



УДК 577.15.17:577.152:577.158

## АКТИВАЦИЯ МАО ТИПА Б ГОЛОВНОГО МОЗГА БЫКА 2-ИЗОПРОПОКСИФЕНИЛМЕТИЛКАРБАМАТОМ И НЕКОТОРЫМИ ЕГО СТРУКТУРНЫМИ АНАЛОГАМИ

\*ЗЕИНАЛОВ Т. А., ЕРМОЛАЕВ К. М., ПОЗДНЕВ В. Ф., КАМЫШАНСКАЯ Н. С.

ИНИ вирусологии, микробиологии и гигиены им. Г. М. Мусабекова МЗ АзССР,  
Баку; Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В опытах с препаратами митохондриальной фракции головного мозга быка при преникубации с байгоном—пестицидом класса карбаматов была обнаружена избирательная активация реакции окислительного дезаминирования фенилэтиламина—субстрата МАО типа Б, но не серотонина—субстрата МАО типа А и тирамина, окисляющегося обоими типами МАО. Цинеб—другой пестицид класса карбаматов, не содержащий фенильного радикала, тормозил активность МАО в отношении всех исследуемых субстратов. Стимулирующий эффект байгона опосредован воздействием на интактную мембрану: нарушение структуры мембраны в процессе солиобилизации и очистки фермента устраняло активирующее действие байгона. Одним из условий, определяющих активирующее действие структурных аналогов байгона, по-видимому, является их высокая липофильность. Введение в структуру байгона полярных групп прелотращало появление стимулирующего эффекта.

МАО, моноамин:  $O_2$ —оксидоредуктазы (дезаминирующие) (содержащие флавин) (КФ 1.4.3.4)—группа родственных, близких по свойствам, но поддающихся препаративному разделению ферментов. Они катализируют ключевую реакцию метаболизма биогенных аминов, многие из которых являются важнейшими медиаторами и модуляторами нервных импульсов в синаптических окончаниях аминергических нейронов. Из них МАО типа А специфически катализируют дезаминирование серотонина и норадреналина; МАО типа Б—окисление 2-фенилэтиламина и бензиламина. Дофамин, триптамин, тирамин дезаминируют оба типа МАО. Нарушение каталитической активности МАО имеет важное значение в патогенезе многих нервных и психических расстройств, а также целого ряда заболеваний, связанных с накоплением в тканях продуктов перекисного окисления липидов [1]. МАО типа А, расположенные на внутренней поверхности наружной мембраны митохондрий, окружены молекулами ненасыщенных жирных кислот, которые при физиологических значениях температуры находятся в жидком состоянии; МАО типа Б, локализованные на внеш-

ней поверхности этой мембраны в непосредственной близости к полярному слою фосфолипидов, находятся в более жестком липидном окружении, по-видимому, состоящем преимущественно из насыщенных жирных кислот и холестерина, входящих при 37° в твердую фазу.

В настоящее время достигнуты большие успехи в создании и изучении свойств субстратно-избирательных, обратимо действующих ингибиторов MAO типа А и Б, многие из которых нашли применение в клинике в качестве антидепрессантов [2]; активаторы же MAO еще мало изучены [3].

Недавно было обнаружено, что интоксикация пестицидами различного химического строения может сопровождаться нарушением реакций дезаминирования биогенных аминов [4]. В частности, при изучении влияния пестицидов класса карбаматов на активность MAO как в опытах *in vivo*, так и *in vitro* с митохондриальными мембранами, выделенными из головного мозга и печени крыс, было установлено, что инсектицид байгон (2-изопропоксифенилметилкарбамат) избирательно стимулировал окислительное дезаминирование фенилэтиламина [5]. Стимуляция активности MAO типа Б была обратной и протекала по конкурентному механизму. Целью данной работы было исследование влияния байгона и некоторых его структурных аналогов на скорость окислительного дезаминирования фенилэтиламина митохондриальными мембранами и высокоочищенными препаратами MAO.

## Материалы и методы

**Выделение митохондриальных мембран.** Из стволовой части головного мозга быка готовили 10%-ный гомогенат на охлажденном 0,25 М растворе сахарозы. Ядра и фрагменты клеток осаждали центрифугированием при 600 г в течение 10 мин. Митохондриальную фракцию получали центрифугированием надосадочной жидкости при 12000 g; осадок промывали охлажденным 0,01 М  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатным буфером, рН 7,4 (буфер А), суспендировали в том же буфере и вновь центрифугировали при 12000 g. Приготовленный таким образом препарат митохондриальной фракции сохраняли замороженными для дальнейшей работы при -20°.

**Очистка фермента.** Солюбилизацию, разделение и очистку препаратов MAO проводили по разработанному ранее методу [6], основанному на сочетании воздействия на препараты митохондрий неионного детергента 1,3%-ного тритона X-100 и 1,3 М мочевины в буфере А при концентрации белка в смеси 10 мг/мл. Суспензию перемешивали 30 мин при 4°, а затем центрифугировали в течение 30 мин при 40000 g. Мочевину удаляли, пропуская надосадочную жидкость через колонку с сефадексом G-50, уравновешенную буфером А. Элюат концентрировали в 6 раз методом ультрафильтрации на приборе «Амикон» (Голландия) с мембраной РМ-30. Концентрат наносили на колонку, содержащую АН-сефарозу 4 В, уравновешенную буфером А. Балластные белки удаляли промыванием колонки этим же буфером, содержащим 10%-ный тритон X-100. Высокоочищенный препарат MAO элюировали с колонки градиентом концентрации тритона X-100 (0,10—0,25%) в буфере А.

**Порядок проведения опытов.** В экспериментах были исследованы следующие соединения (табл. 3): цинне—Zn—N, N—этилен бис-дитиокарбамат (отечественный); байгон-2-изопропоксифенилметилкарбамат («Вауер», ФРГ); соединения, синтезированные в лаборатории органической химии Института биологической и медицинской химии

АМН СССР: № 1—2-гидроксибензилметилкарбамат, № 2-фенилметилкарбамат, № 3—*O,O'*-диацетилпирокатехин, № 4—*N,O,O'*-триацетил-3-аминопирокатехин, № 5—бромид *O,O'*-диацетил-3-пиридиниопирокатехина, 6—бромид 3-пиридиниопирокатехина, № 7—бромид 3-пиридинио-2-ацетокси-2-циклогексен-1-она, № 8—бромид 3-пиридинио-1-ацетокси-6-циклогексен-2-она. Фенилметилкарбамат (температура плавления 83—84°) и 2-гидроксибензилметилкарбамат (температура плавления 117—118°) были синтезированы обработкой соответственно дифенилкарбоната и пирокатехинкарбоната рассчитанными количествами метиламина в тетрагидрофуране. Синтез соединений №№ 4—8 многоэтапен и будет описан в отдельной статье.

Суспензию митохондриальной фракции (5 мг/мл) тщательно растирали и перемешивали с навесками указанных выше соединений (их конечная концентрация составляла 0,05 мМ) в гомогенизаторе Поттера и преникубировали в течение 30 мин при 37°. Об активности MAO судили по освобождению аммиака после инкубации при оптимальных условиях для исследуемого биологического материала с одним из аминов. Определение содержания аммиака в пробах проводили методом изотермической диффузии с последующей неселеризацией. Инкубацию проводили на воздухе в течение 10 мин. Пробы (конечный объем 1,8 мл) содержали 5 мг белка суспензии митохондриальной фракции, 0,1 М  $K^+$ ,  $Na^+$ -фосфатный буфер pH 7,4 и один из субстратов в следующих оптимальных концентрациях в пробе: тирамин гидрохлорид («Merck, ФРГ») — 1 мМ, серотонин креатининсульфат («Reanal», Венгрия) — 1 мМ, 2-фенилэтиламин гидрохлорид (отечественный) — 0,4 мМ. При указанных выше условиях реакция окислительного дезаминирования исследуемых субстратов протекала линейно.

## Результаты и обсуждение

В условиях наших опытов скорости дезаминирования тирамина, серотонина и фенилэтиламина при их инкубации с митохондриальной фракцией стволовой части головного мозга быка составляли 9,5, 5,6 и 4,7 нмоль/мг белка/мин. Преникубация митохондриальных фракций с байгоном приводила к значительной стимуляции реакции окислительного дезаминирования фенилэтиламина (в среднем в 2 раза), тогда как скорость окисления тирамина и серотонина оставалась без изменений (табл. 1). Преникубация же митохондриальной фракции с цине-

Таблица 1

Влияние карбаматных производных (0,05 мМ) — байгона и цинеба на скорость дезаминирования субстратов MAO при их инкубации с митохондриальной фракцией головного мозга быка (n=12)

Условия опыта	Дезаминирование в нмоль аммиака/мг белка/мин		
	тирамин	серотонин	2-фенилэтиламина
Контроль	9,5±1,4	5,6±0,7	4,70±0,07
Байгон	11,3±1,5	6,7±1,2	9,5±1,8*
Цинеб	5,1±1,3*	2,8±0,6*	2,70±0,05*

Примечание. \* $p < 0,05$ .

бом приводила к снижению скоростей дезаминирования всех исследуемых субстратов: тирамина — на 48%, серотонина — на 50% и фенилэтиламина — на 62% (табл. 1).

Таким образом, данные по исследованию влияния производных

карбамата цинеба и байгона на активность MAO митохондриальных фракций стволовой части головного мозга быка согласуются с полученными ранее результатами аналогичных опытов с MAO митохондрий мозга и печени крыс: байгон избирательно активировал процесс окисления фенилэтиламина субстрата MAO типа Б, но не влиял на реакции дезаминирования тирамина и серотонина; циниб тормозил скорость окисления всех исследованных субстратов.

Таблица 2.

Влияние байгона (0,05 мМ) на скорость дезаминирования субстратов MAO при их инкубации с высокоочищенными препаратами MAO головного мозга быка (n=5)

Условия опыта	Дезаминирование в нмоль аммиака/мг белка/мин		
	тирамина	серотонина	2-фенилэтиламина
Контроль	107	63	52
Байгон	96	67	58

В то же время в экспериментах с высокоочищенными препаратами митохондриальной MAO из стволовой части головного мозга быка не было отмечено стимулирующего действия байгона на скорость реакций окислительного дезаминирования не только тирамина и серотонина, но также и фенилэтиламина (табл. 2). В связи с этим полученные результаты дают основание предполагать, что избирательная активация байгоном дезаминирования фенилэтиламина была опосредована взаимодействием этого производного карбаминной кислоты с интактной митохондриальной мембраной: отделение MAO от её структурных элементов в процессе солюбилизации (в наших опытах путём сочетанного воздействия неионного детергента тритона X-100 и мочевины) полностью предотвращало стимулирующий эффект байгона.

Липидное окружение белковой части молекул MAO, находящихся в мембране, играет важную роль в формировании функционального состояния активного центра этих ферментов, в частности MAO типа Б. По литературным данным [7], частичная экстракция липидов метилэтилкетонем из митохондриальных мембран печени быка приводила к увеличению кажущейся  $K_m$  по отношению к фенилэтилмину более чем на порядок. В опытах с митохондриальными мембранами печени быка и крыс было обнаружено сильное и специфическое торможение активности MAO типа Б фосфатидилсеринном, ингибирующий эффект которого не предотвращала обработка мембран другими фосфолипидами, хаотропными агентами и ультразвуком, но частично устраняла обработка мембран поверхностно-активным веществом — октилглюкозидом. Далее следует особо отметить, что фосфатидилсерин не действовал на солюбилизированную MAO типа Б из печени быка; очевидно, для специфического взаимодействия этого фосфолипида с MAO необходимо нахождение фермента в интактной мембране [8].

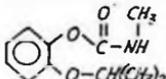
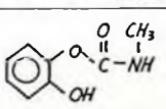
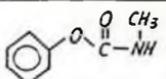
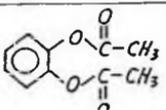
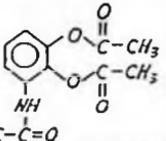
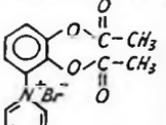
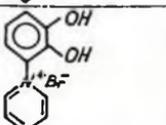
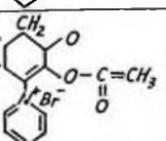
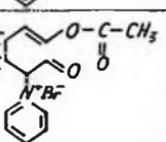
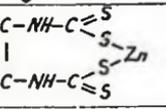
В наших опытах по изучению влияния некоторых структурных аналогов байгона на активность MAO типа Б в препаратах митохондриальной фракции мозга быка (табл. 3) было обнаружено, что четыре из них (№№ 2—5) обладают свойствами стимулировать реакцию окисления фенилэтиламина, однако эффект активации MAO типа Б этими соединениями был значительно ниже уровня активации, наблюдаемой при действии на мембраны митохондрий байгоном. Соединения №№ 1, 6—8 не изменяли скорости дезаминирования фенилэтиламина; отличительной особенностью этих веществ является наличие в их структуре заряженных группировок. Так, более простой по структуре, чем байгон, фенилметилкарбамат (№ 2) сохранял выраженную стимулирующую активность, тогда как введение в положение 2 гидроксильной группировки (соединение № 1) полностью предотвращало эффект стимуляции. Диацетилпирокатехин (№ 3) также проявлял активность. Введение в положение 3 ацетиламинной группы (соединение № 4) относительно мало изменяло активность MAO типа Б; наличие же в этом положении другого, более сильного электроотрицательного пиридинийбромидного остатка (соединение № 5) значительно увеличивало эффект стимуляции дезаминирования фенилэтиламина. С другой стороны, гидролиз этого соединения до бромида 3-пиридиниопирокатехина (соединение № 6) приводило к тому, что последний оказался полностью лишённым активности. Не обладали активностью также и соединения № 7 и 8, хотя они и содержат в своей молекуле группировки, характерные для препарата № 5.

Полученные данные подтверждают предположение о том, что в стимулирующем эффекте байгона и соединений №№ 2—5 главное значение имеет их взаимодействие с липидным окружением активного центра MAO типа Б. Введение гидроксильных группировок, снижающее липофильность соединений №№ 1, 6—8 полностью предотвращало появление у них свойства избирательно активировать окислительное дезаминирование фенилэтиламина после их преникубации с митохондриями мозга быка.

В опытах *in vivo* было показано [5], что байгон как сравнительно небольшое и жирорастворимое соединение [9] проникает через ГЭБ. Попав с кровотоком в ткани мозга, байгон, по-видимому, в первую очередь взаимодействует и активирует экстранейрональные MAO митохондрий глиальных клеток, которые содержат в основном MAO типа Б [10]. Глиальным MAO отводят важную роль в регуляции содержания не только минорного нейромедиатора фенилэтиламина, но и дофамина, модулирующего активность дофаминергических систем в данном случае путём внеснантического контакта. Возрастание активности MAO типа Б в тканях мозга наблюдали при замещении глиальными клетками нейронов, отмирающих в процессе старения [10] или разрушающихся под влиянием токсических и инфекционных агентов [11].

Все пестициды—производные карбаминной кислоты были синтезированы в расчёте на их антихолинэстеразные свойства [9]. По за-

Воздействие производных κ-Замшиной кислоты и их аналогов (0,1 мМ) на дезаминирование фенилэтиламина при его инкубации с препаратами митохондриальных фрак. мозга быка (n—не менее 12)

Условия	Дезаминирование фенилэтиламина (в нмоль аммиака/мг белка/мин)	Изменение активности МАО Б (в %)	
Контроль	4,7±0,07		
Добавленные вещества байгон		9,6±1,8	+100**
№ 1—2-гидроксифенилметилкарбамат		4,8±0,5	0
№ 2—фенилметилкарбамат		7,3±0,7	+55*
№ 3—O,O'-диацетилпирокатехин		5,8±0,5	+28*
№ 4—N,O,O'-триацетил-3-аминопирокатехин		5,7±0,8	+25*
№ 5—бромид O,O'-ди-ацетил-3-пиридинопирокатехина		7,8±0,3	+58*
№ 6—бромид 3-пиридинопирокатехина		4,5±1,2	0
№ 7—бромид 3-пиридино-2-ацетокси-2-циклогексен-1-она		4,5±1,8	0
№ 8—бромид 3-пиридино-1-ацетокси-6-циклогексен-2-она		4,6±0,9	0
Циннеб		2,7±0,05	-62**

Примечание. Уровни достоверности—\*p<0,05; \*\*p<0,01.

включению экспертной комиссии Всемирной организации здравоохранения, инсектицид байгон как один из самых безопасных для человека, рекомендован для борьбы с насекомыми в закрытых помещениях [12]. Можно предполагать, что характерные для интоксикаций байгоном симптомы—тремор, головокружения, временная потеря памяти, быстрое проходящее на свежем воздухе и не сопровождающиеся изменением холинэстеразной активности сыворотки крови [13], обусловлены обратимым возрастанием активности MAO типа Б [5]. Можно также предположить, что разрешенный к применению в клинике и вполне безопасный для человека избирательный ингибитор MAO типа Б депренил [10] будет предотвращать появление функциональных расстройств ЦНС, характерных для интоксикаций пестицидами класса карбаматов. Изыскание новых активных соединений в ряду 2-фенилпропизольных байгона может привести к созданию лекарственных препаратов для лечения некоторых форм шизофрении, для которых характерно повышение содержания дофамина в лимбических структурах мозга [14].

## ACTIVATION OF BOVINE BRAIN MAO (TYPE B) BY 2-ISOPROPOXYPHENYL-METHYLCARBAMATE AND ITS ANALOGUES

\*ZEINALOV T. A., ERMOLAYEV K. M., POZDNEV V. F.,  
KAMYSHANSKAYA N. S.

<sup>\*</sup>Institute of Virology, Microbiology and Hygiene, Ministry of Health, Baku;  
Institute of Biological and Medical Chemistry, USSR Academy of Medical  
Sciences, Moscow

Preincubation of brain mitochondrial fraction with bigone—a carbamate group pesticide—results in the activation of oxidative deamination of phenylethylamine (substrate of MAO type B) and tyramine (substrate of both type of MAO). Cineb—another pesticide of this group without phenyl radical—inhibits activity of MAO against all these substrates. Damage of membrane structure abolishes the activating effect of bigone. Insertion of polar groups into its structure abolishes the stimulating effect of bigone.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Горкин В. З., Москвитина Т. А., Камышанская Н. С. Вест. Акад. мед. наук СССР, № 8, с. 55—59, 1984.
2. Машковский М. Д., Андреева Н. И., Полежаева А. Н. Фармакология антидепрессантов, М., Медицина, 1983.
3. Сафразбекян Р. Р. Особенности изучения активации моноаминоксидазы, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1983.
4. Kadir H. A., Knowles C. O. Gen. Pharm., v. 12, p. 239—247, 1980.
5. Зейналов Т. А. Гигиена и санитария, № 6, с. 49—52, 1984.
6. Камышанская Н. С., Москвитина Т. А. Вопр. мед. химии, т. 27, № 2, с. 261—266, 1981.

7. *Yu P. H.*—In: Monoamine oxidase: structure, function and altered functions, p. 233—245, L.—N. Y., Academic Press, 1979.
8. *Buckman T. D., Eiduson S., Bogcia R.* Biochem. Pharm., v. 32, p. 3639—3647, 1983.
9. *Барнэ Ж. М.* Бюл. ВОЗ, т. 44, с. 421—423, 1972.
10. *Knoll J.*—In: Monoamine oxidase: basic and clinical frontiers, p. 221—230, Amsterdam, Elsevier, 1982.
11. *Salne D. B., Langston J. W.* Lancet, № 2, p. 1457—1459, 1983.
12. *Вандекар М., Плетшина Р., Вильгельм К.* Бюл. ВОЗ, т. 44, с. 255—264, 1972.
13. *Каляюнова-Симонова Ф.* Пестициды: токсическое действие и профилактика, М., Медицина, 1980.
14. *Горкин В. Э.* Аммонооксидазы и их значение в медицине. М., Медицина, 1981.

Поступила 22. VIII 1985