

УДК 577.152.143

АКТИВНОСТЬ МАО В ОТДЕЛАХ МОЗГА МОНГОЛЬСКИХ ПЕСЧАНОК ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ И В ПЕРИОД РЕЦИРКУЛЯЦИИ

Горошинская И.А., *Стоянович Т.,
*Мичич Д., *Мршуля Б.Б.

НИИ биологии Ростовского государственного
университета,

*Институт биохимии Белградского
университета, Югославия

Изучены активность, субстратная специфичность и кинетика МАО в митохондриальной и синаптической фракциях коры головного мозга, стриатума и гиппокампа монгольских песчанок при 1-, 5-минутной ишемии и в постишемический период. Наиболее выраженные изменения свойств МАО, проявляющиеся в снижении активности, приобретении способности дезаминировать глюкозамин, увеличении K_m , снижении V и в значительном отклонении формы кинетических кривых от гиперболического характера, обнаружены в митохондриальной фракции всех исследованных отделов мозга при 5-минутной ишемии. В синаптической фракции изменения свойств МАО имеют ту же направленность, но выражены при 5-минутной ишемии в меньшей степени, чем в митохондриях. В постишемический период активность и субстратная специфичность МАО нормализуется уже через 1 ч рециркуляции. Нормализация кинетических параметров наблюдается через 1 ч лишь в коре, в стриатуме — через 4 суток. Сравнение реакции разных отделов мозга указывает на большую чувствительность гиппокампа по сравнению с корой и стриатумом.

* * *

Ишемия головного мозга является основным повреждающим фактором, определяющим развитие функциональных и метаболических нарушений при инсульте, одном из трех важнейших заболеваний в развитых странах мира. Удобной моделью для исследования ишемии и восстановительных процессов после ишемического инсульта служат монгольские песчанки *Meriones unguiculatus*. Эти животные обладают своеобразным строением круга кровообращения, позволяющим вызывать ишемию головного мозга как при двустороннем, так и при одностороннем пережатии общих сонных артерий. Нами использована модель с двусторонней окклюзией общих сонных артерий, вызывающая у всех животных неврологические признаки ишемии, тогда как при односторонней окклюзии ишемического состояния достигается только у 40% животных [1]. Ведущую роль в механизме патогенетических изменений, происходящих при ишемии, играют нарушения обмена медиаторных систем. Для церебральной ишемии характерны значительные изменения уровня серотонина и катехоламинов,

а также активности ферментов деградации моноаминов [2]. Наиболее чувствительными к ишемии оказались мембраносвязанные ферменты [3].

Целью настоящей работы явилось исследование активности, субстратной специфичности и кинетики МАО, фермента митохондриальных мембран, являющегося ключевым звеном обмена моноаминовых медиаторов.

МАО обладает способностью претерпевать обратимые качественные изменения каталитических свойств (трансформацию) при состояниях, сопровождающихся интенсификацией ПОЛ [4]. Ранее нами обнаружено изменение субстратной специфичности МАО при высотной гипоксии [5]. Накопление липидных перекисей в условиях ишемии [6,7] позволяет предположить, что и при гипоксическом состоянии данной этиологии создаются условия для трансформации МАО. Для проверки данного предположения наряду с активностью фермента со специфическим субстратом кинурамином исследовали интенсивность дезаминирования глюкозамина. Глюкозамин в норме не относится к субстратам МАО, но в условиях, способствующих изменению субстратной специфичности, например, при гипероксии, высотной гипоксии и холодовом стрессе [8], начинает дезаминироваться с наибольшей скоростью по сравнению с другими необычными субстратами. Учитывая неодинаковую чувствительность отделов мозга к ишемическому фактору, исследования проводили в коре головного мозга, стриатуме и гиппокампе при 1-, 5-минутной ишемии и в постишемический период через 1 ч и 4 суток после 5-минутной ишемии. Поскольку МАО локализована не только в свободных митохондриях, но и в синапсомембранных, активность фермента определяли в обеих субклеточных фракциях.

Материалы и методы

В работе использовано 116 половозрелых монгольских песчанок обоего пола массой 50—60 г. Ишемию головного мозга вызывали двусторонним пережатием общих сонных артерий в шейном районе животных [2]. Животных декапитировали сразу после 1- и 5-минутной ишемии и через 1 ч и 4 суток после 5-минутной ишемии. В одном опыте объединяли участки мозга, полученные от 4—5 животных, в каждой группе использовано от 16 до 32 песчанок. Субфракции чистых митохондрий и синапсомембран получали центрифугированием в градиенте фикола [9,10]. Активность МАО с субстратом кинурамином определяли микрофлуориметрическим методом [11]. Интенсивность дезаминирования глюкозамина исследовали по скорости образования глюкозы, о котором судили по образованию восстановленного NADP в присутствии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и гексокиназы. Глюкозамин использовали в концентрации 10 мМ. Белок определяли по методу Bradford [12]. На основании величин активности фермента при 6 разных концентрациях кинурамина ($1 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $6 \cdot 10^{-4}$ и $1 \cdot 10^{-3}$ М) строили кривые зависимости начальной скорости (V_0) реакции дезаминирования кинурамина от концентрации

субстрата [S]. K_m и V определяли графически, пользуясь методом двойных обратных величин Лайнуивера-Берка, а также в ряде случаев для сравнения методом Хофсти (график зависимости V_o от V_o/S). Статистическую достоверность различий определяли по t -критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Активность МАО не изменялась в условиях 1-минутной ишемии в митохондриях коры головного мозга и стриатума, только в гиппокампе обнаружена тенденция к снижению. При 5-минутной ишемии активность фермента значительно снижается в митохондриальных фракциях всех исследованных отделов мозга: в коре—на 69%, стриатуме—на 65%, гиппокампе—на 67%. Снижение активности МАО при 5-минутной ишемии сопровождается 2—7-кратным усилением интенсивности дезаминирования глюкозамина. Достоверное увеличение глюкозаминдезаминазной активности в гиппокампе наблюдается уже при 1-минутной ишемии (табл.1).

Таблица 1
Дезаминирование кинурамина и глюкозамина в митохондриях мозга монгольских песчанок в условиях ишемии и при восстановлении кровотока (нм/мг белка/мин)

Условия опыта	Кора головного мозга		Стриатум		Гиппокамп	
	Кинурамин	Глюкозамин	Кинурамин	Глюкозамин	Кинурамин	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
1-минутная ишемия	0,88±0,27 $p>0,05$	1,97±0,33 $p>0,05$	2,62±0,32 $p>0,05$	2,03±0,28 $0,17>p>0,05$	1,70±0,08 $0,1>p>0,05$	1,58±0,36 $p<0,05$
5-минутная ишемия	0,82±0,05 $p<0,001$	2,85±0,38 $p<0,05$	0,94±0,03 $p<0,001$	3,01±0,36 $p<0,02$	0,76±0,04 $p<0,01$	3,01±0,76 $p<0,01$
5-минутная ишемия + 1ч	2,89±0,17 $p>0,05$	1,31±0,14 $p>0,05$	2,11±0,20 $p>0,05$	1,54±0,41 $p>0,05$	2,06±0,13 $p>0,05$	0,81±0,22 $p>0,05$
5-минутная ишемия + 4 суток	3,03±0,20 $p>0,05$	0,17±0,11 $p<0,05$	2,63±0,28 $p>0,05$	0,21±0,12 $p<0,05$	2,21±0,22 $p>0,05$	0,44±0,44 $p>0,05$

Примечание. Здесь и в табл.2 каждая цифра является средней из 4-8 опытов (16-32 животных).

В синапсосомной фракции при 5-минутной ишемии общая активность МАО снижается в меньшей степени, чем в митохондриях: в коре—на 28%, стриатуме—на 41%, гиппокампе—на 38%. В то же время в синапсосомной фракции снижение активности МАО (в коре—на 39%, стриатуме—на 23%) наблюдается и при 1-минутной ишемии. Усиление интенсивности дезаминирования глюкозамина имеет место в синапсосомах всех отделов мозга и при 1-минутной, и при 5-минутной ишемии (табл.2).

Исследование активности МАО в постишемический период показало, что в митохондриальной фракции уже через 1 ч после восстановления

кровотока как общая активность МАО, так и дезаминирование глюкозамина нормализуется. В синапсомной фракции, так же как и в митохондриальной, активность МАО с кинурамином нормализуется уже к первому часу рециркуляции и остается на контрольном уровне и через 4 суток. Способность дезаминировать глюкозамин через 1 ч после восстановления кровотока снижается в синапсосах по сравнению с 5-минутной ишемией, но остается на сравнительно высоком уровне. На 4-е сутки рециркуляции дезаминирование глюкозамина полностью отсутствует (табл.1,2).

Таблица 2
Дезаминирование кинурамина и глюкозамина в синапсосах мозга монгольских песчанок в условиях ишемии и при восстановлении кровотока (нм/мг белка/мин)

Условия опыта	Кора головного мозга		Стриатум		Гиппокамп	
	Кинурамин	Глюкозамин	Кинурамин	Глюкозамин	Кинурамин	Глюкозамин
Контроль	1,62±0,07	0,37±0,23	1,64±0,13	0,48±0,23	1,19±0,06	0,35±0,26
1-минутная ишемия	0,99±0,19 p<0,05	2,16±0,50 p<0,02	1,26±0,15 p>0,05	1,37±0,27 p<0,05	1,02±0,28 p>0,05	1,71±0,34 p<0,02
5-минутная ишемия	1,16±0,05 p<0,01	1,41±0,17 p<0,01	0,97±0,08 p<0,01	3,57±0,07 p<0,001	0,73±0,07 p<0,01	4,27±0,66 p<0,001
5-минутная ишемия + 1ч	1,69±0,08 p>0,05	1,36±0,49 0,1>p>0,05	1,40±0,01 p>0,05	1,61±0,59 0,1>p>0,05	1,14±0,07 p>0,05	0,88±0,29 p>0,05
5-минутная ишемия + 4 суток	1,38±0,22 p>0,05	0,00	1,55±0,03 p>0,05	0,23±0,22	1,04±0,07 p>0,05	0,00

Таким образом, в условиях ишемии имеет место обратимое изменение субстратной специфичности МАО: снижается активность с кинурамином и резко усиливается интенсивность дезаминирования глюкозамина. Это позволяет заключить, что для ишемии характерны качественные изменения каталитических свойств МАО, подобные обнаруженным ранее при других экстремальных состояниях и обусловленные окислением сульфгидрильных групп фермента липидными перекисями.

Кинурамин является общим субстратом для двух форм фермента: МАО типа А и МАО типа Б [13]. Преинкубация с избирательно действующим ингибитором МАО типа А хлоргилином [14] показала, что в условиях ишемии ингибируются обе формы фермента.

При 5-минутной ишемии более выраженное снижение моноаминоксидазной активности обнаружено в митохондриальной фракции по сравнению с синапсомной. В то же время при более мягком воздействии — 1-минутной ишемии синапсомная МАО оказалась более чувствительной к действию экстремального фактора. В синапсосах коры снижение общей активности МАО при 1-минутной ишемии выражено даже больше, чем при 5-минутной. Достоверное усиление глюкозаминдезаминазной активности

имеет место в синапсоммах всех исследованных отделов мозга. В митохондриальной же фракции при 1-минутной ишемии изменяется активность и субстратная специфичность МАО только в гиппокампе. Полученные данные свидетельствуют об определенных различиях в чувствительности к ишемии митохондриальных и синапсоммных МАО.

Изучение кинетики реакции дезаминирования кинурамина показало, что во всех трех исследованных отделах мозга интактных животных кривые зависимости V_0 от $[S]$ имеют гиперболический вид. В условиях ишемии форма кинетических кривых меняется: они приобретают более сложный негиперболический характер. В митохондриях коры головного мозга и стриатума существенное отклонение формы кривых от гиперболического вида наблюдается только при 5-минутной ишемии. Наиболее сложную форму приобретают кинетические кривые в гиппокампе. В данном случае значительные отклонения формы кривых от гиперболического характера имеют место как при 5-минутной, так и 1-минутной ишемии (рис.1).

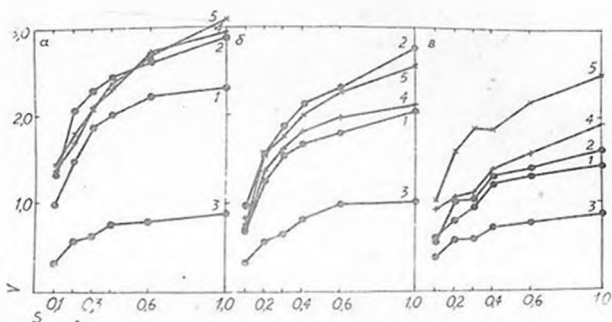


Рис.1. Зависимость скорости дезаминирования кинурамина (V , нмоль/мг белка/мин) МАО митохондрий коры головного мозга (α), стриатума (δ) и гиппокампа (ν) моногальских песчанок от концентрации субстрата (S , мМ) в норме и при ишемии. 1—контроль, 2—1-минутная ишемия, 3—5-минутная ишемия, 4—через 1 ч после 5-минутной ишемии, 5—через 4 суток после 5-минутной ишемии

Хотя кривые зависимости скорости моноаминоксидазной реакции от концентрации кинурамина лишь в ряде случаев подчиняются уравнению Михаэлиса-Ментен, мы, несмотря на известную некорректность нашего подхода, попытались определить кинетические параметры, представив данные в двойных обратных координатах. Из рис.2 видно, что в условиях 5-минутной ишемии наблюдается значительное увеличение K_m , сопровождающееся снижением V во всех исследованных отделах мозга. При 1-минутной ишемии увеличение K_m наблюдается в митохондриях стриатума

и гиппокампа, но отсутствует в коре. V в условиях 1-минутной ишемии достоверно не изменяется. При 5-минутной ишемии во всех отделах мозга можно выявить как бы две формы фермента, отличающиеся по сродству к субстрату, но имеющие близкие V . В коре K_m одной формы увеличена по сравнению с контролем на 197%, K_m другой формы — на 52%, V снижена на 51 и 62% соответственно. В стриатуме K_m одной формы увеличена на 440%, другой формы — на 170%, V снижена на 26 и 36% соответственно. В гиппокампе K_m одной формы увеличена на 46%, K_m другой формы достоверно не отличается от контроля, V снижена на 45 и 34% соответственно. При 1-минутной ишемии появление двух форм фермента имеет место только в гиппокампе, где K_m одной формы превышает контрольный уровень на 61%, K_m другой формы достоверно не отличается от контроля.

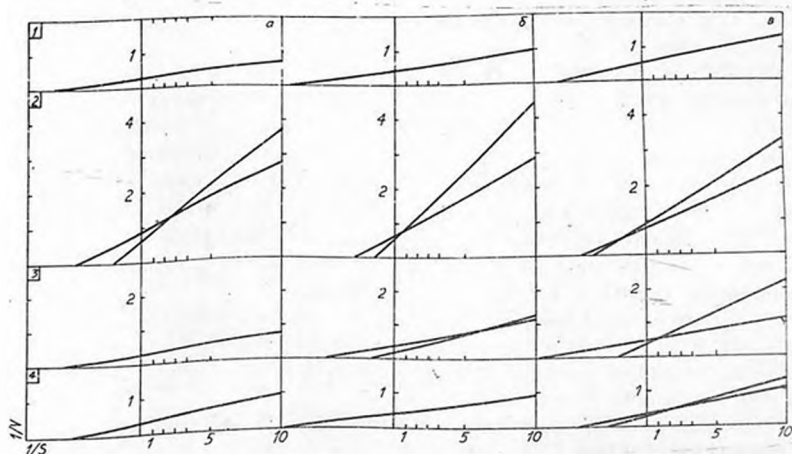


Рис. 2. Зависимость скорости дезаминирования кинураммина от концентрации субстрата в обратных величинах по Лайнуиверу-Берку в митохондриях коры головного мозга (а), стриатума (б) и гиппокампа (в) монгольских песчанок в норме и при ишемии. 1 — контроль, 2 — 5-минутная ишемия, 3 — через 4 ч после 5-минутной ишемии, 4 — через 4 суток после 5-минутной ишемии

Особый интерес представлял вопрос, сопровождается ли восстановлением активности и субстратной специфичности МАО в постишемический период нормализацией кинетики катализируемой ферментом реакции. Как видно из рис. 1, при восстановлении рециркуляции форма кривых зависимости V_0 от S в митохондриях коры головного мозга и стриатума приближается к гиперболической. Однако кривые не становятся идентичными соответствующим гиперболическим кривым интактных животных, в большей степе-

ни напоминая характер кривых у животных, подвергнутых 1-минутной ишемии. В отличие от коры и стриатума в митохондриях гиппокампа и через 1 ч, и через 4 суток после восстановления рециркуляции кинетические кривые имеют сложный негиперболический характер.

Представление данных в двойных обратных координатах показало, что через 1 ч после восстановления кровотока нормализация кинетических показателей наблюдается лишь в коре головного мозга. В стриатуме и гиппокампе сохраняется существование двух прямых, которым соответствуют разные значения K_m и V . На 4 сутки рециркуляции в стриатуме выявляется лишь одна форма МАО, идентичная по K_m ферменту интактных животных, а в гиппокампе сохраняются как бы две формы фермента. K_m одной формы увеличена на 102%, K_m другой формы не отличается от контроля. При этом в отличие от 5-минутной ишемии, когда V были снижены, на 4 сутки рециркуляции V обеих форм в гиппокампе увеличены на 83 и 57% соответственно. Увеличение на 29% V наблюдается и в коре головного мозга (рис.2).

Сравнение реакции МАО разных отделов мозга на воздействие ишемического фактора указывает на большую чувствительность гиппокампа по сравнению с корой и стриатумом. При 1-минутной ишемии только в этом отделе мозга обнаружено снижение активности митохондриальной МАО, изменение ее субстратной специфичности и появление двух форм фермента, отличающихся по сродству к субстрату. Об этом же свидетельствует и исследование кинетических показателей в период рециркуляции. Из всех исследованных отделов мозга лишь в гиппокампе сохраняются две формы фермента через 4 суток после ишемии.

Полученные нами биохимические данные согласуются с результатами электрофизиологических и гистологических исследований, также свидетельствующих о большей чувствительности к ишемии гиппокампа по сравнению с другими отделами мозга [1].

Сопоставление представленных в нашей работе данных с результатами проведенного нами ранее изучения влияния высотной гипоксии [5] свидетельствует о значительно большем ингибировании активности МАО при ишемии. При этом в условиях ишемии наблюдается как ингибирование МАО типа А, так и ингибирование МАО типа Б, тогда как при гипоксической гипоксии снижается только активность МАО типа А. При ишемии выявлены также существенные изменения ультраструктуры синапсов, проявляющиеся прежде всего в уменьшении числа синаптических пузырьков, набухании митохондрий, уменьшении числа крист [15]. Снижение активности МАО, показанное нами в условиях ишемии в синаптической фракции мозга, согласуется с повреждением структуры митохондрий синапсов. Одной из причин нарушения мембранных структур, в том числе ультраструктуры нейронов, происходящего в процессе ишемии [16], по-видимому, является появление способности МАО дезаминировать структурный компо-

нент мембран глюкозамин. Ишемическая форма гипоксии представляется более тяжелой патологией, чем гипоксическая гипоксия, поскольку наряду с дефицитом кислорода организм испытывает недостаточное снабжение рядом других компонентов, поступающих с кровотоком.

MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY IN VARIOUS BRAIN REGIONS OF MONGOLIAN GERBILS UNDER CEREBRAL ISCHEMIA AND DURING REPERFUSION

Goroshinskaya I.A., Stojanovic T.,

*Mičić D., *Mršulja B.B.

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

The activity, substrate specificity and kinetics of MAO were studied in mitochondrial and synaptosomal fractions of *Mongolian gerbils* cerebral cortex, striatum and hippocampus after 1 or 5 minutes of ischemia and during the postischemic period. The most pronounced changes of MAO involved a decrease in its activity, appearance of the ability to deaminate glucosamine, increase in K_m , decrease in the reaction rate and deviation of the kinetic curves from the hyperbolic type; these effects were observed in the mitochondrial fraction of studied all brain structures after 5 minutes of ischemia. In the synaptosomal fraction changes of MAO properties followed the same pattern, but were less pronounced as compared with mitochondria after 5 minutes of ischemia. During the postischemic period MAO activity and substrate specificity returned to the norm already one hour after reestablishment of circulation. Kinetics of the cerebral cortex enzyme normalized after 1 hour, but kinetics of the striatum enzyme normalized only after 4 days. Comparison of the enzyme activity response from various brain regions showed greater vulnerability of hippocampus as compared with cerebral cortex and striatum.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lust W.D., Arai H., Yasumoto Y., Whittingham T.S., Djuričić B., Mršulja B.B., Passonneau J.V.—In: Cerebral energy metabolism and metabolic encephalopathy (ed.D.W.McCandless), p.79—117, Plenum Publishing Corporation, 1985.
2. Cvejić V., Mičić D.V., Djuričić B.M., Mršulja B.J., Mršulja B.B. *Acta Neuropathologica*, v.51, p.71—77, 1980.
3. Mičić D.V., Abe K., Rausch W.D., Abe T., Spatz M. Circulatory and developmental aspects of brain metabolism (ed.M.Sratz, B.B.Mršulja, L.Rakić, W.D.Lust), p.81—95, Plenum Publishing Corporation, 1980.
4. Горкин В.З. Молекуляр.биология, т.10, с.717—736, 1976.
5. Горошинская И.А., Броновицкая З.Г., Кричевская А.А., Кабарухина Е.Г. Нейрохимия, т.1, с.282—286, 1982.

6. Селиченко В.В., Полуэктов Л.В., Конвай В.Д. Бюл.эксперим.биол.и мед. т.96, N7, с.12-14, 1983.
7. Imaizumi S., Kayata T., Suzuki J. *Stroke*, v.15, p.1061—1065, 1984.
8. Горошинская И.А. Бюл.эксперим.биол.и мед., т.99, с.672—674, 1985.
9. Guard J.W., Jones L.R., Mahler H.R., Moore W.J. *J.Neurochem.*, v.22, p.281—290, 1974.
10. Morgan I.G., Wolfe L.S., Mandel P., Gombos G. *Biochim.et biophys.acta*, v.241, p.737—751, 1971.
11. Krajl M. *Biochem.Pharmacol.*, v.14, p.1683—1685, 1965.
12. Bradford M. *Anal.Biochem.* v.72, p.248—251, 1976.
13. Hall T.R., Figueroa H.R. *Pharmacol.Res.Comm.*, v.14, p.431—441, 1982.
14. Yang H.Y.T., Neff N.H. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, v.189, N3, p.733—740, 1974.
15. Боголепов Н.Н. Ультраструктура мозга при гипоксии, М., Медицина, 1979.
16. Petitto C.K., Pulsinelli W.A. *J.Neuropathology and experimental neurology*, v.43, p.141—153, 1984.

Поступила 21.09.1988

G. Naether. Amino Acid Availability and Brain Function in Health and Disease (*NATO ASI Servies, v.H20*), Springer, Berlin, 490p., 1988.
Усвояемость аминокислот и функция мозга у здоровых и больных.

Анализ существующей информации и новейших достижений в области усвояемости аминокислот и физиологии мозга представлен в трудах более чем 40 ведущих специалистов. Семь взаимосвязанных глав охватывают следующие проблемы: периферический контроль поступления аминокислот в мозг; захват, компартментализация и утилизация аминокислот в мозгу; влияние изменения уровня поступающих аминокислот-предшественников на обмен трансмисмиттеров на функциональную нейротрансмиссию, на физиологию и поведение; влияние изменения в поступлении аминокислот на нейрологические и психиатрические заболевания; роль усвояемости аминокислот в ходе эмбриогенеза в развитии мозга.

Книга представляет интерес для специалистов по нейронаукам.