

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР  
ПО НАРОДНОМУ ОБРАЗОВАНИЮ

ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ  
УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ имени ПАТРИСА ЛУМУМБЫ

*На правах рукописи*

ГОРОШИНСКАЯ Ирина Александровна

УДК 577.152.143

РОЛЬ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ В РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА  
НА ЭКСТРЕМАЛЬНЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

*(03.00.04 — биохимия)*

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва — 1988

Работа выполнена в НИИ биологии Ростовского орде-  
на Трудового Красного Знамени государственного уни-  
верситета.

**Официальные оппоненты:**

академик АМН СССР, доктор биологических наук,  
профессор **И. Б. Збарский**,

доктор биологических наук, профессор **М. Ш. Про-  
мыслов**,

доктор медицинских наук, профессор **А. П. Хохлов**.

Ведущая организация — 2-й Московский государст-  
венный медицинский институт им. Н. И. Пирогова.

Защита диссертации состоится «*24*» *марта* 1989 г.  
в *14* час на заседании специализированного совета  
Д 053.22.02 при Университете дружбы народов имени  
Патриса Лумумбы по адресу: 117198, ГСП, Москва,  
ул. Миклухо-Маклая, д. 8, медицинский корпус.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной биб-  
лиотеке Университета дружбы народов имени Патриса  
Лумумбы по адресу: Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Автореферат разослан «*25*» *января* 1989 г.

Ученый секретарь  
специализированного совета

В. Э. ТОРБЕК

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение возможности существования живых организмов в экстремальных условиях, в первую очередь при повышенном и пониженном давлении кислорода, при низкой температуре окружающей среды, является в настоящее время актуальной медико-биологической проблемой. Актуальность определяется интенсивным освоением высокогорных районов, обширных территорий Севера, морских глубин, развитием авиации и космонавтики, широким применением гипербарооксигенации в медицинской практике. Нередко организм подвергается одновременному воздействию нескольких экстремальных факторов. Использование кислорода под повышенным давлением в медицине, при водолазных и космических работах может сопровождаться и влиянием низкой температуры. Сочетание холодового и гипоксического воздействий наблюдается в высокогорных районах и может встречаться при различных экстремальных условиях трудовой деятельности.

Существенная роль в развитии кислородной интоксикации, в ответной реакции организма на гипоксическое воздействие, в регуляции процессов адаптации к холоду принадлежит нейрогуморальным механизмам и прежде всего нарушению моноаминергических медиаторных систем. Универсальными факторами, участвующими в развитии патологического процесса, являются нарушение мембранных структур и модификация активности и свойств мембраносвязанных ферментов. Поэтому при изучении механизмов влияния гипероксии, гипоксии и холода особое внимание привлекает митохондриальная моноаминоксидаза (МАО), основной фермент обмена моноаминов, непосредственно участвующий в выполнении ими медиаторных функций. Важная роль МАО в процессах жизнедеятельности организма и многообразие метаболических реакций, связанных с активностью фермента, позволяют предположить, что изменения каталитических свойств МАО могут вносить существенный вклад в реализацию ответной реакции на экстремальные воздействия и в развитие патологического состояния. Несмотря на многолетний интерес к исследованию МАО и появлению все новых и новых работ по изучению ее активности и свойств при различных воздействиях и заболеваниях, значение обнаруживаемых изменений этого фермента в экстремальных условиях остается неизменным.

В данной работе исследовалось состояние МАО при гипероксии, гипоксической гипоксии, ишемии головного мозга и холодовом воздействии. Поскольку общепринято разделять МАО на типы А и В,

изучались обе формы фермента. Существенным различием между выбранными для исследования воздействиями является их переносимость организмом. Гипероксия относится к воздействиям, с которыми большинство живых организмов в естественных условиях не встречается и адаптация к которым маловероятна. Ишемия головного мозга моделирует условия, в которые попадает мозг при инсульте, и при достаточной длительности ведет к необратимому повреждению функций мозга и гибели организма. Используемые нами условия гипоксической гипоксии также несовместимы с продолжительной жизнью. В отличие от перечисленных состояний длительным воздействием низкой температуры в пределах 0-4<sup>0</sup>C приводит к адаптации организма. Исследование каталитических свойств MAO на начальных этапах действия холодового фактора, когда преобладает стрессовая реакция, и при достижении состояния адаптации является необходимым для установления роли этого фермента в адаптивных процессах в организме.

Цель и задачи исследования. Целью работы явилось выяснение участия моноаминоксидазной системы в реакциях организма в ответ на экстремальные воздействия и при патологических состояниях. Для решения этих вопросов были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Исследование активности, кинетики и субстратной специфичности MAO при гипероксии. Определение тканевой чувствительности MAO к действию повышенного давления кислорода. Установление роли MAO в изменении содержания ряда биологически активных азотсодержащих компонентов клетки при гипероксии. Изучение возможности применения ингибиторов MAO в качестве защитных веществ при гипероксии и механизма их антигипероксического действия.

2. Исследование активности, кинетики и субстратной специфичности MAO в условиях гипоксической гипоксии и ишемии головного мозга.

3. Исследование активности, кинетики и субстратной специфичности MAO в условиях холодового стресса и адаптации к холоду. Изучение влияния на свойства MAO пептида дельта-сина, обладающего адаптогенным действием.

4. Изучение влияния предварительной холодовой адаптации на чувствительность животных и каталитические свойства MAO при последующем действии гипероксии и гипоксии.

5. Изучение состояния митохондриальных мембран при гипероксии, гипоксии и холодовом воздействии.

Выполнение поставленных задач осуществлялось на базе лаборатории адаптации животных к экстремальным факторам среды НИИ биологии Ростовского госуниверситета и частично на базе лаборатории нейрохимии Института биохимии Медицинского факультета Белградского университета (СФРЮ). Клинические испытания проведены на базе больницы № 20 г. Ростова-на-Дону.

Научная новизна. В работе впервые проведено комплексное сравнительное исследование свойств MAO при экстремальных состояниях разной этиологии (гипероксии, гипоксии и холодовом воздействии) и показана роль MAO в ответной реакции организма на действие различных экстремальных факторов. Для всех изученных экстремальных состояний характерно ингибирование MAO типа А мозга, сопровождающееся снижением сродства к моноаминам и изменением субстратной специфичности фермента. MAO типа А приобретает способность дезаминировать аминоксахара, ди- и ползамины, ГАМК, гистамин, гомокарнозин. Усиление дезаминирования АМФ в зависимости от природы воздействия может обуславливаться трансформацией MAO типа А или активацией специфического фермента — АМФ-дезаминазы. Показана наибольшая чувствительность MAO типа А в мозге по сравнению с другими тканями. MAO типа В мозга менее чувствительна к экстремальным воздействиям: не изменяется при гипоксической гипоксии, холодовом стрессе и ингибируется в значительно меньшей степени, чем MAO типа А, в условиях гипероксии. С помощью избирательно действующих ингибиторов MAO однозначно доказано, что существенный вклад в характерные для гипероксии снижение содержания ряда важнейших азотсодержащих компонентов клетки, таких, как ГАМК и спермидин, вносит MAO типа А вследствие изменения субстратной специфичности. Показана ошибочность ранее существовавшего предположения, что снижение уровня ГАМК при гипероксии связано с ингибированием глутаматдекарбоксилазы.

Важнейшими последствиями изменения каталитических свойств MAO типа А в экстремальных условиях являются: 1) нарушение процессов инактивации основных медиаторов и изменение в результате этого нормального соотношения активностей возбуждающих и тормозных медиаторных систем; 2) усиление перекисного окисления липидов вследствие образования в ходе реакций катализируемых MAO продуктов, обладающих прооксидантным эффектом; 3) нарушение мембранных структур в результате приобретения MAO способности дезаминировать аминоксахара и дятенсификации процессов перекисного окисления липидов мембран. В свою очередь усиление процес-

сов перекисного окисления липидов и нарушение структуры и проницаемости мембран митохондрий являются факторами, вызывающими изменение активности и субстратной специфичности MAO. Нарушение мембранных структур разных типов характерно для всех изученных экстремальных воздействий. Об этом свидетельствует выход митохондриальной MAO в цитозоль, данные электронной микроскопии и появление эритроцитарных ферментов в сыворотке крови.

Подтверждением роли MAO в механизме развития патологического состояния являются защитный эффект при гипероксии ингибиторов MAO типа А, препятствующих изменению субстратной специфичности фермента, а также адаптогенное действие пептида дельта-сна, предотвращающего модификацию свойств MAO типа А при холодовом воздействии. При этом нормализуется ряд показателей метаболизма, нарушение которых характерно для описанных экстремальных состояний, в частности, интенсивность перекисного окисления липидов и стабильность мембран. Полученные данные являются основой для использования ингибитора MAO типа А пиразидола в качестве протектора при лечении методом ГБО-терапии. Показано, что предварительная холодовая адаптация, для которой характерна нормализация субстратной специфичности MAO и резкое увеличение сродства фермента к моноаминам, повышает устойчивость животных к гипероксии и гипоксии и может быть использована в качестве одного из способов увеличения резистентности организма к экстремальным воздействиям. На основании полученных данных выдвигаются новые представления, имеющие общебиологическое значение, согласно которым изменению каталитических свойств MAO принадлежит важная роль в реакциях организма на экстремальные воздействия.

#### Основные результаты и положения, выносимые на защиту.

I. Снижение активности и изменение субстратной специфичности MAO типа А, обнаруженное при гипероксии, гипоксии и холодовом воздействии, ведет к нарушению процессов инактивации медиаторов серотонина, норадреналина, гистамина, ГАМК, гомокарбонзина и тем самым изменяет нормальное соотношение между процессами возбуждения и торможения в ЦНС. Характерное для гипероксии и холодового стресса снижение уровня ГАМК, полиаминов, гомокарбонзина, глуксамина обусловлено в значительной степени их дезаминированием при участии модифицированной MAO типа А. Изменение свойств MAO способствует также усилению процессов перекисного окисления липидов и нарушению мембранных структур.

2. При всех изученных экстремальных воздействиях происходит изменение структуры и проницаемости ряда мембран, о чем свидетельствуют выход митохондриальной МАО в цитозоль, данные электронной микроскопии и появление эритроцитарной глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) в сыворотке крови.

3. Ингибиторы МАО типа А оказывают выраженное антигипероксическое действие, механизм которого определяется, по-видимому, их способностью предотвращать изменение субстратной специфичности фермента, результатом чего являются нормализация уровня ГАМК и спермидина, антиоксидантный эффект, стабилизация мембран.

4. Предварительная холодовая адаптация, но не холодовой стресс, повышает устойчивость животных к действию гипероксии и гипоксии и препятствует развитию характерных для этих воздействий метаболических нарушений. Одним из факторов, способствующих неспецифической повышенной сопротивляемости адаптированных к холоду животных, является состояние МАО, характеризующееся повышением сродства фермента к моноаминам и отсутствием изменения субстратной специфичности.

5. Изменение каталитических свойств МАО является одним из ведущих звеньев в ответной реакции организма на экстремальные воздействия, в механизмах развития патологического состояния. Приемы, предотвращающие изменения свойств МАО или способствующие их нормализации, могут служить основой для разработки эффективных методов повышения устойчивости организма к действию неблагоприятных факторов среды.

Практическая значимость работы. Факты и обобщения, полученные в ходе выполнения настоящей работы, послужили предпосылкой к развитию нового перспективного направления исследований в области разработки рациональных способов повышения устойчивости организма к действию экстремальных факторов и поиска пригодных для практического использования антигипероксических протекторов. На примере хлоргидина изучен механизм защитного действия ингибиторов МАО при гипероксии и обосновано их применение в качестве протекторов в клинической практике при лечении методом ГБО-терапии. На основании этих исследований разработаны рекомендации по использованию допущенного в качестве лечебного препарата ингибитора МАО типа А пиразидола у больных, которым по показаниям применялась гипербарооксигенация. Разработана оптимальная схема введения пиразидола и апробировано его при-

менение у больных с ишемической болезнью сердца и рядом других сердечно-сосудистых патологий, получавших сеансы гипербарооксигенации. Применение пиразидола позволяет использовать ГБО-терапию и у чувствительных к повышенному давлению кислорода больных (заявка на изобретение № 433114/14 (177615), приоритет от 2.12.1987 г.).

Показана возможность применения предварительной холодовой адаптации в качестве способа повышения устойчивости организма к гипероксии и гипоксии (распределение № 135/82 от 19.II.1982 г. РГУ внедрено в НИИ акушерства и педиатрии с 1984 г.). Определение активности и субстратной специфичности MAO используется на кафедре биохимии и биотехнологии РГУ и в НИИ биологии РГУ в качестве теста для отбора и апробации антигипероксических препаратов и адаптогенов. Разработан способ определения глубины гипероксического поражения и оценки состояния организма при холодовом воздействии, основанный на определении стабильности эритроцитарных мембран по активности Г6ФДГ в сыворотке крови (внедрен в отделении ГБО больницы № 20 г. Ростова-на-Дону с 1985 г.). Предложены биохимические критерии дифференцировки состояния холодового стресса и адаптации, используемые на кафедре биохимии и биотехнологии РГУ для научно-исследовательских задач и в учебном процессе.

Материалы диссертации используются при чтении лекций в спецкурсах по ферментологии, биохимии ЦНС и сравнительной биохимии на кафедре биохимии и биотехнологии РГУ; они включены в монографии "Нейрохимия" (изд. Ростовского университета, 1977) и "Биохимические механизмы кислородной интоксикации" (изд. Ростовского университета, 1980), которые используются как учебные пособия для специализирующихся по биохимии студентов.

Апробация работы. Основные положения работы доложены на 22 съездах, симпозиумах и конференциях: IУ Всесоюзном биохимическом съезде, Ленинград, 1979; УШ, IХ и X Всесоюзных нейрохимических конференциях, Минск, 1980, Ереван, 1983, Горький, 1987; Всесоюзных симпозиумах "Стресс и адаптация", Кишинев, 1978, 1984; "Окислительные ферменты живой клетки и регуляция их активности", Горький, 1978; "Пентозофосфатный путь превращения углеводов и его регуляция", Гродно, 1978; Карачарово, 1984; 4 Северо-Кавказской биохимической конференции, Нальчик, 1979; Всесоюзных симпозиумах "Кратковременное действие повышенного давления газовой среды на организм человека и животных", Ле-



нинград, 1979; "Адаптивные функции головного мозга", Баку, 1980; "Механизмы пластичности мозга при функциональных и патологических воздействиях", Махачкала, 1982; I и II Всесоюзных конференциях "Важнейшие теоретические и практические проблемы терморегуляции", Новосибирск, 1982, Минск, 1986; I Всесоюзном симпозиуме "Фармакологическая коррекция кислородзависимых патологических состояний", Москва, 1984; 3 Северо-Кавказской школе-семинаре по проблеме "Механизмы экологической адаптации растений и животных к экстремальным факторам среды", Ростов-на-Дону, 1984; VI Балканских биохимических и биофизических днях, Пловдив (Болгария), 1985; Международной конференции "Фосфолипиды в нервной системе: биохимическая и молекулярная фармакология", Мантова (Италия), 1985; XIII Конгрессе Союза Югославских физиологических обществ с международным участием, Скопье (Югославия), 1985; II Всесоюзной конференции "Биоантиоксидант", Москва, 1986; V Всесоюзном симпозиуме по медицинской энзимологии, Махачкала, 1986.

Публикация результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 65 работ, в том числе 27 статей обзорного и экспериментального характера и 38 публикаций в трудах съездов, конференций, симпозиумов. 10 работ опубликовано на английском языке.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы "Материалы и методы исследования", пяти глав экспериментального материала, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 340 страницах машинописного текста, включая 57 таблиц и 36 рисунков. Список использованной литературы, изложенный на 71 странице, состоит из 711 наименований, в том числе 334 зарубежных источников.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основная часть опытов проведена на половозрелых белых крысах массой 150-200 г. Использовано 1780 крыс. В отдельных сериях использованы кролики, морские свинки, кошки, донорская кровь человека. Исследование ишемии головного мозга проведено на 116 половозрелых монгольских песчанках массой 50-60 г. Клинические испытания применения пиразидола в качестве протектора при лечении методом ГБО-терапии проведены на больных ишемической болезнью сердца, атеросклерозом и облитерирующим энтерте-

ритом, получавших курс оксигенотерапии, состоявший из 9-12 сеансов 0,2 МПа кислорода в течение 60 минут.

Действие гипероксии изучали при 0,7 МПа кислорода, судорожная фаза в барокамере при постоянном режиме компрессии и декомпрессии 0,2 МПа/мин. Гипоксическую гипоксию вызывали, помещая крыс на 1 ч в барокамеру, где производили "подъем" на высоту 9000 м (атмосферное давление 0,029 МПа) при скорости декомпрессии 0,005 МПа/мин. В ряде опытов животных подвергали действию атмосферного давления 0,019 МПа, соответствующего высоте 12000 м над уровнем моря. Экспозицию на высоте 12000 м продолжали до появления у животных второго агонального вдоха. Ишемию головного мозга вызывали двусторонним пережатием общих сонных артерий в шейном районе неанестезированных монгольских песчанок. Животных декапитуировали сразу после 1-минутной и 5-минутной ишемии и через 1 час и 4 суток после 5-минутной ишемии. При изучении действия низкой температуры крыс помещали в холодильную камеру при 2°C на 1, 3, 5, 7, 15, 30, 45 и 60 суток. Для исследования сезонных особенностей влияния низкой температуры опыты проводили в два периода: зимне-весенняя серия - со второй половины января по март и осенняя серия - ноябрь - первая половина декабря.

Активность и свойства МАО в большинстве случаев (гипероксия, гипоксия, холодовое воздействие) исследовали в грубой митохондриальной фракции. При исследовании ишемии головного мозга опыты проводили на субфракции чистых митохондрий и синапсом, полученных в градиенте фикола.

Активность МАО типа А в тканях с субстратами серотонином и норадреналином, а также дезаминирование глукосамина, путресцина, спермина, спермидина, гистамина, ГАМК, гомокарнозина и АМК, в норме не являющихся субстратами МАО, определяли по освобождению аммиака в ходе 30-минутной инкубации при 37,5°C, pH 7,45 ферментного препарата с одним из субстратов (Горкин и др., 1968). Содержание аммиака определяли спектрофлуориметрически на флуориметре марки "hitachi 650-60" (Yugawaga, Oyama, 1961) после изотермической отгонки. Активность МАО типа В в тканях определяли спектрофотометрически с субстратом L-нитрофениламинном (Москалкина, 1977). Общую активность с субстратом кетанурамином определяли флуориметрически (Крајл, 1965). В обогащенной тромбоцитами плазме крови активность МАО типа А определяли по сопряженной реакции с алкогольдегидрогеназой (Вережкин

на, Курилова, 1978), активность МАО типа Б - по методу А.И. Балклеевского (1976). Кинетические параметры  $K_M$  и  $V_{max}$  вычисляли на ЭВМ по методу Э. Корниш-Боудена (1979) и графически, пользуясь метод двойных обратных величин.

При исследовании влияния ингибиторов МАО в опытах *in vitro* осуществляли превинкубацию с хлоргиллином и депренилом в концентрации  $10^{-6}$  М, в которой они обладают выраженным избирательным действием. При изучении защитного действия ингибиторов МАО в большинстве опытов хлоргиллин вводили животным внутривенно в дозе 5 мг на 1 кг массы за 30 минут до помещения в барокамеру, пиперазидол - трехкратно в дозе 25 мг на 1 кг массы дважды накануне с интервалом в 6 часов и в день опыта за 30 минут до помещения животного в барокамеру.

При оценке общего состояния животных пользовались критерием степени подвижности (Blenkarn et al., 1969).

Гистамин, спермидин и спермин мозга разделяли на колонках с карбоксиметилцеллюлозой (Endo, Ogura, 1975). Содержание гистамина определяли колориметрическим методом с диазотированным паранитроанилином (Коробова и др., 1982). Содержание спермина и спермидина - флуориметрически с ортофталевым диальдегидом (Endo, 1978).

Содержание ГАМК в мозге определяли на автоматическом аминокислотном анализаторе ААА-88I на малой колонке в 0,2 М натрий-цитратном буфере pH 4,25. Активность глутаматдегидрогеназы - колориметрическим методом (Kitaka, Nakano, 1969). Активность АМФ-дезаминазы изучали в митохондриях и растворимой фракции мозга по количеству аммиака (Нерсесян и др., 1981). Активность Г6ФДГ определяли спектрофотометрически (Захарьин, 1967), содержание внеэритроцитарного гемоглобина (ВЭГ) - (Каракашов, Вичев, 1973), суммарную пероксидазную активность (СПА) - (Покровский, 1969). Липиды из мозга и плазмы крови выделяли по методу E.G. Vliigh, M.J. Dyer (1959). Определяли содержание первичных продуктов перекисного окисления липидов диеновых конъюгатов (Владимиров, Арчаков, 1972) и конечных продуктов - Шиффовых оснований (Bidlack, Tappel, 1973). Интенсивность хемиллюминесценции сыворотки крови измеряли в присутствии двухвалентного железа (Кейс и др., 1983).

Для электронно-микроскопического исследования кусочки мозга фиксировали в глутаральдегиде по Зеренсену, затем в  $OsO_4$  по Милониниугу, заливку проводили в эпон-аралдит. Ультратонкие 3-1219

срезы дополнительно окрашивали в солях свинца по Рейнольдсу и в уранилацетате. Срезы исследовали в электронном микроскопе ВМ-242 ("Tesla", СССР).

При статистической обработке материалов использованы метод Фишера-Стьюдента (Бейли, 1973), метод парных сравнений (Кокунин, 1975), непараметрический парный критерий Вилкоксона (Гублер, 1978). Статистическая обработка проведена на ЭВМ Искра-1256 и ЕС 1033. При сравнении альтернативных распределений пользовались методом "Хи-квадрат" и таблицами, рассчитанными методом Фишера (Гублер, 1978). Корреляционный анализ проведен на ЭВМ ЕС 1033.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Активность, субстратная специфичность и кинетика моноаминоксидаз при гипероксии, гипоксии и холодовом воздействии. В условиях гипероксии, гипоксической гипоксии и холодового стресса имеет место снижение активности MAO типа А в митохондриальной фракции мозга. В судорожную стадию гипероксии активность этой формы фермента ингибируется в среднем на 50%. При гипоксической гипоксии и холодовом стрессе (3 суток при 2°C), активность фермента снижается в меньшей степени - на 22-29% и 29-32% соответственно. Активность MAO типа В в мозге снижается на 21% при гипероксии и не изменяется в условиях гипоксической гипоксии и холодового стресса. Изучение влияния гипероксии на активность двух форм фермента в разных тканях показало, что наиболее выраженные изменения активности MAO типа А наблюдаются в мозге при незначительном ингибировании MAO типа В. В отличие от мозга, в печени, легких и сердце активность MAO типа В снижается в большей степени, чем активность MAO типа А.

Изучение кинетики реакции, катализируемой MAO типа А, показало, что при всех изученных экстремальных воздействиях снижается сродство фермента к серотонину:  $K_m$  реакции дезаминирования серотонина возрастает при гипероксии почти в три раза, при гипоксической гипоксии и холодовом стрессе более чем вдвое.

Снижение специфической моноаминоксидазной активности сопровождается изменением субстратной специфичности фермента. MAO приобретает способность дезаминировать глюкозамин, путресцин, полиамины, ГАМК, гомокарнозин, гистамин.

Сходные обратимые качественные изменения каталитических свойств MAO, названные трансформацией, обнаружены и при таких

патологических состояниях, как облучение, злокачественный рост гипервитаминоз D<sub>2</sub> (Горкин, 1976), черепно-мозговая травма (Акопян, Промислов, 1984), экспериментальная гиперхолестеринемия и атеросклероз (Хужамбердиев и др., 1986) и др.

Поскольку обязательной предпосылкой возможности трансформации MAO является наличие функционально полноценных каталитических центров, установить способность фермента к качественно-му изменению каталитических свойств можно без его выделения, применяя ингибиторы MAO, блокирующие каталитические центры фермента и тем самым предотвращающие его трансформацию. Ингибиторный анализ, проведенный нами с помощью избирательно действующих ингибиторов MAO типа А хлоргилина и MAO типа Б депренила показал, что во всех случаях способность катализировать дезаминирование необычных субстратов приобретает MAO типа А. Параллельно изменению субстратной специфичности MAO типа А наблюдается усиление интенсивности дезаминирования AMФ. Опыты с ингибиторами MAO показали, что при гипоксии AMФ становится, наряду с другими веществами, субстратом MAO типа А. При гипероксии и холодовом стрессе усиление интенсивности дезаминирования AMФ обусловлено активацией специфического фермента AMФ-дезаминазы в митохондриях мозга.

При изучении влияния ишемии головного мозга исследовали активность, субстратную специфичность и кинетику MAO в митохондриальной и синапсосомальной фракциях коры головного мозга, стриатума и гиппокампа монгольских песчанок в условиях 1-минутной и 5-минутной ишемии. Наиболее ярко выраженные изменения каталитических свойств MAO обнаружены в митохондриальной фракции всех исследованных отделов мозга при 5-минутной ишемии. Изменения проявляются в ингибировании фермента с общим для MAO типов А и Б субстратом кинурамином на 65-70%, приобретении способности дезаминировать глюкозамин, увеличении  $K_m$ , снижении  $V_{max}$  и в значительном отклонении формы кинетических кривых от гиперболического характера. Опыты с хлоргилином свидетельствуют, что в условиях ишемии ингибируется в равной степени активность MAO типа А и MAO типа Б. В синапсосомальной фракции изменения свойств MAO имеют ту же направленность, но выражены при 5-минутной ишемии в меньшей степени, чем в митохондриях. В то же время при более мягком воздействии - 1-минутной ишемии - синапсосомальная MAO оказалась чувствительнее к действию экстремального фактора по сравнению с митохондриальным ферментом.

В пост-ишемический период активность и субстратная специфичность МАО нормализуется уже через I час рециркуляции. Однако, нормализация кинетических параметров наблюдается через I час лишь в коре, в стриатуме — через 4 суток. В гиппокампе и через 4 суток кривая зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата имеет сложный негиперболический характер. Сравнение реакции МАО разных отделов мозга указывает на большую чувствительность гиппокампа по сравнению с корой и стриатумом.

При адаптации к холоду активность МАО типа А остается сниженной (дезаминирование серотонина несколько усиливается, хотя и не достигает уровня контроля). Средство МАО типа А к субстратам увеличивается:  $K_M$  реакции дезаминирования серотонина снижается вдвое по сравнению с цитактными животными и в 5 раз по сравнению с животными, находящимися в состоянии холодового стресса. Активность МАО типа Б незначительно снижается. В то же время субстратная специфичность фермента нормализуется.

Умеренное снижение активности МАО типов А и Б при отсутствии изменений субстратной специфичности является, по-видимому, характерным для состояния холодовой адаптации. При введении животным перед 3-суточной экспозицией при 2°C пептида дельта-она, оказывающего адаптогенный эффект при действии никаких температур, активность МАО обоих типов снижается, а субстратная специфичность не изменяется. Таким образом, введение пептида дельта-она оказывает на свойства МАО действие, аналогичное адаптации к холоду. При этом наблюдается также нормализация уровня гистамина и стабилизация эритроцитарных мембран.

II. Последовательное действие на организм холода и гипероксигенации, холода и гипоксии. Установление значительных изменений каталитических свойств МАО при развитии гипероксического и гипоксического поражений и нормализация субстратной специфичности фермента у адаптированных к холоду животных обусловили интерес к исследованию влияния предварительной холодовой адаптации на изменение свойств фермента в условиях гипероксии и гипоксии Б на чувствительность животных к этим воздействиям.

В предварительных исследованиях показано, что увеличение активности ГБОДГ в сыворотке крови, являющееся показателем дестабилизации эритроцитарных мембран, отражает состояние организма и может быть использовано в качестве теста глубины гипероксического, гипоксического и холодового поражений.

У адаптированных к холоду животных время наступления судорог при действии гипероксии (0,7 МПа) увеличивается на 44% по сравнению с контрольными. Активность МАО типа А снижается в той же степени, что и при действии гипероксии на интактных животных. Однако у адаптированных к холоду животных не изменяется субстратная специфичность фермента и активность МАО типа В остается на контрольном уровне. Активность ГбФДГ в сыворотке не повышается при действии гипероксии, что свидетельствует о стабилизации мембранных структур.

С целью проверить, связано ли понижение чувствительности к гипероксии именно с процессом адаптации, исследовали влияние гипероксии на животных, находившихся в условиях холодового стресса. Холодовой стресс увеличивает чувствительность животных к гипероксии, на что указывают как все изученные нами биохимические показатели (субстратная специфичность МАО типа А, активность МАО типа В, уровень ГбФДГ в сыворотке), так и сокращение времени наступления судорог вдвое по сравнению с контрольным.

Следует отметить наличие сезонных особенностей холодового воздействия на организм. 3-суточное действие низкой температуры лишь в зимне-весенний, но не в осенний период вызывает развитие стресс-реакции, сопровождающейся повышением чувствительности к гипероксии, изменением субстратной специфичности МАО и деструкцией эритроцитарных мембран, о чем свидетельствует повышение активности ГбФДГ, СПА и выход эритроцитарного гемоглобина в сыворотку крови. Обнаруженные сезонные различия влияния холода на каталитические свойства МАО и стабильность мембран связаны, вероятно, с сезонными колебаниями антиоксидантной активности.

При действии гипоксии на адаптированных к холоду животных средняя продолжительность жизни увеличивается более чем в 10 раз, достоверно снижается вероятность развития судорог. Адаптация к холоду предотвращает вызываемое гипоксией изменение каталитических свойств МАО. При этом в данном случае нормализуется не только субстратная специфичность, но и активность фермента со специфическими субстратами. Активность ГбФДГ в сыворотке остается на уровне, характерном для адаптированных к холоду животных. Активность ГбФДГ в мозге увеличивается, что характерно для адаптации к гипоксии.

В отличие от холодовой адаптации холодовой стресс не пред-

отражает, а даже усиливает изменение каталитических свойств МАО при гипоксии, не способствует активации пентозного пути обмена глюкозы и вызывает еще более выраженное нарушение проницаемости эритроцитарных мембран, о чем свидетельствует почти 3-кратное увеличение активности Г6ФДГ в сыворотке крови. Продолжительность жизни при гипоксии снижается почти вдвое по сравнению с интактными животными.

Таким образом, предварительная холодовая адаптация, но не холодовой стресс, оказывает выраженный защитный эффект при гипероксии и гипоксии. У адаптированного к холоду организма различаются неспецифическая повышенная сопротивляемость к различным экстремальным воздействиям. Полученные данные свидетельствуют о важной роли изменения обмена моноаминергических медиаторов, свойств МАО в развитии патологических состояний, что дает возможность наметить пути предотвращения или направленной коррекции нарушенной работы медиаторных систем. В качестве одного из способов повышения устойчивости организма к действию гипероксии и гипоксии может быть использована предварительная холодовая адаптация.

Другим способом влияния на каталитические свойства МАО, приводящим к изменению чувствительности организма к экстремальным воздействиям, является использование ингибиторов МАО типа А.

III. Влияние ингибиторов МАО типа А на некоторые показатели метаболизма мозга и чувствительность организма к гипероксии. В условиях экстремальных воздействий субстратами МАО типа А становятся многие вещества, играющие важную роль в метаболизме клетки. С целью установить, вносит ли дезаминирование модифицированной МАО вклад в изменение содержания таких соединений, исследовали влияние ингибитора МАО типа А хлоргидина на уровень ГАМК, полиаминов и гистамина при гипероксии.

В условиях повышенного давления кислорода наблюдается значительное снижение содержания ГАМК и полиаминов, чему придается важная роль в механизме развития кислородной интоксикации (Wood et al., 1967; Цветненко, Шугалей, 1978). Введение хлоргидина полностью предотвращает снижение уровня ГАМК. Уменьшение содержания ГАМК при гипероксии обычно объясняют ингибированием глутаматдекарбоксилазы, основного фермента синтеза ГАМК (Щербакова, 1962; Wood et al., 1967). Однако введение хлоргидина не влияет на снижение активности глутаматдекарбоксилазы, что свидетельствует о ведущей роли в механизме снижения уровня



ГАМК при гипероксии ее дезаминирования под влиянием MAO типа A.

Введение животным хлоргиллина также предотвращает увеличение содержания гистамина и снижение уровня спермидина, вызываемые гипероксией. Снижение содержания спермина, в отличие от спермидина, по-видимому, не связано с трансформацией MAO, что в определенной степени согласуется со значительно меньшей дезаминирующей активностью фермента при использовании в качестве субстрата спермина по сравнению со спермидином и другими необычными субстратами MAO.

Представленные данные свидетельствуют, что изменение каталитических свойств MAO является одной из причин существенных нарушений баланса важных азотистых компонентов клетки при действии на животных гипероксии. Мы предположили, что ингибиторы MAO типа A, предотвращающие изменение субстратной специфичности фермента, могут влиять на течение кислородной интоксикации.

Введение хлоргиллина за 30 минут до сеанса гипероксии в дозе 5 мг/кг внутривенно или 1 мг/кг внутривенно отодвигает время наступления судорог при 0,7 МПа кислорода на 106-110% и увеличивает выживаемость животных. Внутривенное введение хлоргиллина в дозе 2 мг/кг массы тела оказывает менее выраженный защитный эффект, отодвигая время наступления судорог лишь на 32%.

Учитывая роль перекисного окисления и состояния мембранных структур в механизме кислородной интоксикации, исследовали влияние хлоргиллина на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мозге и плазме крови и стабильность эритроцитарных мембран. В судорожную фазу кислородной интоксикации содержание в мозге диеновых конъюгатов возрастает на 197%, Шиффовых оснований - на 211%, в плазме крови увеличение уровня диеновых конъюгатов и Шиффовых оснований достигает 253% и 197% соответственно. Предварительное введение животным хлоргиллина предотвращает увеличение уровня ПОЛ в мозге и плазме крови в условиях гипероксии.

Активация ПОЛ влечет за собой повышение проницаемости мембран. О лабильности эритроцитарных мембран в судорожную фазу кислородной интоксикации свидетельствует увеличение в сыворотке крови содержания ВЭГ на 63%, СПА - на 117%, активности ГбФДГ - на 247%. У защищенных хлоргиллином животных дестабилизация эритроцитарных мембран отсутствует.

Обнаруженный защитный эффект хлоргиллина при гипероксии интересен главным образом с теоретической точки зрения для выяв-

ления механизмов кислородной интоксикации и мишеней действия протекторов. Как и другие необратимые ингибиторы MAO, введение хлоргиллина вызывает у человека побочные эффекты.

В этой связи особый интерес представляло исследовать, обладает ли защитным действием при гипероксии пиразидол, также являющийся ингибитором MAO типа A, но в отличие от хлоргиллина обратимым и хорошо переносимым организмом. Пиразидол — эффективное лекарственное средство, оказывающее регулирующее влияние на центральную нервную систему — стимулирующее при депрессиях и седативное при тревожных состояниях, что позволяет использовать его как при психических, так и при невротических и соматических состояниях (Машковский, 1985).

Введение пиразидола интактным животным и при гипероксии ингибирует активность MAO типа A (субстрат серотонин) на 45%. При этом у гипероксических животных введение пиразидола частично нормализует субстратную специфичность фермента, снижая интенсивность дезаминирования глюкозамина на 58%, спермидина — на 35%.

Введение пиразидола полностью предотвращает интенсификацию процессов ПОМ в плазме крови, но не влияет на уровень диеновых конъюгатов и Шиффовых оснований в мозге. Пиразидол, так же, как хлоргиллин, снижает интенсивность хемиллюминесценции сыворотки крови в присутствии двухвалентного железа, что позволяет предполагать наличие прямого антиоксидантного действия исследованных ингибиторов MAO типа A на процессы ПОМ в крови. Подобно хлоргиллину, пиразидол оказывает стабилизирующее действие на эритроцитарные мембраны.

Введение пиразидола не отдалает время наступления гипероксических судорог, но значительно повышает выживаемость животных и улучшает их общее состояние, о котором судили по критерию степени подвижности животных. Сразу после гипероксического воздействия этот показатель у животных, защищенных пиразидолом, был на 73% выше, чем у незащищенных. Через 72 часа после воздействия все защищенные животные выжили и их состояние не отличалось от нормы. Из 15 незащищенных животных 6 погибло, у 8 крыс состояние не отличалось от контроля, у одного животного наблюдались минимальные неврологические повреждения.

Введение пиразидола препятствует развитию отека легких. Индекс отечности легких в судорожную фазу кислородной интоксикации при 0,7 МПа O<sub>2</sub> возрастает в 2,5 раза, в досудорожную фазу

0,3 МПа  $O_2$ , 4 часа) – в 1,5 раза. У защищенных пиразиолом животных индекс отечности легких снижается в судорожную фазу почти вдвое, при действии 0,3 МПа  $O_2$  в течение 4 часов – не отличается от контроля.

Нами изучено применение пиразиола у больных с диагнозами ишемическая болезнь сердца, атеросклероз и облитерирующий эндартерит, получавших курс ГБО-терапии. 20 больных из 40 принимали за 30 мин до каждого сеанса по 0,05 г пиразиола *per os*. У всех испытуемых брали кровь из вены за час до I-го сеанса (фон), после 3-го сеанса и после 9-го сеанса гипербарооксигенации. В группе больных, подвергавшихся ГБО-терапии без приема пиразиола, отмечались интенсификация ПОЛ на 50–80% по сравнению с фоном и увеличение уровня показателей, свидетельствующих о дестабилизации эритроцитарных мембран (СПА, ВЭГ, активность ГФДГ) в среднем на 70–130%. В группе больных, принимавших пиразиол перед сеансами гипербарооксигенации, средние уровни содержания диеновых конъюгатов, Шиффовых оснований, ВЭГ, СПА и активности ГФДГ после 3-го и 9-го сеансов достоверно не изменяются по сравнению с фоновыми значениями.

Сравнительный анализ эффективности ГБО-терапии показал, что больные, получавшие подготовку пиразиолом, лучше переносят лечение гипероксическим кислородом по сравнению с больными, схема лечения которых не включала прием пиразиола. У больных, получавших пиразиол, не наблюдалось клинических признаков кислородной интоксикации: подъема артериального давления, головных болей, что позволяло увеличивать продолжительность курса лечения до полного исчезновения жалоб и улучшения объективных критериев их состояния.

IV. Состояние клеточных мембран при гипероксии, гипоксии и холодовом воздействии. MAO представляет собой мембраносвязанный, липидзависимый фермент, свойства которого в значительной степени определяются липидным окружением и прочностью связи с мембранами. Предполагая наличие зависимости между состоянием мембранных структур и изменением свойств MAO, исследовали возможность выхода митохондриальной MAO в цитозоль и электронно-микроскопическое строение мозга.

Как показали проведенные исследования, снижение активности MAO типа A в митохондриальной фракции мозга в условиях гипероксии, гипоксии и холодового стресса сопровождается появлением серотониндезаминазной и глюкозамилдезаминазной активности в

цитозоле. Прейнкубация супернатанта, полученного после осаждения митохондрий, с хлоргилином полностью предотвращает появление дезаминирования серотонина и глюкозамина, что свидетельствует о моноаминоксидажном происхождении индуцируемой в супернатанте активности. Обнаружена четкая обратная коррелятивная зависимость между активностью MAO в митохондриальной фракции и супернатанте. У адаптированных к холоду животных дезаминирование серотонина и глюкозамина в супернатанте отсутствует.

Электронно-микроскопические исследования выявили набухание митохондрий, снижение числа крист и просветление матрикса. С набуханием митохондрий связывают изменение проницаемости их мембран. Таким образом, как изучение активности MAO, так и данные электронной микроскопии свидетельствуют о дестабилизации митохондриальных мембран при изученных экстремальных воздействиях. Наблюдение электронно-микроскопических картин свидетельствует также о значительном уменьшении размеров лизосом. Это в сопоставлении с имеющимися данными о снижении уровня кислых пептидгидролаз в лизосомальной фракции и увеличении их активности в надосадочной фракции при гипероксии, гипоксии и холодовом стрессе указывает на изменение проницаемости лизосомальных мембран.

3-4-кратное увеличение активности эритроцитарной ГбФДГ в сыворотке крови при гипероксии и холодовом стрессе и 2-кратное увеличение этого показателя при гипоксии свидетельствуют также о дестабилизации эритроцитарных мембран.

Сопоставление наших результатов с имеющимися в литературе позволяет сделать вывод, что характерным для гипероксического, гипоксического и холодового повреждений является нарушение мембранных структур всех типов с изменением их проницаемости и свойств мембраносвязанных ферментов.

Полученные данные дают возможность обсудить вопрос о механизме изменения свойств MAO при изученных экстремальных воздействиях.

При гипероксии (Noda et al., 1983; Гольдштейн и др., 1986 и др.), гипоксической гипоксии (Шафран и др., 1979), ишемии головного мозга (Imaizumi et al., 1984), холодовом стрессе (Ломакина, 1980) имеет место усиление перекисного окисления липидов. Интенсификация ПОЛ ведет к реализации нескольких механизмов, вызывающих нарушение структуры мембран и свойств мембраносвязанных ферментов. Для MAO выявлена корреляция между

величиной микровязкости и  $K_M$ : чем более вязкой становится мембрана, тем ниже сродство фермента к субстратам (Бурлакова и др., 1984). Увеличение микровязкости мембран мозга и эритроцитов, обнаруженное при гипероксии (Кричевская и др., 1987), сопровождается, как следует из наших данных, увеличением  $K_M$  реакции дезаминирования серотонина. В условиях эксперимента, идентичных с нашими, показано увеличение микровязкости эритроцитарных мембран при гипоксии, при которой нами обнаружено двукратное увеличение  $K_M$ . Напротив, при холодовой адаптации, когда  $K_M$  реакции дезаминирования серотонина резко снижается, имеет место разжижение липидной компоненты мембран (Wotke, Schilke, 1983). Другой повреждающий эффект ПОЛ состоит в образовании между белками и продуктами ПОЛ полимерных соединений — Шиффовых оснований, резкое увеличение которых обнаружено нами в мозге и плазме крови при гипероксии.

Изменение субстратной специфичности MAO при различных экстремальных воздействиях связывают, главным образом, с окислением сульфгидрильных групп фермента липидными перекисями, что показано также в модельных опытах на высокоочищенных препаратах фермента (Горкин, 1979, 1985). В пользу того, что трансформация MAO происходит в результате обратимого окисления SH-групп фермента липидными перекисями, свидетельствуют и наши данные о восстановлении исходных свойств MAO при обработке митохондрий, полученных от гипероксических животных аскорбиновой кислотой и предотвращение трансформации фермента мочевиной, препятствующей усилению процессов ПОЛ (Горошинская, Бронвицкая, 1976).

Наряду с окислением SH-групп определенную роль при трансформации MAO может играть и состояние митохондриальных мембран. Одновременное появление в цитозоле хлоргидринчувствительных серотонин- и глюкозаминдезаминазных активностей указывает на выход из митохондрий трансформированной MAO типа А.

Таким образом, при изученных экстремальных состояниях изменение каталитических свойств MAO типа А, сопровождающееся изменением кинетики реакции, катализируемой ферментом, является результатом комплексного воздействия липидных перекисей на сульфгидрильные группы самого фермента и на структуру и свойства митохондриальных мембран, приводящего к ослаблению связи MAO типа А с липидной компонентой мембраны и выходу фермента в цитозоль. При этом снижение активности MAO может быть обуслов-

лено как перераспределением активности фермента в компартментах клетки, так и изменением каталитических свойств MAO, о чем свидетельствует снижение сродства фермента к субстрату.

Определенную роль в ингибировании MAO типа А при сохранении активности MAO типа В может играть гибель нейронов (Oreland et al., 1983), а также активация природных избирательно действующих ингибиторов MAO при экстремальных воздействиях (Glover et al., 1983).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

MAO является уникальным ферментом по крайней мере по двум аспектам: во-первых, по своей роли в организме и прежде всего в функционировании головного мозга, будучи единственным ферментом, с которым связана работа большинства существующих в организме медиаторных систем и, во-вторых, по своей лабильности, способности изменять каталитические свойства при самых разных нарушениях внутренней и внешней среды. Кроме того, моноаминоксидаза относится к типично мембранным ферментам, играющим первостепенную роль в развитии патологического процесса. Поэтому, изучая механизмы действия на организм разных экстремальных факторов, мы остановились на исследовании роли MAO в ответной реакции организма на стрессовые воздействия разной этиологии.

Изменение активности и субстратной специфичности MAO, обнаруженное нами при изученных экстремальных воздействиях, ведет к дискоординации работы многих медиаторных систем. Ингибирование MAO типа А, препятствуя нормальной терминации медиаторного действия моноаминов, обуславливает повышение функциональной активности симпато-адреналовой системы. Поскольку норадренергическая система оказывает тормозящее действие на ГАМК-ергическую систему мозга, являющуюся основной тормозной системой ЦНС, увеличение активности норадренергической системы ведет к растормаживанию и усилению процессов возбуждения в ЦНС. Помимо опосредованного норадренергической системой тормозного действия на ГАМК-ергическую систему, MAO оказывает и прямое влияние на уровень тормозных медиаторов ГАМК и гомокарбозина, осуществляя в условиях патологии их окислительное дезаминирование. Как показали опыты с ингибиторами, MAO является одним из основных факторов, обуславливающих снижение ГАМК, ди- и полнаминов при гипероксии, а также гипоксии и холодовом стрессе.

При всех изученных воздействиях лучшим новоприобретенным субстратом трансформированной MAO типа А становится глюкозамин. Деаминация моноаминоксидазой, по-видимому, является одной из причин снижения уровня глюкозамина в мозге при гипероксии и нарушении структуры и проницаемости мембран, в состав которых входят аминокислоты. Следовательно, с одной стороны, повреждение мембран может являться одним из факторов изменения мембраносвязанных ферментов, в том числе MAO, с другой стороны, изменение каталитических свойств MAO может, в свою очередь, способствовать дальнейшему нарушению мембранных структур.

Одним из факторов, способствующих усилению ПОЛ, является перекись водорода, представляющая собой конечный продукт деятельности MAO. Катализируемая MAO реакция считается основным путем образования  $H_2O_2$  в мозге (Sinet et al., 1980; Seregi et al., 1982). Несмотря на снижение активности MAO типа А при острой гипероксии, гипоксических состояниях и холодовом стрессе резкое увеличение суммарного объема реакций, катализируемых ферментом в результате приобретения им способности деаминировать большое число азотсодержащих компонентов клетки, может способствовать избыточной продукции перекиси водорода при патологических состояниях.

Важную роль в инициации и усилении процессов ПОЛ играют не только перекись водорода, но и другие продукты моноаминоксидазной реакции. Наиболее активная стимуляция ПОЛ имеет место в системе с субстратами MAO типа В и с субстратами трансформированной MAO типа А. Серотонин, напротив, оказывает антиоксидантный эффект (Каган и др., 1984). Поскольку при гипероксии, гипоксии и холодовом стрессе интенсивность деаминации серотонина остается при практически неизменной в мозге активности MAO типа В и многократном увеличении интенсивности деаминации необычных субстратов, создаются условия для усиления ПОЛ: система, оказывающая стимулирующее действие на ПОЛ, активно функционирует, а деаминация серотонина, в процессе которой образуются продукты, обладающие антиоксидантным действием, ингибируется. Таким образом, при исследованных экстремальных воздействиях возникает "порочный круг", играющий, по мнению В.Е.Кагана и соавт. (1984), важную роль в развитии патологии. Инициация ПОЛ под действием активных форм кислорода вызывает трансформацию MAO, в результате чего усиливается ПОЛ,

которое, в свою очередь, вызывает дополнительную трансформацию МАО и, следовательно, лавинообразное накопление продуктов ПОЛ в биомембранах.

Важно отметить, что изменения МАО не первичны, а являются результатом происходящих при экстремальных воздействиях нарушений. Но затем изменение свойств МАО становится причиной последующих нарушений не только медиаторного обмена, но и структурных компонентов клетки.

Подтверждением роли изменения субстратной специфичности МАО в механизме развития патологического процесса является защитный эффект ингибиторов МАО при гипероксии.

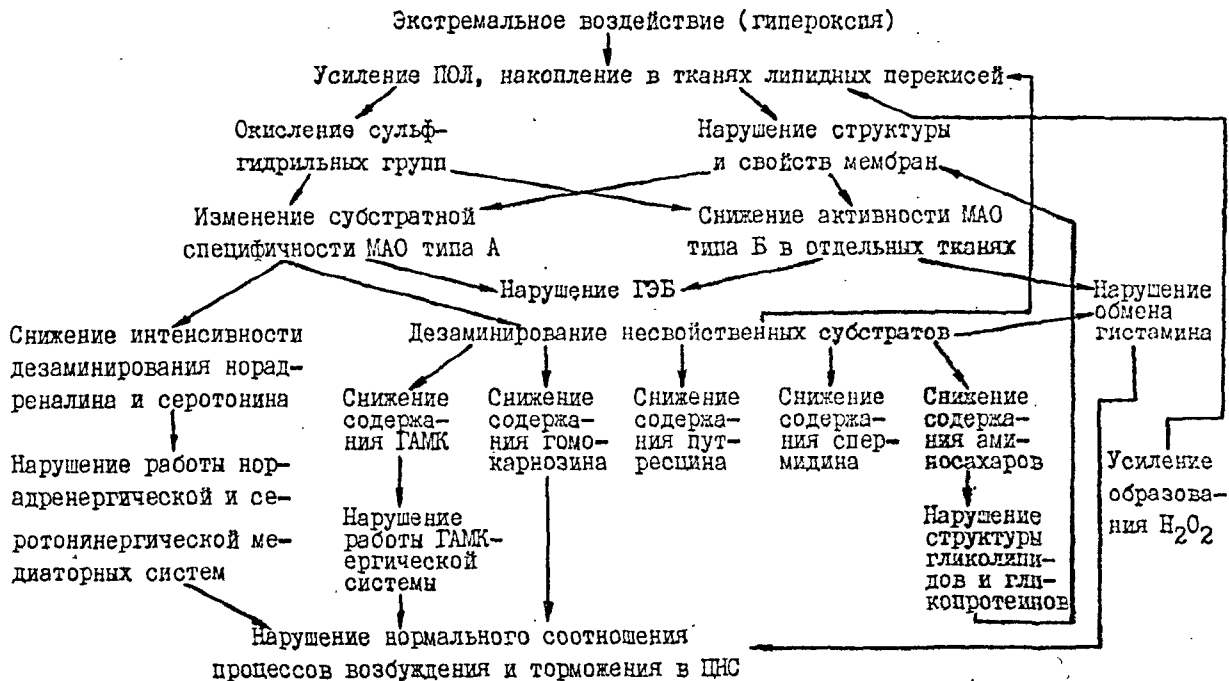
Предполагаемая роль МАО в развитии патологии на примере наиболее изученной нами кислородной интоксикации показана на рисунке.

Представленные данные позволяют заключить, что при различных экстремальных воздействиях наблюдаются однонаправленные изменения активности и субстратной специфичности МАО. Общность реакции МАО на изученные экстремальные воздействия и ее физиологические последствия определяются, во-первых, общими пусковыми механизмами и, во-вторых, структурой, локализацией и ролью МАО, обеспечивающей возможность включения фермента в обмен большого числа важнейших компонентов живых систем. Значимость изменений каталитических свойств МАО в ответной реакции организма на различные стрессорные факторы и в механизме развития патологии определяется главным образом ролью специфических и новоприобретенных субстратов и прежде всего тех медиаторных систем, в метаболизме которых МАО участвует в норме или в обмен которых включается в результате происходящей с ней качественной модификации. Субстратами МАО, помимо медиаторов моноаминовой природы, становятся ГАМК, гомокарнозин, гистамин. То есть работа практически всех основных медиаторных систем, кроме холинергической, начинает в значительной степени зависеть от состояния МАО. Важнейшими последствиями изменения каталитических свойств МАО при экстремальных воздействиях являются дискоординация работы медиаторных систем, усиление процессов перекисного окисления липидов и нарушение структуры и проницаемости клеточных мембран.

Изучение механизма включения МАО в ответную реакцию организма на экстремальные воздействия позволяет рекомендовать использование препаратов, препятствующих изменению субстратной



Место моноаминоксидазы в развитии патологического процесса



Рисунок

специфичности фермента (например, обратных ингибиторов MAO типа А и пептида дельта-она) при адаптации к экстремальным условиям существования и в клинической практике. Клинические испытания подтвердили перспективность применения пиразидола в качестве антигипероксического средства при лечении методом ГБО-терапии,

## В В О Д Ы

1. При гипероксии, гипоксической гипоксии, церебральной ишемии и холодовом стрессе снижается активность и изменяется субстратная специфичность MAO типа А мозга: фермент приобретает способность дезаминировать глюкозамин, ди- и полиамины, гистамин, ГАМК и гомокарнозин.

Активность MAO типа Б не изменяется при гипоксии и холодовом стрессе, незначительно ингибируется в условиях гипероксии и только при ишемии снижается в равной степени с MAO типа А.

2. При всех изученных экстремальных воздействиях снижается сродство фермента к моноаминам. При ишемии головного мозга кинетические кривые приобретают сложный негиперболический характер. Наибольшей чувствительностью к ишемическому воздействию по сравнению с другими отделами мозга обладает гиппокамп.

3. Выявлена тканевая специфичность реакции MAO на гипероксию. В мозге ингибируется преимущественно MAO типа А, в сердце, печени и крови — обе формы фермента, в легких только MAO типа Б, в почках достоверных изменений не обнаружено. Во всех изученных тканях MAO приобретает способность дезаминировать глюкозамин.

4. При гипероксии, гипоксии и холодовом стрессе увеличивается интенсивность дезаминирования АМФ. Методом ингибиторного анализа показано, что только при гипоксии АМФ становится субстратом MAO типа А мозга. В условиях гипероксии и холодового стресса усиление дезаминирования АМФ обусловлено активацией АМФ-дезаминазы. Введение АМФ животным оказывает защитный эффект при гипероксии, улучшая общее состояние животных, предотвращая изменение субстратной специфичности MAO типа А и стабилизируя мембраны.

5. Ингибиторы MAO типа А (хлоргидин и пиразидол), препятствующие изменению субстратной специфичности фермента, оказывают выраженный защитный эффект при гипероксии: улучшают общее состояние животных и увеличивают их выживаемость, оказывают ан-

тигистаминный эффект, обладают антиоксидантным действием и стабилизируют мембраны. Введение хлоргиллина отдаляет наступление судорог. Пиразидол антисудорожным действием не обладает и защищает организм в основном от развития легочной формы кислородной интоксикации.

6. Клинические испытания впервые показали перспективность применения пиразидола при лечении методом ГБО-терапии. У больных, получавших пиразидол, повышалась переносимость кислорода под повышенным давлением, на что указывали как клиническое состояние пациентов, так и отсутствие интенсификации перекисного окисления липидов и дестабилизации мембран в крови.

7. Для состояния холодовой адаптации характерно повышение сродства MAO типа А к серотонину, нормализация субстратной специфичности фермента и стабилизация мембранных структур.

Введение животным пептида дельта-сна препятствует стрессорным изменениям в организме на начальном этапе холодового воздействия. По свойствам MAO и ряду других параметров такие животные не отличаются от животных, адаптированных к холоду.

Холодовая адаптация повышает устойчивость организма к последующему гипероксическому и гипоксическому воздействию. Холодовой стресс, напротив, повышает чувствительность к другим экстремальным воздействиям.

8. Впервые установлено появление хлоргиллинчувствительной моноаминоксидазной активности в растворимой фракции мозга при экстремальных воздействиях, что указывает на нарушение связи MAO с мембранами митохондрий.

Об изменении структуры и проницаемости мембран при изученных экстремальных воздействиях свидетельствуют также данные электронной микроскопии и выход эритроцитарных ферментов в сыворотку крови.

9. Совокупность впервые полученных экспериментальных данных дает основание полагать, что изменению каталитических свойств MAO принадлежит ведущая роль в механизме ответной реакции организма на экстремальные воздействия. Следствием изменения активности и субстратной специфичности MAO являются нарушение процессов инактивации основных медиаторов ЦНС: норадреналина, серотонина, ГАМК, гомокарбонина и гистамина, интенсификация перекисного окисления липидов и нарушение структуры и свойств мембран.

Защитный эффект ингибиторов MAO, адаптогенов и предварительной холодовой адаптации может быть использован в клинической практике и при адаптации к экстремальным условиям существования.

Основное содержание диссертации изложено в следующих опубликованных работах.

1. Горошинская И.А., Активность моноаминоксидаз типа А и Б в условиях гипербарической оксигенации // *Вопр. мед. химии.* - 1979. - 25, № 3. - С.328-332.
2. Бондаренко Т.И., Горошинская И.А., Активность некоторых медиаторных систем мозга при гипербарической оксигенации // *Физиологический журнал СССР.* - 1979. - 65, № 8. - С.1214-1219.
3. Горошинская И.А., Шугалей В.С., Внуков В.В., Могильницкая Л.В., Шерстнева И.Я. Перекисное окисление - фактор регуляции активности ферментов // *IУ Всесоюзный биохимический съезд (Ленинград, сентябрь 1979).* - М.: Наука, 1979. - Т.1. - С.184-185.
4. Горошинская И.А., Броновицкая З.Г. Активность и субстратная специфичность моноаминоксидазы в мозгу крыс при действии холода // *Восьмая Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы (Минск, ноябрь 1980): Тезисы докладов.* - Минск: Наука и техника, 1980. - С.172-173.
5. Горошинская И.А., Ломакина Л.В., Ананян А.А., Шугалей В.С. Роль ферментативных систем головного мозга крыс при акклимации к холоду // *Адаптивные функции головного мозга (Баку, октябрь 1980).* - Баку: ЭЛМ, 1980. - С.61.
6. Горошинская И.А., Броновицкая З.Г. Роль моноаминоксидазы в механизме развития гипероксического поражения // *Известия Северо-Кавказского центра высшей школы. Естественные науки.* - 1981. - № 3. - С.84-90.
7. Горошинская И.А., Кричевская А.А., Броновицкая З.Г. Влияние низкой температуры на активность и субстратную специфичность моноаминоксидаз в митохондриальной фракции мозга крыс // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* - 1981. - 91, № 4. - С.431-433.
8. Броновицкая З.Г., Бондаренко Т.И., Горошинская И.А., Мильтина Н.П., Сулейманов А.К., Шерстнева И.Я. Особенности ме-

таболической реакции структур мозга к гипербарической оксигенации // УП Международный конгресс по гипербарической медицине (Москва, сентябрь 1981). Тезисы. - М.: Наука, 1981. - С.189.

9. Горошинская И.А., Грабовскова Л.Л., Броницкая З.Г., Кричевская А.А. Активность моноаминоксидаз мозга при холодовой адаптации и совместном действии холода и гипербарооксигенации // Физиологический журнал СССР. - 1981. - 67, № II. - С.1611-1616.
10. Горошинская И.А., Броницкая З.Г., Кричевская А.А., Кабарухина Е.Г. Активность и субстратная специфичность моноаминоксидаз мозга крыс в условиях гипоксии // Нейрохимия. - 1982. - I, № 3. - С.282-286.
11. Горошинская И.А., Броницкая З.Г. Каталитические свойства моноаминоксидазы мозга крыс при экстремальных воздействиях // Девятая Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы (Ереван, ноябрь 1983). Тезисы научных сообщений. - Ереван: Изд-во АН Армянской ССР, 1983. - С.270.
12. Горошинская И.А., Ананян А.А. Сезонные особенности влияния низкой температуры на активность моноаминоксидазы мозга и чувствительность крыс к гипероксии // Физиологический журнал СССР. - 1983. - 69, № 8. - С.1079-1084.
13. Горошинская И.А., Ананян А.А., Броницкая З.Г., Шугалей В.С. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в сыворотке крови крыс при гипероксии, гипоксии и холодом воздействии // Вопр. мед. химии. - 1984. - 30, № I. - С.60-64.
14. Шугалей В.С., Ананян А.А., Могильнишкая Л.В., Горошинская И.А. Биохимическая диагностика и пути коррекции состояния холодового стресса и холодовой адаптации // Стресс, адаптация и функциональные нарушения (Кишинев, июнь 1984). Тезисы всесоюзного симпозиума. - Кишинев: Штиинца, 1984. - С.312.
15. Кричевская А.А., Бондаренко Т.И., Горошинская И.А., Крупеникова Е.Б., Михалева И.И., Ходакова А.А. Антистрессорный эффект пептида дельта-сна // Стресс, адаптация и функциональные нарушения (Кишинев, июнь 1984). Тезисы всесоюзного симпозиума. - Кишинев: Штиинца, 1984. - С.343.
16. Горошинская И.А., Цветненко Е.З., Ходакова А.А., Френкель М.Л. Защитный эффект хлоргиллина в условиях гипербари-

- ческой оксигенации // Фармакологическая коррекция кислородзависимых патологических состояний (Москва, октябрь 1984). Тезисы докладов I-го Всесоюзного симпозиума. - М., 1984. - С.173-174.
17. Брновицкая З.Г., Горошинская И.А. Защитное действие АМФ при гипербарооксигенации и ее влияние на свойства некоторых ферментов // Фармакологическая коррекция кислородзависимых патологических состояний (Москва, октябрь 1984). Тезисы докладов I-го Всесоюзного симпозиума. - М., 1984. - С.168-169.
  18. Горошинская И.А., Ходакова А.А., Коробова Л.Н., Френкель М.Л., Немашкалова Л.А. Активность моноаминоксидаз и диаминоксидазы в тканях крыс в судорожную фазу кислородной интоксикации // Научные доклады Высшей школы. Биологические науки. - 1984. - № II. - С.20-24.
  19. Горошинская И.А., Федоренко Г.М., Ходакова А.А. Исследование активности моноаминоксидазы и ультраструктуры головного мозга крыс при холодовом воздействии // Нейрохимия. - 1985. - 4, № 2. - С.134-140.
  20. Горошинская И.А. Моноаминоксидазная активность мозга крыс при холодовом воздействии // Укр. биохимич. журнал. - 1985. - 57, № I. - С.41-45.
  21. Горошинская И.А. Возможный механизм изменения каталитических свойств моноаминоксидазы мозга крыс // Булл. эксперим. биологии и медицины. - 1985. - 99, № 6. - С.672-674.
  22. Goroshinskaya I.A., Rakić L.M., Krichevskaya A.A. Rat brain monoamine oxidase catalytic properties under extreme conditions // Phospholipids in the Nervous System: Biochemical and Molecular Pharmacology (Mantova, Italy, May, 1985). Abstracts. Mantova, 1985. - P.91.
  23. Mičić D.V., Gorošinskaya I., Stojanović T., Mršulja B.B. Monoamine oxidase, cytochrome C oxidase and acetylcholine esterase activity in brain mitochondria and synaptosomes during ischemia // VI Balkan Biochemical and Biophysical Days (Plovdiv, Bulgaria, april 1985). Abstracts. - Plovdiv, 1985. - P.6.
  24. Goroshinskaya I.A., Stojanović T., Mičić D.V., Mršulya B.B. The activity and kinetics of monoamine oxidase during brain ischemia // XIII Congress of the Union of Yugoslav

- Physiological Societies with international participation (Skopje, Yugoslavia, September 1985). Abstracts. Skopje, 1985. - P.31.
25. Goroshinskaya I.A., Rakić Lj. Mediator metabolism regulation by monoamine oxidase type A and B in rat brain during cold adaptation // XIII Congress of the Union of Yugoslav Physiological Societies with international participation (Skopje, Yugoslavia, September 1985). Abstracts. Skopje, 1985. - P.300.
  26. Goroshinskaya I.A., Tsvetnenko E.Z., Krichevskaya A.A., Rakić L.N. Polyamine level and monoamineoxidase activity of rat brain under hyperbaric oxygen // IRCS Med. Sci. - 1985. - 13, N 7. - P.673-674.
  27. Goroshinskaya I.A., Hodakova A.A., Tsvetnenko E.Z., Rakić Lj. Monoamine oxidase activity and level of histamine and polyamine under some extreme conditions // IRCS Med. Sci. - 1985. - 13, N 10. - P.999-1000.
  28. Goroshinskaya I.A., Hodakova A.A. Rat brain monoamine oxidase catalytic properties and histamine level during cold stress and cold adaptation // Molecular basis of Neurotransmission (Pregue, CzSSR, September 1986). The Sixth Meeting of the European Society for Neurochemistry. Prague, 1986. - P.184.
  29. Кричевская А.А., Горошинская И.А., Федоренко Г.М., Ходакова А.А. Активность моноаминоксидазы и ультраструктура головного мозга крыс при разных режимах гипероксии // Нейрология. - 1986. - 5, № 1. - С.37-44.
  30. Горошинская И.А., Ходакова А.А. Активность моноаминоксидазы и уровень гистамина в мозгу крыс при холодовом воздействии // Известия СибИЦ ВШ. Естественные науки. - 1986. - № 2. - С.119-122.
  31. Горошинская И.А., Шерстнев К.Б. Влияние хлоргидина на уровень гамма-аминомасляной кислоты при гипероксии // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. - 1986. - 101, № 1. - С.45-46.
  32. Горошинская И.А., Цветненко Е.З., Ходакова А.А., Френкель М.Л., Горюхи В.З. Моноаминоксидазная активность и влияние хлоргидина на уровень полиаминов при гипероксии у крыс // Укр. биохим. ж. - 1986. - 58, № 3. - С.74-77.

33. Кричевская А.А., Бондаренко Т.И., Горошинская И.А., Ходакова А.А., Михалева И.И., Крупеникова Е.Ю. Влияние пептида дельта-сва на активность моноаминоксидазы и содержание гистамина в мозгу и крови крыс при действии холодового стресса // *Нейрохимия*. - 1986. - 5, № 4. - С.408-412.
34. Горошинская И.А., Кричевская А.А., Шугалей В.С., Шерстнев К.Б., Баламирзоева Р.М. Активность моноаминоксидазы и уровень гамма-аминомасляной кислоты при гипероксии, влияющие хлоргидина // *Вопросы мед. химии*. - 1986. - 32, № 2. - С.76-79.
35. Горошинская И.А., Милютина Н.П., Бежанова В.А. Антиоксидантный эффект хлоргидина при действии гипероксии // П Всесоюзная конференция "Биоантиоксидант" (Москва, май 1986). Тезисы докладов, т.1. - Черноголовка, 1986. - С.112.
36. Горошинская И.А., Ананян А.А., Могильницкая Л.В., Цветненко Е.З., Шугалей В.С. Биохимические показатели дифференцировки холодового стресса и адаптации // *Важнейшие теоретические и практические проблемы терморегуляции* (Минск, сентябрь 1986). Тезисы докладов П Всесоюзной конференции. - Минск, 1986. - С.74.
37. Горошинская И.А., Милютина Н.П., Ходакова А.А., Цветненко Е.З., Горкин В.З. Влияние хлоргидина на интенсивность перекисного окисления липидов и стабильность эритроцитарных мембран при гипероксии // *Бюлл. эксперим. биол. и медицины*. - 1987. - 103, № 1. - С.54-56.
38. Горошинская И.А., Цветненко Е.З., Френкель М.Л., Ходакова А.А., Кричевская А.А. Моноаминоксидазная активность и содержание гистамина и полиаминов мозга при некоторых экстремальных воздействиях // *Укр. биохим. ж.* - 1987. - 59, № 2. - С.84-86.
39. Горошинская И.А., Ананян А.А., Могильницкая Л.В., Шугалей В.С. Биохимические показатели дифференцировки холодового стресса и адаптации // *Вопр. мед. химии*. - 1987. - 33, № 4. - С.62-65.
40. Брновицкая З.Г., Горошинская И.А., Кривцова Е.Ю. АМФ-дезаминаза мозга и введение АМФ при гипероксии и действии холода // *Фундаментальные достижения нейрохимии - медицине*. X Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы



(Горький, сентябрь 1987). Тезисы докладов. - Горький, 1987. - С.31.

41. Горошинская И.А., Рудин Г.М. Влияние холодовой адаптации и кратковременного действия холода на устойчивость животных к гипоксической гипоксии // *Биол. з. СССР*. - 1987. - 73, № 4. - С.532-536.
42. Горошинская И.А., Ананян А.А., Шугалой В.С., Кричевская А.А. Биохимические показатели чувствительности адаптированных к холоду животных к действию гипероксии // *Бiol. науки. Научные доклады высшей школы*. - 1987. - № 11. - С.54-59.

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В АВТОРЕФЕРАТЕ СОКРАЩЕНИЙ

- АМФ - аденозин-5' - монофосфат  
ВЭГ - внеэритроцитарный гемоглобин  
ГАМК - гамма-аминомасляная кислота  
ГБО - гипербарооксигенация  
ГБФДГ - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа  
ГЭБ - гематоэнцефалический барьер  
МАО - моноаминоксидаза  
ПОЛ - переносное окисление липидов  
СПА - суммарная пероксидазная активность  
ЦНС - центральная нервная система  
 $K_m$  - константа Михаэлиса  
 $V_{max}$  - максимальная скорость реакции

*Игорь*