

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

Архив журнала

## **Вопросы медицинской химии**

*ISSN 0042-8809*

1989

**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*

1989

**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 35

БЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989

ВОПРОСЫ  
МЕДИЦИНСКОЙ  
ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. А. ТУТЕЛЬЯН

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)  
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)  
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)  
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)  
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

И. А. Горошинская, Т. Стоянович, Д. В. Милич, Б. Б. Мршуля

## СВОЙСТВА МОНОАМИНОКСИДАЗЫ В МОЗГЕ МОНГОЛЬСКИХ ПЕСЧАНОК ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

НИИ биологии Ростовского-на-Дону университета, Институт биохимии Белградского университета, СФРЮ

В настоящей работе представлены результаты исследования влияния церебральной ишемии на активность, субстратную специфичность и кинетические свойства моноаминоксидазы (МАО) в митохондриальной фракции коры головного мозга, стриатума и гиппокампа. МАО (КФ 1.4.3.4) — ключевой фермент обмена моноаминов, выполняющих медиаторные функции. В мозге и ряде других тканей различают две формы фермента: МАО типа А (субстраты серотонин, норадреналин, ингибитор хлоргилин) и МАО типа Б (субстраты бензиламин,  $\beta$ -фенилэтиламин и метилгистамин, ингибитор депренил). Дофамин, тирамин, триптамин, а также кинурамин являются общими субстратами для обеих форм фермента [16, 22].

При ряде патологических состояний, сопровождающихся стимуляцией перекисного окисления липидов (ПОЛ), обнаружены обратимые качественные изменения активности (трансформация) МАО типа А, выражающиеся в снижении активности фермента по отношению к специфическим субстратам и появлению способности дезаминировать диамины, полиамины, аминосакхара и некоторые другие вещества, в норме не являющиеся субстратами МАО [4]. Такие изменения свойств МАО имеют место при лучевом поражении, злокачественном росте, гипервитаминозе D<sub>2</sub> [4], гипероксии [6], туберкулезе [5], холодном стрессе [8] экспериментальной гиперхолестеринемии [12], черепно-мозговой травме [1]. Снижение активности МАО типа А с субстратами серотонином и норадреналином и появление способности фермента дезаминировать глюкозамин, путресцин и АМФ обнаружены нами ранее при высотной гипоксии [7]. Можно предполагать, что подобные изменения свойств МАО будут иметь место и при гипоксическом состоянии другой этиологии — церебральной ишемии.

### Методика

В работе использовано 80 половозрелых монгольских песчанок обоего пола массой 50—60 г. Ишемию головного мозга вызывали путем двустороннего пережатия общих сонных артерий в шейном отделе [14]. Ранее у монгольских песчанок с двусторонней окклюзией сонных артерий были обнаружены биохимические изменения, характерные для ишемии, и положительные неврологические признаки инсульта [18]. Животных декапитировали сразу после 1- и 5-минутной ишемии. Все последующую обработку проводили на холоду. В одном опыте объединяли участки мозга, полученные от 4—5 животных, в каждой группе использовано от 16 до 32 песчанок. Субфракцию чистых митохондрий получали центрифугированием в градиенте фиколла [15, 20]. Активность МАО с субстратом кинурамином определяли микрофлюориметрическим методом [19]. Исследовали также интенсивность дезаминирования глюкозамина по скорости образования глюкозы, о котором судили по образованию восстановленного НАДФ в присутствии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и гексокиназы. Глюкозамин использовали в концентрации 10 мМ. Белок определяли по методу Bradford [13]. На основании величин активности фермента при 6 различных концентрациях кинурамин (от 0,1 до 1 мМ) строили кривые зависимости начальной скорости (V) реакции дезаминирования кинурамин от концентрации субстрата [S]<sub>0</sub>. При исследовании влияния хлоргилина митохондриальную фракцию пренкубировали в течение 15 мин при 20 °С с ингибитором в концентрации 10<sup>-6</sup> М, при которой он оказывает максимально избирательное действие на МАО типа А [25]. Поскольку хлоргилин вызывает практически полное ингибирование МАО типа А, остаточную после инкубации с ингибитором активность рассматривали как активность МАО типа Б, а по разности между общей и остаточной активностью судили об активности МАО типа А. Статистическую достоверность различий определяли по критерию *t* Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, общая активность МАО, (субстрат кинурамин) не изменяется в условиях 1-минутной билатеральной ишемии в митохондриях коры и стриатума, лишь в гиппокампе отмечается тенденция к снижению. При 5-минутной ишемии активность фермента значительно снижается во всех исследованных отделах мозга: в коре на 69 %, в стриатуме на 65 %, в

Деаминарование кинуранина и глюкозамина (в нмоль/мин на 1 мг белка) в митохондриях мозга монгольских песчанок при ишемии

Условия опыта	Кора головного мозга		Стриатум		Гиппокамп	
	кинуранин	глюкозамин	кинуранин	глюкозамин	кинуранин	глюкозамин
Контроль	2,61±0,27	1,47±0,32	2,70±0,25	1,12±0,37	2,31±0,29	0,40±0,21
Ишемия: 1 мин	2,88±0,27	1,97±0,33	2,62±0,32	2,03±0,28	1,70±0,08	1,58±0,36*
5 мин	0,82±0,05*	2,85±0,38*	0,94±0,03*	3,01±0,36*	0,76±0,04*	3,01±0,76*

Примечание. Здесь и в табл. 2 представлены средние ( $M \pm m$ ) данные 4—8 опытов. Звездочка— $p < 0,001$ — $0,05$ .

Таблица 2

Активность МАО (в нмоль/мин на 1 мг белка) в митохондриях мозга монгольских песчанок при 5-минутной ишемии

Активность МАО	Кора головного мозга		Стриатум		Гиппокамп	
	контроль	ишемия	контроль	ишемия	контроль	ишемия
Общая	2,22±0,17	0,93±0,13*	2,06±0,13	0,85±0,02*	1,56±0,13	0,82±0,07*
МАО типа А	1,70±0,16	0,70±0,15*	1,56±0,14	0,58±0,06*	1,26±0,12	0,67±0,06*
МАО типа Б	0,53±0,01	0,23±0,02*	0,50±0,02	0,27±0,03*	0,30±0,01	0,15±0,01*

гиппокампе на 67 %. Снижение активности МАО при 5-минутной ишемии сопровождается 2—7-кратным усилением интенсивности деаминации глюкозамина. Достоверное повышение глюкозаминдеаминазной активности в гиппокампе наблюдается уже при 1-минутной ишемии.

Опыты с избирательно действующим ингибитором МАО типа А хлоргилином показали, что в условиях ишемии ингибируется в одинаковой степени и МАО типа А, и МАО типа Б (табл. 2).

Во всех трех исследованных отделах мозга интактных животных кривые зависимости начальной скорости реакции деаминации кинуранина от концентрации субстрата имели гиперболический вид. В условиях ишемии форма кривых изменялась, они приобретали более сложный негиперболический характер. В митохондриальной фракции коры головного мозга и стриатума существенное отклонение формы кривых от гиперболического вида наблюдалось только при 5-минутной ишемии (рис. 1). Наиболее сложную форму приобретали кривые зависимости  $V$  от  $[S]_0$  в митохондриальной фракции гиппокампа. В этом случае значительные отклонения формы кривых от гиперболического характера имели ме-

сто как при 5-минутной, так и при 1-минутной ишемии (рис. 2).

Следует отметить, что данные литературы о характере кинетических кривых МАО противоречивы. Для митохондриальной МАО из печени крыс показано, что кривые зависимости  $V$  от  $[S]_0$  субстрата серотонина имеют сложный негиперболический характер, значительно зависящий от возраста и линии животных. Кинетические кривые при использовании в качестве субстра-

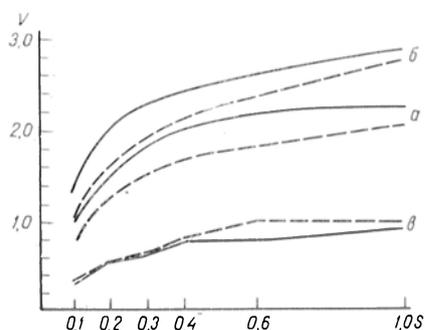


Рис. 1. Зависимость скорости деаминации кинуранина ( $V$ , нмоль/мин на 1 мг белка) МАО митохондрий коры головного мозга (сплошная линия) и стриатума (пунктирная линия) монгольских песчанок от концентрации субстрата ( $S$ , мм) в норме и при ишемии. а — контроль; б — ишемия в течение 1 мин; в — в течение 5 мин.

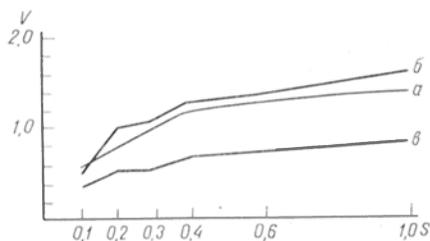


Рис. 2. Зависимость скорости дезаминирования кинурамина МАО митохондрий гиппокампа монгольских песчанок от концентрации субстрата в норме и при ишемии. Обозначения те же, что и на рис. 1.

та тирамина, как и кинурамина, являющегося общим субстратом для МАО типов А и Б, были значительно проще, хотя также не имели гиперболической формы [3]. Другие авторы не сообщали о сложности кинетических кривых реакций, катализируемых МАО. Полученные нами данные позволяют предположить, что характер кинетических кривых МАО мозга в отличие от печени менее сложен и подчиняется уравнению Михаэлиса—Ментен. Поскольку все опыты по изучению кинетики МАО из мозга интактных животных и животных с ишемией проводились параллельно и в идентичных условиях, обнаруженное нами усложнение формы кинетических кривых обусловлено влиянием ишемического фактора.

Снижение активности МАО со специфическим субстратом кинурамином при параллельном резком увеличении интенсивности дезаминирования глюкозамина, в норме не являющегося субстратом МАО, позволяет предположить, что в условиях церебральной ишемии происходит качественное изменение каталитических свойств МАО, сходное с обнаруженным при других патологических состояниях.

Ранее нами было показано, что усиление интенсивности дезаминирования глюкозамина и других необычных субстратов при высокой гипоксии, гипероксии и холодовом стрессе предотвращается предварительным введением животным ингибитора МАО типа А хлоргилина или преинкубацией ферментного препарата с хлоргилином, что свидетельствует об изменении в этих условиях субстратной специфичности МАО типа А [7, 8, 10]. Можно думать, что и при церебральной ишемии выраженное усиление в митохонд-

риальной фракции глюкозаминдезаминазной активности связано с изменением субстратной специфичности МАО типа А, в результате которого эта форма фермента приобретает способность дезаминировать глюкозамин.

Изменение каталитических свойств МАО при ишемии обусловлено, по-видимому, окислением сульфгидрильных групп фермента липидными перекисями, накопление которых имеет место в данных условиях и рассматривается как один из основных факторов развития ишемии [11, 17, 24]. В то же время изменение субстратной специфичности МАО, ведущее к образованию продуктов со свойствами прооксидантов, может способствовать дальнейшему усилению процессов ПОЛ [9]. Взаимосвязь между ингибированием МАО и интенсификацией ПОЛ обнаружена при ишемии миокарда у крыс [2]. Изменение каталитических свойств МАО может вносить существенный вклад в развитие характерных для ишемии нарушений метаболизма. В частности, снижение моноаминоксидазной активности, возможно, служит одной из причин уменьшения уровня обратного захвата норадреналина, обнаруженного при ишемии [21]. Появление способности МАО дезаминировать глюкозамин — структурный компонент мембран — может обусловить нарушение ультраструктуры нейронов в процессе ишемии [23].

Полученные данные свидетельствуют о снижении активности, изменении субстратной специфичности и изменении формы кинетических кривых МАО во всех исследованных отделах мозга при 5-минутной ишемии. В гиппокампе изменения свойств МАО наблюдаются уже при 1-минутной ишемии головного мозга.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аюлян А. С., Промыслов М. Ш. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 1. — С. 75—77.
2. Бахова Л. К., Фадеева Т. К. // Там же. — 1988. — № 1. — С. 22—25.
3. Васильевых Л. Г., Горкин В. З., Каган З. С. // Биохимия. — 1979. — Т. 44, № 9. — С. 1542—1550.
4. Горкин В. З. // Молекул. биол. — 1976. — № 4. — С. 717—736.
5. Горкин В. З., Елистратова Н. А. // Вопр. мед. химии. — 1979. — № 6. — С. 743—748.
6. Горошинская И. А., Броновицкая З. Г. // Там же. — 1976. — № 3. — С. 558—562.

7. Горошинская И. А., Брновицкая З. Г., Кричевская А. А., Кабарухина Е. Г. // Нейрохимия. — 1982. — № 3. — С. 282—286.
8. Горошинская И. А., Кричевская А. А., Брновицкая З. Г. // Бюл. exper. биол. — 1981. — № 4. — С. 431—433.
9. Каган В. Е., Смирнов А. В., Савов В. М., Горкин В. З. // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 1. — С. 112—118.
10. Кричевская А. А., Горошинская И. А., Федоренко Г. М., Ходакова А. А. // Нейрохимия. — 1986. — № 1. — С. 37—44.
11. Селиченко В. В., Подузков Л. В., Конвай В. Д. // Бюл. exper. биол. — 1983. — № 7. — С. 12—14.
12. Хужамбердиев М. М., Сайдуллаев Т., Маладиев М., Горкин В. З. // Нейрохимия. — 1986. — № 3. — С. 277—285.
13. Bradjori M. // *Analyt. Biochem.* — 1976. — Vol. 72. — P. 248—251.
14. Свєјић В., Мићић Д. В., Ђуричић В. М. et al. // *Acta neuropath.* — 1980. — Vol. 51. — P. 71—77.
15. Gurd J. W., Jones L. R., Mahler H. R., Moore W. J. // *J. Neurochem.* — 1974. — Vol. 22. — P. 281—290.
16. Hall T. R., Figueroa H. R. // *Pharmacol. Res. Commun.* — 1982. — Vol. 14, N 5. — P. 431—441.
17. Imaizumi S., Kayama T., Suzuki J. // *Stroke.* — 1984. — Vol. 15, N 6. — P. 1061—1065.
18. Kobayashi M., Lust W. D., Passonneau J. V. // *J. Neurochem.* — 1977. — Vol. 29, N 1. — P. 53—59.
19. Krajl M. // *Biochem. Pharmacol.* — 1965. — Vol. 14. — P. 1683—1685.
20. Morgan I. G., Wolfe L. S., Mandel P., Gombos G. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1971. — Vol. 241. — P. 737—751.
21. Mrsulja B. B., Mrsulja B. J., Свєјић В. et al. // *J. Neural. Transmis.* — 1978. — Vol. 14. — P. 23—30.
22. Neff N. H., Yang H.-Y. T. // *Life Sci.* — 1974. — Vol. 14, N 11. — P. 2061—2078.
23. Petito C. K., Pulsinelli W. A. // *J. Neuro-path. exp. Neurol.* — 1984. — Vol. 43, N 2. — P. 141—153.
24. Watson B. D., Busto R., Goldberg W. J. et al. // *J. Cerebr. Blood Flow.* — 1983. — Vol. 3, N 1. — P. 325—326.
25. Yang H.-Y. T., Neff N. H. // *J. Pharmacol. exp. Ther.* — 1973. — Vol. 187, N 2. — P. 365—371.

Поступила 08.09.88

#### PROPERTIES OF MONGOLIAN GERBILS BRAIN MONOAMINE OXIDASE DURING CEREBRAL ISCHEMIA

I. A. Goroshinskaya, T. Stojanovic, D. V. Micic, B. B. Mrsulja

Institute of Biology, State University, Rostov-on-Don, Institute of Biochemistry, Belgrade University, Yugoslavia

Properties of monoamine oxidase (MAO) were investigated in mongolian gerbils brain mitochondria isolated from cerebral cortex, striatum and hippocampus during cerebral ischemia. 5 min of ischemia caused inhibition of MAO activity (kynuramine as a substrate), alterations in substrate specificity and in kinetic curves form deflexion from hyperbolic type in all the brain structures investigated. Alterations in properties of MAO were observed in hippocampus already after 1 min of ischemia.

УДК 615.919:598.12].017:615.273.53

С. М. Струкова, А. Е. Коган, А. А. Тара, А. А. Аавиксаар

#### ПРОТИВОТРОМБОТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ АКТИВАТОРА ПРОТЕИНА С ИЗ ЗМЕИНОГО ЯДА

Кафедра физиологии человека и животных МГУ им. М. В. Ломоносова, сектор биохимии ИХБФ АН ЭССР, Таллинн

Протени С — витамин К-зависимый белок, циркулирующий в крови в виде профермента — предшественника сериновой протениазы [11]. Активация протенина С в организме происходит под действием тромбина, который отщепляет от него 14-членный (в случае протенина С из крови быка) пептид, превращая белок в активную форму [7]. Этот процесс происходит при участии рецептора тромбина — тромбомодулина, расположенного на эндотелии сосудов и ускоряющего активацию протенина С на 3 порядка [5]. Активированный протенин С тормозит свертывание крови, расщепляя прокоагулянтные факторы крови V, Va,

VIII, VIIIa [9] и, следовательно, является антикоагулянтом. Кроме того, активированный протенин С обладает профибринолитическими свойствами, участвуя в высвобождении тканевого активатора плазминогена [4].

Наследственная недостаточность протенина С сопровождается высоким риском возникновения тромботических и тромбоэмболических осложнений [6]. Однако тромботические осложнения при инфаркте миокарда, диабете [13], нефротическом синдроме [10] не сопровождаются активацией протенина С в крови. В связи с этим поиск экзогенных активаторов протенина С представляется весьма актуальным.