

МОДИФИКАЦИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ МОНОАМИНОКСИДАЗ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ПЕРЕКИСНОМ ОКИСЛЕНИИ ЛИПИДОВ

МИЛЕНДЕР А. Е., РАПГОВОДСКАЯ Л. И., ГОРАНЫ В. Э.,
ЧЕДОВА Н. Б., *СЕМНОХИНА А. Ф.

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва*, МГУ

Индукция синтеза и переносных митохондрий болевых пелуларий головного мозга крысы с индукторами ПОЛ (железо-аскорбатной смесью) сопровождается торможением деаминации серотонина (субстрат МАО-А) и митохондрий, но не с деаминацией с односторонней деаминацией серотонина ГАМК и глюкозамина в обеих фракциях. Окисление 2-фенилэтиламина (ФЭА) (субстрат МАО-В) в этих условиях заметно не изменяется. Пиразидол, селективный ингибитор МАО-А, эффективно тормозит деаминацию серотонина, ГАМК и глюкозамина, но не ФЭА. МАО-В и гидролиз хлоридкарбонатов хлорид (ингибиторы модифицированных МАО и модифицированных митохондрий) ингибируют деаминацию ГАМК и глюкозамина.

Предполагается, что индуцируемое ПОЛ модифицирование каталитических свойств мембраносвязанных МАО стимулирует ПОЛ в синапсах и митохондриях болевых пелуларий головного мозга. Это сопровождается снижением деаминации серотонина и ФЭА и увеличением деаминации ГАМК и глюкозамина.

Предполагается, что индуцируемое ПОЛ модифицирование каталитических свойств мембраносвязанных МАО может внести существенный вклад в нарушение медиаторных процессов в мозгу, в частности провоцировать возникновение приступов эпилептических судорог.

Моноаминоксидазы (К.Ф. 1.4.3.4) катализируют реакцию окислительного деаминации моноаминов в ЦНС и периферических тканях [1]. Активность МАО является одним из существенных факторов, определяющих уровень ряда нейромедиаторов в головном мозгу, и таким образом, важным механизмом регулирования самих медиаторных процессов [1]. В условиях стимуляции ПОЛ в биомембранах МАО претерпевают модифицирование—такое изменение ферментативных свойств, в результате которого наряду с некоторым снижением скорости окисления биогенных моноаминов появляются качественно новые реакции деаминации целого ряда азотистых соединений, к числу которых относятся аminosахара, ди- и полпампы, нуклеотиды, некоторые аминокислоты, такие как лизин и ГАМК [1].

К настоящему времени накоплен значительный материал о качественном изменении каталитических свойств МАО при стимуляции ПОЛ *in vivo* и *in vitro* [1—3], однако сравнительное изучение роли ПОЛ в модификации синаптических и митохондриальных МАО мозга до сих пор не было проведено.

Целью настоящей работы было изучение возможного участия МАО синапсом и митохондрией мозга в дезаминировании ГАМК и глюкозамина при стимуляции ПОЛ *in vitro*, а также во время эпилептиформного судорожного припадка, развитие которого сопровождается интенсификацией процессов ПОЛ [4—6].

Материалы и методы

В экспериментах использовали крыс линий Wistar и Крышинского-Молодкиной с наследственной аудиогенной эпилепсией, генерализованный судорожный припадок у которых индуцировали звуком электрического звонка (110—120 дБ, 90 с).

Синапсомы и несинаптические митохондрии из больших полушарий мозга выделяли по методу Hajos [7], однократно промывали в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7,4) и суспендировали в 20 мМ фосфатном буфере (рН 7,4). Для стимуляции ПОЛ синапсомы и митохондрии (10—15 мг белка/мл) инкубировали с 10 мкМ Fe^{2+} и 0,5 мМ аскорбатом 15 мин при 37° [3]. Содержание одного из вторичных продуктов ПОЛ малонового диальдегида (МДА) определяли в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [8]. Для определения активности МАО пробы (1—2 мг белка синапсомом или митохондрией) инкубировали в 1,8 мл 20 мМ фосфатного буфера (рН 7,4) в аэробных условиях в течение 30 мин при 37° с 5 мМ серотонином (субстрат МАО-А), 0,4 мМ ФЭА (субстрат МАО-Б), 10 мМ ГАМК или 8 мМ глюкозамином (субстраты модифицированных МАО). За это время имела место линейная зависимость между длительностью инкубации и количеством образующегося аммиака. Реакции останавливали добавлением ТХУ (конечная концентрация 5%), осадок удаляли центрифугированием, а в надосадочной жидкости определяли содержание освободившегося в ходе реакции аммиака методом изотермической микродиффузии с последующей нesslerизацией [1].

Селективный ингибитор МАО-А пипразидол [9], ингибиторы активности диаминооксидаз гидразиды хинолин-2- и хинолин-6-карбоновых кислот [10], ингибитор модифицированной активности МАО изониазид [1] добавляли в среду инкубации вместе с одним из субстратов. Содержание белка определяли биуретовым методом [11] или методом Lowry [12] с БСА в качестве стандарта.

В работе использовали серотонин креатинсульфат («Reanal», Венгрия), глюкозамин HCl («Sigma», США), кристаллический БСА, ГАМК, 2-тиобарбитуровую кислоту («Calbiochem», США). Остальные реактивы были отечественного производства максимальной доступной чистоты.

Инкубация синапсом и несинаптических митохондрий больших полушарий головного мозга крыс с индукторами ПОЛ приводит к повышению накоплению МДА в синапсосамах (в 1,8 раза) и в митохондриях (в 2,5 раза). Это сопровождается стимуляцией ГАМК- и глюкозамин-дезаминирующих активностей (в 3—4 раза) в обеих фракциях. Скорость дезаминирования ФЭА в синапсосамах и митохондриях, серотонина в синапсосамах значительно не изменяется ($p > 0,3—0,8$), в то время как скорость дезаминирования серотонина в митохондриях снижается в среднем на 45% (табл. 1). Соотношения скоростей дезаминирования ГАМК:серотонин и глюкозамин:серотонин, отражающие взаимосвязь между индуцируемой и «классической» активностями МАО, возрастает в условиях стимуляции ПОЛ в 3—5 раз.

Добавление селективного ингибитора МАО-А пипразидола сильно ингибирует дезаминирование ГАМК и полностью тормозит дезаминирование глюкозамина и серотонина. Дезаминирование ФЭА при этом значительно не изменяется (табл. 2). Приведенные результаты полностью согласуются с предыдущими данными [1, 2] о том, что дезаминирование ГАМК и серотонина в условиях стимуляции ПОЛ, очевидно, катализируют именно модифицированные МАО-А.

Ранее было установлено, что активность модифицированных МАО чувствительна к изониазиду и другим ингибиторам диаминооксидаз [1]. В настоящей работе мы исследовали чувствительность ГАМК- и глюкозамин-дезаминирующих активностей модифицированных МАО в условиях стимуляции ПОЛ к действию изониазида и двух новых эффективных ингибиторов диаминооксидаз [10]. Результаты, приведенные в табл. 3, свидетельствуют о том, что дезаминирование ГАМК и глюкозамина, катализируемое синапсомными и митохондриальными МАО, модифицированными в условиях стимуляции ПОЛ, существенно ингибируются всеми исследованными соединениями.

Аудиогенный эпилептиформный судорожный припадок у крыс линии Крушинского-Молодкиной приводит к повышению содержания МДА в синапсосамах и несинаптических митохондриях больших полушарий головного мозга (табл. 4), что сопровождается существенным понижением скорости дезаминирования серотонина и ФЭА в обеих фракциях. В то же время дезаминирование ГАМК и глюкозамина резко возрастает (в 5 и более раз). Отношение скоростей дезаминирования ГАМК:серотонин увеличивается от 0 до 2,62 в синапсосамах и от 0,06 до 2,1 в митохондриях. Аналогичные изменения обнаружены и в соотношении скоростей дезаминирования глюкозамина:серотонин; в митохондриях оно повышается от 0,07 до 1,03, а в синапсосамах—от 0,01 до 1,08.

Ранее было установлено [1, 2], что стимуляция ПОЛ *in vitro* и *in vivo* в митохондриях мозга и других тканей приводит к изменению каталитических свойств МАО-А. Это изменение характеризуется появлением качественно новых реакций дезаминирования азотистых

Таблица 1

Влияние стимуляции ПОЛ на содержание малонового диальдегида (МДА) и дезаминирование азотистых соединений в митохондриях и синаптосомах головного мозга

Условия опыта	Содержание МДА	Дезаминирование				Соотношение скоростей дезаминирования	
		серотонина	2-фенил-этиламина	ГАМК	глюкозамина	ГАМК: серотонин	глюкозамин: серотонин
Синаптосомы							
Контроль	3,4±0,6	3,6±0,4	2,2±0,4	0,5±0,3	0,7±0,2	0,14	0,19
ПОЛ	6,0±0,7	3,4±0,6	1,7±0,4	1,6±0,3	2,9±0,6	0,47	0,85
р	<0,001	н. д.	н. д.	<0,01			
Митохондрии							
Контроль	2,3±0,1	8,9±1,0	3,2±0,5	1,1±0,4	1,3±0,4	0,12	0,15
ПОЛ	5,7±0,8	4,9±0,9	3,2±0,6	4,0±0,7	4,7±0,8	0,82	0,96
р	<0,001	<0,02	н. д.	<0,001	<0,01		

Примечание. Содержание МДА выражено в нмоль/мг белка. Скорость дезаминирования азотистых соединений выражена в нмоль $\text{NH}_3/\text{мин}$ на 1 мг белка. н. д.—различия статистически недостоверны ($p > 0,05$). В каждой серии по 3—8 опытов.

соединений, которые обычно не являются субстратами МАО. Обнаружена существенная тканевая вариабельность модифицированных активностей МАО, измеренных с различными азотистыми соединениями в качестве субстратов [1, 2]. При этом оказалось, что глюкозамин является одним из лучших субстратов модифицированных МАО [1, 13]. Известно, что суммарная митохондриальная фракция мозга

Таблица 2

Влияние пипразидола на дезаминирование азотистых соединений в системах с преннукбированными в присутствии индукторов ПОЛ несинаптическими митохондриями из больших полушарий мозга крыс

Субстрат	Контроль	1 мМ пипразидол
	нмоль $\text{NH}_3/\text{мин}$ на 1 мг белка	
Серотонин	$4,9 \pm 0,9$	0
2-Фенилэтиламин	$3,2 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,6$
ГАМК	$4,0 \pm 0,7$	$0,5 \pm 0,2$
Глюкозамин	$4,7 \pm 0,8$	0

Примечание. Митохондрии преннукбировали с индукторами ПОЛ (Fe^{2+} и аскорбатом), после чего измеряли скорость дезаминирования азотистых соединений в присутствии 1 мМ пипразидола или без него. В каждой серии по 3—7 опытов. Аналогичные результаты были получены и в опытах с синапсосами.

Таблица 3

Влияние ингибиторов модифицированных МАО и диазинноксидаз на дезаминирование ГАМК и глюкозамина в системах с фракциями синапсосом или несинаптических митохондрий больших полушарий головного мозга крыс в условиях стимуляции ПОЛ

Добавки (1 мМ) в среду измерения	ГАМК		Глюкозамин	
	Синапсосомы	Митохондрии	Синапсосомы	Митохондрии
	нмоль $\text{NH}_3/\text{мин}$ на 1 мг белка			
Без добавок	$1,6 \pm 0,4$	$3,9 \pm 1,2$	$2,8 \pm 0,8$	$4,5 \pm 0,6$
Изониазид	0,1	0,2	$0,5 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,5$
Гидразид хинолин-7-карбоновой кислоты	0	0	0	0
Гидразид хинолин-6-карбоновой кислоты	0	0	0,2	0,2

Примечание. Митохондрии и синапсосомы преннукбировали с индукторами ПОЛ (Fe^{2+} и аскорбатом), после чего определяли ГАМК- и глюкозаминдезаминирующие активности в присутствии указанных ингибиторов. В каждой серии по 3—7 опытов.

обычно содержит синапсосомы (осмотически активные частицы нервных окончаний), в «которых сохранены все главные структурные особенности нервных окончаний» [14]. Поэтому оставался открытым вопрос: где локализована ГАМК-дезаминирующая активность модифицированных МАО мозга (в синапсосах, в митохондриях или в обеих

Таблица 4

Деаминация азотистых соединений и содержание малонового диальдегида (МДА) в синапсосомах и митохондриях мозга крыс линии *Крушинского-Молодкиной* при эпилептиформном судорожном припадке

Условия опыта (группа животных)	Содержание МДА	Деаминация:				Соотношение скорости деаминации	
		серотонина	2-фенил- этиламина	ГАМК	глюкоз- амина	ГАМК: серотонин	глюкозамин: серотонин
Синапсосома							
Контроль (крысы линии <i>Wistar</i>)	$1,80 \pm 0,04$	$7,0 \pm 0,5$	$4,5 \pm 1,0$	0	$0,1 \pm 0,1$	0	0,01
Эпилептиформный припадок (крысы линии <i>Крушинского-Молодкиной</i>) р	$2,6 \pm 0,1$ $< 0,001$	$1,30 \pm 0,03$ $< 0,001$	$0,6 \pm 0,2$ $< 0,05$	$3,4 \pm 0,2$ $< 0,001$	$1,4 \pm 0,1$ $< 0,001$	2,62	1,08
Митохондрия							
Контроль (крысы линии <i>Wistar</i>)	$1,30 \pm 0,04$	$8,2 \pm 0,9$	$4,7 \pm 0,9$	$0,5 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,3$	0,06	0,67
Эпилептиформный припадок (крысы линии <i>Крушинского-Молодкиной</i>) р	$3,6 \pm 0,1$ $< 0,001$	$3,1 \pm 0,2$ $< 0,01$	$1,2 \pm 0,3$ $< 0,05$	$6,5 \pm 0,1$ $< 0,001$	$3,2 \pm 0,2$ $< 0,001$	2,10	1,03

Примечание. Содержание МДА выражено в нмоль/мг белка. Скорость деаминации аминокислот—в нмоль/мин на 1 мг белка. В каждой серии по 3—8 опытов.

фракциях)? Результаты настоящей работы показывают, что ПОЛ стимулирует в 3—4 раза ГАМК- и глюкозамин-дезаминазные активности как в синаптосомах, так и в несинаптических митохондриях. Реакции ферментативного дезаминирования ГАМК и глюкоаминна в обеих фракциях характеризуются высокой чувствительностью как к селективному ингибитору МАО-А пипразидолу, так и к ингибиторам модифицированных МАО (изониазиду и гидразидам хинолин-карбонновых кислот). На это указывает сопоставление результатов, приведенных в табл. 1 и 4, согласно которым активность МАО А (субстрат серотонин) и МАО Б (субстрат ФЭА) подавляется при индуцировании ПОЛ в синаптосомах, но не в митохондриях. Кроме того, в синаптосомах, в отличие от митохондрий, при отсутствии эффекта индуцирования ПОЛ практически не наблюдалось дезаминирования ГАМК и глюкоаминна.

Недавно было установлено, что инкубация липноксигеназы ретикулоцитов с митохондриями печени крысы вызывает качественное модифицирование мембраносвязанных МАО, сопровождающееся появлением диаминооксидазоподобной активности (субстрат: путресцин) [15]. Этот подход, пока неиспользованный в наших экспериментах, представляет значительный интерес для установления механизмов модифицирования каталитических свойств МАО *in vivo*. Можно предположить, что в ингибировании модификации каталитических свойств мембраносвязанных МАО при некоторых физиологических и патологических состояниях участвует фермент, выполняющий сходные с липноксигеназой функции.

По современным представлениям, интенсификация ПОЛ в головном мозгу способствует формированию такого патогенетически важного механизма, как качественное изменение ферментативной инактивации нейромедиаторов; при этом существенное значение должна иметь модификация каталитической активности МАО [16]. Если допустить, что МАО синапсом и несинаптических митохондрий имеют соответственно пре- и постсинаптическую локализацию, обнаруженные в наших опытах *in vivo* и *in vitro*, изменения активности этих ферментов позволяют рассмотреть следующий механизм ПОЛ-индуцированного, МАО-зависимого нарушения инактивации медиаторов в головном мозгу. Снижение дезаминирования моноаминов в мозгу должно способствовать пресинаптическому накоплению аминов и ингибированию процессов их постсинаптической инактивации. Повышение ГАМК-дезаминазной активности должно, по-видимому, вызывать снижение пресинаптического содержания ГАМК. Все это может привести к нарушению сопряжения процессов торможения и возбуждения в ЦНС с очевидным преобладанием последних. Рассмотренный механизм хорошо согласуется с данными, полученными в настоящей и других работах на примере экспериментальной модели эпилепсии у животных: 1. Развитие эпилептической активности сопровождается интенсификацией процессов ПОЛ [4, 16] (табл. 4); 2. Крысы линии Крушинского-Молодкиной характеризуются повыше-

нием содержания ряда моноаминов в головном мозгу [17]; 3. При эпилептическом судорожном припадке имеет место качественное изменение каталитических свойств MAO синапсом и несинаптических митохондрий, сопровождающееся появлением ГАМК-деаминазной активности (табл. 4) и снижением содержания ГАМК в головном мозгу [18, 19]. Аналогичные изменения (стимуляция ПОЛ, модификация MAO с появлением ГАМК-деаминазной активности в митохондриальной фракции мозга, снижение уровня ГАМК) были обнаружены в головном мозгу крыс с судорожным синдромом, вызванным токсическим действием кислорода во время гипербарической оксигенации [20].

Принято считать, что в норме содержание ГАМК в головном мозгу контролируется активностью двух ферментов [19]: глутамат-декарбоксилазы, катализирующей образование ГАМК из глутамата, и ГАМК-трансаминазы, катализирующей перенос аминогруппы между ГАМК и 2-оксоглутаратом. Согласно нашим данным, индуцируемая ПОЛ модификация каталитических свойств MAO с появлением ГАМК-деаминазной активности может определять возможность участия модифицированных MAO в катаболизме ГАМК как в синаптических, так и в несинаптических митохондриях мозга. Это, очевидно, приводит к вовлечению MAO в формирование патологически функционирующих регуляторных систем, которым придается важное значение в возникновении различных патологических состояний в ЦНС [5, 16].

MODIFICATION OF CATALYTIC PROPERTIES OF BRAIN MEMBRANE-BOUND MONOAMINE OXIDASES DURING LIPID PEROXIDATION

MEDVEDEV A. E., RAIGORODSKAYA D. I., GORKIN V. Z., *FEDOTOVA I. B.,
*SEMIOKHINA A. F.

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

Effects of lipid peroxidation (LPO) on the catalytic properties of membrane-bound monoamine oxidases (MAO) were studied in brain synaptosomes and nonsynaptic mitochondria. The incubation of both fractions with LPO inducers (Fe^{2+} + ascorbate) was shown, to be accompanied by a marked increase in glucosamine- and γ -amino butyric acid (GABA) deamination, sensitive to inhibitors of modified MAO activity (isoniazid, hydrazides of quinoline carbonic acids). Simultaneously, deamination of serotonin (MAO-A substrate) was markedly decreased in mitochondria, but not in synaptosomes, while deamination of 2-phenyl-ethylamine (PEA; substrate of MAO-B) was insignificantly changed in both fractions. Pyrazidol, a selective inhibitor of MAO-A, decreased the deamination of serotonin, GABA and glucosamine, but not PEA.

Audiogenic epileptiformic seizures in Krushinskii-Molodkina strain rats intensified LPO in brain, which was accompanied by activation of GABA- and glucosamine deamination with simultaneous inhibition of serotonin and PEA deamination.

The data obtained suggest that LPO-induced alteration in catalytic properties of MAO may make a valuable contribution in impairment of neurotransmitter processes in brain under different neuropathological disorders, characterized by intensive LP.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горкин В. З. Амбиксепиды и их значение в медицине. М., Медицина. 1981.
2. Gorkin V. Z. In: Structure and functions of amine oxidases (Mondolfi B. ed), CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 205-218, 1985.
3. Антипов А. Д., Гурин В. А., Ларова Н. Ф., Хованских А. Е., Казан В. Е. Бюлл. экпер. биол. и мед. т. 57, № 2, с. 169-171, 1989.
4. Пукушкин Л. В., Крыжановский Г. Н. Патол. физиол. и экпер. тер. № 3, с. 19-24, 1987.
5. Крыжановский Г. Н. Патол. физиол. и экпер. тер. № 2, с. 3-8, 1990.
6. Медведев А. Л., Гейгородская Д. И., Горкин В. З. В кн.: Физиология и биохимия медиаторных процессов, М., с. 191, 1990.
7. Hajos F. Brain Res. v. 93, p. 485-489, 1975.
8. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Anal. Biochem. v. 95, p. 351-358, 1979.
9. Вережкина Н. В., Аснина В. В., Горкин В. З., Машковский М. Д. Вопр. мед. химии т. 29, № 5, с. 118-123, 1983.
10. Грачева Н. Н., Груднев Л. Н., Тоцкии А. И., Горкин В. З. Хим.-фарм. ж. т. 22, № 11, с. 1526-1539, 1988.
11. Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. J. Biol. Chem., v. 177, p. 751-766, 1949.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. J., Randa'l R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 165-175, 1951.
13. Goroshinskaya I. A., Bronovizkaya Z. G., Gorkin V. Z. Comm. Psychopharmacol., v. 1, p. 39-47, 1977.
14. Whittaker V. P., Michaelson I. A., Kirk'and J. A. Biochem. J., v. 90, p. 293-303, 1964.
15. Weisner R., Kasalschke A., Kähn H., Anton M., Schewe T. Biochim. Biophys. Acta, v. 986, p. 11-17, 1989.
16. Крыжановский Г. Н. Патол. физиол. и экпер. тер. № 5, с. 75-84, 1989.
17. Долина С. А. Ж. невропатол. и психиатр. им. Корсакова, т. 82, с. 841-849, 1982.
18. Antezark G., Horton R. W., Meldrum B. S., Sawaya C. M. Biochem. Pharmacol., v. 25, p. 413-417, 1976.
19. Meldrum B. S. Clin. Neuropharmacol., v. 5, p. 293-316, 1982.
20. Горошинская И. А. Вопр. мед. химии т. 25, № 3, с. 328-333, 1979.

Поступила 20. II. 1991