

ДОКЛАДЫ

АКАДЕМИИ НАУК БССР

1976

ТОМ XX

№ 7



В. Н. НИКАНДРОВ

**ЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ
ПРИ МИОТОННИИ, ВЫЗВАННОЙ ДИХЛОРФЕНОКСИАЦЕТАТОМ***(Представлено академиком АН БССР Р. С. Чеботаревым)*

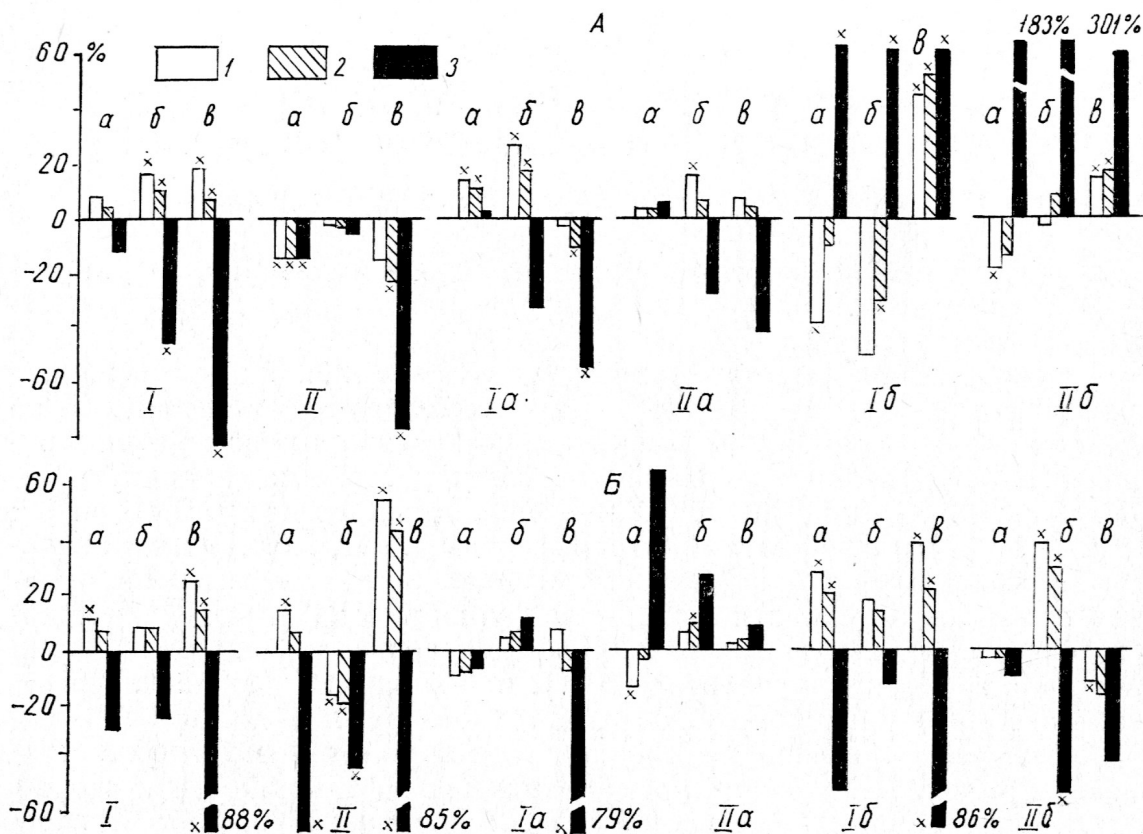
Большое значение в патогенезе миотонической реакции, вызванной дихлорфеноксиацетатом, придается нарушениям энергетических процессов мышечной ткани (1).

Изучено влияние миотонического яда — аммонийной соли 2,4-дихлорфеноксисуксусной кислоты (2,4-ДА) и гомолога этого соединения, не обладающего миотоническим эффектом, — 2-метил-4-хлорфенокси-γ-бутирата (2М-4ХБ) в одинаковых по токсичности дозах на свободную, общую, связанную активность лактат-, малатдегидрогеназ (ЛДГ, МДГ; 1.1.1.27, 1.1.1.37) и аспартатаминотрансферазы (АСТ, 2.6.1.1) и на активность их изоэнзимов в икроножных мышцах белых крыс. Выбор указанных энзимов обусловлен важностью функции ЛДГ и МДГ для энергетического обмена мышечной ткани и конкурентными их отношениями в цитозоле за пиридиннуклеотиды (2, 3). Функция АСТ важна для регуляции МДГ-реакции ходом малат-аспартатного шунта.

Эксперимент проведен на 158 половозрелых гетерозиготных вистаровских крысах. В 1-й серии крысам трех опытных групп (по 8 голов) вводили перорально 2,4-ДА в дозе ЛД₁₆, а восьми контрольным животным — воду. Через 1, 3, 6 ч после затравки животных декапитировали. По такому же плану поставлены следующие 3 серии опытов, в которых изучали действие 2,4-ДА в дозе 1/2 ЛД₁₆; 2М-4ХБ в дозах ЛД₁₆ и 1/2 ЛД₁₆. Известно, что 2,4-ДА в дозе ЛД₁₆ вызывает заметные проявления миотонии (4), а в дозе 1/2 ЛД₁₆ миотоническая реакция фактически не проявляется. Извлекали икроножные мышцы, измельчали в мясорубке Латани и готовили гомогенаты на 0,25 М растворе сахарозы, содержащем 0,01 М трис-буфера (рН=7,4), в конечном оптимальном разведении 1 : 400. Солюбилизацию связанных форм энзимов и определение активности ЛДГ, МДГ и АСТ проводили, как описано в предыдущих работах (5-7). В 5-й серии опытов крысам 4 опытных групп (до 6 голов) вводили 2,4-ДА и 2М-4ХБ в указанных дозах, а контрольным животным — воду. Через 6 ч — время максимального уровня 2,4-Д в тканях (8) — крыс убивали. Гомогенаты в этом случае готовили в соотношении 1 : 2 (9). Изоэнзимы ЛДГ, МДГ и АСТ разделяли до и после обработки гомогенатов тритоном X-100 в блоке из 1%-ного агарового геля в камере Zeiss-Jena модели 1969 г. Для выявления изоэнзимов дегидрогеназ использовали соли тетразолия (10, 11), а АСТ — «Fast Blue B-salt» (12). Результаты исследований обработаны статистически (13).

Начиная с 3 ч, после введения крысам 2,4-ДА в дозе ЛД₁₆ в мышечной ткани интенсифицировалось общее дегидрирование лактата (рисунок) из-за повышения свободной активности ЛДГ, хотя связанная активность энзима угнеталась. Сдвиги активности свободной и связанной форм ЛДГ усиливались к 6 ч. Эти явления могут до известной степени свидетельствовать об изменениях физико-химических свойств мембран

субклеточных частиц. Однако это, по-видимому, дополнялось повышением скорости дегидрирования лактата в цитозоле. Через 6 ч после введения 2,4-ДА в дозе ЛД₁₆ в гомогенатах икроножных мышц относительная активность ЛДГ₂ уменьшалась, а ЛДГ₄ увеличивалась (табл. 1 и 2). При снижении дозы препарата в 2 раза за 1 и 6 ч окисление лактата тормозилось, хотя при пересчете на 1 мг белка активность свободной ЛДГ в это время менялась мало. К 6 ч в «нативных» и обработанных тритоном X-100 гомогенатах повышалась активность ЛДГ₅, а ЛДГ₂



Активность некоторых ферментов (в процентах по отношению к контролю, принятому за 100%) в скелетной мускулатуре белых крыс через 1 (а), 3 (б) и 6 (в) ч после введения 2,4-ДА (А) или 2М-4ХБ (Б) в дозах ЛД₁₆ (I, Ia, Ib) или 1/2 ЛД₁₆ (II, IIa, IIб). Крестиками отмечены статистически достоверные изменения. I и II — ЛДГ; Ia и IIa — МДГ; Ib и IIб — АСТ. 1 — свободная активность, 2 — общая, 3 — связанная

и ЛДГ₃ уменьшалась, т. е. изменялась активность характерных для ядер (¹⁴) изоэнзимов ЛДГ.

Окисление малата после затравок 2,4-ДА в дозе ЛД₁₆ ускорялось в первые 3 ч из-за активации растворимой МДГ, хотя активность связанного фермента тормозилась. Угнетение связанной МДГ усиливалось, приводя к подавлению общего окисления малата к 6 ч, когда тормозилась активность обеих форм митохондриального изоэнзима МДГ. В дозе 1/2 ЛД₁₆ препарат к 3 ч после затравок обусловил перераспределение активности между формами МДГ в сторону угнетения связанной. К 6 ч резко угнеталась связанная МДГ и мит.-МДГ в мышцах. Из сравнения эффекта доз 2,4-ДА на связанную МДГ и мит.-МДГ можно предполагать действие 2,4-ДА в дозе ЛД₁₆ на связанный фермент немитохондриальной топографии.

Введение 2,4-ДА в дозе ЛД₁₆ приводило в мышечной ткани к нарастанию активности связанной АСТ, которая у контрольных крыс была очень мала. При этом через 1 ч снижалась свободная и общая активность АСТ, а к 6 ч нарастала. К 6 ч уменьшалась и активность мит.-АСТ. Следует, однако, заметить, что обработка гомогенатов мышц контрольных крыс тритоном X-100 приводила к значительному увеличению ак-

Таблица 1

Активность изоэнзимов (%) ЛДГ, МДГ и АСТ в «нативных» гомогенатах скелетных мышц белых крыс через 6 ч после введения феноксикислот

Препарат; доза	Статистический показатель	ЛДГ					МДГ		АСТ	
		ЛДГ ₁	ЛДГ ₂	ЛДГ ₃	ЛДГ ₄	ЛДГ ₅	мит.-МДГ	цит.-МДГ	мит.-АСТ	цит.-АСТ
Контроль	\bar{x}	10,0	20,2	14,3	20,2	35,3	15,0	85,0	7,3	92,7
	S	2,5	1,5	2,9	1,5	4,2	4,0	4,0	1,6	1,6
2,4-ДА; ЛД ₁₆	\bar{x}	11,3	14,5**	11,5	28,0**	34,6	8,1**	91,9**	4,3**	95,7**
	S	1,8	2,7	5,0	3,6	5,9	2,8	2,8	1,2	1,2
2,4-ДА; 1/2 ЛД ₁₆	\bar{x}	8,4	13,2**	10,4**	23,5*	44,5**	8,9**	91,1**	7,5	92,5
	S	1,5	1,9	0,9	2,3	3,5	3,0	3,0	2,4	2,4
2М-4ХБ; ЛД ₁₆	\bar{x}	10,1	19,6	15,0	30,7**	24,6**	12,6	87,4	4,0**	96,0**
	S	1,4	2,0	1,7	2,1	2,7	4,5	4,5	1,2	1,2
2М-4ХБ; 1/2 ЛД ₁₆	\bar{x}	6,7*	16,8	14,5	20,2	41,8	15,4	84,6	3,8*	96,2**
	S	1,6	4,0	1,7	2,1	7,3	4,3	4,3	0,8	0,8

* Изменения достоверные при уровне значимости 95%. ** При уровне значимости 99%.

Таблица 2

Влияние феноксикислот на активность изоэнзимов (%) ЛДГ, МДГ и АСТ в обработанных тритоном X-100 гомогенатах скелетных мышц белых крыс

Препарат; доза	Статистический показатель	ЛДГ					МДГ		АСТ	
		ЛДГ ₁	ЛДГ ₂	ЛДГ ₃	ЛДГ ₄	ЛДГ ₅	мит.-МДГ	цит.-МДГ	мит.-АСТ	цит.-АСТ
Контроль	\bar{x}	9,0	19,2	14,1	23,0	34,7	30,5	69,5	15,8	84,2
	S	1,9	2,3	3,0	3,8	3,5	5,9	5,9	4,0	4,0
2,4-ДА; ЛД ₁₆	\bar{x}	10,5	13,7**	13,2	28,4*	34,2	8,2**	91,8**	8,5**	91,5**
	S	2,2	2,2	4,0	3,2	2,3	4,8	4,8	1,2	1,2
2,4-ДА; 1/2 ЛД ₁₆	\bar{x}	8,6	14,0**	9,2**	23,7	44,5**	6,5**	93,5**	18,7	81,3
	S	1,4	2,4	1,1	2,8	3,6	4,4	4,4	1,6	1,6
2М-4ХБ; ЛД ₁₆	\bar{x}	8,5	20,1	15,5	29,8**	26,1**	8,3**	91,7**	6,3**	93,7**
	S	1,5	1,7	2,3	1,9	3,6	5,5	5,5	2,4	2,4
2М-4ХБ; 1/2 ЛД ₁₆	\bar{x}	7,5	17,9	12,1	19,1*	43,4**	36,3	93,7	10,3*	89,7*
	S	1,9	2,9	1,2	1,2	4,6	7,1	7,1	2,8	2,8

тивности мит.-АСТ. Полученные факты мы интерпретируем следующим образом: во-первых, возможна сильная метаболическая реакция ядер — источников связанной АСТ. В связи с этим уместно напомнить об обнаруженном 2—6-кратном увеличении числа ядер в мышечных волокнах при *myotonia congenita* (15—17), моделью которой является 2,4-Д-миотония. Кроме того, тритон X-100 в ряде случаев солибилизирует белки и энзимы лишь после предварительной модификации мембран (18, 19). Такие явления могут иметь место и при действии миотоника.

Введение 2М-4ХБ в дозе ЛД₁₆ вызывало в мышцах однотипные с 2,4-ДА сдвиги активности ЛДГ, хотя в 1 ч изменения были более выражены, чем в 3 ч. К 6 ч после затравок 2М-4ХБ в гомогенатах мышечной ткани происходило лишь перераспределение активности между ЛДГ₄ и ЛДГ₅. Уменьшение дозы 2М-4ХМ вызывало изменения, аналогичные описанным для большей дозы, но в 1 ч более резкие, хотя в это время при расчете на 1 мг белка активность свободной и общей ЛДГ несколько уменьшилась. К 3 ч активность ЛДГ тормозилась. Наблюдалось перераспределение активности между ЛДГ₄ и ЛДГ₅, но в растворимой фазе клеток уменьшалась активность ЛДГ₁.

Введение 2М-4ХБ в дозе ЛД₁₆ в первые 3 ч не меняло активность МДГ в мышцах, а к 6 ч резко угнетало связанную активность мит.-МДГ. После затравок 2М-4ХБ в половинной дозе в 1 ч увеличивалось сродство энзима к мембранам: связанная активность повышалась за счет свободной. К 3 ч усиливалось общее дегидрирование малата.

После введения 2М-4ХБ в дозе ЛД₁₆ ускорялось трансаминирование, катализируемое АСТ, на протяжении 6 ч. В отличие от 2,4-ДА активность свободной АСТ нарастала, а связанной тормозилась. В дозе 1/2 ЛД₁₆ препарат лишь к 3 ч обусловил перераспределение АСТ (при увеличении свободной активности), дополняемое активированием растворимого энзима. К 6 ч трансаминирование в мышцах подавлялось. После введения 2М-4ХБ в обеих дозах активность мит.-АСТ падала.

Полученные данные могут свидетельствовать о важности для проявления миотонии определенных сдвигов реакций обмена оксалацетата, катализируемых МДГ и АСТ. К тому же миотонический яд, очевидно, более резко изменяет метаболизм ядер мышечных волокон, но пока неясно, какую роль эти изменения играют в генезисе миотонического синдрома.

Белорусский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии

Поступило 18.II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. L. Graff, C. Guenning, B. Vanderkelen, C. r. Soc. Biol., **166**, 11, 1565, 1972. ² N. R. Alpert, Ann. N. Y. Acad. Sci., **119**, art. 3, 995, 1965. ³ А. А. Покровский, К. А. Коровников, сб.: II Всесоюзный биохимический съезд. Тезисы Докладов симпозиума, симп. IV, 110, Ташкент, 1969. ⁴ С. Ю. Буслевич, Автореф. канд. дис., Минск, 1964. ⁵ В. Н. Никандров, Депонировано ВИНТИ № 6566-73 Деп. ⁶ В. Н. Никандров, Укр. биохим. журнал, **46**, 3, 364, 1974. ⁷ В. Н. Никандров сб.: Биохимия, вып. 2, 31, Минск, 1974. ⁸ S. Khanna, S. C. Fang, J. Agr. Food Chem., **14**, 5, 500, 1966. ⁹ A. M. Katz, W. Kalow, Canad. J. Biochem., **43**, 10, 1653, 1965. ¹⁰ H. J. van der Helm, J. Neurochem., **9**, 3, 325, 1962. ¹¹ И. М. Маркелов, Лабораторное дело, **12**, 707, 1966. ¹² Takeshi Wajima, Bull. Yamag. Med. School, **14**, 2, 191, 1965. ¹³ И. П. Ашмарин, Н. Н. Васильев, В. А. Амбросов, Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов, Л., 1971. ¹⁴ В. Л. Немчинская, Л. Ш. Ганелина, А. Д. Браун, Цитология, **10**, 3, 322, 1968. ¹⁵ W. H. Erb, Neurol. Centrall, **289**, 1885. ¹⁶ W. H. Erb, Die Thompsenche Krankheit (*myotonia congenita*), Leipzig, 1886. ¹⁷ P. Seifert, Dtsch. Arch. f. klin. Med., **47**, 127, 1890. ¹⁸ Н. Г. Гиммельрейх, О. Л. Санина, Цитология, **15**, 7, 847, 1973. ¹⁹ W. C. Hunter, E. L. Kuff, J. histochem. cytochem., **12**, 5, 359, 1964.