

УДК 612.82.015.1.014.46:615.217

КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МАО ТИПА Б ОТДЕЛОВ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА К ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОМУ НЕЙРОТОКСИНУ 1-МЕТИЛ-4-ФЕНИЛ, 1,2,3,6-ТЕТРАГИДРОПИРИДИНУ

ЕРМАКОВ Н. В., ИШКОВ А. Г., МИКЕРОВ С. В.

Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва

Исследовали скорость окисления 1-метил, 4-фенил, 1, 2, 3, 6-тетрагидропиридина (МФТП) в МАО-реакции флуориметрическим методом на препаратах фермента, выделенных из 6-и отделов мозга: п. Accumbens, п. Caudatus, Putamen, glob. Pallidus, s. Nigra, loc. Ceruleus. Максимальная скорость образования нейротоксического агента МФП+ отмечена в п. Caudatus. Можно полагать, что этот отдел мозга, в котором локализованы сигналы дофаминергических нейронов, подвержен наибольшему воздействию МФП+ и является местом первичных нарушений функции ЦНС. Выявлены различия между исследованными 4-мя образцами мозга по величине биохимического индекса скорости МАО-реакции (V/K_m), который отражает скорость накопления МФП+ при низких (≤ 1 мкМ) концентрациях МФТП в тканях мозга и связан с индивидуальной чувствительностью лиц к дофаминергическому нейротоксину.

Известны случаи развития симптомов болезни Паркинсона и даже гибели людей, использовавших наркотические анальгетики типа пептидина и сходных с ним аналогов химических соединений [1, 2]. Эти препараты содержали примесь МФТП, оказавшего столь губительное действие на организм человека. Нейротоксический и нейрофармакологический эффекты МФТП определяются длительностью сохранения определенного уровня МФП+ в тканях мозга и зависят от кинетики клиренса нейротоксина из отделов мозга и скорости паработки МФП+ из МФТП в реакции, контролируемой МАО.

Целью настоящей работы является оценка кинетических параметров МАО-реакции к субстрату МФТП, выявление структур мозга с максимальной скоростью образования МФП+ и прогнозирование чувствительности лиц к воздействию нейротоксина МФТП и сходных с ним аналогов химических соединений.

Материалы и методы

В работе был использован мозг 4-х здоровых лиц мужского пола в возрасте 25—50 лет через 3—10 ч после наступления (фиксиро-

вания) клинической смерти в результате несчастных травматических случаев. Мозг после аутопсии охлаждали при 8° в течение 1 ч и затем извлекали дофаминергические и связанные с ними отделы: n. accumbens, n. caudatus, Putamen, globus Pallidus, s. Nigra, loc. Ceruleus. 150—200 мг ткани указанных отделов гомогенизировали в 10-и объемах 0,32 М сахарозы стеклянным гомогенизатором Поттера и получали P₂-фракцию синапсом, содержащую MAO мозга, по стандартной методике Grau и соавт. [3, 4]. Гомогенат центрифугировали при 200 g в течение 10 мин, после чего надосадочную жидкость вновь центрифугировали при 16000 g в течение 20 мин для осаждения синапсом. Осадок, содержащий синапсомы, промывали дважды 0,1 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,4 и суспензировали в нем. Все операции проводили с использованием охлажденных растворов. Для исследования кинетических характеристик MAO типа B 350 мкл суспензии синапсом с концентрацией 0,05—0,20 мг/мл инкубировали в течение 5 мин при 37°. Реакцию начинали введением 50 мкл раствора МФТП в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, достигая конечной концентрации нейротоксина в различных пробах в диапазоне от 0 до 1 мМ. Пробы инкубировали в течение 60 мин при постоянном перемешивании. Реакцию останавливали введением в пробы 0,1 мл смеси, состоящей из равных объемов свежеприготовленных растворов 1,5 М соляной кислоты (HCl) и 10%-ного ДДС-Na. Измерение количества МФП⁺, образовавшегося в пробах в ходе MAO-реакции, проводили на флуориметре при длине волны возбуждения 290 нм и длине волны эмиссии 375 нм, по стандартным растворам МФП⁺. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [6], используя в качестве стандартных растворов БСА. Расчет кинетических параметров MAO (V образования МФП⁺ и K_m для МФТП) определяли в системе обратных координат Лайнуивера-Берка [7]. Регрессионный анализ проводили на компьютере типа IBM-PC с указанием доверительных интервалов для K_m и V при уровне значимости $p < 0,05$ и ошибки средней величины.

Результаты и обсуждение

В таблице представлены кинетические характеристики мембраносвязанной MAO, содержащейся в препаратах P₂ фракции синапсом различных отделов мозга по 4-м образцам. Наблюдается индивидуальный разброс в величинах V и K_m.

Препараты MAO выделяли из отделов мозга крыс линии *Sprague-Dawley*, которые получали через 3—10 ч после наступления клинической смерти. Режим и сроки хранения животных могли повлиять на кинетические характеристики фермента, в связи с чем были проведены специальные исследования. Установлено, что хранение трупов животных при 4° в течение 48 ч и при 20° в течение 10 ч не приводит к достоверному изменению кинетических характеристик MAO, выделенных из отделов *caudatus, striatum, s. Nigra*.

Из литературных данных известно, что активность МАО мозга (конкретно формы МАО типа Б) увеличивается с возрастом, в особенности после 60 лет. Однако в диапазоне 25—50 лет значения активности МАО типа Б увеличиваются не более чем в два раза [8]. Поэтому причины обнаруженных нами значительных индивидуальных различий в величинах V и K_m следует искать в другом.

В пределах одного и того же отдела мозга отмечены значительные вариации в величине V и K_m . На наш взгляд, условия микроокружения фермента в мембране могут быть причиной различий в функциональных свойствах исследуемой МАО-реакции, отражаясь на величине K_m и V .

$$V = \frac{V \cdot C}{K_m + C} = \frac{V}{K_m} \cdot C,$$

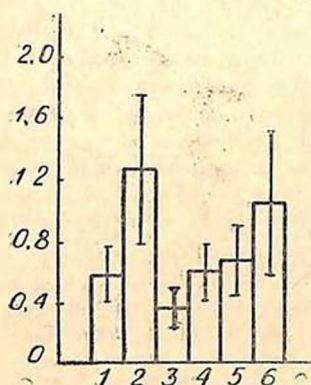


Рис. Значения биохимического индекса МАО-реакции (V/K_m) для 6-и отделов мозга. По оси абсцисс—отделы мозга: 1 п. Accumbens, 2—п. Caudatus, 3—Putamen, 4—glob. Pallidus, 5—s. Nigra, 6—locus Cereus, по оси ординат— V/K_m (нмоль МФТП/(мг/ч/мг МФТП))

При низких концентрациях МФТП в тканях мозга порядка 1 мкМ и менее скорость образования МФТП⁺ из МФТП прямо пропорциональна величине V/K_m :

где C —концентрация МФТП; указанный биохимический индекс МАО-реакции (V/K_m) целесообразно оценить в исследуемых отделах мозга, чтобы определить их потенциальную чувствительность к нейротоксину при таких низких концентрациях, которые могут быть созданы при приеме фармакологических доз лекарственных препаратов или поступлении в организм химических соединений, содержащих примесь МФТП или его аналогов, из окружающей среды.

На рисунке представлены данные статистически обработанных значений V/K_m , полученных для 6-и отделов мозга. Наименьшая величина зафиксирована в отделе Putamen, а наибольшая— в зоне п. Caudatus. Если принять во внимание, что в синапсосах, выделенных из этого отдела мозга, имеются и системы обратного захвата дофамина (по которым образованный в МАО-реакции МФТП⁺ попадает внутрь нейрона), то можно считать, что этот отдел дофаминергической системы наиболее чувствителен к воздействию МФТП. Высокий

биохимический индекс МАО-реакции и, следовательно, значительная скорость продуцирования МФП⁺ в п. Caudatus при низких (С—1 мкМ) концентрациях МФТП в мозгу предполагает, что эта зона должна быть местом развития первичных обратимых нарушений функций дофаминергической системы и через нее—ЦНС в целом. locus Ceruleus не имеет систем обратного захвата дофамина, поэтому МФП⁺ не попадает в нейроны этого отдела мозга [9], который, несмотря на высокий биохимический индекс МАО-реакции (V/K_m) проявляет устойчивость к нейротоксину МФТП.

Таблица

Кинетические характеристики МАО отделов мозга человека к МФТП

Отделы мозга	N ₂	K _m (мкМ)	V ($\frac{\text{нмоль МФП}^+}{\text{мг/ч}}$)
nucleus accumbens	1	22,5±0,7	16,2±0,3
	2	306,2±89,7	24,2±5,8
	3	88,9±22,7	77,6±16,4
	4	21,5±1,3	13,0±0,7
nucleus caudatus	1	69,6±5,5	120,9±9,1
	2	140,0±38,1	37,7±7,6
	3	105,3±10,4	269,2±5,8
	4	27,2±2,9	14,2±1,4
Putamen	1	70,5±10,1	18,3±2,2
	2	60,1±9,7	11,6±1,5
	3	76,6±16,8	39,6±7,2
	4	44,4±22,8	5,7±2,2
globus Pallidus	1	54,3±6,1	33,9±3,5
	2	63,5±8,0	12,4±1,4
	3	42,3±9,1	44,2±8,6
	4	28,5±11,4	11,4±2,2
substantia nigra	1	30,0±1,1	14,8±1,8
	2	205,4±159,1	69,0±37,3
	3	55,3±21,9	75,7±3,4
	4	25,2±2,9	7,6±0,8
locus Ceruleus	1	42,9±8,8	35,8±6,3
	2	204,8±44,5	48,0±8,8
	3	181,5±39,8	487,3±135,2
	4	23,8±1,5	9,3±1,6

Отдел s. Nigra представляет собой зону с высокой концентрацией дофаминергических нейронов; воздействие МФТП характеризуется разрушением клеток именно этого отдела, приводя к структурным необратимым нарушениям дофаминергической системы и являясь причиной развития симптомов, сходных с идиопатической болезнью Паркинсона [8]. Высокий индекс МАО-реакции (характеризующий скорость наработки токсического агента МФП⁺), определяемый в s. nigra указывает на этот отдел как на чувствительную мишень. Как правило, структурные изменения в этом образовании мозга являются результатом хронических неоднократных воздействий МФТП. Образующийся МФП⁺, проникая в тело клетки, накапливается нейромеланином и аккумулируется, оказывая длительное воздей-

ствие на нейрон [9, 11]. Накопление МФП⁺ в теле нейрона зоны s. Nigr может происходить и за счет переноса МФП⁺ из синапсов отдела n. Caudatus, хотя эти отделы разделены между собой значительным расстоянием.

Так, исследования на приматах, проведенные Imai H. и соавт. [2], показали, что унилатеральная инфузия МФТП в зону n. caudatus характеризуется разрушением собственно тела нейронов компактной зоны s. nigra. Авторы полагают, что МФТП, трансформируясь в нейротоксический агент МФП⁺, по системам обратного захвата дофамина проникает внутрь синапса [13] и диффундирует по аксону в направлении тела клетки.

Таким образом, высокий индекс MAO-реакции для отделов мозга n. Caudatus и s. Nigra характеризует устойчивость дофаминергической системы мозга к нейротоксину МФТП. При низкой величине клиренса МФТП и МФП⁺ из мозга [14] эти структуры представляют собой наиболее чувствительную мишень воздействия МФТП и его аналогов.

Анализ величины индекса MAO-реакции показывает, что индивидуумы могут различаться по своей чувствительности к МФТП. Можно составить следующий ряд в порядке убывания величины V/K_m для исследованных лиц:

$$3 > 1 > 4 > 2,$$

тем самым определив их чувствительность к нейротоксину.

Предварительные исследования, проведенные на препаратах MAO тромбоцитов крови, показывают, что по своим кинетическим характеристикам MAO тромбоцитов подобна MAO дофаминергических отделов мозга. Так как тромбоциты наиболее доступны для анализа MAO-реакции к МФТП, то прогнозирование устойчивости (чувствительности) лиц к нейротоксину и сходных с ним аналогов целесообразно проводить на полученных из них препаратах MAO.

Лица с высоким индексом MAO-реакции должны характеризоваться быстрым и необратимым развитием нейротоксического эффекта при хроническом воздействии даже малых концентраций МФТП на организм человека. И наоборот, низкий индекс скорости MAO-реакции должен характеризовать устойчивость лиц к нейротоксину и обратимость (нормализацию) функций при неоднократных воздействиях препарата и сходных с ним химических соединений.

KINETIC PARAMETERS OF HUMAN BRAIN MAO CONCERNING DOPAMINERGIC NEUROTOXIN MPTP

YERMAKOV N. V., ISHKOV A. G., MIKEROV S. V.

Research Center of Molecular Diagnostics, Moscow

The kinetic parameters of brain MAO-reaction were investigated to find the areas with a maximal rate of MPP⁺ production. Spectrofluorophotometric assay of MAO-reaction revealed the following distribution

of the V_{max}/K_m index $\frac{nM \text{ MPP}^+}{(\mu g \cdot \text{hour} \cdot \mu M \text{ MPTP})}$ of the synaptosomal P_2 fraction in the following 6 brain areas: nucl. Caudatus ($1,50 \pm 0,56$), nucl. Accumbens ($0,73 \pm 0,88$), sub t. Nigra ($0,63 \pm 0,25$), glob. Pallidus ($0,57 \pm 0,18$), locus ceruleus ($0,43 \pm 0,18$), Putamen ($0,26 \pm 0,09$).

The highest rate of MPP⁺ production is observed in nucl. Caudatus. It may be assumed that this area is an area of primary functional disturbances under the action of MPTP.

Human brain dopaminergic system is characterised by wide variation in the biochemical index (V_{max}/K_m) of the rate of MAO reaction to MPTP. This indicates an individual sensitivity of 4 patients to the neurotoxin at low ($\leq 10^{-6}$ M) concentration of MPTP in brain tissue.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Davis G. C., Williams F. C., Markey S. P., Ebert M. H., Caine E. D., Reichart C. M., Kopin S. J. *Psychiatr. Res.*, v. 1, p. 249-254, 1979.
2. Langston J. W., Ballard P., Tetrud J. W., Irwin I. *Science*, v. 219, p. 99-980, 1983.
3. Gray F. G., Whitaker V. P. J. *Anat.* v. 96, p. 79-88, 1952.
4. Patric R. L., Snyder T. E., Barches J. D. *Mol. Pharmacol.*, v. 11, p. 621-631, 1974.
5. Ермаков Н. В., Ишков А. Г., Микеров С. В., Мирошниченко Е. В. *Вопр. мед. химии*, № 3, с. 67-68, 1991.
6. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, c. 193, p. 265-271, 1951.
7. Lineweaver H., Burk D. J. *Amer. Chem. Sol.*, v. 56, p. 658-656, 1934.
8. Langston J. W. *Life Sci.*, v. 36, p. 201-203, 1984.
9. Irwin J. *Life Sci.*, v. 36, p. 207-212, 1985.
10. D'Amato R. J., Alexander G. M., Schwartzman R. J., Kitt C. K., Price D. L., Snyder S. M. *Life Sci.*, v. 40, p. 705-712, 1987.
11. D'Amato R. J., Lipman Z. P., Snyder S. H. *Science*, v. 231, p. 987-989, 1986.
12. Imai H., Nakamura T., Endo K., Narabayashi H. *Brain Res.*, v. 474, p. 327-332, 1988.
13. Javitch J. A., D'Amato R. J., Strittwater S. M., Snyder S. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 82, p. 2173-2178, 1985.
14. Langston J. W. *Neurosci. Lett.*, v. 43, p. 87-92, 1984.

Поступила 1. V. 1991