен компенсаторными сдвигами в обмене и усилением функции цитратного цикла (учитывая

Таблица 1

Влияние 2-метил-4-хлорфенокси-γ-масляной кислоты в дозе 1570 мг/кг на общую активность АСТ, а также активность свободной и связанной ее форм в организме белых крыс (в мкмольях пировата на 1 г ткани; $M \pm m$)

Время после затравок, ч	Головной мозг			Печень			Скелетные мышцы		
	Свободная форма	Общая активность	Связанная форма	Свободная форма	Общая активность	Связанная форма	Свободная форма	Общая активность	Связанная форма
Контроль	298±12	486±26	188±35	473±22	583±16	111±12	482±19	567±22	85±21
1	315±25	518±50	203±43	559±36	636±48	77±15	617±25	685±27	43±11
<i>p</i>	>0,5	>0,5	>0,5	<0,1	<0,5	<0,1	<0,001	<0,01	<0,1
3	369±61	538±51	128±25	486±42	654±49	169±22	567±40	646±40	76±15
<i>p</i>	<0,5	<0,5	<0,2	>0,5	<0,2	<0,05	<0,2	<0,2	>0,5
6	296±16	417±26	121±25	567±17	627±31	60±17	670±18	693±23	12±5
<i>p</i>	>0,5	<0,1	<0,2	<0,01	<0,5	<0,05	<0,001	<0,01	<0,01

Таблица 2

Активность АСТ в некоторых органах и тканях белых крыс при введении 2-метил-4-хлорфенокси-γ-масляной кислоты в дозе 785 мг/кг (в мкмольях пировата на 1 г ткани; $M \pm m$)

Время после затравок, ч	Головной мозг			Печень			Скелетные мышцы		
	Свободная форма	Общая активность	Связанная форма	Свободная форма	Общая активность	Связанная форма	Свободная форма	Общая активность	Связанная форма
Контроль	259±10	475±31	208±16	468±24	611±18	143±21	470±17	538±17	68±12
1	279±35	568±33	290±17	432±29	587±30	155±25	464±33	527±43	63±19
<i>p</i>	>0,5	<0,1	<0,01	<0,5	<0,5	>0,5	>0,5	>0,5	>0,5
3	212±17	459±31	197±33	570±15	662±24	92±15	657±38	690±33	33±8
<i>p</i>	<0,05	>0,5	>0,5	<0,01	<0,2	<0,1	<0,001	<0,01	<0,05
6	267±30	372±24	104±17	575±17	590±15	11±4	418±12	459±11	42±8
<i>p</i>	>0,5	<0,02	<0,001	<0,01	<0,5	<0,001	<0,05	<0,01	<0,1

сильное разобщающее действие яда на окислительное фосфорилирование [4]. С другой стороны, такое явление может быть обусловлено (особенно для мозга) опосредованным воздействием на АСТ сдвигов в самом цитратном цикле, а также изменением концентрации основных регулирующих факторов обмена глутамата: НАД⁺/НАДН (+Н⁺), оксалацетата и аммиака [10]. В такой ситуации вследствие возможного избытка восстановленных эквивалентов НАДН (+Н⁺) из-за угнетения дыхания [4] функции синтеза глутамата может с большей интенсивностью выполнять процесс восстановительного аминирования. Усиление процессов трансаминирования в изучаемых органах в ряде моментов характеризует противоположную описанной направленность изменений и обеспечивает интенсификацию образования оксалацетата, трансформирующегося в ходе глюконеогенеза, синтеза цитрата и т. д. Однако в случае исключения последних путей преобразования метаболита последующее повышение его концентрации приводит к подавлению активности АСТ и ряда реакций цикла Кребса. В печени изменения интенсивности трансаминирования могут быть связаны с функцией систем мочевинообразования или же отражаться на ней вследствие изменения количества поступающего аспартата. В заключение следует отметить, что более выраженные сдвиги в активности АСТ под влиянием препарата в меньшей дозе могут быть связаны с проявлением фазы метаболической адаптации к действию яда и компенсаторными сдвигами в обмене. При воздействии препарата в двойной дозе эта фаза протекает очень быстро либо вовсе выпадает вследствие токсического воздействия на лабильные метаболические структуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. Ю. Буслович, Автореф. дисс. «Токсикологическая и фармакологическая характеристика гербицидов — хлорпроизводных феноксиуксусной кислоты», Минск, 1964.
2. T. Vrody, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 80, 533, 1952.
3. С. Ю. Буслович, Ф. Д. Колдобская, С. В. Мараховская, «Вопросы эндокринологии», Минск, 1972, 36.
4. С. Ю. Буслович, Ф. Д. Колдобская, С. В. Мараховская, «Биохимия», Минск, 1973, 13.
5. Я. Э. Кенгсберг, Автореф. дисс. «Воспроизведение миотонического синдрома у теплокровных животных, вопросы патогенеза и терапии», Минск, 1968.
6. N. E. Topfazu, W. W. Umbreit, N. C. White, Arch. Biochem., 28, 6, 1950.
7. Т. С. Пасхина, Инструкция по определению глутамино-аспарагиновой и глутамино-аланиновой трансаминаз (аминотрансфераз) в сыворотке крови человека, М., 1970.
8. O. H. Lowry, C. N. Rosenbrough, A. L. Farr, Randall, J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
9. И. П. Ашмария, Н. Н. Васильев, В. А. Амбросов, Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов, Изд-во ЛГУ, Л., 1971.
10. Н. С. Нилова, Успехи совр. биол., 63, 73, 1967.

INTENSITY OF REAMINATION FROM ASPARTATE FOR α-KETOGLUTARATE IN RAT TISSUES AS AFFECTED BY 2-METHYL-4-CHLOROPHENOXY γ-BUTYRIC ACID

V. N. Nikandrova

Research Institute of Veterinary, Byelorussian SSR, Minsk

Summary

Administration of 2-methyl-4-chlorophenoxy-γ-butyric acid to albino rats in a dose of 1570 mg/kg avokes inhibition of the activity in the bound form of aspartate aminotransferase (AST) in the liver and skeletal muscles. The total activity of AST in the skeletal muscles increases within all the time intervals due to activation of the enzyme free form.

In a dose of 785 mg/kg the preparation intensifies transamination in the brain and muscles for the first hours after priming but inhibits it by the sixth hour because of inhibition in the activity of the AST bound form and in the muscles — the free form as well.

In the liver only redistribution among some forms of the enzyme is found.