

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

заминидазы и β -глюкуронидазы возрастает в 2,4 раза, α -галактозидазы — в 2,1 раза, а α -глюкозидазы — в 1,6 раза. При ОМЛ и ОММОЛ снижение активности α -маннозидазы также более выражено, чем снижение активности других ферментов. Таким образом, вероятно, при лейкозах происходит не только изменение процессов, общих для всех гликозидаз, но и некоторых процессов, касающихся отдельных гликозидаз, в частности α -маннозидазы.

Авторы выражают глубокую благодарность профессору Е. Л. Розенфельду и профессору Ф. Э. Файнштейну за участие в обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коваль С. В., Лунина Н. В., Антипчук Ю. П. — Цитол. генет., 1983, № 4, с. 61—66.
2. Кузьмичева Н. А., Видершайн Г. Я. — Вопр. мед. химии, 1984, № 5, с. 76—81.
3. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика / Под ред. Дж. Натвига и др. Пер. с англ. М., 1980, с. 9—19.
4. Преображенская М. Е., Минакова А. Л. — Вопр. мед. химии, 1984, № 1, с. 77—82.
5. Шардаков В. И., Минаков В. И. — Гематол. трансфузиол., 1984, № 5, с. 16—19.
6. Besley G. T. H., Moss S. E., Bain A. D., Dewar A. E. — J. clin. Path., 1981, vol. 34, p. 1000—1004.
7. Broadhead D. M., Besley G. T. N., Moss S. E. et al. — Leukemia Res., 1981, vol. 5, p. 29—40.
8. Dewji N., Rapson N. T., Greaves M. F., Ellis R. B. — Ibid., p. 19—27.
9. Douglas S. D., Cohnen G., König E., Brittinger C. — Blood, 1973, vol. 41, p. 511—518.
10. Ellis R. B., Rapson N. T., Patrick A. D. et al. — New Engl. J. Med., 1978, vol. 298, p. 476—480.
11. Kraaighagen R. I., Shipper-Kester G. P. M., Rijkse G. et al. — Clin. chim. Acta, 1982, vol. 118, p. 255—263.
12. Nakagawa S., Kumin S., Nitowski M. — Ibid., 1980, vol. 101, p. 33—44.
13. Tanaka T. — Hiroshima J. med. Sci., 1978, vol. 27, p. 253—259.
14. Tanaka T., Kobayashi M., Saito O. et al. — Clin. chim. Acta, 1981, vol. 117, p. 121—131.
15. Tanaka T., Kobayashi M., Saito O. et al. — Ibid., 1983, vol. 128, p. 19—28.

Поступила 25.12.84

ACID GLYCOSIDASES IN LEUKOCYTES OF PATIENTS WITH CHRONIC AND ACUTE MYELOID LEUKEMIA

A. L. Minakova, M. E. Preobrazhenskaya, N. D. Khoroshko

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Central Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Moscow

Activities of five acid glycosidases were examined in leukocytes of 30 healthy persons, 17 patients with chronic myeloid leukemia (CML) and 7 patients with acute myeloid leukemia (AML). In leukocytes of the patients with CML activities of α -D-mannosidase, N-acetyl- β -D-hexosaminidase and β -D-glucuronidase were significantly higher ($p < 0.01$) and those of α -D-galactosidase and α -D-glucosidase were somewhat higher ($p < 0.05$) as compared with control leukocytes. Activities of all five glycosidases in leukocytes of patients with AML were within the normal limits. Glycosidase activities were also examined in leukocytes of three groups of patients with CML at different stages of the disease: chronic, progressive and blast crisis. All the enzymes exhibited the highest activity in the first group of patients; the activities of these enzymes in the second group were lower and those in the third group were close to normal. When CML leukocytes were fractionated using the Ficoll-verografin method, the activities of the enzymes in the interface fraction (unmatured cells) were higher than those in the bottom fraction (matured granulocytes). These data suggest that the increased glycosidase activity in CML cells is due to the presence of the population of un-matured granulocytes which are distinct from blast cells.

УДК 616.153.1:577.152.1]-074:543.544

А. З. Киркель, Ю. П. Романюк, Г. А. Давидова,
К. М. Ермолаев, В. А. Пеккель

ОКИСЛЕНИЕ П-НИТРОБЕНЗИЛАМИНА И П-ДИМЕТИЛАМИНОМЕТИЛБЕНЗИЛАМИНА АМИНОКСИДАЗАМИ ПЛАЦЕНТЫ И СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва, Львовский НИИ педиатрии, акушерства и наследственной патологии Минздрава УССР

Бензиламин и довольно многочисленная группа его производных являются хорошими синтетическими субстратами различных аминоксидаз из многих тканей человека и животных.

Интенсивное изучение ряда бензиламинов и поиск новых производных во многом обязаны простоте и большой чувствительности спектрофотометрических методов определения активности

аминоксидаз с этими субстратами. Тестирование аминоксидаз с бензиламином и его производными осуществляется либо путем прямого фотометрирования образующихся альдегидов [11], либо после избирательной экстракции продуктов реакции органическими растворителями [10]. Особенно плодотворным обещает быть применение бензиламина и его производных в качестве субстратов для определения активности аминоксидаз при установлении факта беременности в спорных случаях и оценке степени риска невынашивания плода [8, 13, 16]. Среди известных производных бензиламина наиболее перспективными в этом отношении являются п-диметиламинометилбензиламин и п-нитробензиламин. П-диметиламинометилбензиламин давно используют как субстрат диаминооксидазы, однако имеющийся для определения аминоксидазной активности с этим субстратом кинетический метод не соответствует требованиям серийных анализов [3]. Применение в качестве субстрата п-нитробензиламина также наталкивается на некоторые трудности, связанные прежде всего с разногласиями относительно вида фермента, катализирующего окисление этого амина. Так, по данным ряда исследователей, п-нитробензиламин является субстратом диаминооксидазы почек свиньи [12, 14], однако попытка использования его в качестве субстрата диаминооксидазы плаценты человека была безуспешной [4]. Возможно, что указанные разногласия объясняются влиянием очистки на свойства фермента. Моноаминоксидаза почек быка, по-видимому, не катализирует окисление п-нитробензиламина [6]. Ввиду важности широкого внедрения в практику отечественных лечебных учреждений методов исследования активности аминоксидаз был усовершенствован способ синтеза п-нитробензиламина, разработаны удобные методы определения аминоксидазной активности с п-диметиламинометил- и п-нитробензиламинами, изучены специфичность и особенности действия на них различных аминоксидаз плаценты человека, являющейся источником ряда сывороточных ферментов при беременности, исследованы уровни окисления данных аминов в сыворотках крови здоровых и беременных женщин.

Методика

Субклеточные фракции плаценты получали путем дифференциального центрифугирования 30 % гомогената плацент в 0,25 М сахарозе. Митохондриальные фракции представляли собой осадок, полученный после центрифугирования при 10 000 g в течение 20 мин (предварительно отделяли клеточные обломки и ядра при 1500 g), отмытый дважды 0,25 М сахарозой, микросомальная фракция — отмытый осадок, полученный после центрифугирования при 125 000 g в течение 20 мин (промежуточный осадок, полученный после центрифугирования при 20 000 g, отбрасывали), растворимая фракция — надосадочная жидкость, полученная после центрифугирования при 250 000 g (60 мин) и обессоленная на колонке с сефадексом G-50.

Для синтеза п-нитробензиламина к 8,64 г п-нитробензилбромид и 7,4 г фталимида калия (не содержащего щелочи и свободного фталимида) приливали 20 мл безводного диметилформамида и тщательно перемешивали. При этом температура реакционной смеси быстро достигала 70—75 °С, после чего начинала снижаться. Реакция заканчивалась через 1 ч. Смесь перемешивали с 50 мл воды, выпавшие кристаллы отфильтровывали и промывали водой. Выход п-нитро-N-(фталионил)бензиламина составлял 11,2 г (98 %). Полученное соединение без дополнительной очистки кипятили 36 ч в смеси 100 мл уксусной кислоты и 100 мл 18 % соляной кислоты. Реакционный раствор оставляли при комнатной температуре на 12—15 ч. Выпавшую фталевую кислоту отфильтровывали и промывали холодной водой. Фильтрат упаривали в вакууме (10—15 мм), завершая этот процесс на кипящей водяной бане. Кристаллический остаток обрабатывали 50 мл воды, смесь охлаждали 2 ч при 0 °С и отделяли остатки фталевой кислоты (общий выход 90 %). Фильтрат упаривали в вакууме, как описано выше, а кристаллический остаток сушили в вакуум-эксикаторе над КОН и H₂SO₄. Кристаллы растирали с 10 мл охлажденного абсолютного этанола, отделяли и промывали этанолом и эфиром. Выход хлоргидрата п-нитробензиламина составлял 6,45 г (86 %). Бесцветные кристаллы имели температуру плавления 255—256 °С (из п-пропанола; растворимость в 100 мл кипящего растворителя 1 г). Найдено (в %): С 44,61; Н 4,98; Cl 18,95; N 14. Вычислено (в %): С 44,58; Н 4,81; Cl 18,80; N 14,85. Использование для гидролиза фталионильного производного 47 % бромистоводородной кислоты сокращает длительность реакции до 10 ч. Выхода бромгидрата п-нитробензиламина составлял 7,50 г (80 %). Температура плавления 265 °С (из п-пропанола; растворимость ~3 г). Найдено (в %): С 36,19; Н 3,87; Br 34,26; N 12,10. Вычислено (в %): С 36,08; Н 3,84; Br 34,28; N 12,02.

Синтез п-диметиламинометилбензиламина осуществляли методом, описанным ранее [3]. Ингибитор Лилли 51641 предоставил R. Fuller, депренил — J. Knoll, амингуанидин и семикарбазид были производства фирмы «Merck», HEPES — «Calbiochem», серотонин — «Reanal» меченые субстраты — «Amersham», прочие реактивы были отечественного производства.

Определение активности аминоксидаз с п-нитробензиламином и бензиламином прово-

дили методом, аналогичным описанному в литературе [10], в малых пенициллиновых флаконах с полиэтиленовыми пробками. Для исследования препаратов плаценты пробы брали объемом 1 мл, включающие в себя 0,025 М НЕРЕС-буфера, 1 мМ субстрата и ферментного материала. Для митохондрий и микросом среда имела рН 8,1, содержание белка составляло 1 мг/мл, длительность реакции 15 мин (п-нитробензиламин) или 60 мин (бензиламин) при 37°C; для растворимой фракции рН равнялся 7,0; белка было 3 мг/мл, инкубация составляла 30 или 120 мин. Останавливали реакцию 0,2 мл 1 М НСl, после чего в каждый флакон добавляли по 3 мл гексана, производили энергичное встряхивание проб на механическом шейкере в течение 5 мин и отбирали шприцем примерно 2 мл верхней органической фазы. В контрольные пробы белок добавляли после остановки реакции. Эффективность экстракции п-нитробензальдегида в этих условиях составляла 83 %, бензальдегида — 94 %. Количество указанных продуктов в гексановых экстрактах измеряли на спектрофотометре СФ-16 по оптической плотности при 258 и 241 нм соответственно против чистого гексана. Расчеты удельной активности ферментов (A) осуществляли по формуле: $A = k \cdot \Delta D / t \cdot E$ (нмоль на 1 мг в 1 мин), где ΔD — разность между оптическими плотностями опытной и контрольной проб за время реакции t (в минутах), E — количество белка в пробе (в миллиграммах). С учетом коэффициента молярной экстинкции соответствующих альдегидов (ϵ) и эффективности экстракции значение k для бензиламина составляло 244,02 ($\epsilon_{241} = 13080 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), а для п-нитробензиламина — 218,87 ($\epsilon_{258} = 16520$).

Для определения аминоксидазной активности с п-диметиламинотетилбензиламином в качестве субстрата был также использован принцип экстракции продукта реакции гексаном. Пробы содержали 0,02 М фосфатный буфер рН 7,0 1 мМ субстрат и обычно 3 мг белка растворимой фракции в 1 мл. Инкубация продолжалась 60 мин при 37°C. По истечении времени реакции к пробам добавляли 1 мл 1 М NaHCO_3 , затем сразу же 3 мл гексана, встряхивали 5 мин и измеряли оптическую плотность при 248 нм, $\epsilon = 11547$; эффективность экстракции альдегида составляла 79 %.

$$A = 328,95 \cdot \Delta D / t \cdot E.$$

Аминоксидазные активности сыворотки крови определяли в пробах объемом 1,5 мл. Пробы содержали 0,075 мл 0,04 М фосфатного буфера рН 7,0; 0,15 мл 10 мМ раствора субстрата и 0,6 мл сыворотки крови. Время реакции составляло 120 мин при 37°C. Ход анализа не отличался от описанных выше. Расчет удельных активностей (в наномолях альдегида на 1 мл сыворотки в 1 мин) осуществляли путем умножения значений оптических плотностей на коэффициенты: 3,39 для бензиламина, 3,04 для п-нитробензиламина и 4,57 для п-диметиламинотетилбензиламина.

Титрование митохондриальной моноаминоксидазы проводили по методу Аккермана — Поттера [2]. При необратимом ингибировании активности фермента стехиометрически взаимодействующим с ним ингибитором график зависимости ферментативной активности от концентрации белка параллелен в присутствии

ингибитора графику для контроля без ингибитора и отсекает на оси абсцисс величину молярного эквивалента, показывающего, при какой концентрации белка в пробе молярная концентрация фермента равна использованной концентрации ингибитора.

Участие аминоксидаз плаценты в катализе окисления п-нитробензиламина определяли путем анализа влияния этого амина на кинетику ферментативного окисления специфических радиоактивных субстратов (методом смешанных субстратов). Если исследуемый амин взаимодействует с тем же ферментом, что и субстрат, он изменяет пересечение кинетических графиков в координатах Лайнуивера — Берк с осью абсцисс ($1/K_m$) и не влияет на пересечение с осью ординат ($1/V$), т. е. конкурентно ингибирует реакцию.

Результаты и обсуждение

Изучение окисления исследуемых аминов при участии аминоксидаз субклеточных фракций плаценты показало, что окисление п-диметиламинотетилбензиламина катализируют только аминоксидазы растворимой фракции, а окисление п-нитробензиламина, так же как и бензиламина, помимо аминоксидаз растворимой фракции, катализируют также аминоксидазы митохондриальной и микросомальной фракций, содержащих только моноаминоксидазу и бензиламиноксидазу. Окислительное дезаминирование п-нитробензиламина мембраносвязанными аминоксидазами было установлено двумя независимыми методами: спектрофотометрическим (по образованию альдегида) и колориметрическим (по образованию аммиака).

Реакция ферментативного окисления п-диметиламинотетилбензиламина высокочувствительна к специфическому ингибитору диаминоксидазы аминоксидину и не блокируется ингибиторами моноаминоксидаз (табл. 1). Полученные результаты подтверждают данные литературы об окислении п-диметиламинотетилбензиламина при участии диаминоксидазы [3, 5] и указывают на то, что диаминоксидаза является единственным ферментом в плаценте человека, катализирующим окисление этого субстрата. Окисление п-нитробензиламина ингибирует все использованные ингибиторы (см. табл. 1). Судя по относительной чувствительности к избирательным ингибиторам моноаминоксидаз типов А и Б — Лилли 51641 и депренилу, окисление этого субстрата в митохондриях и микросомах катализируют главным образом

Особенности окисления производных бензиламина, катализируемого аминоксидазами плаценты человека

Свойства аминоксидаз	Митохондрии		Микросомы		Растворимая фракция		
	п-НБА	БА	п-НБА	БА	п-НБА	БА	п-ДМАМБА
Активность:							
общая	9459 11080	918 918	6636 6837	878	3316 1791	393	5076
удельная	8,14 9,53	0,79	10,50 10,82	1,39	0,49 0,26	0,058	0,75
I_{50} , мМ:							
Лилли 51641	0,000011	0,00002	0,000005	0,000025	0,0000016	+	Не ингибирует
депренил	0,00013	0,000028	0,0018	0,000063	0,001	+	Не ингибирует
семикарбазид	1,6	2	0,8	1,6	0,0016	0,005	0,00063
аминогуанидин	7,5	4	3	3,2	0,00035	0,079	0,0000063
K_m , мМ:							
диапазон	0,02—0,5	0,02—1,0	0,02—1,0	0,02—1,0	0,02—0,5	0,02—1,0	0,05—5,0
значение	0,17	0,26	0,26	0,22	0,095	0,19	0,034

Примечание. Активность в знаменателе определена по выделению NH_3 , в остальных случаях — спектрофотометрически по альдегиду. Общая активность выражена в наномолях продукта за 1 мин реакции, удельная — в наномолях на 1 мг белка в 1 мин. Значение I_{50} представляет собой концентрацию ингибитора I (в мМ), вызывающую ингибирование активности на 50% (время преинкубации 30 мин при 37 °C). Знаком + отмечены случаи, когда степень ингибирования составляла всего 10%. Здесь и в табл. 2 и 3: п-НБА — п-нитробензиламин, п-ДМАМБА — п-диметиламинометилбензиламин, БА — бензиламин.

моноаминоксидазы типа А, а несколько повышенная чувствительность реакции к семикарбазиду наводит на мысль об участии в ней мембраносвязанной бензиламиноксидазы [7]. Окисление п-нитробензиламина при участии моноаминоксидаз типа А подтверждается также необратимостью действия Лилли 51641 уже при 30-минутной преинкубации с ферментом и обратимым ингибированием депренилом даже при 3-часовой преинкубации (рис. 1). Концентрация моноаминоксидазы А, по данным титрования ингибитором Лилли 51641, составляла 156 пмоль на 1 мг белка, число оборотов (молекулярная активность) для п-нитробензиламина — 61 моль продукта на 1 моль фермента в 1 мин.

Анализ кривых ингибирования с 3-часовой преинкубацией (рис. 2) показал, что при всех испытанных условиях ингибиторы моноаминоксидазы не ингибировали окисление п-нитробензиламина митохондриями и микросомами полностью, а какая-то его доля (5—10%) всегда окислялась при участии фермента, устойчивого к действию Лилли 51641 и депренила. Поскольку, судя по кривым ингибирования семикарбазидом и аминогуанидином, в системе является фермент с повышенной чув-

ствительностью к реагентам на карбоксильную группу, катализирующей окисление аналогичной доли п-нитробензиламина, можно допустить, что этот амин является субстратом мембраносвязанной бензиламиноксидазы (БАО или CRAO), обладающей высокой чувствительностью к семикарбазиду и резистентной к ацетиленовым ингибиторам моноаминоксидазы [7]. При высо-

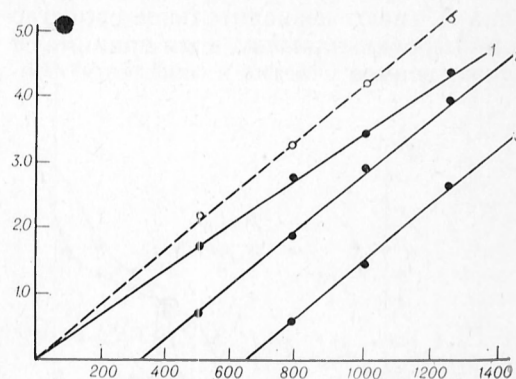


Рис. 1. Титрование митохондриальной моноаминоксидазы ингибитором Лилли 51641.

По оси абсцисс — концентрация митохондриального белка в пробе (в мг/мл), по оси ординат — скорость окисления субстрата (в нмоль/мин). Концентрация п-нитробензиламина 1 мМ, концентрация депренила 10^{-7} М (1), концентрация Лилли 51641 $5 \cdot 10^{-8}$ М (2) и 10^{-7} М (3). Преинкубация с депренилом 180 мин при 37 °C, с Лилли 51641 30 мин при 37 °C. Пунктиром представлен график контрольного опыта (в отсутствие ингибитора).

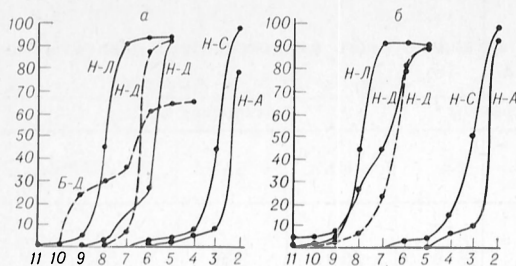


Рис. 2. Ингибирование окисления бензиламина и п-нитробензиламина в митохондриях и микросомах плаценты человека различными ингибиторами.

а — митохондрии, б — микросомы. Здесь и на рис. 3 по оси абсцисс — отрицательный логарифм концентрации ингибитора, по оси ординат — степень ингибирования (в %); концентрация бензиламина (Б) 1 мМ и п-нитробензиламина (П) 1 мМ — сплошная линия и 0,1 мМ — пунктирная линия. Л — Лилли 51641, Д — депренил, С — семикарбазид, А — аминогуанидин. Препарация с ингибиторами моноаминоксидаз 180 мин при 37 °С.

кой концентрации п-нитробензиламина (1 мМ) в его окислении, по-видимому, начинает принимать участие особая форма моноаминоксидазы, имеющая одинаковую чувствительность к Лилли 51641 и депренилу, обнаруженная ранее в опытах с бензиламином в качестве субстрата [9] и названная моноаминоксидазой типа Б'. Согласно положению плато на кривой ингибирования депренилом (см. рис. 2), доля участия этой формы моноаминоксидазы в общем окислении 1 мМ п-нитробензиламина составляет 35% для микросом и 20% для митохондрий (см. рис. 2). Однако БАО и моноаминоксидазы типа Б' в отличие от моноаминоксидазы типа А имеют незначительное сродство к п-нитробензиламину, хотя принимают существенное участие в окислении бен-

зиламина. По данным ингибиторного анализа, доля БАО в окислении 0,1 мМ бензиламина, катализируемого аминоксидазами митохондрий, составляет 30%, доля моноаминоксидазы Б' — 35%. «Классическая» моноаминоксидаза Б катализирует окисление 30% бензиламина, а количественно преобладающая в плаценте форма А моноаминоксидазы — лишь незначительную его часть (5%). Приведенные результаты свидетельствуют о том, что заместители в пара-положении молекулы бензиламина решающим образом влияют на способность этого соединения служить субстратом той или иной аминоксидазы. Введение в пара-положение нитро-группы оказывается достаточным для того, чтобы бензиламин почти полностью утратил свойства субстрата моноаминоксидазы типа Б; введение нитрогруппы в пара-положение превращает бензиламин в субстрат моноаминоксидазы типа А, т. е. осуществляется так называемый А-сдвиг [5]. Введение в пара-положение диметиламинометильной группировки лишает бензиламин свойства окисляться при участии моноаминоксидаз (скорее всего из-за стерических препятствий), приводя к получению субстрата, чрезвычайно специфичного для диаминоксидазы.

Пара-нитропроизводное бензиламина оказалось субстратом диаминоксидаз. Как следует из ингибиторного анализа растворимой фракции, доля диаминоксидазы в окислении 1 мМ п-нитробензиламина составляла 55%, а доля моноаминоксидазы типа А — 30% (рис. 3). Конкурентный характер ингибирования п-нитробензиламином окис-

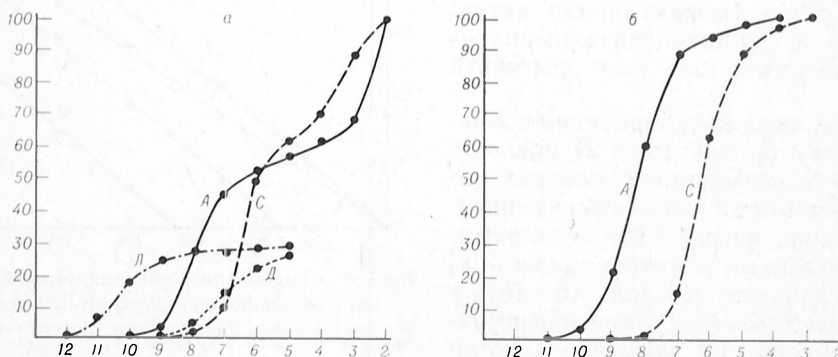


Рис. 3. Ингибирование окисления производных бензиламина в растворимой фракции гомогената плаценты человека различными ингибиторами.
а — п-нитробензиламин, б — п-диметиламинометилбензиламин.

Участие аминоксидаз плаценты в окислении бензиламина и его производных

Аминоксидазы	Митохондрии				Микросомы			Растворимая фракция		
	п-НБА		БА		п-НБА		БА	п-НБА	БА	п-ДМЛМБА
	0,1 мМ	1,0 мМ	0,1 мМ	1,0 мМ	0,1 мМ	1,0 мМ	1,0 мМ	1,0 мМ	1,0 мМ	1,0 мМ
Моноаминоксидаза:										
А	95	75	5	20	92	55	10	30	10	0
Б	0	0	30	10	0	0	15	0	10	0
Б'	0	20	35	60	0	35	50	0	10	0
Бензиламиноксидаза	5	5	30	10	8	10	25	15	50	0
Диаминоксидаза	0	0	0	0	0	0	0	55	20	100

Примечание. Представлены доли участия плацентарных аминоксидаз в окислении изучаемых аминов (в % от общего уровня).

ления ^{14}C -путресцина и ^{14}C -серотонина (рис. 4) подтверждает участие обеих аминоксидаз в катализе реакции окислительного дезаминирования п-нитробензиламина, а полученные при этом значения констант ингибирования позволяют заключить, что диаминоксидаза ($K_i=0,085\text{ мМ}$) имеет к п-нитробензиламину значительно большее сродство, чем моноаминоксидаза ($K_i=0,37\text{ мМ}$). Такой же вывод можно сделать, если сравнить значение K_M для окисления п-нитробензиламина в растворимой фракции, где эта реакция в большей степени катализируется диаминоксидазой, со значением K_M для

митохондриальной моноаминоксидазы типа А (см. табл. 1). Окисление бензиламина в растворимой фракции, по данным ингибиторного анализа, катализирует главным образом растворимая бензиламиноксидаза. Однако диаминоксидаза и моноаминоксидаза также участвуют в окислении этого амина, хотя и в небольшой степени. Примерные доли участия различных аминоксидаз плаценты в окислении бензиламина и п-нитробензиламина представлены в табл. 2. Полученные данные свидетельствуют о том, что п-нитробензиламин является субстратом практически всех известных аминоксидаз плаценты, включая растворимую бензиламиноксидазу, по-видимому, аналогичную сывороточному ферменту, и поэтому мало пригоден для оценки уровней определенных ферментов при беременности (табл. 3). В то же время п-диметиламинометилбензиламин, являясь высокоспецифическим субстратом диаминоксидазы, может быть использован для анализа изменения активности этого фермента в процессе беременности. Динамика изменения активности диаминоксидазы с п-диметиламинометилбензиламином в качестве субстрата при неосложненной беременности представлена на рис. 5. Ряд авторов [13, 16] считают, что путем сопоставления динамики изменения активности диаминоксидазы в процессе беременности с ходом «нормальной» кривой можно оценить степень риска невынашивания плода (примерный ход кривой при угрозе прерывания беременности показан на рис. 5 пунктиром). Скорость окисления п-нитробензиламина в сыворотке беременных сохраняется неизменной на довольно высоком уровне примерно до

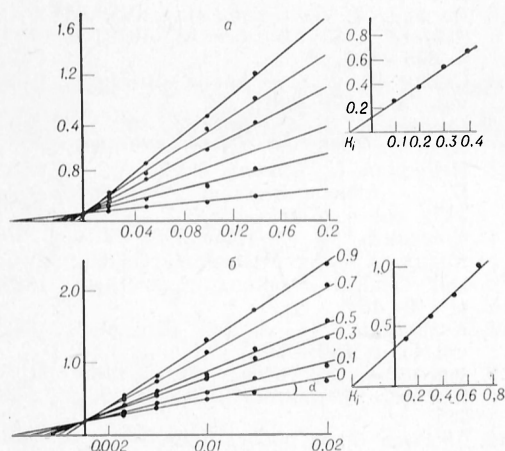


Рис. 4. Характер ингибирования п-нитробензиламином окисления меченых путресцина и серотонина в растворимой фракции гомогената плаценты человека.

Графики зависимости скорости реакции (v) окисления ^{14}C -путресцина (а) и ^{14}C -серотонина (б) от концентрации субстрата (S) в координатах Лайнуивера — Берка в отсутствие и в присутствии различных концентраций п-нитробензиламина (мМ). На вставках помещены вторичные графики зависимости наклонов ($\text{tg } \alpha$) от концентрации п-нитробензиламина (II), позволяющие рассчитать значения констант ингибирования (K_i).

Активность аминоксидаз сыворотки крови с бензиламином и его производными, используемыми в качестве субстратов

Субстрат	Мужчины		С	Женщины		
	число доно- ров	активность		число доно- ров	активность	С
п-ДМАМБА	75	0,067	142	40	0,071	100
п-НБА	64	0,628	74	30	0,427	64
БА	81	0,569	32	38	0,618	31

Примечание. Активность выражена в наномолях освобождаемого альдегида на 1 мл сыворотки в 1 мин. С — коэффициент вариации, $S = \frac{\sigma}{M} \cdot 100\%$ (σ — среднее квадратическое отклонение, M — среднеарифметические значения).

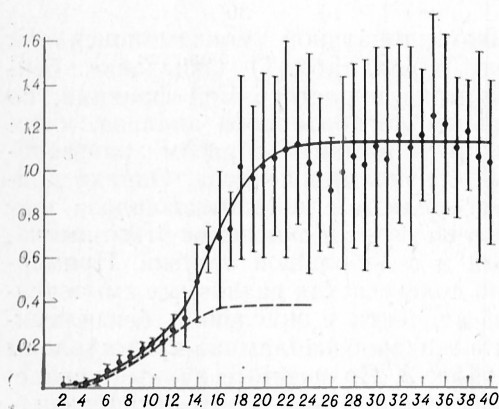


Рис. 5. Диаминооксидазная активность сыворотки крови человека с п-диметиламинометилбензиламином в качестве субстрата при беременности.

Здесь и на рис. 5 по оси абсцисс — срок беременности (в нед.); по оси ординат — скорость окисления 1 мМ п-диметиламинометилбензиламина на 1 мл сыворотки в 1 мин. Каждая точка представляет собой среднее значение из данных анализа сывороток 10–12 женщин с одинаковыми сроками беременности. Пунктиром показан гипотетический ход кривой при угрозе невынашивания плода.

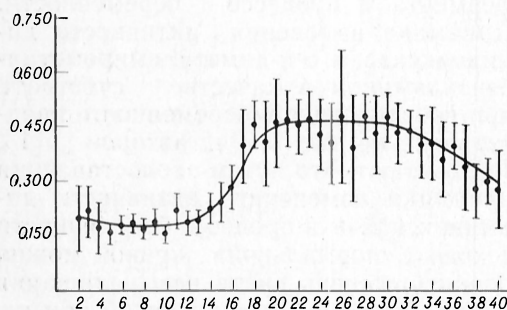


Рис. 6. Аминоксидазная активность сыворотки крови с п-нитробензиламином в качестве субстрата при беременности.

Каждая точка представляет собой среднее значение из данных анализа сывороток крови 2–26 женщин с одинаковыми сроками беременности.

14-й недели беременности, а затем незначительно повышается (рис. 6). Это повышение, по-видимому, связано с изменением активности диаминооксидазы в ходе беременности, но высокая исходная скорость окисления п-нитробензиламина и небольшой прирост активности, наблюдаемый в период от 14-го до 20-й недели беременности, свидетельствуют о непригодности такого теста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Деркач М. П. — В кн.: Элементы статистической обработки результатов биологического эксперимента. Львов, 1963, с. 1–68.
2. Ackermann W. W., Potter V. R. — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 1949, vol. 72, p. 1–9.
3. Bardsley W. G., Crabbe M. J., Shindler J. S., Ashford J. S. — Biochem. J., 1972, vol. 127, p. 875–879.
4. Crabbe M. J. C. — Analyt. Biochem., 1976, vol. 75, p. 676–681.
5. Crabbe M. J. C., Bardsley W. G. — Biochem. J., 1976, vol. 155, p. 679–687.
6. Hellerman L., Chuang H. Y. K., De Luca D. C. — Advanc. Biochem. Psychopharmacol., 1972, vol. 5, p. 327–337.
7. Kinemuchi H., Morikawa F., Tajima H., Kamijo K. — In: Monoamine Oxidase. Basic and Clinical Frontiers. Amsterdam, 1982, p. 112–124.
8. Kobayashi Y. — J. Lab. clin. Med., 1963, vol. 62, p. 699–702.
9. Lewinsohn R., Glover V., Sandler M. — Biochem. Pharmacol., 1980, vol. 29, p. 777–781.
10. McEwen C. M., Cohen J. O. — J. Lab. clin. Med., 1963, vol. 62, p. 766–772.
11. Tabor C. W., Tabor H., Rosenthal S. M. — J. biol. Chem., 1954, vol. 208, p. 645–661.
12. Tourkov M. I., Klimova G. I., Davydova G. A. et al. — Analyt. Biochem., 1975, vol. 64, p. 177–185.
13. Weingold A. B., Southren A. L., Lee B. O. — Int. J. Fertil., 1971, vol. 16, p. 24–35.
14. Zeller E. A. — Advanc. Biochem. Psychopharmacol., 1972, vol. 5, p. 167–180.
15. Zeller E. A., Arora K. L., Gurne D. H., Huprikar S. V. — In: Monoamine Oxidase:

- Structure, Function and Altered Functions. New York, 1979, p. 101—120.
16. Zeller E. A., Birkhauser H. — Schweiz. med. Wschr., 1940, Bd 70, S. 975.

Поступила 25.12.84

OXIDATION OF P-NITROBENZYLAMINE AND P-DIMETHYLAMINOMETHYLBENZYLAMINE CATALYSED BY AMINE OXIDASES FROM HUMAN PLACENTA AND BLOOD SERUM

A. Z. Kirkel, Yu. P. Romanyuk, G. A. Davydova, K. M. Ermolaev, V. A. Pekkel

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow, Institute of Pediatrics, Obstetrics and Hereditary Pathologies, Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Lvov

Oxidation of p-nitro- and p-dimethylaminomethyl derivatives of benzylamine, catalyzed by amine oxidases from human placenta and blood serum, was studied. The amine oxidase activity was estimated by means of a spectrophotometric procedure involving measurement of aldehyde formed during the reaction after extraction with hexane. For extraction of benzaldehyde and p-nitrobenzaldehyde in the samples HCl was added up to the concentration of 0.17 M

and for extraction of p-dimethylaminomethyl benzaldehyde — NaHCO_3 up to the 0.5 M concentration. The reaction products were extracted with a yield of 94 %, 83 % and 78 % respectively; molar extinction coefficients for aldehydes at the maximal absorption were equal to 13,080 (241 nm), 16,520 (258 nm), and 11,547 (248 nm), respectively. Analysis of the oxidative reactions using inhibitors Lilly 51,641, deprenyl, aminoguanidine and semicarbazide showed that monoamine oxidase of the A type (95 %) and benzylamine oxidase (7 %) catalyzed oxidation of 0.1 mM p-nitrobenzylamine in mitochondria and microsomes but oxidation of the substrate at 1 mM concentration was catalyzed by monoamine oxidase of the B type (20 % in mitochondria and 35 % in microsomes). In the soluble fraction oxidation of p-nitrobenzylamine was catalyzed mainly by diamine oxidase (55 %); monoamine oxidase of the A type catalyzed oxidation of 30 % of the amine, benzylamine oxidase — 15 %. The molecular activity of the mitochondrial monoamine oxidase of the A type with p-nitrobenzylamine as a substrate was equal to 61 nmol of the product per 1 mole of the enzyme per 1 min. Since only diamine oxidase catalyzed the p-dimethylaminomethylbenzylamine oxidation in the soluble fraction of placenta this substrate might be used in clinical studies for evaluation of diamine oxidase secretion into blood in pregnancy.

УДК 579.873.21:579.222:577.152.633

Е. В. Шаркова, И. И. Никольская, П. Шомоди, И. Фельдеш, С. С. Дебов

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЙ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ДНК-МЕТИЛАЗ ИЗ КЛЕТОК MYCOBACTERIUM SMEGMATIS BUTYRICUM

НИИ медицинской энзимологии АМН СССР, Москва, Исследовательская группа микробиологии Национального института гигиены, ВНР, Будапешт

Согласно данным литературы, ДНК-метилазы аденина и цитозина, полученные из различных бактериальных источников, характеризуются крайней лабильностью [3, 7, 12, 24, 25]. Вопрос о стабилизации этих ферментов приобретает особую актуальность в связи с возможностью практического использования индивидуальных сайт-специфических ферментов метилирования для изучения первичной структуры ДНК [2, 20]. Одним из подходов к решению этой задачи является подбор различных условий, при которых степень инактивации индивидуальных метилаз минимальна.

Целью настоящей работы было изучение влияния различных факторов на изменение при хранении активности адениновых метилаз из *Mycobacterium smegmatis butyricum*, полученных методом изоэлектрофокусирования (ИЭФ).

Методика

В работе использовали бактериальный штамм *M. sm. butyricum* из музея Исследовательской группы микробиологии Национального института гигиены (Будапешт). Акценторная ДНК тимуса — коммерческий препарат фирмы «Serva» (ФРГ). Донором метильных групп служил меченый S-аденозил-L-метионин ($^3\text{H-SAM}$) с удельной активностью 15 Ки/ммоль фирмы «Amersham» (Англия). Амфолины — фирмы «LKB» (Швеция), глицерин и сахара — фирмы «Serva» (ФРГ). Остальные реактивы — аналитической степени чистоты.

Выращивание клеток *M. sm. butyricum*, получение грубого клеточного экстракта и суммарного белкового препарата, осаждаемого при 0.8 насыщении аммония сульфата (фракция СА), описаны ранее [6, 11].

ИЭФ на амфолинах проводили в градиенте плотности глицерина 0—60 % на колонке объемом 110 мл, используя 1 % раствор амфолинов в диапазоне pH 3.5—10.0 [8]. Фракции метилаз после ИЭФ хранили при -10°C .

К фракциям при хранении добавляли различные компоненты в следующих конечных концентрациях: MgCl_2 и CaCl_2 — $2 \cdot 10^{-3}$ М, сывороточный альбумин — 1 мг/мл, фенил-