

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1985

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

1985

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 XXXI

ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ
МЕДИЦИНСКОЙ
ХИМИИ



МОСКВА. МЕДИЦИНА. 1985



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. Н. ГЕРАСИ-
МОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН,
Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ,
Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС,
С. Е. СЕВЕРИН, 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)
ТАРАКУЛОВ 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

1983

39. Tapscott E. B., Dohm G. L. — J. Chromatogr., 1975, vol. 107, p. 420—422.
40. Tombropoulos E. G., Hadley J. G. — Lipids, 1976, vol. 11, p. 491—497.
41. Wirlthensohn G., Brocks D. G., Guder W. G. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1980, Bd 363, S. 985—993.
42. Witisuwannakul D., Kim K. H. — Biochem. biophys. Res. Commun., 1978, v. 80, p. 1007—1012.
43. Wong E. H. A., Loten E. G., Park C. L. — J. Cyclic. Nucl. Res., 1978, v. 4, p. 359—374.

Поступила 24.04.84

EFFECT OF ACTH ON BIOSYNTHESIS OF GLYCEROLIPID CONSTITUENTS IN RAT LIVER TISSUE

D. G. Pitsin, V. N. Titov, M. P. Vasileva-Dimova, V. M. Sanfirova

All-Union Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow,

Institute of Gastroenterology and Nutrition,
Medical Academy, Sofia, Bulgaria

Single administration of ACTH led to stimulation of synthesis of saturated and mono-
enic fatty acids in liver tissue as well as to
their esterification with formation of triacyl
glycerols. The hormone inhibited elongation
and desaturation of fatty acids and decreased
the formation of polyenic fatty acids in liver
tissue. Cycloheximide alone or simultaneously
with ACTH activated synthesis of unsaturated
and monoenic fatty acids and stimulated the
glycerophosphate shunt of triacyl glycerols
synthesis. The tropic hormone activated gly-
ceroneogenesis contributing to an increase in
concentration of both α -glycerophosphate and
long-chain fatty acids in hepatocytes; either
ACTH or cycloheximide stimulated the tri-
acyl glycerols synthesis via induction of the
key enzymes by excess of the substrates. Con-
sumption of acetyl-CoA, derived from labeled
leucine, for biosynthesis of individual lipids
was regulated by other mechanisms distinct
from those involved in consumption of acetyl-
CoA pool, derived from labelled acetate.

УДК 612.822.1:577.175.821.015.1:577.152.1431.014.46:615.285.7

Т. А. Зейналов

ОБ АКТИВАЦИИ БАЙГОНОМ (2-ИЗОПРОПОКСИФЕНИЛ-N-МЕТИЛ КАРБАМАТ) ФЕРМЕНТАТИВНОГО ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ 2-ФЕНИЛ-ЭТИЛАМИНА

НИИ вирусологии, микробиологии и гигиены Минздрава Азербайджанской ССР,
Баку

Биогенные моноамины, к числу ко-
торых относят многие важнейшие ме-
диаторы и модуляторы нервных импуль-
сов, принимают участие в регуляции
основных функций центральной нерв-
ной, нейроэндокринной и сердечно-
сосудистой систем [1, 3]. Ключевая роль
в обмене биогенных аминов принадле-
жит реакции их окислительного деза-
минирования, которую катализируют
родственные, близкие по свойствам, но
поддающиеся препаративному разделе-
нию флавиновые ферменты моноамино-
оксидазы (МАО) (КФ 1.4.3.4), локали-
зованные преимущественно во внешней
мембране митохондрий. Согласно при-
нятой в настоящее время бинарной клас-
сификации, основанной на субстратной
специфичности и чувствительности к
действию ацетиленовых ингибиторов
(хлоргиллина и депренила), в организме
человека и животных существует по
крайней мере 2 типа МАО: А и Б. Спе-
цифическими субстратами МАО типа А
являются серотонин и норадреналин, а
МАО типа Б — бензиламин, 2-фенил-

этиламин и фенилэтанолламин. Некото-
рые биогенные амины, такие как тира-
мин, триптамин, дофамин и кинуранин,
окисляются МАО обоих типов [4].

Нарушение каталитической актив-
ности МАО лежит в основе патогенеза мно-
гих нервных и психических расстройств,
гипертонии, а также целого ряда эк-
спериментальных и клинических забо-
леваний животных и человека, связан-
ных с накоплением в тканях продуктов
перекисного окисления липидов или (и)
отклонением от нормы функций симпа-
тико-адреналовой системы [3, 4].

Новые данные по исследованию гетеро-
генности МАО [9, 10], в результате ко-
торых было установлено, что множест-
венные формы МАО различаются не
только по функции, но также по струк-
туре и биологической роли, подчерки-
вают важность выяснения именно изби-
рательно действующих блокаторов и
стимуляторов реакций дезаминирования
биогенных аминов с целью разработки
новых лекарственных средств. Если в
области выяснения соединений, обла-

дающих свойствами избирательного ингибирования активности МАО, имеются большие достижения — избирательные ингибиторы МАО типа А (пиразидол, инказан) и типа Б (депренил) с успехом применяют в клинике [4], то вопрос о стимуляции активности этих ферментов остается малоизученным [3, 7]. В этой связи определенный интерес представляет работа болгарских исследователей из Института профессиональной гигиены в Софии [8], содержащая сведения об активации *in vivo* в результате введения в организм крыс инсектицида класса карбаматов байгона (2-изопропоксифенил-N-метилкарбамат), который широко применяется в сельском хозяйстве как в СССР, так и за рубежом. Однако об активации МАО судили по увеличению скорости дезаминирования лишь одного субстрата — кинурамина, который является субстратом обоих типов МАО [3, 8]. Возникает следующий вопрос: является ли повышение активности МАО результатом специфической ответной реакции организма на введение байгона или процессы дезаминирования биогенных аминов могут стимулировать и другие пестициды, производные карбаминовой кислоты, например цинеб ($Z_N - N$, N-этиленбисдитиокабамат). Если активация обоих типов МАО действительно имеет место при попадании в организм байгона, а не опосредована действием эндогенных активаторов [11, 16], то она должна наблюдаться и в опытах *in vitro*, и при использовании специфических субстратов МАО типа А серотонина и МАО типа Б 2-фенилэтиламина. Экспериментальная проверка указанных предположений была основной целью данных исследований.

Методика

Опыты проводили на крысах-самцах Вистар с массой тела 150—180 г. В экспериментах *in vivo* животным (по 10 крыс в каждой группе) ежедневно в течение 6 сут перорально вводили взвесь пестицидов в 1 мл физиологического раствора в дозе, равной 0,1 от ЛД₅₀. Ежедневная доза цинеба была равна 52 мг на 100 г массы тела байгона — 1,2 мг на 100 г [8]. Животным контрольной группы вводили равный объем физиологического раствора. На 6-й день через 2 ч после последнего введения препаратов животных декапитировали и быстро извлекали мозг и печень. Готовили 10% гомогенат на охлажденном 0,25 М растворе сахарозы. Ядра осаждали центрифугированием при 600 g в течение 10 мин. Митохондриальную фракцию получали центрифугированием освобожденной от клеточных ядер

и фрагментов клеток надосадочной жидкости при 12 000 g. Осадок митохондрий суспендировали в 0,01 М К-Na-фосфатном буфере, pH 7,4. Приготовленные таким образом препараты митохондриальных мембран сохраняли замороженными при -20°C .

В опытах *in vitro* суспензию митохондрий тщательно растирали и перемешивали с навесками цинеба и байгона (конечная концентрация 0,5 мМ) в гомогенизаторе Поттера и преинкубировали в течение 30 мин при 37°C .

Для определения активности МАО проводили измерения количества освобождаемого при инкубации проб аммиака методом изотермической диффузии с последующей несселектизацией. Инкубацию проводили на воздухе в течение 10 мин. Пробы (конечный объем 1,8 мл) содержали 3—5 мг белка суспензии митохондрий, 0,01 М К-Na-фосфатный буфер, pH 7,4 и один из субстратов в следующих насыщающих концентрациях: тирамина гидрохлорид («Merck», ФРГ) — 3 мМ, серотонина, креатининсульфат («Reanal», Венгрия) — 5 мМ и 2-фенилэтиламина гидрохлорид (ФЭА, отечественного производства) — 0,5 мМ. В опытах по измерению кинетических констант пробы содержали от 0,1 до 0,8 мМ ФЭА. Байгон («Bayer», ФРГ) и цинеб (отечественный х. ч., без наполнителей) были любезно предоставлены главным специалистом по пестицидам при Министерстве сельского хозяйства СССР А. А. Калининной. Реакцию окислительного дезаминирования аминов останавливали добавлением ТХУ (конечная концентрация 5%). Диализ проводили при 4°C в целлофановых мешочках против 100-кратного объема 0,01 М К-Na-фосфатного буфера, pH 7,4, который сменяли через каждые 24 ч (3 раза). Белок находили по методу Лоурин [13], используя стандартный раствор сычороточного альбумина быка. Результаты обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение

В условиях наших опытов скорость дезаминирования тирамина, серотонина и ФЭА при их инкубации с митохондриальными фракциями печени крыс составляла в среднем 13, 6, и 5 нмоль аммиака на 1 мг белка в 1 мин (табл. 1). Пероральное введение байгона вызывало достоверное увеличение скорости дезаминирования ФЭА (на 30%), но не влияло на скорость дезаминирования тирамина и серотонина. В опытах *in vitro* после предварительной преинкубации байгона с препаратами митохондриальных мембран печени крыс наблюдалась аналогичная картина, но стимуляция дезаминирования ФЭА была еще более выраженной и составляла в среднем 45% (см. табл. 1).

Введение цинеба вызывало в печени крыс достоверное снижение скорости дезаминирования тирамина (на 45%), серотонина (на 55%) при этом отмечалась тенденция к снижению скорости

Таблица 1

Влияние байгона и цинеба на скорость дезаминирования биогенных аминов (в нмолях NH_3 на 1 мг белка в 1 мин) митохондриальными МАО из печени крыс ($M \pm m$)

Субстрат	Норма	Байгон				Циниб			
		in vivo		in vitro		in vivo		in vitro	
		перорально (6 сут) по 1,2 мг на 100 г массы	изменение активности, %	преинкубация (0,5 мМ), 30 мин при 37 °С	изменение активности, %	перорально (6 сут) по 520 мг/кг	изменение активности, %	преинкубация (0,5 мМ), 30 мин при 37 °С	изменение активности, %
Тирамин (3 мМ)	12,8±1,41	10,4±17,8	—19	13,2±1,27	+3	7,05±0,86*	—45	4,74±0,57*	—63
Серотонин (5 мМ)	5,9±0,65	4,8±0,49	—18	5,5±0,71	—7	2,65±0,76*	—55	1,95±0,23*	—67
ФЭА (0,5 мМ)	4,6±0,38	6,1±0,72*	+32	6,6±0,55*	+43	4,2±0,32	—9	2,9±0,27*	—35

Примечание. Здесь и в табл. 2 приведены средние значения не менее 9 параллельных измерений (3 параллельных проб в 3 сериях экспериментов). В каждой новой серии экспериментов при выделении фракции митохондриальных мембран использовали объединенный гомогенат печени 8—10 крыс. Звездочка $P < 0,05$.

дезаминирования ФЭА (см. табл. 1). В опытах *in vitro* преинкубация цинеба ($5 \cdot 10^{-4}$ М) с митохондриальными фракциями печени крыс приводила к достоверному снижению скорости дезаминирования как тирамина (на 63%) и серотонина (на 67%), так и ФЭА (на 35%) (см. табл. 1).

В опытах с митохондриальными фракциями мозга крыс скорость дезаминирования тирамина, серотонина и ФЭА в норме составляла в среднем 5,4 и 1,5 нмоль аммиака на 1 мг белка в 1 мин соответственно. Байгом в опытах *in vivo* вызывал в мозге крыс достоверное увеличение скорости дезаминирования ФЭА в среднем на 40%, но не изменял скорость дезаминирования тирамина и серотонина; в опытах *in vitro* скорость окисления ФЭА возрастала на 50% по отношению к норме и отмечалась тенденция к увеличению скорости дезаминирования тирамина и серотонина (табл. 2).

Циниб в опытах *in vivo* не вызывал в тканях мозга крыс изменения окисли-

тельного дезаминирования тирамина, серотонина и ФЭА, однако в опытах *in vivo* было отмечено статистически достоверное снижение окисления тирамина (в среднем на 35%) и серотонина (на 22%), но не ФЭА (см. табл. 2).

Активирующий эффект байгона был обратимым: скорость дезаминирования ФЭА при инкубации с освобожденными от байгона путем длительного диализа (72 ч, но не 24 ч) препаратами митохондриальных мембран мозга и печени возвращалась к исходному уровню.

Результаты изучения кинетики процесса показали, что активация байгоном окислительного дезаминирования ФЭА в митохондриальных мембранах печени (рис. 1) и мозга крыс (рис. 2) протекает по конкурентному механизму. Из графиков зависимости $1/v$ от $1/S$ видно, что под действием байгона в значительной мере повышается сродство ФЭА к активному центру фермента при неизменном значении V_{\max} . При этом байгон в большей мере снижал K_M в тканях мозга

Таблица 2

Влияние байгона и цинеба на скорость дезаминирования биогенных аминов (в нмолях NH_3 на 1 мг белка в 1 мин) препаратами митохондриальных МАО из мозга крыс

Субстраты	Норма	Байгон				Циниб			
		in vivo		in vitro		in vivo		in vitro	
		перорально 6 сут по 1,2 мг на 100 г тела	изменения активности, %	преинкубация (0,5 мМ), 30 мин при 37 °С	изменения активности, %	перорально 6 сут 52 мг на 100 г тела	изменения активности, %	преинкубация (0,5 мМ), 30 мин при 37 °С	изменения активности, %
Тирамин (3 мМ)	5,2±0,58	5,0±1,37	—4	5,7±1,72	+9	4,5±0,61	—14	3,4±0,65*	—35
Серотонин (5 мМ)	4,1±0,32	4,5±1,53	+9	4,8±0,94	+17	3,9±0,52	—5	3,2±0,27*	—22
ФЭА (0,5 мМ)	1,6±0,21	2,2±0,33*	+38	2,4±0,45*	+50	1,6±0,73		1,5±0,46	—6

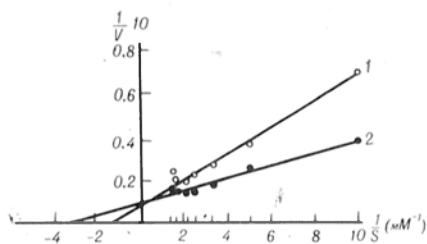


Рис. 1. Влияние байгона (0,5 мМ) на окислительное дезаминирование 2-фенилэтиламина МАО митохондриальных мембран печени крыс. Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс обратные величины концентрации ФЭА (в мМ); по оси ординат — обратные величины скорости дезаминирования (в нмолях аммиака на 1 мг белка в 1 мин). 1 — контроль; 2 — в присутствии байгона. Каждая точка — среднее значение не менее 9 определений.

(с 0,33 до 0,08 мМ), чем в печени (с 0,7 до 0,3 мМ) (см. рис. 1 и 2).

Таким образом, в условиях наших опытов как *in vivo*, так и *in vitro* статистически достоверная и значительная (до 50%) активация МАО-активности наблюдалась только при использовании в качестве субстрата 2-фенилэтиламина в результате перорального введения байгона или его преникубации с митохондриальными фракциями печени и мозга крыс.

При этом байгон не изменяет скорости дезаминирования тирамина и специфического субстрата МАО типа А серотонина. Даже если учесть, что при использованных в наших опытах концентрациях (от 0,1 до 0,8 мМ) ФЭА может окисляться и МАО типа А [12], полученные данные дают основание предполагать, что байгон избирательно активизирует только МАО типа Б.

Как известно, в связывании митохондриальной МАО с ФЭА важную роль играют гидрофобные взаимодействия [3]. Обнаруженный нами конкурентный механизм активации дает основание предполагать, что байгон как соединение, обладающее липофильными свойствами [13], способствует конформационным изменениям мембраносвязанной МАО типа Б с демаскированием центров связывания и повышением сродства ФЭА к ферменту. Следует отметить, однако, что вопрос о механизме активации байгоном МАО-активности остается открытым, поскольку пока неизвестно, направлено ли воздействие байгона непосредственно на молекулу фермента МАО или оно опосредовано воздействием на биомембрану, с которой связаны молекулы этого фермента. Для однозначного решения этого вопроса

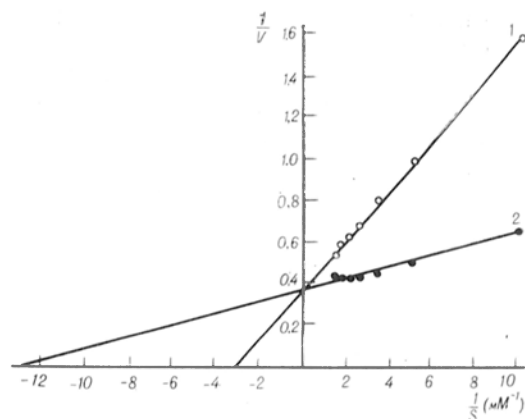


Рис. 2. Влияние 0,5 мМ байгона на окислительное дезаминирование 2-фенилэтиламина МАО митохондриальных мембран мозга крыс.

необходимо проведение экспериментов с высокоочищенными препаратами митохондриальных МАО. Циниб не стимулирует активности МАО, однако в опытах *in vivo* было отмечено избирательное торможение окислительного дезаминирования тирамина и серотонина в печени.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показали, что пестициды класса карбаматов байгон и циниб влияют на активность МАО.

Необходимо отметить, что все пестициды, производные карбаминовой кислоты, были синтезированы как антихолинэстеразные вещества. Принято считать, что механизм их токсического действия обусловлен блокадой нервных импульсов в холинергических рецепторах; происходит накопление ацетилхолина в синапсах, в результате чего наступают паралич и смерть насекомых [13]. Известно, что ацетилхолин может оказывать влияние на адренергическую передачу, принимая участие в высвобождении биогенных аминов (в частности, норадреналина) из симпатических нервных окончаний путем деполяризации биомембран и мобилизации ионов Ca^{2+} [12]. Мобилизация ионов Ca^{2+} может принимать участие в эндогенной активации МАО типа Б тромбоцитов плазмой крови человека [9]. Ранее было показано, что альдегиды, образующиеся при ферментативном дезаминировании ФЭА, тормозят транспорт ионов Ca^{2+} в везикулы и активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой АТФазы [2]. Исходя из этого можно предположить, что нарушение проницаемости мембран может быть одним из меха-

низмов токсического действия карбаматов на организм человека.

В настоящее время основным биохимическим тестом на отравление пестицидами класса карбаматов является определение активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в сыворотке крови [5]. Однако отравления карбамидами (особенно в малых дозах), сопровождаемые явными признаками расстройства функций центральной нервной системы (ЦНС), не всегда удается диагностировать при определении АХЭ сыворотки крови [5, 8]. Исходя из результатов исследований, можно предполагать, что эти отклонения от нормы функций ЦНС обусловлены изменением не только уровня ацетилхолина, но и таких нейротрансмиттеров, как биогенные амины. Временная потеря памяти, депрессия и головокружения, наблюдаемые у профессиональных опрыскивателей (бонификаторов) при работе в закрытых помещениях [5, 8], могут быть обусловлены нарушениями дофаминергических процессов, связанных с возрастанием активности МАО типа В в тканях мозга [12, 14]. Можно предполагать, что депренил как избирательный ингибитор МАО типа В вполне безопасен для человека [3, 4, 12] и будет предотвращать указанные нарушения функций ЦНС. Известно, что тромбоциты обладают определенными чертами сходства с препаратами нервных окончаний мозга в отношении механизмов активного переноса биогенных аминов, образования их резервных форм, а также набора ферментов, участвующих в обмене биогенных аминов [3]. На основании вышеизложенного можно думать, что определение активности МАО в тромбоцитах крови может служить новым чувствительным биохимическим тестом для диагностики интоксикаций пестицидами, в частности такими производными карбаминовой кислоты, как байгон.

Приношу благодарность дирекции Института биологической и медицинской химии АМН СССР за предоставление рабочего места в Лаборатории биохимии аминов и других азотистых оснований, где была выполнена экспериментальная часть настоящей работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буданцев А. Ю. Моноаминергические системы мозга. М., 1976.

2. Горкин В. З. — Хим.-фарм. журн., 1977, № 1, с. 6—13.
3. Горкин А. З. Аминоксидазы и их значение в медицине. М., 1981.
4. Горкин В. З. — Вopr. мед. химии, 1982, № 2, с. 2—9.
5. Калоянова-Симеонова Ф. Пестициды. Токсическое действие и профилактика. М., 1980.
6. Меткаф Р. А. — Бюл. ВОЗ, 1972, № 1, с. 44—65.
7. Сафразбекян Р. Р. Особенности изучения активации моноаминоксидазы. Ереван, 1983.
8. Bainova A., Zaprianov Z., Kaloyanova-Simeonova F. — Arh. hig. rada toksikol., 1979, v. 30, p. 531—535.
9. Cawthon R. M., Breakfield X. O. — Biochem. Pharmacol., 1983, v. 32, p. 441—448.
10. Denney R. M., Frits R. R., Patel N. T. et al. — Science, 1982, v. 215, p. 1400—1403.
11. Fowler C. J., Oreland L. — In: Monoamine Oxidase: Basic and Clinical Frontiers. Amsterdam, 1982, p. 28—39.
12. Knoll J. — In: Strategy in Drug Research. Amsterdam, 1982, p. 107—135.
13. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
14. Strolin-Benedetti M., Dorset P., Boucher T. et al. — In: Monoamine Oxidase: Basic and Clinical Frontiers. Amsterdam, 1982, p. 209—220.
15. Suzuki O., Katsumata Y., Oya M. — Ibid., p. 74—86.
16. Tipton K., Fowler C. J., Miles D. — Ibid., p. 87—98.

Поступила 24.04.84

STIMULATION OF 2-PHENYLETHYL-AMINE ENZYMATIC DEAMINATION USING 2-ISOPROPYL HYDROXYPHENYL-N-METHYLCARBAMATE (BIGONE)

T. A. Zeinalov

Institute of Virology, Microbiology and Hygiene, Ministry of Public Health of the Azerbaijan SSR, Baku

Carbamate-containing pesticides, particularly bigone, might alter the activity of monoamine oxidase (MAO) in vivo. Bigone was found to stimulate selectively the deamination of 2-phenylethylamine, which is a specific substrate of MAO of the B type; the stimulating effect of bigone was reversible. Kinetic studies showed that the stimulation of the enzyme in presence of bigone of the competitive type. A selective inhibitor of MAO of the B type deprenyl might prevent the impairments of the central nervous system, which are observed in the bigone intoxication. Estimation of the MAO activity in blood thrombocytes may be used as a new biochemical test in diagnosis of intoxications caused by pesticides.