

УДК 577.615

ИЗОФОРМЫ MAO A В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

А.Н. Фаттахова, Н.А. Нигматзянова

Аннотация

Из микросом коры головного мозга условно здоровых и пациентов с диагнозами F1-F9 «шизофрения» и F20-F29 «органический психоз» с помощью хроматографии выделены изоформы моклобемид чувствительной MAO A. Сравнительный анализ значений константы Михаэлиса K_m , каталитического числа V/K_m и константы ингибирования K_i для моклобемид в выделенных фракциях показал, что по сравнению с нормой фенотипы «шизофрения» и «органический психоз» характеризуются отсутствием высоко каталитических изоформ MAO A со значениями каталитического числа 36.3 и 37.16. Все изоформы MAO A микросом коры пациентов с фенотипом «органический психоз» являются ферментами с низким каталитическим числом, не превышающим 0.41.

Введение

Моноаминоксидаза A (MAO A) представляет собой главную ферментную систему, определяющую концентрацию нейромедиаторов: серотонина, дофамина, норадреналина и адреналина, являющихся также вазоактивными аминами в тканях организма человека [1]. Следует отметить, что MAO A локализована в митохондриях гепатоцитов, в альвеолярной и железистой тканях, в стенке тонкого кишечника, в слизистой ротовой полости, в адипоцитах и жидкостях организма [2]. По данным гистохимических и иммунологических исследований, в нервной ткани MAO A обнаружена в областях синапса, оксональной бляшки, компартментах астроцитов и в других клетках нейроглии [2, 3]. Очевидно, что MAO A можно считать одной из важных гомеостазных систем, обеспечивающих постоянство внутренней среды организма и постоянство частотных характеристик синапсов в ЦНС в пределах нормы реакции. Вместе с тем следует признать, что недостаточная изученность вопроса об изоформах MAO A, специфичных для каждой ткани и жидкости организма, затрудняет установление механизмов регуляции MAO A в норме и при патологии, а также делает проблематичной успешную селекцию ингибиторов MAO A, не обладающих вредными побочными эффектами. Анализ полиморфизмов гена MAO A позволил установить, что некоторые мутантные аллели гена входят в генетический набор, определяющий ряд нейродегенеративных заболеваний, таких, как синдром Брюннера, тревожный панический синдром, аутизм, синдром гиперактивности и дефицита внимания у детей и шизофрения [4, 5]. Однако в случае шизофрении не наблюдается четкой корреляции между носительством мутантных аллелей гена MAO A и клиническим проявлением шизофрении [4]. Ранее нами установлено, что активность MAO A в слюне пациентов с диагно-

зом «шизофрения» достоверно понижена по сравнению с уровнем активности в слюне здоровых людей [6]. Можно сделать предположение, что некоторые фенотипы MAO A, характерные для шизофрении, определяются своеобразием изоформ фермента, специфичных для коры головного мозга при шизофрении.

Целью нашего исследования был сравнительный анализ изоформного состава MAO A в микросомах коры головного мозга условно здоровых людей и пациентов с диагнозами F1-F9 «шизофрения» и F20-F29 «органический психоз».

Методика

В экспериментах использовали образцы аутопсийной коры головного мозга условно здоровых мужчин 19–25 лет ($n = 2$), пациентов с диагнозом F1-F9 «шизофрения» ($n = 10$) и с диагнозом F20-F29 «органический психоз» ($n = 8$) в возрасте от 25 до 69 лет обоего пола. Образцы любезно предоставлены Банком тканей Судебно-медицинской экспертизы и Банком тканей Республиканской психиатрической больницы г. Казани. Анализ лечебных дел показал, что все пациенты не принимали ингибиторы MAO A, такие, как моклобемид и амитриптилин, а также наркотики и алкоголь на момент смерти.

Микросомальную фракцию коры головного мозга выделяли согласно методике [7]. Активность MAO A определяли с адреналином в качестве субстрата в дозах 0.2–1 мМ, как указано [6]. В вариантах с ингибитором реакционные смеси содержали моклобемид (F. Hoffmann-La Roche Ltd Basel) в дозах 10^{-3} – 10^{-6} М. Бензиламинооксидазную активность (BAO) измеряли по методике [8]. Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом [7]. Значения константы Михаэлиса K_m и константы ингибирования K_i определяли графически методом обратных величин.

С целью выделения изоформ MAO A микросомальные фракции, содержащие активность моклобемид зависимой MAO A адреналина, насыщали сульфатом аммония на холоду. Выпавший осадок (2 мл) наносили на колонку (1 × 6 см), заполненную Sephadex G-200 (Sigma). В качестве элюирующей среды использовали 0.05 М фосфатный буфер pH 7.0. Фракции, содержащие активность моклобемид зависимой MAO A адреналина, разделяли на диске ZetaPrep QAE (LKB Pharmacia) в градиенте NaCl 0–0.2 М в 0.01 М TRIS HCl буфере pH 6.8.

Результаты

В дендритах, в области синапса, а также в мембранах митохондрий нейронов и клеток нейроглии локализованы ферменты, катализирующие окисление адреналина, а именно, MAO A, MAO B и семикарбазид чувствительная медь-содержащая аминоксидаза (мембранная изоформа плазматической бензиламиноксидазы) [2, 9]. Для того чтобы исключить загрязнение фракций активностями MAO B и BAO, в реакционные смеси добавляли специфические ингибиторы купризон и гидразин. Для доказательства участия MAO A в катализе адреналина использовали селективный ингибитор MAO A моклобемид [10].

В результате гель-хроматографии микросомальной фракции коры головного мозга условно здоровых людей получили 1 фракцию, пациентов с диагнозом

Табл. 1

Значения константы Михаэлиса K_m (μM) для адреналина, каталитическое число (V/K_m) и значения константы ингибирования K_i (μM) для моклобемида во фракциях микросом коры головного мозга человека

Условно здоровые			
Фракции №	K_m	K_i	V/K_m
3	2.5 ± 0.1	0.085 ± 0.02	36.3 ± 0.05
4	0.27 ± 0.06	0.088 ± 0.02	37.2 ± 0.02
5	40 ± 0.05	0.10 ± 0.05	0.16 ± 0.02
6	5 ± 0.02	0.17 ± 0.02	6.07 ± 0.05
7	8 ± 0.05	0.32 ± 0.02	4.36 ± 0.1
8	40 ± 0.1	0.055 ± 0.01	2.71 ± 0.05
Шизофрения F1-F9			
8	1.4 ± 0.02	0.048 ± 0.02	5.89 ± 0.2
9	4 ± 0.1	1.170 ± 0.1	5.25 ± 0.5
7	2.85 ± 0.05	0.080 ± 0.02	1.54 ± 0.5
6	0.5 ± 0.08	0.030 ± 0.01	13.5 ± 0.1
Органический психоз F20-F29			
3	1.8 ± 0.02	0.120 ± 0.05	0.08 ± 0.02
4	0.49 ± 0.03	0.370 ± 0.05	0.41 ± 0.05
5	4 ± 0.04	0.5 ± 0.05	0.03 ± 0.01
6	12.5 ± 0.05	0.3 ± 0.02	0.26 ± 0.06
7	12.5 ± 0.05	0.3 ± 0.05	0.14 ± 0.05
8	0.9 ± 0.05	0.32 ± 0.05	0.31 ± 0.02

«шизофрения» – 3 фракции, пациентов с диагнозом «органический психоз» – 2 фракции, содержащие активность моклобемида чувствительной МАО А, но не содержащие активности БАО или МАО В. Полученные фракции разделяли с помощью ионообменной хроматографии на диске ZetaPrep QAE. В результате нами установлено, что микросомы коры головного мозга человека содержали от 4 до 6 изоформ моклобемида чувствительной МАО А в зависимости от фенотипа.

Сравнительный анализ значений K_m для адреналина в выделенных фракциях показал, что изоформы МАО А для каждого фенотипа можно условно разделить на высоко аффинные ($K_m < 1$ мМ), средне аффинные (K_m от 1 до 8 мМ) и низко аффинные (K_m от 8 до 40 мМ) (табл. 1).

Следует отметить, что микросомы коры пациентов с фенотипом «шизофрения» не содержали низко аффинных изоформ МАО А, что свидетельствует, по нашему мнению, о глубоком нарушении метаболизма нейроаминов при шизофрении. Значения K_i для моклобемида в выделенных фракциях микросом условно здоровых свидетельствовали о том, что все выделенные изоформы МАО А условно здоровых представляют собой ферменты, обладающие высокой чувствительностью к ингибитору, который является популярным антидепрессантом под маркой Augoix. Однако изоформа № 9, выделенная из микросом пациентов с диагнозом «шизофрения», обладала низкой чувствительностью к моклобемиду. Следует подчеркнуть, что все изоформы МАО А микро-

сом пациентов с фенотипом «органический психоз» обладали практически одинаковой чувствительностью к ингибитору.

Сравнительный анализ значений каталитического числа также выявил три класса изоформ MAO A в микросомах условно здоровых с фенотипом «норма» (табл. 1). Следует отметить, что высоко каталитические изоформы со значением V/K_m 36.3 и 37.16 отсутствовали в микросомах пациентов с фенотипами «шизофрения» и «органический психоз». Кроме того, все изоформы MAO A в микросомах пациентов с диагнозом «органический психоз» являлись ферментами с низким каталитическим числом.

Таким образом, выявленные различия кинетических параметров и чувствительности к ингибитору изоформ MAO A коры головного мозга здоровых людей и пациентов с фенотипами «шизофрения» и «органический психоз» свидетельствуют не только о специфическом для каждого заболевания ЦНС метаболизме нейроаминов, но демонстрируют необходимость селекции новых антидепрессантов – ингибиторов MAO A, которая основана на информации о регуляции изоформ MAO A, специфичных для нервной и глиальной тканей.

Summary

A.N. Fattakhova, N.A. Nigmatzyanova. MAO A isotypes in human brain cortex microsomes.

The moclobemide sensitive MAO A isotypes from brain cortex microsomes in healthy, schizophrenic F1-F9 and psychotic F20-F29 patients were obtained by chromatography methods. It was shown with comparative analysis of K_m , V/K_m and moclobemide K_i values in fractions that unlike in the healthy phenotype the phenotypes “schizophrenia” and “psychosis” were characterized by absence of high catalytic MAO A isotypes with catalytic number values 36.3 and 37.16. The all MAO A isotypes in psychotic patients were shown to be the enzymes with poor catalytic number below 0.41.

Литература

1. *Veselovsky A.V., Ivanov A.S., Medvedev A.E.* Computer modeling and visualization of active site of monoamine oxidases // *NeuroToxicology*. – 2004. – V. 25. – P. 37–46.
2. *Adeghate E., Parvez H.* The effect of diabetes mellitus on the morphology and physiology of monoamine oxidase in the pancreas // *NeuroToxicology*. – 2004. – V. 25. – P. 167–173.
3. *Burke W.J., Li S., Zahm D., Macarthur H., Kolo L., Westfall C., Anwar M., Glickstein S., Ruggiero D.* Catecholamine monoamine oxidase a metabolite in adrenergic neurons is cytotoxic in vivo // *Brain Research*. – 2001. – V. 891. – P. 218–227.
4. *Tivol E.A., Shalish C., Schuback D.E., Hsu Y., Breackfield X.O.* Mutational analysis of the human MAO A gene // *Neuropsychiatric Genetics*. – 1996. – V. 67. – P. 92–97.
5. *Jiang S., Xim R.* Linkage studies between attention deficit hyperactivity disorder and the monoamine oxidase genes // *Neuropsychiatric Genetics*. – 2001. – V. 105. – P. 783–788.
6. *Фаттахова А.Н., Фаттахов Ф.З.* Биохимические особенности инсомнии больных алкоголизмом // *Наркология*. – 2004. – № 11. – С. 41–43.
7. *Фаттахова А.Н.* Методы молекулярной фармакологии. – Казань: УНИПРЕСС, 2002. – 30 с.

8. *Riley L.A., Denney R.M.* Problems with measurement of monoamine oxidase A protein concentrations in mitochondrial preparations // *Biochemical Pharmacology*. – 1991. – V. 42. – P. 1953–1959.
9. *Belleli A., Morpurgo L., Mondova B., Agostinelli E.* The oxidation and reduction reactions of bovine serum amine oxidase. A kinetic study // *Europ. J. Biochemistry*. – 2000. – V. 267. – P. 3264–3269.
10. *Yamada M., Yasuhara H.* Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future // *NeuroToxicology*. – 2004. – V. 25. – P. 215–221.

Поступила в редакцию
15.05.06

Фаттахова Альфия Нурлимановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии Казанского государственного университета.

E-mail: afattakh@rambler.ru

Нигматзянова Наиля Ахатовна – студентка 5-го курса кафедры биохимии Казанского государственного университета.