

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

Архив журнала

## **Вопросы медицинской химии**

*ISSN 0042-8809*

1986

**Внимание!** Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

## **Voprosy meditsinskoi khimii**

*ISSN 0042-8809*

1986

**Attention!** OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ XXXII

ВЫПУСК 2

МАРТ—АПРЕЛЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1986

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

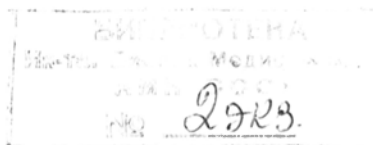
Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА,  
В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОК-  
ШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РО-  
ЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС, С. Е. СЕ-  
ВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)  
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)  
БЫЧКОВ С. М. (Москва)  
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)  
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)  
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)  
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)  
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)  
ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)  
УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)  
ШАПОТ В. С. (Москва)  
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)  
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



Адрес редакции журнала:

Москва, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

5. Орехович В. П., Елисева Ю. Е., Павлухина Л. В. — Вестн. АМН СССР, 1976, № 9, с. 42—47.
6. Barrett A. J. — In: Proteinases in Mammalian Cells and Tissues / Ed. A. J. Barrett. Amsterdam, 1977, p. 181—208.
7. Ebashi S. — In: Muscular Dystrophy / Ed. S. Ebashi. Tokyo, 1982, p. 265—285.
8. Gohda E., Pilot H. C. — Biochim. biophys. Acta, 1981, vol. 659, p. 114—122.
9. Jarvinen M., Hopsu-Havu V. K. — Acta chem. scand., 1975, vol. B-29, p. 671—676.
10. Kirschke H., Langner J., Riemann S. et al. — In: Proteinases and Tumor Invasion / Ed. P. Strauli et al. New York, 1980, p. 69—79.
11. Kirschke H., Lagner J., Wiederanders B. et al. — Acta biol. med. germ., 1976, Bd 35, s. 285—299.
12. Kirschke H., Langner J., Wiederanders B. et al. — Europ. J. Biochem., 1977, vol. 74, p. 293—301.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. — J. biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
14. Luetscher J. A., Bialek J. W., Gristis G. — Clin. exp. Hypertens, 1982, Pt A N 11—12, p. 2149—2158.
15. Murachi T. — Trends Biochem. Sci., 1983, vol. 8, p. 167—169.
16. Okitani A., Matsukura U., Kato H., Fjima-ki M. — J. Biochem. (Tokyo), 1980, vol. 87, p. 1133—1143.
17. Ostensen M., Morland B., Husly G., Rekvig O. P. — Clin. exp. Immunol., 1983, vol. 54, p. 397—404.
18. Pontremoli S., Melloni E., Salamino F. et al. — Arch. Biochem., 1982, vol. 214, p. 376—385.
19. Poole A. R., Recklies A. D., Mort J. S. — In: Proteinases and Tumor Invasion / Ed. P. Strauli et al. New York, 1980, p. 81—95.
20. Ryle A. P., Porter R. R. — Biochim. J., 1959, vol. 73, p. 75—86.
21. Slater E. E., Gounaris A. D., Haber E. — Clin. Sci., 1979, vol. 57, Suppl. 5, p. 93s—96s.
22. Stewler G. J., Manganiello V. C. — J. biol. Chem., 1979, vol. 254, p. 11891—11898.
23. Takahashi S., Murakami K., Miyake Y. — J. Biochem. (Tokyo), 1982, vol. 91, p. 419—422.
24. Towatari T., Tanaka K., Yoshikawa D., Katunuma M. — Ibid., 1978, vol. 84, p. 659—671.

Поступила 19.12.84

## CHARACTERISTICS OF CYSTEINE PEPTIDE HYDROLASES FROM HUMAN KIDNEY CORTEX

E. A. Dilakjan, L. A. Lokshina,  
V. N. Orekhovich

Institute of Biological and Medical Chemistry,  
Academy of Medical Sciences of the USSR,  
Moscow

Spectrum of cysteine peptide hydrolases was studied in human kidney cortex using a variety of protein and synthetic substrates after the preparation was fractionated on Sephadex G-100 following the precipitation with ammonium sulfate 40-70 %. Activities of dipeptidyl aminopeptidase I, lysosomal carboxypeptidases A and B, cathepsins B and H, as well as the activity of  $Ca^{+2}$ -dependent neutral proteinase were detected. A thiol-dependent proteolytic activity, which was apparently stimulated by cathepsin T- and -M like enzymes, was also observed. Besides, the proteinase with molecular mass of 50-60 kDa and high hemoglobin and casein splitting activity was found. This activity cannot be attributed to any of the proteinases so far known. Isoelectrofocusing technique showed that two forms of cathepsin B occurred in human kidney with isoelectric points at pH 5.32 and pH 5.65; two forms of cathepsin H were also detected exhibiting isoelectric points at pH 6.03 and pH 6.7.

УДК 616-008.922.1-008.61-07:616.831-008.931:577.152.143 + 616.831-008.934.663]-02:615.214.32

И. А. Горошинская, А. А. Кричевская, В. С. Шугалей,  
К. Б. Шерстнев, Р. М. Баламирзоева

## АКТИВНОСТЬ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ И УРОВЕНЬ γ-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ГИПЕРОКСИИ. ВЛИЯНИЕ ХЛОРГИЛИНА

Ростовский университет им. М. А. Суслова

Для патологических состояний, сопровождающихся стимуляцией перекисного окисления липидов, характерны качественные изменения каталитических свойств митохондриальной моноаминоксидазы — МАО [амин: кислород-оксидоредуктаза (дезаминирующая) (флавиносодержащая), КФ 1.4.3.4] — ключевого фермента обмена моноаминовых медиаторов. Изменения, проявляющиеся в снижении активности фермента со специфическими субстра-

тами и появлении способности дезаминировать целый ряд веществ, в норме не являющихся субстратами МАО (диамины, полиамины, аммиосола и др.), обнаружены при лучевом поражении, злокачественном росте гипервитаминозе D [2], холодовом стрессе [7], гипоксии [6], экспериментальной гиперхолестеринемии [9], черепно-мозговой травме [1]. При всех изученных состояниях изменяется субстратная специфичность чувствитель-

ной к хлоргилину МАО типа А, естественными субстратами которой являются серотонин и норадреналин, но не МАО типа В (ингибитор — депренил, субстраты  $\beta$ -фенилэтиламин, бензиламин, метилгистамин). Сходные изменения каталитических свойств МАО типа А обнаружены нами при гипероксии [5]. Важное значение в механизме развития гипероксического поражения, в частности в появлении судорожной активности, придается снижению содержания в мозге тормозного медиатора ЦНС  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) [8, 11, 20]. Ранее нами показано, что модифицированная в условиях холодового стресса МАО типа А приобретает способность дезаминировать наряду с другими необычными субстратами и ГАМК [7].

В настоящей работе исследовали способность МАО дезаминировать ГАМК в условиях гипероксии и влияние избирательно действующего ингибитора МАО типа А хлоргилина на уровень ГАМК и активность глутаматдекарбоксилазы — ГДК (КФ 4.1.1.15) — фермента синтеза ГАМК, регулирующего ее уровень и существенно ингибируемого при гипероксии [8, 12, 19].

## Методика

Объектом исследования служили взрослые беспородные белые крысы обоего пола массой тела 150—180 г. Животных подвергали действию 0,7 МПа кислорода до наступления судорог в специальной барокамере, снабженной щелочным поглотителем углекислоты при постоянном режиме компрессии и декомпрессии 0,2 МПа в 1 мин. При исследовании влияния хлоргилина в барокамеру одновременно помещали интактное животное и животное, которому за 30 мин до сеанса гипероксии вводили внутривенно хлоргилин в дозе 5 мг на 1 кг массы тела. Опыт прекращали при наступлении судорог у интактных животных (в среднем через 30 мин). Одной группе животных вводили хлоргилин за 60 мин до декапитации.

Активность МАО определяли в митохондриальной фракции. Митохондрии мозга выделяли методом дифференциального центрифугирования [10]. Активность МАО типа А с субстратом серотонином, а также скорость дезаминирования ГАМК определяли по освобождению аммиака после инкубации суспензии митохондрий с одним из субстратов в насыщающей концентрации (для серотонина 2,5 мМ, для ГАМК 10 мМ) [4].

Инкубацию проводили в воздушной среде при 37,5 °C и pH 7,45 в течение 30 мин. Содержание аммиака определяли спектрофлуориметрическим методом на флуориметре марки «Hitachi 650-60» (Япония) [17] после изотермической отгонки [16]. При исследовании

in vitro влияния хлоргилина и депренила суспензию митохондрий преникубировали в течение 15 мин при 25 °C с одним из ингибиторов в концентрации  $10^{-6}$  М, при которой они обладают максимально избирательным свойством [21]. Хлоргилин и депренил, полученные от доктора J. J. Barber (фирма «May & Baker», Англия) и доктора K. Magyar (Институт фармакологии Медицинского университета, Будапешт, ВНР), любезно предоставлены проф. В. З. Горкиным.

При исследовании уровня ГАМК 10 % спиртовой гомогенат мозга центрифугировали 10 мин при 4000g, осадок отбрасывали, надосадочную фракцию испаряли на ротационном испарителе и определяли содержание ГАМК на аминокислотном анализаторе ААА-881 («Микротехна», СССР) на малой колонке в 0,2 М Na-цитратном буфере pH 4,25.

Активность ГДК определяли в гомогенате мозга, приготовленном на дистиллированной воде (150 мг ткани на 1 мл воды). Об активности фермента судили по образованию ГАМК в процессе 60-минутной инкубации гомогената мозга с глутаминовой кислотой (12,1 мкмоль в пробу) и пиридоксальфосфатом (3,75 мкмоль в пробу) при 37,5 °C и pH 6,4. Содержание ГАМК определяли фенол-гипохлоридным методом на спектрофотометре СФ-26 при 630 нм [14].

Содержание белка определяли модифицированным методом Лоури [15]. Статистическую обработку результатов проводили методом Финнера — Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

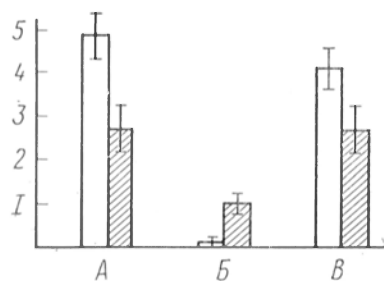
Как видно из табл. 1, при гипероксии 0,7 МПа кислорода (судороги) активность МАО типа А с субстратом серотонином снижается в мозге на 49 %, что сопровождается появлением ГАМК-дезаминазной активности. В митохондриях большинства интактных животных способность дезаминировать ГАМК отсутствует, лишь у 4 из 14 исследованных животных наблюдалось незначительное дезаминирование ГАМК. В условиях гипероксии интенсивность дезаминирования ГАМК увеличивается в среднем в 14 раз.

Преникубация суспензии митохондрий с избирательно действующим инги-

Таблица 1  
Дезаминирование серотонина и ГАМК в митохондриях мозга крыс при гипероксии, имоль азота аммиака на 1 мг белка за 1 мин

Субстрат	Контроль	0,7 МПа кислорода (судороги)
Серотонин	7,18 $\pm$ 0,415 (12)	3,68 $\pm$ 0,460 (10)
<i>P</i>		<0,001
ГАМК	0,175 $\pm$ 0,095 (14)	2,50 $\pm$ 0,746 (14)
<i>P</i>		<0,01

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках — число опытов.



Влияние преникубации с хлоргилином и депренилом на деаминацию серотонина (белые столбики) и ГАМК (заштрихованные столбики) в митохондриях мозга крыс при гипероксии. По оси ординат — интенсивность деаминации (в нмоль азота аммиака на 1 мг белка в 1 мин). А — без ингибитора; Б — хлоргиллин; В — депренил.

битором МАО типа А хлоргилином препятствует резкому усилению интенсивности деаминации ГАМК, а преникубация с ингибитором МАО типа В депренилом не влияет на этот процесс (см. рисунок). Следовательно, увеличение интенсивности деаминации ГАМК в условиях гипероксии обусловлено МАО типа А.

Многочисленными исследованиями показано снижение содержания ГАМК в мозге крыс, а также мышей, кроликов, цыплят и хомяков на разных стадиях гипероксии [8, 12, 18, 19]. Это снижение обычно связывают с ингибированием при гипероксии активности ГДК [8, 12, 19], катализирующей основной путь образования ГАМК в организме.

Предположив, что определенную роль в снижении уровня ГАМК при гипероксии может играть приобретение способности к ее деаминации МАО типа А, мы исследовали влияние

предварительного введения животным хлоргилина на содержание ГАМК и активность ГДК. Хлоргиллин блокирует каталитические центры МАО типа А и предотвращает изменение каталитических свойств этой формы фермента [3].

Использованная доза хлоргилина (5 мг/кг массы внутрибрюшинно) вызывает почти полное ингибирование активности МАО типа А (деаминарование серотонина снижается на 77 %) и оказывает выраженное защитное действие, отдалая время наступления судорог в 2 раза.

Из табл. 2 видно, что введение хлоргилина intactным животным не влияет на активность ГДК, а вызывает снижение уровня ГАМК на 31 %, что обусловлено, по-видимому, антидепрессивными свойствами хлоргилина и его влиянием на интенсивность тормозных процессов.

В судорожную фазу кислородной интоксикации уровень ГАМК в мозге снижается на 40 %, активность ГДК — на 44 %. Введение хлоргилина перед помещением животных в барокамеру предотвращает снижение содержания ГАМК, но не влияет на активность ГДК. Активность ГДК у животных, защищенных хлоргилином, достоверно не отличается от активности фермента у intactных животных, помещенных в барокамеру.

Уровень ГАМК при гипероксии в отличие от такового у intactных животных определяется не только интенсивностью ее образования под влиянием ГДК и деаминации под действием ГАМК-трансаминазы, но и деаминацией с участием МАО. Активность ГАМК-трансаминазы не изме-

Таблица 2

Содержание ГАМК (в нмоль на 1 г ткани) и активность ГДК (в нмоль ГАМК на 1 мг белка за 1 ч) в мозге крыс при гипероксии и введении хлоргилина

Условия опыта	ГАМК	ГДК
Контроль	$1,68 \pm 0,146$ (6)	$117 \pm 5,5$ (12)
Хлоргиллин	$1,16 \pm 0,069$ (6)	$102 \pm 16,2$ (10)
$P_1$	$<0,01$	$>0,05$
0,7 МПа кислорода (судороги)	$1,02 \pm 0,041$ (4)	$65,3 \pm 8,6$ (8)
$P_1$	$<0,01$	$<0,001$
Хлоргиллин + 0,7 МПа кислорода	$1,59 \pm 0,056$ (4)	$80,8 \pm 8,4$ (10)
$P_1$	$>0,05$	$<0,01$
$P_2$	$<0,001$	$>0,05$

Примечание.  $P_1$  — сравнение с контролем,  $P_2$  — сравнение с группой, подвергнутой гипероксии (0,7 МПа кислорода — судороги).

няются в условиях гипероксии [19]. Представленные в работе данные свидетельствуют о том, что решающее влияние на уровень ГАМК при гипероксии оказывает МАО. Ингибирование ГДК в данных условиях, вероятно, не является определяющим фактором в снижении содержания ГАМК, поскольку нормализация уровня ГАМК под влиянием хлоргиллина достигается на фоне значительно сниженной активности ГДК.

Таким образом, снижение уровня ГАМК при гипероксии обусловлено в основном ее дезаминированием трансформированной в условиях патологии МАО типа А. Предотвращение трансформации фермента хлоргиллином оказывает защитное действие при гипероксии, отдалая время наступления судорог и нормализуя содержание ГАМК. Ранее нами было показано, что хлоргиллин в отличие от депренила наряду с отдалением судорог повышает выживаемость животных и предотвращает дезаминирование МАО в условиях гипероксии глюкозамина, что должно сказаться на целостности мембранных структур, компонентом которых являются аминоксахара [13]. Полученные данные подтверждают важную роль изменения каталитических свойств МАО в механизме развития кислородной интоксикации. Предотвращение изменения свойств фермента или их нормализация представляются важными при разработке способов антигипероксической защиты.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аюбян А. С., Промыслов М. Ш. — *Вопр. мед. химии*, 1984, № 1, с. 75—77.
2. Горкин В. З. — *Молекулярная биол.*, 1976, № 4, с. 717—736.
3. Горкин В. З. — *Хим.-фарм. журн.*, 1977, № 1, с. 6—13.
4. Горкин В. З., Вережкина И. В., Гриднева Л. И. и др. — В кн.: *Современные методы в биохимии*. М., 1968, т. 2, с. 155—177.
5. Горошинская И. А. — *Вопр. мед. химии*, 1979, № 3, с. 328—332.

6. Горошинская И. А., Брновицкая З. Г., Кричевская А. А., Кабарухина Е. Г. — *Нейрохимия*, 1982, № 3, с. 282—285.
7. Горошинская И. А., Кричевская А. А., Брновицкая З. Г. — *Бюл. exper. биол.*, 1981, № 4, с. 431—433.
8. Кричевская А. А., Шугалей В. С., Щербина Л. Д., Ермоленко Г. Г. — *Вопр. мед. химии*, 1974, № 3, с. 294—298.
9. Мамадиев М., Хужамбердиев М., Горкин В. З. — Там же, 1983, № 1, с. 83—89.
10. Москвитина Т. А. — В кн.: *Современные методы в биохимии*. М., 1977, с. 22—26.
11. Сытинский И. А. Гамма-аминомасляная кислота в деятельности нервной системы. Л., 1972.
12. Щербакова Т. В. — *Докл. АН СССР*, 1962, т. 146, № 5, с. 1213—1215.
13. Goroshinskaya I. A., Bronovitskaya Z. G., Gorkin V. Z. — *Commun. Psychopharmacol.*, 1977, vol. 1, p. 39—47.
14. Kituka S., Nakao V. — *J. Biochem. (Tokyo)*, 1969, vol. 66, p. 87—90.
15. Schacterle G. R., Pollack K. L. — *Analyt. Biochem.*, 1973, vol. 51, p. 654—655.
16. Seligson D., Seligson H. A. — *J. Lab. clin. Med.*, 1951, vol. 38, p. 324—330.
17. Sugawara K., Oyama F. — *J. Biochem. (Tokyo)*, 1981, vol. 89, p. 771—774.
18. Wood J. D. — *J. Neurochem.*, 1970, vol. 17, p. 573—579.
19. Wood J. D., Watson W. J., Ducker A. J. — *Ibid.*, 1967, vol. 14, p. 1067—1074.
20. Wood J. D., Watson W. J., Murray G. W. — *Ibid.*, 1969, vol. 16, p. 281—287.
21. Yang H. Y., Neff N. H. — *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1973, vol. 187, p. 365—371.

Поступила 17.12.84

#### THE MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY AND CONTENT OF $\gamma$ -AMINO BUTYRIC ACID IN HYPEROXIA; EFFECT OF CHLORGILINE

I. A. Goroshinskaya, A. A. Krichevskaya,  
V. S. Shugaley, K. B. Sherstnev,  
R. M. Balamirzoeva

Under conditions of hyperoxia mitochondrial monoamine oxidase (MAO) of the A type from rat brain proved to be able to deaminate  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA); the transformation in the enzymatic properties appears to be responsible for a decrease in content of the intermediate in brain. Preadministration of chlorgiline (inhibitor of MAO of the A type) into animals before hyperoxygenation prevented completely the GABA content decrease, not affecting the glutamate decarboxylase activity, which was decreased in hyperoxia. At the same time, chlorgiline exhibited the total protective effect increasing 2-fold the period before oxygen convulsions.