

УДК 557.15.02; 577.15.06

©Москвитина

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА МОНОАМИНОКСИДАЗ СУБКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР В НОРМЕ И ПРИ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

Т.А. Москвитина

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН, Москва, 119121,
Погодинская ул., д. 10; тел.: (495)246-33-75; факс: (495)245-08-57;
эл.почта: tatyana.moskvitina@ibmc.msk.ru

В работе показана зависимость скорости восстановления активности МАО от сезонности в различных компартментах клетки *in vivo* после необратимого торможения паргилином. Алкоголизация приводит к снижению скорости восстановления активности мембраносвязанных форм МАО в печени крысы.

По зависимости скорости восстановления активности после необратимого ингибирования *in vivo* цитозольная МАО резко отличается от мембраносвязанных форм.

Ключевые слова: алкоголизм, множественные формы, сезонность, синтез, *in vivo*, паргиллин.

ВВЕДЕНИЕ. Моноаминоксидаза (МАО КФ 1.4.3.4) ключевой фермент катаболизма биогенных аминов (серотонина, норадреналина, дофамина, фенилэтиламина и др.). Наиболее изучены изоферменты моноаминоксидазы А и Б, кодируемые разными генами и характеризующиеся различной экспрессируемостью, специфичностью, липофильностью, чувствительностью к специфическим ингибиторам [1, 2]. Показано, что синтез МАО осуществляется на свободных полисомах одномоментно с ковалентным присоединением кофактора [3, 4] и лишь затем происходит внедрение в мембрану митохондрий энергозависимым процессом с участием убиквитина [5].

Установлено наличие субпопуляции МАО Б, отличающейся по связыванию с производными имидазолинов [6].

В разных источниках обнаружены и особые формы фермента, отличающиеся по своим свойствам и локализации от этих классических А и Б форм [7]. Известны и иные множественные формы МАО, различающиеся по чувствительности к различным ингибиторам, локализации и некоторым другим свойствам [8-10]. Физиологическая роль множественных форм МАО ждет изучения. Известно лишь, что при алкоголизме активность цитозольной формы МАО возрастает [11, 12]. Она отличается от классических МАО А и Б не только по внутриклеточной локализации, но и по некоторым свойствам *in vivo* [10].

В данном исследовании мы изучали скорости синтеза МАО различной клеточной локализации - мембраносвязанных и цитозольной - по скорости восстановления активности после необратимого ингибирования *in vivo* паргилином для суждения о взаимозависимости биосинтеза. Данный подход был продуктивен при изучении влияния алкоголизации на синтез одной из форм МАО мозга крысы - митохондриальной [13].

МЕТОДИКА. Выделение субклеточных структур из 10% гомогената печени крыс проводили при дифференциальном центрифугировании гомогената в изотоническом растворе сахарозы при pH 7,6. Лёгкие и тяжелые митохондрии осаждали при 18000 g в течение 20 мин, микросомы и цитозоль разделяли при 105000 g в течение 2-х часов [10].

Активность МАО определяли радиометрически, используя в качестве субстрата МАО типа А 100 мкМ [¹⁴C]-серотонин, а МАО типа Б – 5 мкМ [¹⁴C]-фенилэтиламин, как описано ранее [14]. Белок определяли по методу Лоури [15].

В работе использовали крыс (170-200 г) линии Wistar, содержащихся на стандартном рационе вивария. Паргилин на основании предыдущих опытов вводили в дозе 50 мг/кг для полной инактивации фермента за 25 и 50 и 100 час до забоя подкожно. Алкоголизацию проводили 15% раствором спирта в течение трех месяцев, как описано ранее [13]. В опытах исследована группа крыс здоровых (контроль) (50) и группа крыс-алкоголиков (50).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Ранее нами было показано [10], что введение небольших доз паргилина *in vivo* приводит к значительно большему падению активности цитозольной МАО, чем митохондриальной. В данной работе использованы условия обработки крыс классическим необратимым ингибитором паргилином *in vivo*, вызывающим полную потерю всей активности МАО в клетке. Использовано четкое разделение отдельных клеточных структур, доказанное определением белков-маркеров для каждой из них [10].

Синтез МАО *de novo* в печени крысы после полной инактивации фермента паргилином изучался в различные периоды года. Интерес к последним условиям обусловлен зависимостью активности изучаемого фермента и аминергической нейротрансмиссии от состава фосфолипидов [16], участия фосфолипидов [17] и моноаминов [18] в механизмах холодовой адаптации, белковой экспрессии [19] в зависимости от сезонности у гибернирующих и не гибернирующих животных [20].

По данным литературы, сезонные изменения в освещенности и питании могут служить причиной изменения в составе липидов мембран, гормональном фоне организма [21]. Можно ожидать, что сезонность будет больше сказываться на встраивании, в частности, молекул фермента мембраносвязанных форм. Результаты опытов представлены в таблице. Видно, что скорости восстановления активности МАО Б в митохондриях и микросомах весной достоверно различны. Осенью процесс синтеза идет значительно быстрее, при этом разница в скоростях синтеза митохондриальной и микросомальной МАО определена как мало достоверная. По этой характеристике мембраносвязанные формы МАО не различаются между собой в полном соответствии с выводом об их идентичности полученном при изучении кинетических характеристик [22].

Однако ранее было показано, что после необратимого торможения хлоргилином активность МАО в микросомах восстанавливается ранее, чем в митохондриях [23]. Поэтому полагали, что микросомальный фермент является предшественником митохондриального. В наших опытах показано, что восстановление активности МАО А в субклеточных фракциях клетки происходит со статистически недостоверными различиями, а активность МАО Б весной восстанавливается в первую очередь в митохондриях.

В цитозоле печени отмечалось отставание в скорости восстановления активности МАО от восстановления мембраносвязанных форм, как А, так и Б, и осенью, и весной (табл.). Влияние сезонности на процесс биосинтеза цитозольной формы значительно меньше, чем на мембраносвязанные формы. Восстановление активности мембраносвязанных форм МАО А и Б в 2 - 4 раза выше осенью, чем весной, а скорость восстановления цитозольной МАО несколько ниже или равна весенней. Следовательно, можно предположить, что эти процессы регулируются разными факторами. В любом случае, видно, что процесс образования цитозольной формы фермента независим от биосинтеза мембраносвязанных форм. Это скорее всего свидетельство того, что цитозольный и митохондриальный

ферменты синтезируются независимым путём. Принципиальная возможность такого процесса – существование альтернативного сплайсинга - описана, однако каталитически активные белковые продукты получены не были [24].

Таблица. Восстановление активности МАО А и МАО Б в различных субклеточных фракциях печени в % от контр. (осень / весна), здоровые крысы.

	Субклеточные фракции	Время, часы после введения паргилина	
		25	50
МАО А	Митохондрии	$31,3 \pm 1,8 \%$	$58 \pm 4,3 \% *$
		$28,0 \pm 5,1 \%$	$42 \pm 3,4 \%$
	Микросомы	$27,3 \pm 1,2 \%$	$55,0 \pm 2,1 \% *$
		$26,0 \pm 2,2 \%$	$36,7 \pm 2,3 \%$
	Цитозоль	$8 \pm 1,4 \% *$	$20,3 \pm 3,4 \% *$
		$19 \pm 2,1 \%$	$29,6 \pm 1,9 \%$
МАО Б	Митохондрии	$26,0 \pm 1,6 \% *$	$58,6 \pm 2,8 \% *$
		$14,1 \pm 2,1 \%$	$19,3 \pm 2,0 \%$
	Микросомы	$24,6 \pm 2,05 \% *$	$54,6 \pm 2,4 \% *$
		$8,3 \pm 1,7 \%$	$11,6 \pm 2,0 \%$
	Цитозоль	$8,7 \pm 1,6 \% *$	$30,0 \pm 3,3 \% *$
		$12,1 \pm 2,4 \%$	$13,7 \pm 0,8 \%$

Примечание: * $p < 0,05$ - сезонные различия статистически достоверны. За 100% активности принималась активность фермента до введения паргилина.

Множественные формы ферментов рассматриваются не только как основа адаптации к окружающей среде, но и как основа поддержания гомеостаза и создания физиологических преимуществ организма при патологии [25].

Можно сделать предположение о различных генетических или посттрансляционных процессах синтеза цитозольной формы фермента. Последний, очевидно, следует рассматривать в первую очередь, т.к. показано, что отсутствие последовательности 492-511 в молекуле МАО приводят к невозможности встраивания ее в мембрану [3]. Мутант МАО Б, имеющий 481 аминокислотный остаток, является цитозольным белком [26]. Существование растворимой формы МАО оказалось бы существенным в случае патологических нарушений. И действительно, нарушение локализации ферментативной активности при алкоголизме - увеличение ее активности в цитозоле [12] может быть существенным для этой патологии.

Поэтому нами было проведено исследование влияния алкоголизации животных на восстановление активности в различных компартментах клетки, т.к. известна модулирующая роль фосфолипидов на МАО [27] и изменение текучести мембран под действием этанола [28]. Алкоголизация не сказывается на скорости синтеза цитозольной МАО в печени. Полученные результаты по изменению скорости синтеза митохондриальной и микросомальной МАО представлены на рисунке. Видно, что алкоголизация приводит к снижению скорости восстановления активности МАО Б и в митохондриях печени, и в микросомах. Ранее было показано, что при аналогичной алкоголизации крыс в мозге процесс

МАО СУБКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР

восстановления активности МАО А в митохондриях происходит быстрее [13]. Обнаруженное нарушение синтеза МАО в печени, очевидно, отражает тканевые особенности свойств фермента или особенности тканевого обмена. Последнему придается большое значение предположительно и вследствие особенностей поверхности митохондриальной мембраны [29]. По этой же причине возможно отсутствие изменений в скорости синтеза и цитозольной МАО.

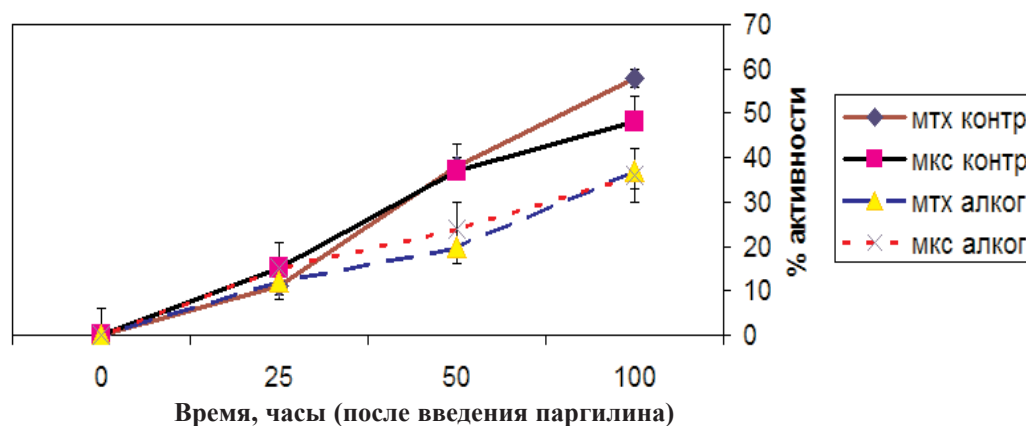


Рисунок.

Влияние алкоголизации на восстановление активности МАО.
За 100% активности принималась активность фермента до введения паргилина.

Описанные закономерности влияния алкоголизации являются еще одним независимым доказательством различий МАО разных форм.

Работа поддержана финансированием РФФИ по гранту 04-04-49221.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shin J.C., Chen K., Ridd M. (1999) Ann. Rev. Neurosci., **22**, 197-217.
2. Tipton K.F., Boyce S., O'Sullivan J., Davey G.P., Healy J. (2004) Curr. Med. Chem., **11**, 1965-1982.
3. Mitoma J., Ito A. (1992) J. Biochem., **111**, 20-24.
4. Zhuang Z., Marks B., McCauley R. (1992) J. Biol. Chem., **267**, 591-596.
5. Zhuang Z., McCauley R. (1989) J. Biol. Chem., **264**, 14594-14596.
6. Zhu H., Piletz J.E. (2003) Ann. N.Y. Acad. Sci., **1009**, 347-352.
7. Chen K., Wu H.F., Grimsby J., Shin J.C. (1994) Mol. Pharmacol., **46**, 1226-1233.
8. Huang R.H., Eiduson S. (1977) J. Biol. Chem., **252**, 284-290.
9. Moskvitina T.A., Kamyshanskaya N.S., Garishvili T.G., Gorkin V.Z. (1979) Prep. Biochem., **9**(2), 171-196.
10. Москвитина Т.А., Медведев А.Е. (2000) Вопр. мед. химии, **46**, 48-51.
11. Горкин В.З., Овчинникова Л.Н. (1993) Вопр. мед. химии, **39**, 2-10.
12. Medvedev A.E., Kinkel A.Z., Kamyshanskaya N.S., Gorkin V.Z. (1995) Alcohol and alcoholism, **30**(6), 729-735.
13. Panova N.G., Axenova L.N., Medvedev A.E. (2000) Neurobiology (BP), **8** (3-4), 225-230.
14. Пеккель В.А., Куркель А.З. (1985) Вопр. мед. химии, **31**, 122-125.
15. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 165-175.
16. Delion S., Chalon S., Guilloteau D., Lejeune B., Besnard J.S., Durand G. (1997) J. Lipid. Res., **38** (4), 680-689.

17. Коломийцева И.К., Перепелкина Н.И., Патрушев И.В., Попов В.И. (2003) Биохимия, **68**, 954-966.
18. Семенова Т.П., Аношкина И.А., Долгачева Л.П., Абжалелов Б.А., Колаева С.Г. (2000) Росс. физиол. ж. им. И.М. Сеченова, **86**, 1188-1194.
19. Epperson L.E., Dahl T.A., Martin S.L. (2004) Mol. Cell. Proteomics, **3**(9), 920-933.
20. Аззамов Х., Эрматова С.М., Ахмеров Р.Н. (1998) Журнал эволюционной биохимии и физиологии, **34**(2), 199-201.
21. Khan I.A., Joy K.P. (1988) Chronobiol. Int., **5**(4), 311-316.
22. Gomez N., Balsa D., Unzeta M. (1988) Biochem. Pharmacol., **37**(18), 3407-3413.
23. Egashira T., Yamanaka Y. (1981) Jpn. J. Pharmacol., **31**(5), 763-770.
24. Vindis C., Parini A. (1998) 8th Amine Oxidase Workshop, Hungary Abstracts, 26.
25. Naessens M., Vandamme E.J. (2003) Biotechnol. Lett., **25**, 1119-1124.
26. Rebrin I., Geha R.M., Chen K., Shin J.C. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 29499-29506.
27. Binda C., Hubalek F., Li M., Edmondson D.E., Mattevi A. (2004) FEBS Lett., **30**, **564**(3), 225-228.
28. Сторожок С.А., Панченко Л.Ф., Филиппович Ю.Д., Глушков В.С. (2001) Вопр. мед. химии, **47**, 198-208.
29. Orelan L., Hallman J., Damberg M. (2004) Curr. Med. Chem., **11**, 2007-2016.

Поступила: 14. 09. 2004.

THE PECULIARITY OF MONOAMINE OXIDASE SYNTHESIS IN NORMAL AND ALCOHOLIZED RATS

T.A. Moskvitina

V.N. Orechovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: (495)246-33-75; fax: (495)245-08-57; e-mail: tatyana.moskvitina@ibmc.msk.ru

Seasonal variations of recovery of liver monoamine oxidase activity were studied in different subcellular fractions after administration of a large dose of pargyline *in vivo*.

It was shown that the recovery of cytosolic MAO differs greatly from the membrane bound forms in the rate of reconstitution of its activity upon irreversible inhibition *in vivo*. Alcoholization leads to a decrease of the rate of recovery of only the membrane-bound but not a cytosolic MAO B forms in rat liver.

Key words: alcohol, multiple forms, season, synthesis, *in vivo*, pargyline.