



УДК 577.152.143:616.89—008.441.13

ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА АКТИВНОСТЬ МАО ТИПА Б
МОЗГА, ТРОМБОЦИТОВ И АМИНОКСИДАЗЫ КРОВИ

ДРОЗДОВ А. З.

ВНИИ общей и судебной психиатрии им. В. С. Сербского МЗ СССР, Москва

Как известно, нарушения метаболизма катехоламинов, и в первую очередь дофамина, играют важнейшую роль в формировании клинической картины как острого алкогольного опьянения, так и синдромов, характерных для хронического алкоголизма [1]. В качестве одной из причин изменения метаболизма катехоламинов может выступать влияние этанола на активность ферментов их обмена. В частности, при алкоголизме отмечается сниженная активность МАО мозга, тромбоцитов, печени [2—4] и аминоксидазы (бензиламиноксидазы) (АО) плазмы крови [2]—ферментов, дезаминирующих наряду с другими субстратами и дофамин.

На протяжении многих лет изучались эффекты непосредственного влияния этанола на активность упомянутых ферментных систем. К сожалению, результаты исследований не отличаются однозначностью—сообщалось об отсутствии какого-либо влияния этанола на активность МАО [5, 6], об активировании [7] и об ингибировании [8] этого фермента этиловым алкоголем. Цель настоящего исследования—изучение ферментативной активности митохондриальных МАО типа Б мозга и тромбоцитов и активности аминоксидазы плазмы крови в присутствии этилового спирта, а также оценка механизма влияния этанола на активность этих энзимов.

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 150—200 г. Тромбоциты и плазму выделяли из крови двух здоровых доноров в возрасте 24-х лет, затем полученный материал объединяли. Активность МАО типа Б в мозгу крыс и в тромбоцитах человека и активность АО плазмы крови человека (субстрат—бензиламин) определяли разработанным нами методом.

Активность МАО определяли в гомогенате продолговатого мозга. Крыс декапитировали, продолговатый мозг выделяли, гомогенизировали в 10 объемах 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,6, 0,05 мл гомогената вносили в реакционную смесь. Кровь для определения активности МАО

тромбоцитов собирали в стаканчики, содержащие 0,27 М раствор ЭДТА, рН 7,4 (0,6 мл/20 мл крови), центрифугировали при 300g 5 мин. Обогащенную тромбоцитами плазму центрифугировали 20 мин при 2000g, осадок гомогенизировали в 2—3 мл 0,01 М фосфатного буфера, рН 7,6, гомогенат центрифугировали при 20000 g 20 мин. Получившийся осадок мембранных структур тромбоцитов гомогенизировали в 1—2 мл 0,2 М фосфатного буфера, рН 8,4, 0,1—0,2 мл гомогената вносили в реакционную смесь (100—400 мкг белка в пробе). Кровь для определения активности АО плазмы собирали в гепаринизированные стаканчики, центрифугировали при 10000 g 10 мин и 0,1 мл плазмы вносили в реакционную смесь. Все стадии выделения препаратом мозга и крови проводили при 4°.

Таблица

Ингибирование этанолом активности аминоксидаз		
	K_m для бензиламина, мМ	K_i для этанола, мМ
МАО мозга крысы	140,1 $\pm$ 17,7 (3)	167,0 $\pm$ 30,2 (3)
МАО тромбоцитов человека	31,4 $\pm$ 9,8 (3)	144,4 $\pm$ 45,8 (3)
Аминоксидаза плазмы крови человека	93,7 $\pm$ 10,5 (3)	184,0 $\pm$ 53,6 (3)

Примечание. В скобках указано количество проведенных экспериментов, достоверная разница между K_i отсутствует.

Реакционная смесь (общий объем 0,6 мл) содержала препарат мозга или крови, фосфатный буфер и бензиламин в конечной концентрации (в мМ): мозг—7,5, тромбоциты—2, плазма крови—1, приготовленный на этом же буфере. Для мозга использовали 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,6, для тромбоцитов—0,2 М, рН 8,4, для плазмы крови—0,2 М, рН 7,2. Этанол добавляли в реакционную смесь до внесения субстрата. Обычно конечные концентрации этанола составляли 5,8, 57,8, 288,9, 577,8 мМ.

Реакционную смесь инкубировали 10 мин (мозг, тромбоциты) или 1 ч (плазма крови) при 37° при непрерывном встряхивании. Реакцию останавливали внесением 0,1 мл 20%-ной ТХУ в ледяной бане. Контрольные пробы инкубировали без бензиламина, который добавляли после внесения ТХУ. После остановки реакции в пробы вносили 1,5 мл н-гептана и пробирки интенсивно встряхивали в течение 3-х мин в вортекс-миксере, после чего центрифугировали 10 мин при 2000 g. 20 мкл гептановой фазы вносили в хроматографическую систему высокого давления (насос—„Constametric III“, детектор—„Spectromonitor III “LDC“, США). Разделение проводили на колонке „Spherisorb ODS-10“ („Alltech“, США), при 35°, в качестве элюента использовали систему этанол—H₂O (60% к 40% по объему), скорость потока 2 мл/мин. В этих условиях пик бензальдегида выходил из колонки через 1,9—2,2 мин после введения образца. Регистрацию данных проводили при длине волны 250 нм.

Содержание белка в пробах определяли с помощью метода Lowry

и соавт. [9]. В ходе исследования показано, что этанол ингибирует активность МАО типа В мозга крыс, тромбоцитов человека и активность АО плазмы крови человека. Активности всех ферментов менялись под влиянием этанола сходным образом, а величины K_i практически не различались между собой (таблица). Степень ингибирования МАО этанолом не зависела от времени пренкубации фермента в присутствии этилового алкоголя. Установлено также, что ингибирование носит конкурентный характер (рисунок).

Таким образом, полученные данные совпадают с результатами работы [8], в которой было обнаружено конкурентное ингибирование активности МАО типа В мозга и тромбоцитов этанолом. Однако авторы упомянутого исследования полагают, что ингибирование алкоголем активности МАО типа В обусловлено изменением состояния липидного микроокружения МАО в присутствии этанола. Результаты настоящей работы ставят это предположение под сомнение, поскольку АО крови не является мембраносвязанным ферментом. Если предположить, что действие этанола связано с нарушением вязкости липидного бислоя вблизи молекулы фермента, то результаты, касающиеся АО крови (рисунок, таблица), трудно интерпретировать.

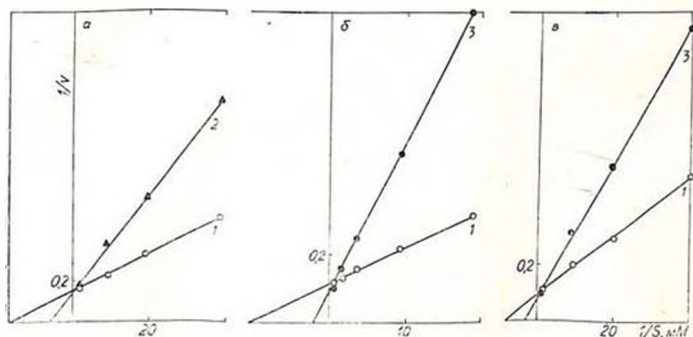


Рис. Активность МАО тромбоцитов (а), аминоксидазы плазмы крови (б), МАО типа В продолговатого мозга (в) в отсутствие и в присутствии этанола в реакционной смеси. По оси абсцисс — $1/[\text{бензилламин}]$, $1/\text{мМ}$; 1—контроль, 2—288,9 мМ этанол, 3—577,8 мМ этанол

Мы использовали различные препараты ферментов, ферменты разных тканей и видов. Тем не менее, были получены однотипные кинетические параметры конкурентного ингибирования исследуемых ферментов этанолом. Этот факт указывает на то, что этиловый алкоголь может конкурировать с субстратом за связывание в активном центре ферментов.

Следует отметить, что в литературе имеются данные о сходстве конкурентного ингибирования митохондриальных МАО типа В и АО плазмы крови алифатическими спиртами, например, октанолом [5, 10], но авторы сообщили, что этанол в концентрации 0,2 М не оказывает видимого эффекта на активность МАО и АО крови.

Вполне обосновано, что этанол способен ингибировать MAO типа Б в организме при употреблении алкоголя людьми [8]. Согласно данным настоящей работы, этанол может угнетать активность и MAO типа Б, и АО крови. Следовательно, можно ожидать, что уменьшение активности этих ферментов приведет к замедлению дезаминирования как самих катехоламиновых медиаторов, так и моноаминов, которые могут выступать в роли «ложных медиаторов» (например, β -фенилэтиламин [8]). Одновременно при ингибировании MAO и АО в присутствии алкоголя и ацетальдегида может стимулироваться альтернативный путь утилизации катехоламинов с образованием тетрагидроизохинолиновых и тетрагидропапаверолиновых алкалоидов [11]. Вследствие этого эффект ингибирования указанных аминоксидаз может проявляться в клинической картине острого алкогольного опьянения.

EFFECT OF ETHANOL ON THE B FORM MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY IN BRAIN AND PLATELETS AND ON PLASMA AMINE OXIDASE ACTIVITY

DROZDOV A. Z.

All-Union Research Institute of General and Forensic Psychiatry,
Moscow

Ethanol has been shown to inhibit the activity of these enzymes (benzylamine as substrate). The inhibition is of competitive nature and K_i values do not differ for the enzymes studied (140–180 mM). The mechanism of ethanol action and possible consequences of enzyme activity alteration after ethanol ingestion are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анохина И. П., Котан Б. М.—В кн.: Итоги науки и техники, т. 13, с. 151–178, М., ВИНТИ, Токсикология, 1984.
2. Анохина И. П., Котан Б. М., Дроздов А. З., Губский А. В.—В кн.: Алкоголизм (клиника, терапия, судебно-психиатрическое значение) (под редакцией Г. В. Морозова), с. 62–69, М., 1983.
3. Giller E. J., Nocks J., Hall H., Stewart C., Schilt J., Sherman B. *Psychiatry Res.*, v. 12, p. 339–347, 1984.
4. Major L. F., Hawley R. J., Salni N., Garrick V. A., Murphy D. L. *Alcoholism. Clin. Exp. Res.*, v. 9, p. 6–9, 1985.
5. McEwen C. M., Sasali G., Lenz W. R. *J. Biol. Chem.*, v. 243, p. 5217–5225, 1968.
6. Major L. F., Murphy D. L. *Brit. J. Psychiatry*, v. 132, p. 548–554, 1978.
7. Kurosawa Y. *Jap. J. Pharmacol.*, v. 24, p. 787–795, 1974.
8. Tabakoff B., Lee J. M., De Leon-Jones F., Hoffman P. L. *Psychopharmacology*, v. 87, p. 152–155, 1985.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265–276, 1951.
10. McEwen C. M. *J. Biol. Chem.*, v. 240, p. 2011–2018, 1965.
11. Сытинский Н. А. Биохимические основы действия этанола на центральную нервную систему, М., Медицина, 1980.

Поступила 16. VI 1987