



т. 6. № 3. 1987

УДК 577.157:577.152

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ ПИРАЗИДОЛОМ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ ТИПА А В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫСЫ И ЧЕЛОВЕКА

ВЕРЕВКИНА И. В., АСНИНА В. В., "ГОРКИН В. Э., МАШКОВСКИЯ М. Д.

Всесоюзный научно-исследовательский химико-фармацевтический институт им. С. Орджоннидае

*Институт биологической и медицинской химии АМi-I СССР, Москва

Пиразидол (гидрохасрид ,2, 3, 3а, 4, 5, 6-гексагидро-8-метил-1-Н-пиразин .[3, 2, 1—], к] карбазола, пирамидол) избирательно блокирует катализируемое МАО мителопарий головисто мозга крыс и человска дезаминирование серотонина и кораденельны—специфических субстратов МАО гипа А и в закачительно меньшей степени или, пражтически не влияет на деламинирование специфических субстратов МАО типа Б-2-фенильтильямина и бензильмена. Степень ингибирования пиразилолом дезачинирования дофамина зависит от типа МАО, участвующего в омислении этого замна. Оченильно, что антидепрессантный эффект пиразидола сивлан с его свойством избирательно блокировать в головном диозгу человека дезаминирование физиологических концентраций таких и меротараемамичеторов. как серотонии и порадреналии.

Митохондриальные МАО участвуют в метаболизме аминов—нейротрансмиттеров и нейромодуляторов [1, 2]. Блокирование активности МАО или патологические состояния, связанные с изменением уровня активности фермента в организме, как правило, приводят и к изменениям функций мозга, контролируемых аминами [2].

Ингибиторы МАО, избирательно блокирующие дезамникрование отдельных биогенных аминов, успешно применяют при лечении депрес-

сияных состояний и паркинсонизма [3].

По современиям представлениям, различают МАО типов А и Б, высокочувствительные к ингибирующему действию инзких концентраций хлоргилина или депренила соответственно [3, 4]. Соотношение этих двух типов МАО значительно варьирует в зависимости от ткани и вида животного [5]. Так, отмечают значительные колебания активности МАО в различных участках головного мозга животных и человека. Наиболее высокая активность обнаружена в гипоталамусе [2]. Возможно, что и субстратная специфичность, которая также изменяется в зависимости от источника МАО, в значительной степени обусловлена соотношением МАО типов А и Б в различных тканах [6].

Обычно для изучения свойств митохондриальных МАО с успехом используют такие высокоспецифичные ингибиторы фермента, как хлоргилин, депренил, паргилин [3]. Ранее нами было показано, что производные пиразино-карбазола, в частности пиразидол (гидрохлорид 2, 3, 3а, 4, 5, 6-гексагидро-8-метил-1-Н-пиразин [3, 2, 1—j, к] карбазола; пирлиндол), обладающий свойствами антидепрессанта, избирательно блокирует активность МАО типа А в различных тканях человека и животных [7]. Избирательность действия пиразидола сохраняется и в условиях in vico [8].

В настоящей работе рассматриваются вопросы, связанные с исследованием влияния пиразидола на активность МАО типов А и Б голозмого мозга крысы и человека. Изучение пиразидола в этом аспекте представляет значительный теоретический и практический интерес, так как этот оригинальный отечественный антидепрессант нашел широкое примемение в медицинской практике [1, 9—11].

Материалы и методы

Митохондриальные фракции из головного мозга человека и крысы получали, как описано ранее [12, 13]. Суспензию митохондрий в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,4 хранили при -20°; перед употреблением материал оттаивали, разбавляли в 10-кратном объеме того же буфера и центрифугировали при 1200 g 2 мин. Осадки, представляющие собой фрагменты митохондриальных мембран, суспензировали в 10 мМ Фосфатном буфере, рН 7.4 и использовали в качестве источника МАО. Митохондриальную фракцию из печени крысы выделяли, как описано ранее [14]. Для получения препарата митохондрий печени крысы, п котором МАО типа Б была инактивирована, по МАО типа А сохраняла активность, суспензию митохондрий преинкубировали в течение 4 ч при комнатной температуре с депренилом в конечной концентрации 1.10-7 М, затем центрифугировали 20 мин при 20000 g и осадки промывали в тех же условиях 50 мМ фосфатным буфером, рН 7,4. Полученный препарат фрагментов митохондриальных мембран катализировал дезаминирование серотонина, норадреналина и 2-фенилэтиламина (в высоких концентрациях); препарат не катализировал окисление бензиламина. Хлоргилин в концентрации 1-10-7 М полностью ингибировал дезаминирование указанных аминов.

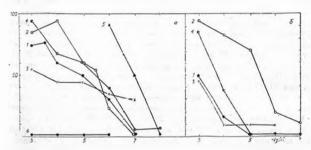
В качестве субстратоп использовали амины в оптимальных для данной ткани концентрациях, подобранных в отдельных опытах. Для митохондрий головного мозга крысы эти концентрации составляли (в мікмоль/1.8 мл пробы): норадреналин битартрат («Signia», США)—4: серотопин креатинипсульфат ("Reanal", Венгрия)—12; дофамин гидрохлорид ("Ferak", ГДР)—6; тирамин гидрохлорид ("Метск", ФРГ)—8; 2-фенилэтиламин гидрохлорид (отечественный)—0.8; бенаиламин гидрохлорид (отечественный)—7.8; отераторующей отечественный)—8: для митохондрий головного мозга человека и субстратов тирамина, серотопина, дофамина и 2-фенилэтиламина—6. 3. 4 и 0.6 соответственно.

Об активности МАО судили по освобождению аммиака в процессе шккубации проб при 37° в атмосфере кислорода в течение 30 мин со всеми субстратами кроме 2-фенилатиламина, пробы с которым инкубировали 15 мин. Белок определяли по методу Lowty, используя в качестве стандаота кристаллический альбумии сыволотки крови быка.

Результаты и обсуждение

Степень ингибирования пиразидолом дезаминирования различных аминов зависит от того, какой тип MAO в данной ткани участвует в дезаминировании данного амина и от используемой при измерении активности MAO концентрации амина.

В головном мозгу человека и крысы содержатся оба основных типа МАО. Однако их соотношение в головном мозгу животных и человека различио: у человека преобладает МАО типа Б. а у грызунов в том числе и у крысы, присутствует преимущественно МАО типа А [2, 15]. Установлено, что МАО типа А докализована главным образом в нейронах, а МАО типа Б в акстранейрональной ткани головного мозга [2, 15, 16]. Соотношение МАО типа Б и А увеличивается с возрастом:



Рыс. 1. Ингибирование пиразидолом дезаминирования различных аминов при их инкубации с митомопдриями головного мозга крысы (а), челенеем (б). По оси абецисс—отридательный Ід концентрации пиразилола в пробе (М). По оси одлинат—степень ингибирования (в %) дезаминирования тирамина, серотопина, 2-фенилатиламина, дофамина, порядреналина, бензиламина (соответственно кривые 1—6). Представлени средние арифметические величины по данным 3—6 спытов с 2-мя паралаглыными определениями в каждом

или при некоторых патологических состояниях, например, болезни Альцгеймера [17]. Обычно это связано с увеличением количества экстранейрональной ткани головного мозга [16, 18].

По нашим данным, в головном мозгу крысы наиболее чувствительно к ингибирующему действию пиразидола дезаминирование норадремалина (рис. 1, а, кривая 5). По данным ингибиторного анализа, в го-

ловном мозгу крысы и человека в дезаминировании норадреналина принимают участие оба типа МАО, однако в головном мозгу крысы 85% норадреналина дезаминируется при участии МАО типа А [19, 20]. Обычно МАО типа А докализована в участках головного мозга, богатых порадреналином [19]. Очевидно, с этим связана высокая чувствительность дезаминирования норадреналина митохондриями головного мозга крысы к низким концентрациям пиразидола.

Серотонии обычно относят в специфическим субстратам МАО типа А [15]. Однако данные ингибиторного анализа свидетельствуют о том, что серотонии так же, как и тирамии в тканях головного мозга крысы дезаминируется при участии обоих типов МАО, котя сродство тирамина и, особенио, серотонина к МАО типа А значительно выше [6, 21]. В условиях, когда величины Кан и V значительно различаются для двух типов МАО, степень участия того или иного типа МАО в дезаминировании амина зависит от концентрации последнего [2]. В тканях головного мозга крысы серотонин при инзких концентрациях стсключительно, а тирамии в основном дезаминируются при участии МАО типа А. Увеличение концентрации этих аминов приводит к увеличению доли участия МАО типа Б в их дезаминировании [6, 21]. В наших опытах характер кривой зависимости степени ингибирования дезаминирования серотонина при участии МАО митохондрий головного мозга крысы от концентраций пиразидола очень напоминает таковую для тирамина (рис. 1, а, кривые 1, 2). Видимо, это связано с тем, что в наших опытах концентрация серотонина (5 мМ) была достаточно высока для того, чтобы субстрат мог акисляться и при участии МАО типа Б. Тирамин в используемой концентрации (1 мМ) дезаминируется при участии обоих типов МАО.

2-фенилатиламин, относящийся к специфическим субстратам МАО типа Б, при использовании его в относительно высоких концентрациях также теряет специфичность и начинает дезаминироваться и при участии МАО типа А [22]. Относительно высокая чувствительность дезаминирования 2-фенилатиламина, катализируемого МАО митохондрий головного мозга крысы, к действию пиразидола в наших опытах объясияется, очевидно, тем, что 2-фенилатиламин был использован в относительно высокой концентрации (0,44 мМ; рис. 1, а, кривая 3).

Дезимпиирование боизпламина, катализирусмое МАО митохоплрий головного мозга крысы не чувствительно к действию даже высоких концентраций пиразидола (рис. 1, п, кривая 6). Результаты наших опытов с бензиламином согласуются с даиными Suzuki и соавт. [22], которые показали, что бензиламин является весьма специфическим субстратом для МАО типа Б головного мозга крысы.

В митохондриях головного мозга человека пиразидол избирательно ингибирует дезаминирование серотонина (рис. 1, 6, кривая 2). Так, п концентрации 1-10-5М пиразидол на 75% блокирует дезаминирование этого амина и практически не влияет на окисление дофамина, тирамина и 2-фенилатиламина. Несмотря на тот факт, что в головном мозгу че-

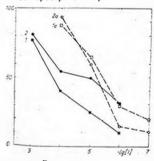
ловека доминирует МАО типа Б [2], а серотонии в наших опытах был использован в концентрации, которая уже окисляется при участия МАО типа Б, тем не менее дезаминирование атого амина, катализируемое МАО митохондрий головного мозга человека, сохраняет достаточно высокую чувствительность к действию пиразидола. Очевидно, в головном мозгу человека в окислении серотонина существенная роль принадлежит МАО типа А.

Дезаминирование тирамина при его инкубации с митохондонями головного мозга человека менее чувствительно к действию пиразидола... чем в аналогичных опытах с митохондриями головного мозга крысы (рис. 1, а. кривая 1; б. кривая 1). Если пиразидол в концентрации 1-10-3 М ингибирует дезаминирование тирамина, происходящее при участии МАО митохондоми головного мозга крысы, то при этой же концентрации пиразидол не влияет на дезаминирование тирамина, катализируемое МАО митохондрий головного мозга человека. Графики зависимости стелени ингибирования дезаминирования тирамина и 2-фенилатиламина при участии МАО митохондрий головного мозга человека от концентраций пиразидола практически идентичны. Очевидно, в головном мозгу человека дезаминирование тирамина, в основном, катализирует МАО типа Б. Интересно отметить различную чувствительность к действию пиразидола реакции дезаминирования 2-фенилатиламина при его инкубании с митохондриями головного мозга крысы и человека (рис. 1, л. кривая 3; б. крипая 3). В данных тканях этот амин относится к субстратам МАО типа Б. В наших опытах 2-фенилатиламии был использован я концентрации, при которой дезаминирование этого амина катализируют обя типа МАО. Однако различная степень ингибирования пиразидолом 2-фенилатиламина при его инкубации с митохондриями головного мозга человека и крысы, очевидно, связана с различным соотношением МАО типов А и Б в тканях головного мозга крысы и человека: в первой превалирует тип А, а во второй--тип Б [2].

Избирательность ингибирующего действия пиразидоля на МАО типа А в тканях головного мозга крысы и человека убедительно показана в опытах с дофамином в качестве субстрата. Известно, что
МАО типов А и Б головного мозга приматов и грызунов раздичаются,
в частности, по субстратной специфичности. Так, «например, дефамии в
головном мозгу крысы дезаминируется при участии обоих типов МАО,
а в головном мозгу человека—в осповном при участии МАО типа В
[18]. Полагают, что возрастное учасние функций дофаминертической
системы головного мозга связано с увеличением активности МАО типа В, локализованной, главным сбразом, в глиальных клетках, содержание которых в тканях головного мозга с возрастом учеличнается [3]. В связи с этим представляло интерес именно на тканях головного
мозга человека и крысы подтвердить избирательность ингибирующего
мозга человека и крысы подтвердить избирательность ингибирующего
действия пиразидола на МАО типа А и показать, что избирательность
действия данного ингибитора определяется не типом окисляемого суб-

страта, а типсм фермента. Как видно из графиков зависимости степени ингибирования дезаминирования дофамина, катализирусмого МАО мито-кондрий головного мозга человека и крысы (рис. 1, а, кривая 4; б, кривая 4), чувствительность одной и той же реакции окислительного дезаминирования дофамина к действию пиразидола зависит от природы ткани, из которой получены митохондрии. Величины I_{50} для пиразидола (субстрат дофамин) у МАО митохондрий головного мозга крысы и человека различаются почти на два десятичных порядка.

Избирательная направленность действия пиразидола на МАО типа А была показана в опытах с использованием препарата митохондрий (из печени крысы), в котором после преинкубации с депренилом (см. «Материалы и методы») была инактивирована МАО типа Б, но МАО типа А была активна. Обычно в митохондриях печени крысы к действию низких концентраций пиразидола более чувствительна реакция дезаминирования серотонина. чем тирамина (рис. 2, кривые 1, 2). Величны 1.0 для пиразидола в таких системах при использовании в качестве субстратов серотонина и тирамина различаются почти на 1,5



порядка. В препаратах митохондрий, в которых МАО типа Б была предварительно инактивирована депренилом, кривые зависимости степени ингибирования дезаминирования серотонина и тирамина от концентраций пиразидола практически идентичны (рис. 2, кривые /а и 2а).

Таким образом, получениые нами данные свидетельствуют о том, что в тканях головного мозга крысы и человека пиразилол избирательно ингибирует активность МАО типа А независимо от того, окисление каких аминов катализирует этот тип фермента. Действие пиразидола направлено не на блокирование дезаминирования того или иного субстрата (например. 5-окситриптамина), а на ингибирование определениото типа МАО—именно МАО типа А, независимо от того, какой смин служит субстратом для этого типа МАО в тканях головного мозга крысы и человека.

Антидепрессантный эффект ингибиторов МАО обычно связывают с воздействием на серотонин- и катехоламинергические системы голов-

ного мозга и, в первую очередь, на норадреналинергическую систему [2]. Пиразидол, очепидно, оказывает влияние как на серотонин-, так и на катехоламинергические системы, так как введение его вызывает в отдельных участках головного мозга животных увеличение содержания серотонина, норадреналина и дофамина. При этом наблюдают синжение уровня 5-оксииндолуксусной и диоксифенилуксусной кислот [1].

На основании полученных данных можно предположить, что в актидепресслитиом аффекте пиразидола важное значение имеет его свойство избирательно блокировать в головном мозгу человека катализируемое главным образом МАО типа А дезаминирование, в первую очередь, физиологических концентраций таких нейротрансмиттеров, как серотонии и норадремалии.

SELECTIVE INHIBITION OF TYPE A MONOAMINE OXIDASE BY PYRAZIDOL IN RAT AND HUMAN BRAIN

VERYOVKINA I. V., ASNINA V. V., "GORKIN V. Z., MASHKOVSKY M. D.

*Institute of Biological and Medical Chemistry, USSR Academy of Medical Sciences, All-Union S. Ordzhonikidze Chemical Pharmaceutical Research Institute. Moscow

Pyrazidol (2, 3, 3a, 4, 5, 6-Hexahydro-8-methyl-1-H-pyrazino (3, 2, 1-j, k) carbazol hydrochloride) blocks selectively the deamination in rat and human brain mitochondria of serotonin and norepinephrine—the main substrates in these tissues of the type A MAO and almost did not affect the deamination of the main substrates of the type B MAO-2-phenylethylamine and benzylamine. The degree of inhibition of dopamine deamination by pyrazidol in rat and human brain depends on the particular type of MAO involved in oxidation of this amine. The antidepressant effect of pyrazidol might be related to its property of selective blocking of the deamination of physiological concentrations of such neurotransmitters as serotonin and norepinephrine in human brain.

AHTEPATYPA

- Машковский М. Д., Андресва Н. И., Полежаева А. И. Фармакология антидепрессантов, М., Медицина, 1983.
- Murphy D. L., Garrick N. A., Cohen R. M.-In: Antidepressants (eds. Berrows, Norman, Davies), p. 209-227, Elsevier Science Publishers, 1983.
- 3. Knoll J. Acta Neurol. Scand., v. 95, p. 57-80, 1983.
- Tipton K., Fowler Ch., Houslay M.—In: Monoamine oxidase. Basic and Clinicalfrontiers (eds. Kamijo, Usdir, Nagatsu). Amsterdam. Excerpta Medica, 1982.
- Gorkin V. Z.-In: Amine Oxidase in Clinical Research, Pergamon Press, Oxford, 1983.
- Benedettt M. S. Boucher Th., Carlson A., Fowler Ch. J. Biochem. Pharmacol., v. 32, p. 47-53, 1983.
- Веревкина И. В., Асмина В. В., Горкин В. З., Машковский М. Д. Вопр. мед. химин, т. 29, № 5, с. 118—124, 1983.

- Машковский М. Д., Горкин В. З., Веревкина И. В., Аскина В. В., Тупикина С. М. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 2, с. 169—171, 1981.
- Машковский М. Д., Андресва Н. И. Журн. невропатол. и психнатр., т. 75, № 3. с. 430—435, 1975.
- Аврункий Г. Я., Громова В. В., Зайнев С. Г. Журн. невропатол, и пенхимтр., т. 75, № 5, с. 734—741, 1975.
- Руденко Г. М., Аспахия В. К., Музыченко А. П. Новые лекарственные препараты. Экспресс-информация, № 5, с. 2—13, 1977.
- 12. Brody T. M., Brain J. A. J. Biol. Chem., v. 195, p. 682-696, 1951,
- 13. Selden L. S., Westley J. Biochem. et hiophys, acta, v. 58, p. 363-367, 1962.
- 14. Горкин В. З., Версакина И. В.-Вопр. мед. химин, т. 9, с. 315-318, 1963.
- 15. Горкин В. З. Непрохимия, т. 4, № 1, с. 68-78, 1985.
- Oreland L., Fowler C. J.-In: Monoamine Oxidase. Basic and Clinical frontiers (eds. Kamijo, Usdin, Nagatsu), p. 237-242. Amsterdam, Excerpta Medica, 1982.
- Oreland L., Adolfsson R., Fowler C. J., Gottfries C. G., Wiberg A., Wiblad B. Biol. Psychiatry (eds. Perris, Struwe, Jansson), p. 973-976, Biomedical Press, Amsterdam, 1981.
- 18. Fowler Ch. J., Tipton K. F. Biochers. Pharmacol., v. 30, p. 3329-3332, 1981.
- 19. Gurrick N. A., Murphy D. L. Biochem. Pharmacol., v. 31, p. 4060-4066, 1982.
- 20. Youdim M. B. H. British J. Pharmacol., v. 79, p. 477-481, 1983.
- 21. Fowler Ch. J., Tipton K. F. J. Neurochem., v. 38, p. 733-736, 1982.
- 22. Suzuki O., Katsumata Y., Oya M. Biochem. Pharmecol., v. 28, p. 953-956, 1979.

. Поступила 9. Х 1986