

9306

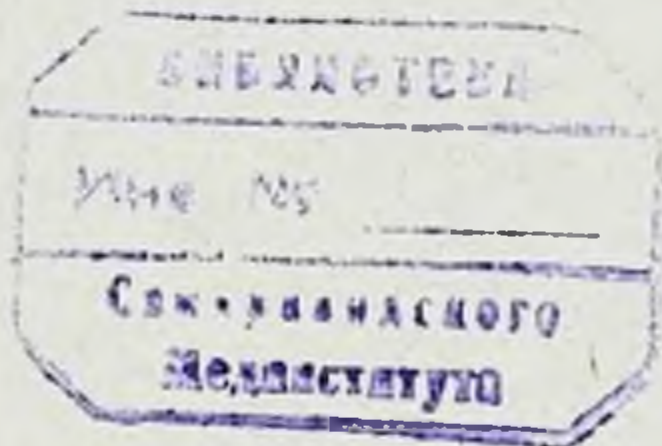
АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР

На правах рукописи

В. З. ГОРКИН

**О ПРИРОДЕ
МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ
МОНОАМИНОКСИДАЗ**

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
доктора биологических наук



Москва — 1964

На правах рукописи

В. З. ГОРКИН

О ПРИРОДЕ
МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ
МОНОАМИНОКСИДАЗ

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва — 1964

Работа выполнена в лабораториях биохимии аминокислот и азотистых оснований (заведующий лабораторией — академик А. Е. Браунштейн) и биохимии аминов и других азотистых оснований (заведующий лабораторией — канд. мед. наук В. З. Горкин). Института биологической и медицинской химии АМН СССР (директор института — действительный член АМН СССР, профессор В. Н. Орехович).

Официальные оппоненты:

Действительный член АМН СССР, член-корреспондент АН СССР профессор С. Е. Северин;

Член-корреспондент АМН СССР, профессор М. Д. Машковский;

Доктор химических наук В. А. Яковлев.

Защита диссертации состоится в Совете отделения медико-биологических наук Академии медицинских наук СССР « 8 » XII 1964 г.

Автореферат разослан « 4 » XI 1964 г.

ВВЕДЕНИЕ

Современная биологическая наука стремится не только к познанию сущности процессов жизнедеятельности, но и к созданию эффективных и специфических способов активного воздействия на биологические явления. Поскольку в основе всех процессов обмена веществ в живых системах лежат биохимические реакции, катализируемые ферментами, а нарушения функций тех или иных ферментных систем в органах и тканях человека, в том числе в центральной нервной системе, составляют материальную основу большого числа заболеваний, изучение природы ферментов занимает центральное место как в теоретической биологии, так и в медицинской химии.

На основе современных достижений химии белков и других биополимеров значительно продвинулись вперед исследования механизма каталитического действия и специфического торможения ряда ферментных систем, что создает предпосылки для развития биохимической фармакологии, изучающей механизм действия лекарственных препаратов и токсинов на молекулярном, субклеточном и клеточном уровнях. От успехов биохимической фармакологии во многом зависят перспективы работ по изысканию новых лечебных средств. Именно это обстоятельство побуждает биохимиков детально изучать природу ферментных систем, особенно тех, которые участвуют в образовании и разрушении биологически активных веществ в организме.

В ходе многолетних исследований обмена аминокислот и азотистых оснований, проводившихся в Институте биологической и медицинской химии Академии Медицинских Наук СССР под руководством академика А. Е. Браунштейна, значительное внимание было уделено аминоксидазам, катализирующим реакции окислительного дезаминирования биогенных аминов.

В организме животных встречаются три различающиеся по своим свойствам аминоксидазы — диаминоксидаза, моноаминоксидаза и сперминоксидаза. Объектом настоящего исследования является так называемая моноаминоксидаза, сосредоточенная в митохондриях клеток многих органов и тканей.

По современным представлениям, реакция окислительного дезаминирования биогенных моноаминов, катализируемая моноаминоксидазой, занимает центральное положение в процессах обмена исключительно активных фармакологически соединений, играющих важную роль в регуляции ряда физиологических функций и в патогенезе многих заболеваний.

Так, например, исследованиями последнего 10-летия доказано, что соотношения процессов торможения и возбуждения в коре и подкорковых центрах головного мозга определяются в значительной мере состоянием обмена норадреналина, серотонина (5-окситриптамина) и дофамина (3,4-диоксифенилэтиламина), т. е. соединений, которые являются субстратами моноаминоксидазы. Появилась реальная возможность конкретно охарактеризовать связь между функциональной активностью мозга и биохимическими процессами в нем. На основе этих достижений биохимии в небывалых масштабах развернулись исследования по биохимической фармакологии.

Среди современных психофармакологических средств важное место занимают так называемые «ингибиторы моноаминоксидазы», тормозящие дезаминирование биогенных моноаминов в организме человека.

Реакции, катализируемые митохондриальными аминоксидазами, оказались, следовательно, таким звеном в цепи биохимических превращений моноаминов, активное воздействие на которое в организме человека при помощи фармакологических препаратов является вполне реальным уже в настоящее время.

Ингибиторы моноаминоксидазы привлекают внимание все более широкого круга клиницистов. В большом масштабе ведутся исследования по биохимии и биохимической фармакологии биогенных моноаминов, по клинической химии моноаминов, опирающиеся в значительной мере на использование ингибиторов моноаминоксидазы.

Однако все применяемые в настоящее время ингибиторы моноаминоксидазы в большей или меньшей мере токсичны, что значительно ограничивает возможности их использования. Необходимость изыскания новых высокоэффективных и безопасных при использовании в клинике ингибиторов моноаминоксидазы делает весьма актуальными биохимические исследования природы того фермента, на который направлено действие этих соединений.

Однако моноаминоксидаза не является удобным объектом для энзимологических работ. Этот фермент не относится к числу растворимых и поэтому не может быть очищен обычно применяемыми в энзимологии приемами. Моноаминоксидаза очень прочно связана со структурными элементами мембраны митохондрий. Таким образом, задача получения высокоочищенных препаратов моноаминоксидазы упирается в препятствие, которое современная энзимология пока не может преодолеть, а именно — в разработку эффективных способов очистки структурно-связанных ферментов.

Тем не менее, уже в настоящее время для успешного решения неотложных задач по созданию новых, более совершенных, ингибиторов моноаминоксидазы, пригодных для использования в клинической медицине, по нашему мнению, необходимо прежде всего получить ответы на следующие вопросы: является ли моноаминоксидаза единым ферментом или семейством родственных (близких по некоторым свойствам, но различающихся, например, по субстратной специфичности) аминоксидаз; можно ли избирательно затормозить дезаминирование различных моноаминов; каково строение каталитических центров моноаминоксидазы и каков механизм действия ингибиторов моноаминоксидазы на молекулярном уровне.

В ходе экспериментов, направленных на решение некоторых из числа поставленных выше вопросов, возникла необходимость в проведении специальных исследований по субстратной специфичности аминоксидаз и по разработке новых экспресс-методов определения начальных скоростей ферментативных реакций, катализируемых аминоксидазами.

О методах определения активности митохондриальных моноаминоксидаз

В работе с любым ферментом большое значение имеет подбор методик измерения его активности. Существующие методы определения активности моноаминоксидазы основаны главным образом на измерениях поглощения кислорода или отщепления аммиака. Они при определенных условиях дают точные результаты, но довольно трудоемки. Мы поставили перед собой задачу разработать спектрофотометрические методы определения активности аминоксидаз, пригодные для изучения воздействия разнообразных ингибиторов на начальные скорости дезаминирования моноаминов как в частично очищенных ферментных препаратах, так и в не фракционированных гомогенатах органов.

Известно, что положения максимумов поглощения и коэффициенты молярной экстинкции аминов и образующихся при

их окислении альдегидов во многих случаях значительно различаются. Так, при длине волны 250 мкм коэффициент молярной экстинкции для бензальдегида равен 13000, а для бензиламина — лишь 200. Измеряя нарастание оптической плотности при этой длине волны во времени, находят начальную скорость реакции (Тэйбор и др. 1954).

Мы разработали условия солюбилизации митохондрий отечественным неионным детергентом ОП-10, а также оптимальные условия спектрофотометрического определения активности митохондриальных аминоксидаз.

Метод дает воспроизводимые, точные данные и весьма чувствителен. Его недостатки обусловлены необходимостью проводить измерения при 250 мкм, т. е. в той области спектра, где многие биохимические компоненты тканей (белки, нуклеиновые кислоты и нуклеотиды, ароматические аминокислоты), а также различные органические соединения, применяемые или исследуемые в качестве ингибиторов аминоксидаз, поглощают ультрафиолетовые лучи. Поэтому определить активность аминоксидаз в нефракционированных гомогенатах органов этим методом нельзя.

В дальнейшем мы разработали еще два спектрофотометрических метода, которые лишены этого недостатка. Один из них основан на использовании в качестве субстрата м-нитро-п-оксибензиламина, продукт дезаминирования которого имеет максимум поглощения при длине волны 315 мкм. Метод позволяет быстро и точно определять активность моноаминоксидазы в гомогенатах печени, но недостаточно чувствителен для исследования тканей мозга и, в особенности, сердца, где концентрация моноаминоксидазы относительно низка. Для выполнения таких определений мы предложили спектрофотометрическую методику, основанную на использовании в качестве субстрата п-нитро-фенилэтиламина. В этом случае измерения ведут при длине волны 450 мкм, т. е. уже в видимой части спектра.

Таким образом, используя в качестве субстрата один из трех аминов (бензиламин, м-нитро-п-оксибензиламин, п-нитрофенилэтиламин) удается сравнительно быстро (5—6 минут на одно определение) получить количественные данные об активности моноаминоксидаз в любом ферментном препарате из органов или тканей, а также исследовать воздействие на ферментативную активность практически любого водорастворимого соединения (за исключением некоторых очень глубоко окрашенных веществ).

О субстратной специфичности моноаминоксидазы. Проблема «множественности» митохондриальных моноаминоксидаз

Еще в 1937 г. Блашко, Рихтер и Шлоссман пришли к выводу о том, что моноаминоксидаза представляет собой единый фермент с широкой субстратной специфичностью. Это заключение было основано на следующих наблюдениях: 1) различные аминоксидазы обнаруживали сходство по распространению в животных тканях, а также по отношению к действию таких ферментных ядов как цианид, гидроксилламин, октиловый спирт, тимол; 2) в опытах, проведенных так называемым методом «смешанных субстратов», было отмечено торможение дезаминирования одних аминов другими.

Представление о моноаминоксидазе как о ферменте, катализирующем окислительное дезаминирование весьма различных по химической структуре моноаминов получило широкое распространение в литературе и даже нашло отражение в рациональном названии, предложенном для обозначения митохондриальной моноаминоксидазы Международной комиссией по номенклатуре ферментов в 1961 г.: моноамин: O_2 -оксидоредуктаза (дезаминирующая) (КФ 1.4.3.4).

Однако в настоящее время накапливается все больше данных, не совместимых с существующими представлениями о природе единой моноаминоксидазы, и поддерживающих противоположную точку зрения, т. е. гипотезу о «множественности» митохондриальных аминоксидаз.

Интенсивные исследования аминоксидаз, проведенные в последние годы, указывают на отсутствие параллелизма в распространении ферментных систем, катализирующих окислительное дезаминирование отдельных биогенных моноаминов в различных тканях животных одного вида или в одной ткани животных разных видов.

Конкурентные взаимоотношения между различными аминами, обнаруживаемые методикой «смешанных субстратов», как теперь известно, не могут считаться однозначным доказательством наличия в препарате одного фермента. Известны примеры изменения активности ферментов под влиянием тех или иных соединений, не взаимодействующих непосредственно с активными центрами (так называемые аллостерические, или конформационные кофакторы). Возможно конкурентное торможение активности одной аминоксидазы субстратами других, сопутствующих, аминоксидаз.

Наконец, при изучении воздействия на препараты митохондриальных аминоксидаз целого ряда физических или химических факторов, а также при других условиях экспериментов, установлены определенные различия в свойствах ферментных систем, катализирующих окислительное дезаминиро-

вание следующих пар различных моноаминов: алифатические и жирно-ароматические амины, норадреналин и тирамин, серотонин и тирамин, а также, вероятно, серотонин и норадреналин.

Нами было предпринято сравнительное исследование свойств митохондриальных ферментных систем, катализирующих дезаминирование таких относительно близких по химической структуре жирноароматических аминов как тирамин и бензиламин.

Оказалось, что воздействием целого ряда физических и химических факторов (строго контролируемое нагревание, сдвиги рН, обработка некоторыми органическими комплексообразующими реагентами, олеинатом натрия) удается вызвать избирательное торможение окислительного дезаминирования тирамина и, соответственно, бензиламина препаратами моноаминоксидазы митохондрий печени крысы. Так, например, преинкубация в течение 30 минут при 40°C почти полностью (на 92%) лишает ферментный препарат способности дезаминировать тирамин, в то время как окисление бензиламина снижается лишь на 48%; 8-оксихинолин тормозит окислительное дезаминирование тирамина в концентрации $2,5 \cdot 10^{-4}$ М на 50%, тогда как даже при концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М этот комплексообразующий реагент (адденд) не оказывает воздействия на скорость окислительного дезаминирования бензиламина. Эти данные, а также другие сделанные нами наблюдения можно объяснить, допустив наличие в препаратах митохондриальной моноаминоксидазы печени крысы двух ферментов (или двух активных центров на поверхности одной макромолекулы), катализирующих предпочтительно или исключительно окислительное дезаминирование тирамина и, соответственно, бензиламина.

Внутриклеточное распределение, очистка и разделение митохондриальных моноаминоксидаз

Митохондриальные моноаминоксидазы, прочно связанные со структурными элементами мембраны митохондрий, удалось частично очистить от растворимых балластных белков после разрушения митохондрии путем повторного замораживания и оттаивания или путем «гипотонического лизиса» с последующим отмыванием нерастворимых структурных образований в специально разработанных нами условиях. Такие условия оказались различными для митохондрий различных органов животных одного вида.

Полученные таким образом частично очищенные препараты митохондриальной моноаминоксидазы практически свободны от примеси альдегиддегидрогеназы — фермента, обычно сопровождающего моноаминоксидазу в тканях животных.

При воздействии ультразвуковых волн (600 кГц, 1 киловатт в течение 30 минут в атмосфере водорода) частично очищенные препараты митохондриальных аминоксидаз не теряют своей активности, хотя при этом все структурные элементы митохондриальных мембран (уже частично поврежденных предшествующей обработкой митохондрий) полностью разрушаются, превращаясь в гомогенную взвесь частиц, размер которых составляет, по данным электронномикроскопических исследований (В. М. Митюшин, Институт биофизики АН СССР), всего 50—200 ангстрем. Эти частицы переходят в осадок при центрифугировании в препаративной ультрацентрифуге «Спинко» в течение часа при 105.000 g. Обнаруживаемые в указанных частицах аминоксидазы не отличались от соответствующих ферментных систем исходного материала по способности катализировать дезаминирование различных моноаминов.

В опытах, направленных на разделение митохондриальных моноаминоксидаз, катализирующих дезаминирование различных моноаминов, мы пользовались в качестве исходного материала фрагментами митохондриальных мембран, предварительно солюбилизованными путем обработки нейтральным детергентом ОП-10 в специально разработанных нами условиях. В качестве субстратов в этих опытах были использованы синтетические амины, пригодные для спектрофотометрического определения активности аминоксидаз: м-нитро-п-оксибензиламин и п-нитрофенилэтиламин (см. выше).

Фракционирование белков митохондриальных мембран осуществляли методом колоночной хроматографии. Колонки с адсорбентом брушитом (одна из кристаллических модификаций фосфата кальция) насыщали 0,1М фосфатным буфером, рН 7,0, содержащим детергент ОП-10 (конечная концентрация 1,25%). После нанесения исследуемого материала на колонку адсорбированные белки извлекали 0,1; 0,4; 0,5 и 0,7 М фосфатными буферными растворами, рН 7,0, также содержащими детергент ОП-10. Оттекающие от колонки растворы собирали фракциями по 15 мл, в каждой из которых определяли ферментативную активность и содержание белка.

Результаты одного из типичных опытов представлены в таблице 1.

Как видно из приведенных в таблице 1 данных, 0,4 М фосфатный буфер извлекает до 56% нанесенного на колонку в начале опыта фермента, катализирующего дезаминирование п-нитрофенилэтиламина, в то время как в этих же фракциях (№№ 9—16) обнаружить фермент, окисляющий м-нитро-п-оксибензиламин, не удается. При более высоких концентрациях фосфата в элюате обнаруживали оба фермента.

Частичное разделение митохондриальных
аминоксидаз печени крысы

	Исходный материал	Объединенные фракции элюата (№№)				Выход (в %)
		1-8	9-16	17-25	26-34	
Объем (мл)	20,0	131,2	131,0	149,5	135,5	
Концентрация фосфата (М/л)	0,1	0,1	0,4	0,5	0,7	
Содержание белка мг/мл	2,25	0,225	0,06	0,02	0,02	
общее	45,0	29,32	7,86	2,99	2,71	95,2
Дезаминирование м-нитро-п-оксибен- зиламина Ед/мл (макс.)	40,0	0	0	2,5	1,0	
общее	800,0	0	0	37,5	12,5	6,25
Ед/мг белка (макс.)	17,8	0	0	125,0	50,0	
Дезаминирование п-нитрофенилэтиламина Ед/мл (макс.)	57,5	1,0	19,5	8,0	5,7	
общее	1350,0	13,0	753,5	327,0	138,0	90,2
Ед/мг белка (макс.)	30,0	4,4	325,0	400,0	285,0	

Во всех случаях выход фермента, атакующего п-нитрофенилэтиламин, составлял величину порядка 90%, тогда как значительная часть фермента, дезаминирующего м-нитро-п-оксибензиламин, при этих условиях хроматографирования теряла активность. При других воздействиях на солиобилизированные препараты митохондриальных мембран удалось наблюдать обратное явление, т. е. преимущественное снижение активности фермента, окисляющего п-нитрофенилэтиламин.

Полученные данные не совместимы с представлением о наличии в тканях единой моноаминоксидазы с широкой субстратной специфичностью; они являются свидетельством в пользу существования различающихся по субстратной специфичности моноаминоксидаз.

Об ингибиторах митохондриальных моноаминоксидаз

Если в митохондриях, как следует из наших данных, действительно имеются различные структурно-связанные аминоксидазы, то можно было надеяться найти ингибиторы, более или менее специфически тормозящие окислительное дезаминирование различных аминов.

В ходе исследований влияния различных трициклических ароматических соединений на окислительное дезаминирование ряда моноаминов препаратами митохондриальных моноаминоксидаз было показано, что многие относительно простые (лишенные сложных боковых цепей) соединения в низких концентрациях (порядка 10^{-5} — 10^{-6} М) тормозят активность фермента. К числу таких соединений относятся производные фенотиазина (метиленовый синий, фиолетовый Лаута), акридина (профлавиин, акридиновый оранжевый NO, трипфлавиин), а также ксантеновые (пиронины), азиновые (нейтральный красный) и оксазиновые (капри-голубой) красители. Характерной особенностью воздействия целого ряда трициклических соединений на активность моноаминоксидазы является избирательность торможения дезаминирования различных аминов. Так, например, в опытах с профлавином (3,6-диаминоакридинсульфат) концентрация, необходимая для торможения дезаминирования серотонина составляет величину порядка $3 \cdot 10^{-5}$ М, тирамина — $8 \cdot 10^{-4}$ М, тогда как дезаминирование изоамиламина тормозится лишь на 40% при концентрации профлавиина в пробах, равной $1 \cdot 10^{-3}$ М. Акридиновый оранжевый NO преимущественно тормозит дезаминирование серотонина ($I_{50} = 2,5 \cdot 10^{-6}$ М), слабее воздействуя на дезаминирование тирамина ($I_{50} = 7 \cdot 10^{-5}$ М). Обнаруженные различия в величинах I_{50} (концентрация ингибитора, необходимая для торможения активности фермента на 50%) были статистически достоверны (t = тест Стьюдента). Пиронин G, отличающийся от предыдущего трициклического красителя тем, что гетероатомом в трициклической структуре, составляющей основу его строения, является кислород, а не азот, как у акридинового оранжевого NO, наоборот, преимущественно тормозит дезаминирование тирамина, по сравнению с серотином (величины $I_{50} = 1,5 \cdot 10^{-6}$ и $2 \cdot 10^{-4}$ М, соответственно).

Избирательность воздействия трициклических соединений (в частности пиронина G и акридинового оранжевого NO) на дезаминирование различных моноаминов обнаруживается не

только в опытах с частично очищенными ферментными препаратами, но и в условиях экспериментов *in vivo*.

Природное трициклическое соединение — алкалоид гармин — давно известно как ингибитор моноаминоксидазы, обладающий конкурентным и обратимым действием. По нашим данным, гармин является в 1000 раз более мощным ингибитором дезаминирования серотонина, чем тирамина или триптамина.

Наши опыты с типичным представителем мощных синтетических гидразинных ингибиторов моноаминоксидазы ипрониазидом (1-изоникотиноил-2-изопропил гидразин) показали, что это соединение в равной мере тормозит окислительное дезаминирование тирамина, серотонина, бензиламина препаратами митохондриальной моноаминоксидазы. Из числа других гидразинных ингибиторов моноаминоксидазы фенизин или катрон (β -фенилизопропилгидразин), марплан или изокарбосазид [1-бензил-2-(5-метил-3-изоксазоллилкарбонил) гидразин], а также новый мощный ингибитор (синтезированный в лаборатории специального органического синтеза Московского университета проф. А. Н. Костом и Р. С. Сагитудлиным) — ветразин (3,4-диметоксибензилгидразин) — в практически равной мере тормозят реакцию ферментативного дезаминирования различных моноаминов. Однако такие мощные гидразинные ингибиторы моноаминоксидазы как иналамид или инамид [1-изоникотиноил-2-(бензилкарбоксамидоэтил) гидразин] и фелазин, или фенелзин (β -фенилэтилгидразин), также находящие широкое применение как в психиатрии, так и в клинике внутренних болезней, обнаруживают некоторую (меньшую, чем в опытах с трициклическими соединениями) избирательность действия на окислительное дезаминирование различных моноаминов. Эти ингибиторы оказались, по нашим данным, примерно в 10 раз более эффективными ингибиторами дезаминирования серотонина, чем тирамина.

При исследовании представителя относительно простых производных гидразина — ассиметричного диметилгидразина — нами было показано, что не это соединение, а продукт его окисления — тетраметилтетразен — является ингибитором митохондриальных аминоксидаз. По нашим данным, тетраметилтетразен в равной мере тормозит дезаминирование различных моноаминов.

О строении каталитических центров, механизме действия и специфического торможения митохондриальных моноаминоксидаз

Дальнейшая работа по изысканию и совершенствованию ингибиторов моноаминоксидаз требует, в частности, расшифровки строения каталитически активных центров этих ферментов.

В литературе имеются данные о роли сульфгидрильных групп и флавинового компонента в действии митохондриальных аминоксидаз. По нашим данным, активность препаратов митохондриальных моноаминоксидаз тормозят некоторые вещества, существенно различающиеся по своему химическому строению (например, 8-оксихинолин, орто-фенантролин, диэтилдитиокарбамат натрия, цистеамин, этилендиаминтетраацетат натрия, циклогександиаминтетрауксусная кислота и другие), но обладающие одним общим свойством — способностью к образованию устойчивых клешневидных (внутрикомплексных) соединений с катионами металлов.

Среди исследованных нами изомеров оксихинолина (8-, 2- и 4-оксихинолины) или меркаптоамниносоединений (цистеамин, цистеин, гомоцистеин, пеницилламин, цистамин) те вещества, которые лишены способности при взаимодействии с растворами катионов металлов давать устойчивые комплексные соединения (4-оксихинолин, цистамин) практически не оказывают никакого влияния на реакцию окислительного дезаминирования моноаминов препаратами митохондриальных моноаминоксидаз.

Нами было обнаружено, что добавление растворов, содержащих катионы ряда двувалентных металлов, к частично очищенным препаратам митохондриальных моноаминоксидаз, обработанных органическими комплексообразующими реагентами, в той или иной степени (но обычно не полностью) восстанавливает каталитическую активность ферментных препаратов. В аналогичных опытах добавление в пробы значительного избытка (до пятикратного, по сравнению с концентрацией комплексообразующего реагента) цистеина или глутатиона не восстанавливает аминоксидазную активность. Нами было показано также, что внесение катионов металлов в растворы комплексообразующих реагентов (до момента их контакта с ферментным препаратом) частично предотвращает тормозящее действие аддендов на ферментативное дезаминирование моноаминов.

Результаты этих экспериментов позволили нам в 1959 г. высказать предположение о том, что в каталитическом действии митохондриальных моноаминоксидаз принимают участие катионы металлов. В дальнейшем в литературе появились сообщения об исследованиях других аминоксидаз — сперминоксидазы (аминоксидазы сыворотки крови крупного рогатого скота) и диаминоксидазы (гистаминазы) растительных объектов и тканей животных. Было установлено, что в действии этих ферментов, значительно отличающихся по субстратной специфичности, по отношению к ингибиторам и другим свойствам от митохондриальных моноаминоксидаз, также участвуют катионы металлов. Как диаминоксидаза, так и сперминоксидаза являются растворимыми ферментами. Они были по-

лучены в виде высокоочищенных препаратов; на основании результатов ряда работ (Е. В. Горяченкова, П. Дж. Манн, Ямада и Ясунобу и др.) катионом, входящим в состав каталитических центров этих ферментов, можно считать двувалентную медь, хотя вопрос о том, является ли медь единственным металлом, способным в физиологических условиях принимать участие в действии каталитических центров этих ферментов, остается открытым.

Характеристика природы металлов, участвующих в каталитическом действии митохондриальных моноаминоксидаз, требует полного отделения этих ферментов от структурных элементов мембран митохондрий, что пока представляется неразрешимой задачей.

Однако, независимо от природы катионов, участвующих в построении каталитических центров митохондриальных моноаминоксидаз, имеющиеся сведения о роли металлов в их действии открывают новые подходы при исследовании механизма действия некоторых ингибиторов этих ферментов.

Пытаясь выяснить вопрос о том, участвует ли металл во взаимодействии каталитического центра моноаминоксидаз с ингибиторами, мы исследовали один из наиболее известных ингибиторов моноаминоксидазы необратимого действия — ипрониазид (ипразид). Тормозящее действие ипрониазида на активность препаратов моноаминоксидазы развивается во времени в ходе преинкубации ингибитора с ферментом в присутствии кислорода. Условно действие ипрониазида на активность моноаминоксидазы можно расчленить на два последовательных этапа: **первичный** — когда действие ингибитора обратимо и конкурентно и **вторичный**, протекающий в присутствии кислорода, когда действие ингибитора становится необратимым и неконкурентным.

Наши исследования были направлены на выяснение сущности именно первичного этапа действия ипрониазида, являющегося необходимой предпосылкой развития характерного для этого ингибитора мощного и необратимого тормозящего действия на ферментативное дезаминирование моноаминов.

По нашим данным, полученным методом определения относительных показателей непрочности комплексных соединений по В. И. Кузнецову, ипрониазид обладает способностью связывать катионы металлов. Такой же способностью характеризуются моноамины-субстраты, конкурирующие с ипрониазидом на первичном этапе его действия за связывание с каталитическим центром фермента. Добавление к ферментному препарату цистеаминна, вызывающего торможение активности моноаминоксидазы в результате блокирования металлов в активном центре, частично защищает фермент от действия ипрониазида. Преинкубация фермента, обработанного цистеамином, с ипрониазидом не приводит к развитию характерного

для действия ипронназида необратимого торможения ферментативной активности. При изменении порядка добавления цистеаминна и ипронназида в содержание ферментный препарат пробы, т. е. при внесении в систему цистеаминна после того, как преинкубация фермента с ипронназидом уже была проведена, цистеамин не оказывает никакого влияния на тормозящее действие ипронназида.

Следовательно, первым этапом действия ипронназида на моноаминоксидазу, по всей вероятности, является его связывание с катионами металлов в активном центре. Этот этап может быть предотвращен или заторможен в тех случаях, когда металл уже связан с комплексообразующим реагентом (как, например, при действии цистеаминна) либо, когда в пробе имеется избыток субстрата, вытесняющего ингибитор из связи с металлом, либо наконец, если в систему введен избыток катионов металлов, связывающих ингибитор. Можно заключить таким образом, во-первых, что связывания металла в активном центре недостаточно для того, чтобы вызвать мощное торможение активности фермента. Во-вторых, можно полагать, что среди соединений, в молекулах которых совмещаются группировки, имитирующие строение части молекулы субстрата, образующие комплексные соединения с катионами металлов, а также реагирующие с другими функциональными группами на каталитической поверхности фермента, могут быть найдены новые ингибиторы моноаминоксидазы.

Действительно, по нашим данным, классические комплексообразующие соединения в условиях эксперимента на целых животных не тормозят активность моноаминоксидазы.

Подтверждение второго предположения было получено в опытах с 2-ацетаминоциклогексенонем, который был синтезирован в Институте биологической и медицинской химии АМН СССР академиком М. М. Шемякиным и его сотрудниками при изучении механизма образования озазонов. Это соединение, структура которого указывает на возможность образования клешневидных комплексов с металлами, а химические свойства свидетельствуют о вероятности реагирования и с другими функциональными группами активного центра, оказалось ингибитором моноаминоксидазы, эффективным как *in vitro*, так и *in vivo*. Уже через 15 минут после момента внутривенного введения 2-ацетаминоциклогексенона (40 мг/100 г веса тела) крысам обнаруживалось статистически достоверное торможение активности моноаминоксидазы в мозгу, тогда как активность этого фермента в печени не была изменена.

Таким образом, сделанные выводы о механизме каталитического действия и специфического торможения активности митохондриальных моноаминоксидаз могут быть использованы в работах по изысканию новых ингибиторов этих ферментов.

Ценным свойством таких ингибиторов было бы избира-

тельное действие на дезаминирование определенных аминов в определенном органе или ткани. Соединения, сочетающие в себе свойства трициклических ингибиторов (избирательное блокирование дезаминирования различных моноаминов) и свойства 2-ацетаминоциклогексена (избирательность действия на аминоксидазы мозга) в известной мере удовлетворяли бы этим требованиям.

Создание на основе новых биохимических данных о природе митохондриальных моноаминоксидаз новых эффективных ингибиторов, пригодных для использования в клинике, является задачей, которая может быть решена в ходе совместной работы не только химиков, биохимиков и фармакологов, но также физиологов и клиницистов.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны три спектрофотометрических метода количественного определения активности структурно-связанных моноаминоксидаз. Эти методы основаны на учете начальной скорости накопления в пробах альдегидов, образующихся при дезаминировании одного из трех аминов: бензиламина, м-нитро-п-оксибензиламина, п-нитрофенилэтиламина.

2. Спектрофотометрический метод определения активности моноаминоксидаз с бензиламином в качестве субстрата отличается высокой чувствительностью. Были разработаны условия солюбилизации митохондрий неиононным детергентом ОП-10 отечественного производства и показана пригодность метода для изучения воздействия различных ингибиторов на активность митохондриальных моноаминоксидаз. Однако, поскольку спектрофотометрические измерения при работе этим методом приходится проводить при длине волны 250 мкм, т. е. в той области спектра, где многие биохимические компоненты тканей или ингибиторы поглощают ультрафиолетовые лучи, возможности использования метода ограничены.

3. Спектрофотометрический метод определения активности митохондриальных моноаминоксидаз, основанный на использовании в качестве субстрата м-нитро-п-оксибензиламина, лишен основного недостатка предыдущего метода, поскольку измерения оптической плотности проводятся при длине волны 315 мкм. Однако этот метод уступает предыдущему по чувствительности и может быть использован лишь при работе с содержащими значительные количества аминоксидаз тканями (печень, кишечник).

4. При спектрофотометрическом определении активности митохондриальных моноаминоксидаз с п-нитрофенилэтиламином в качестве субстрата измерения оптической плотности проводятся при длине волны 450 мкм. Метод весьма чувствителен, что позволяет использовать его для определения актив-

ности малых количеств аминоксидаз (например, в тканях мозга).

5. Используя сочетание этих трех спектрофотометрических методик, можно сравнительно быстро (5—6 минут на одно определение) исследовать влияние на активность моноаминоксидаз митохондрий или гомогенатов органов и тканей практически любого водорастворимого соединения (за исключением некоторых очень глубоко окрашенных веществ).

6. Показано, что при воздействии различных физических и химических факторов (контролируемое нагревание, сдвиги pH, обработка некоторыми органическими комплексообразующими реагентами, олеинатом натрия) на препараты митохондриальной моноаминоксидазы удается вызвать избирательное торможение дезаминирования относительно близких по строению жирно-ароматических аминов — тирамина и бензиламина. Эти данные позволяют предполагать, что дезаминирование различных моноаминов катализируется различными каталитическими центрами на поверхности одной макромолекулы.

7. При воздействии ультразвуковых волн (600 килогерц, 1 киловатт в течение 30 минут в атмосфере водорода) препараты митохондриальных аминоксидаз не теряют своей активности, хотя при этом митохондриальные мембраны полностью разрушаются, превращаясь в гомогенную взвесь частиц, размер которых составляет всего 50—200 ангстрем.

8. Путем хроматографирования предварительно солюбилизованных при помощи неионного детергента ОП-10 фрагментов митохондриальных мембран на колонках с адсорбентом брусшитом (одна из кристаллических модификаций фосфата кальция) удалось выделить белковые фракции, различающиеся по способности дезаминировать различные моноамины м-нитро-п-оксibenзиламин и п-нитрофенилэтиламин. Эти данные являются свидетельством в пользу существования различающихся по субстратной специфичности моноаминоксидаз.

9. В ходе исследований, направленных на разработку методов избирательного торможения активности митохондриальных моноаминоксидаз, было впервые установлено, что многие синтетические трициклические красители являются мощными ингибиторами моноаминоксидаз, воздействующими в различной мере на дезаминирование определенных моноаминов. Так, например, пиронин G является в 100 раз более мощным ингибитором дезаминирования тирамина, чем серотонина, тогда как акридиновый оранжевый NO, наоборот, преимущественно тормозит дезаминирование серотонина.

10. Природное трициклическое соединение — алкалоид гармин является в 1000 раз более мощным ингибитором дезаминирования серотонина, чем тирамина или триптамина.

11. Из числа гидразинных ингибиторов моноаминоксидазы, широко применяемых в клинической медицине, ниаламид (ниамид) и фелазин (фенелзин) оказались примерно в 10 раз более мощными ингибиторами дезаминирования серотонина, чем тирамина, тогда как ипронназид (ипразид), фенизин (катрон), ветразин (3,4-диметоксибензилгидразин), марплан (изокарбоксазид) — в практически равной мере тормозят ферментативное дезаминирование различных моноаминов.

12. Тетраметилтетразен — продукт окисления ассиметричного диметилгидразина — является ингибитором митохондриальных аминоксидаз, в равной мере тормозящим дезаминирование различных моноаминов.

13. Показано, что некоторые вещества, существенно различающиеся по своему химическому строению (например, 8-оксихинолин, орто-фенантролин, диэтилдитиокарбамат натрия, этилендиамин-тетраацетат, цистеамин и др.), но обладающие общим свойством — способностью к образованию устойчивых клешневидных (внутрикомплексных) соединений с катионами металлов тормозят активность митохондриальной моноаминоксидазы.

14. Среди изомеров оксихинолина или меркаптоаминосоединений те вещества, которые лишены способности к образованию устойчивых комплексных соединений с металлами, практически не оказывают влияния на дезаминирование моноаминов препаратами митохондриальных моноаминоксидаз.

15. Добавление катионов металлов к препаратам митохондриальных моноаминоксидаз, обработанным комплексообразующими реагентами, частично восстанавливает ферментативную активность. Добавление избытка цистеина или глутатиона не оказывает такого действия. Показано также, что внесение катионов металлов в растворы комплексообразующих реагентов частично предотвращает их тормозящее действие на ферментативное дезаминирование моноаминов.

16. Результаты наших опытов позволяют предполагать, что в каталитическом действии митохондриальных моноаминоксидаз принимают участие катионы металлов. Характеристика природы этих металлов требует полного отделения моноаминоксидаз от структурных элементов митохондриальных мембран, что пока представляется неразрешимой задачей.

17. На основании исследований механизма торможения активности митохондриальных моноаминоксидаз ипронназидом (ипразидом) сделано заключение о том, что первичным этапом в действии этого ингибитора на дезаминирование моноаминов является связывание с металлом, входящим в состав каталитического центра фермента. Воздействием избытка ионов металлов, комплексообразующих реагентов, субстратов удается частично препятствовать осуществлению этого этапа действия ипронназида и тем самым в определенной мере пред-

отвращать характерное для него необратимое торможение ферментативной активности.

18. Возможность использования сделанных выводов о механизме каталитического действия и специфического торможения активности митохондриальных моноаминоксидаз в работах по изысканию новых ингибиторов моноаминоксидазы показана в ходе исследований 2-ацетаминоциклогексенона. Это соединение, структура которого указывает на возможность образования клешневидных комплексов с металлами, а химические свойства свидетельствуют о вероятности реагирования и с другими функциональными группами активного центра, оказалось ингибитором моноаминоксидазы, эффективным как *in vitro*, так и *in vivo*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горкин В. З. при участии Л. А. Романовой. О некоторых свойствах моноаминоксидазы митохондрий печени и мозга крыс. Биохимия, 24, 826, 1959.
2. Горкин В. З. Исследование природы активных групп аминоксидаз. Пятый международный биохимический конгресс. Рефераты секционных сообщений, т. I, стр. 247. Изд-во АН СССР, М., 1961.
3. Горкин В. З. О природе активных групп аминоксидаз. Роль цинка в действии аминоксидазы сыворотки крови. Вопросы мед. химии, 7, 632, 1961.
4. Горкин В. З. О некоторых свойствах аминоксидаз крови и органов крупного рогатого скота. В кн: Актуальные вопросы современной биохимии (под ред. проф. В. Н. Ореховича), т. II, Химия и механизм действия ферментов, стр. 110. Медгиз, М., 1962.
5. Горкин В. З. Биохимия полиаминов. В кн. Успехи биологической химии, т. 4, стр. 157. Изд-во АН СССР, М., 1962.
6. Горкин В. З., Гриднева Л. И., Романова Л. А. и Северина И. С. Определение активности моноаминоксидазы митохондрий спектрофотометрическим методом. Биохимия, 27, 1004, 1962.
7. Горкин В. З. Современные достижения в изучении процессов и ферментных систем обмена биогенных аминов. Вестник АМН СССР, № 9 28, 1962.
8. Горкин В. З., Авакян А. А., Веревкина И. В., Комиссарова Н. В. Электрофоретический способ разделения веществ. Авторское свидетельство № 156523. Приоритет от 26 июня 1962 г. Бюлл. изобр. № 16, 12, 1963.
9. Горкин В. З., Авакян А. А., Веревкина И. В. и Комиссарова Н. В. Применение зонального электрофореза в вертикальных колонках с новым антиконвекционным материалом (гранулированным полиметилметакрилатом) для очистки аминоксидазы сыворотки крови. Вопросы мед. химии, 8, 78, 1962.
10. Горкин В. З., Авакян А. А., Веревкина И. В. и Комиссарова Н. В. Zone electrophoresis in vertical columns with granulated polymethylmethacrylate in purification of serum amine oxidase. Feder. Proc., 22, T619, 1963.
11. Горкин В. З. и Веревкина И. В. Частичная очистка моноаминоксидазы митохондрий печени крысы. Вопросы мед. химии, 9, 315, 1963.
12. Северина И. С. и Горкин В. З. О природе митохондриальных моноаминоксидаз. Биохимия, 23, 896, 1963.
13. Горкин В. З., Кривченкова Р. С. и Северина И. С. О природе каталитически активных центров и субстратной специфичности

аминоксидаз. Научная конференция по механизму и кинетике ферментативного катализа (28—30 января 1963 г.; Научный Совет при АН СССР по комплексной проблеме «Молекулярная биология». Тезисы докладов, стр. 10, М., 1963.

14. Китросский Н. А., Горкин В. З., Комиссарова Н. В., Леонтьева Г. А. и Северина И. С. Способ спектрофотометрического определения моноаминоксидазы. Авторское свидетельство № 156345. Приоритет от 27 июля 1962 г. Бюлл. изобр., № 15, 71, 1963.

15. Горкин В. З. О хроматографическом разделении митохондриальных аминоксидаз. Вопросы мед. химии, 9, 646, 1963.

16. Горкин В. З. Partial separation of rat liver mitochondrial amine oxidases. Nature, 200, 77, 1963.

17. Горкин В. З., Гриднева Л. И., Ермолаев К. М. и Желязков Д. К. Новый негидразинный ингибитор моноаминоксидазы. ДАН СССР, 153, 468, 1963.

18. Бруслова Л. В., Горкин В. З., Китросский Н. А., Кляшторни Л. Б., Комиссарова Н. В., Леонтьева Г. А., Пучков В. А. и Северина И. С. Спектрофотометрические и колориметрические методы определения активности митохондриальных аминоксидаз. Всесоюзное совещание по производству очищенных ферментных препаратов, г. Рига, 1963 г. Тезисы докладов, стр. 30, 1963.

19. Горкин В. З., Кривченкова Р. С., Северина И. С., Веревкина И. В., Кляшторни Л. Б. и Комиссарова Н. В. О природе митохондриальных аминоксидаз животных тканей. Первый Всесоюзный биохимический съезд, Ленинград, январь 1964 г. Тезисы докладов, вып. 1, стр. 95, 1963.

20. Горкин В. З., Китросский Н. А., Кляшторни Л. Б., Комиссарова Н. В., Леонтьева Г. А. и Пучков В. А. О субстратной специфичности аминоксидаз. Биохимия, 29, 88, 1964.

21. Бруслова Л. В., Горкин В. З., Желязков Д. К., Китросский Н. А., Леонтьева Г. А. и Северина И. С. - Новый спектрофотометрический метод определения активности моноаминоксидазы в гомогенатах печени. Вопросы мед. химии, 10, 83, 1964.

22. Горкин В. З. Современные достижения в изучении природы и физиологической роли митохондриальной моноаминоксидазы. Вопросы мед. химии, 10, 115, 1964.

23. Горкин В. З. и Кривченкова Р. С. О механизме тормозящего действия изониазида на активность аминоксидазы крови (спермидноксидазы). Вопросы мед. химии, 10, 149, 1964.

24. Горкин В. З., Северина И. С. и Поletaев А. И. О воздействии диметилгидразина и тетраметилтетразена на активность митохондриальной моноаминоксидазы. Ж-л Всесоюзного хим. общ-ва им. Д. И. Менделеева, 9, 115, 1964.

25. Горкин В. З., Комиссарова Н. В., Лерман М. И. и Веревкина И. В. The inhibition of mitochondrial amine oxidase in vitro by proflavine. Biochem. Biophys. Res. Commun., 15, 383, 1964.

26. Веревкина И. В., Горкин В. З., Митюшин В. М. и Эльпнер И. Е. О действиях ультразвуковых волн на моноаминоксидазу, связанную с субмикроскопическими структурами митохондрий. Биофизика, 9, 509, 1964.

27. Вихляев Ю. И., Горкин В. З., Гриднева Л. И. и Смирнова А. В. О воздействии хлорацетина на активность митохондриальной моноаминоксидазы. Вопросы мед. химии, 10, 497, 1964.

28. Веревкина И. В., Горкин В. З., Гриднева Л. И., Лерман М. И., Романова Л. А. и А. Ходера. О торможении активности митохондриальных аминоксидаз некоторыми трициклическими соединениями. ДАН СССР, 157, 191, 1964.

29. Ходера А., Горкин В. З. и Гриднева Л. И. Über den Wirkungsmechanismus einiger Monoaminoxidase — Hemipern. Acta Biol. et Med. Germanica, 13. 101, 1964.

30. Горкин В. З. Роль металлов в каталитическом действии ферментов. В кн.: Ферменты (под ред. акад. А. Е. Браунштейна), Изд-во «Наука», М., 1964, стр. 192.

31. Горкин В. З. О природе, механизме действия и специфического торможения митохондриальных моноаминоксидаз. Ж-л Всесоюзного хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 9, 405, 1964.

32. Горкин В. З. On the multiplicity of mitochondrial amine oxidases. В кн.: Sixth International Congress of Biochemistry. New York, July 26—August 1, 1964. Abstracts. IV. Mechanism of Enzyme Action, p. 309.

33. Горкин В. З. и Кривченкова Р. С. Влияние цистеина и других меркаптоаминосоединений на активность митохондриальной моноаминоксидазы. Биохимия, 29, 998, 1964.

Л-60962 от 19/IX-64.

Зак. № 6226

Типолитография ВАФ