

УДК 544:577.122

Кинетика окислительного дезаминирования препаратами моноаминоксидазы

Н. В. ГУРЕЕВА

Тюменская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России,
ул. Одесская, 54, Тюмень 625026 (Россия)

E-mail: natalivg@mail.ru

(Поступила 01.09.11; после доработки 30.11.11)

Аннотация

Проведена оценка активности фермента моноаминоксидазы при дезаминировании серотонина, триптамина и бензиламина у различных групп животных по величине отношения максимальной скорости реакции дезаминирования $w_{\text{макс}}$ к константе Михаэлиса K_M . Для изученных представителей млекопитающих показатель $w_{\text{макс}}/K_M$ варьирует в пределах 1.0–3.6, для птиц этот диапазон шире и составляет 0.4–5.0, для рыб – 0.3–1.8. Показано, что повышение концентрации субстратов (до 10^{-2} моль/л) либо температуры (до 42 °С) способствует активированию фермента.

Ключевые слова: серотонин, триптамин, кинетика, дезаминирование, моноаминоксидаза

ВВЕДЕНИЕ

Фермент моноаминоксидаза (КФ 1.4.3.4.) привлекает внимание исследователей как главный фермент, катализирующий реакцию окислительного дезаминирования важнейших биогенных моноаминов – производных индола и катехоламинов [1–3]. Эти моноамины являются регуляторами, нейрогормонами, чей обширный спектр действия до конца еще не изучен. Они считаются стресс-реализующими факторами и принимают участие в процессе адаптации организмов.

Активность фермента моноаминоксидазы в значительной мере зависит от факторов внешней среды [1–3, 4] и действия ингибиторов, отдельные представители которых используются в качестве лекарственных препаратов [5, 6].

Цель данной работы – определение кинетических параметров и особенностей кинетики окислительного дезаминирования следующих субстратов: серотонина – специфического субстрата моноаминоксидазы А, бензи-

ламина – специфического субстрата фермента Б, а также триптамина – субстрата моноаминоксидаз А и Б в митохондриальной фракции некоторых органов представителей млекопитающих, птиц и рыб.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для исследования отобраны образцы тканей печени и мозга у представителей млекопитающих, рыб и птиц обоего пола половозрелого возраста, обитающих в Западной Сибири (табл. 1). Птицы добыты путем отстрела, рыбы выловлены в озерах Тюменской области (за исключением ставриды океанической коммерческой глубокой заморозки). Печень быка взята на мясокомбинате, белые крысы и мыши – беспородные лабораторные животные. Исследуемые органы млекопитающих, птиц и рыб помещались на лед сразу после изъятия и хранились в морозильной камере не более 3 сут.

ТАБЛИЦА 1

Кинетические параметры дезаминирования моноаминов в митохондриальной фракции тканей органов млекопитающих, птиц при температуре 38 °С и рыб при 20 и 38 °С (приведены средние значения 5 опытов)

Животные (орган)	Серотонин		Триптамин		Бензиламин	
	$K_M,$ 10^{-3} моль/л	$w_{\max}/K_M,$ 10^6	$K_M,$ 10^{-3} моль/л	$w_{\max}/K_M,$ 10^6	$K_M,$ 10^{-3} моль/л	$w_{\max}/K_M,$ 10^6
Бык (печень)	1.8±0.2	1.8	1.4±0.1	2.3	0.4±0.0	6.25
Крыса (мозг)	1.6±0.1	2.1	1.3±0.0	1.8	н/д	н/д
Крыса (печень)	2.2±0.4	1.8	1.1±0.0	3.6	н/д	н/д
Собака (печень)*	2.6±0.1	1.0	2.0±0.6	0.55	2.0±0.6	0.7
Голубь сизый (печень)	0.8±0.0	2.1	0.4±0.1	4.0	2.4±0.0	0.83
Голубь сизый (мозг)	0.8±0.2	1.9	0.8±0.4	2.25	0.8±0.2	0.22
Канюк мохноногий (печень)	1.3±0.0	1.5	0.9±0.3	2.1	0.8±0.1	4.1
Глухарь (печень)	0.4±0.0	5.0	0.6±0.1	4.2	0.8±0.1	4.1
Синица большая (печень)	1.4±0.0	2.9	1.0±0.1	5.0	6.7±0.9	0.75
Чайка серебристая (печень)	1.4±0.5	1.4	2.0±0.2	0.65	2.5±0.0	1.2
Снегирь (печень)	1.5±0.1	1.3	0.9±0.0	1.3	1.1±0.2	1.8
Турухтан (печень)	4.5±0.3	0.4	4.0±0.1	0.25	1.5±0.3	1.7
Пустельга (печень)	2.5±0.0	1.0	2.0±0.1	1.25	5.0±0.6	0.7
Ставрида океаническая	10.0±0.4**	0.3	2.5±0.3	2.0	н/д	н/д
(печень)	2.8±0.10	1.0	4.7±0.0	0.6	н/д	н/д
Карась золотой (печень)	1.6±0.15**	1.8	1.25±0.3	1.8	н/д	н/д
	1.4±0.4	0.9	3.8±0.1	0.4	н/д	н/д

Примечание. н/д – нет данных.

* Обработка данных [8].

** Данные, полученные при температуре 20 °С.

Активность моноаминоксидазы определялась по количеству выделившегося аммиака [2, 7]. В качестве субстратов использовали серотонин креатинин сульфат, триптамин гидрохлорид (Sigma, США) и бензиламин гидрохлорид – отечественный препарат квалификации “х. ч.”. В качестве источника фермента выбрана митохондриальная фракция клеток. Митохондрии осаждались путем дифференциального центрифугирования из 10 % гомогената тканей. Активность моноаминоксидазы выражалась в микромолях выделившегося аммиака на количество белка в пробе. Проведена статистическая обработка данных: определены среднее арифметическое параллельных опытов, стандартная ошибка: $\bar{x} \pm S_x$. Доверительные границы среднего арифметического рассчитаны как $S_x \cdot t$, где t – критерий Стьюдента, $t = n - 1$ при $P = 0.05$ и числе степеней свободы f .

В работе использовано уравнение Михаэлиса – Ментена:

$$w^2 w_{\max} = w_{\max}^2 w[S] / (K_M [S]) \quad (1)$$

где $[S]$ – концентрация субстрата. Уравнение (1) преобразовано в следующий вид:

$$w = -K_M w / [S] + w_{\max} \quad (2)$$

Нами построен график Эди – Хофсти в координатах w и $w/[S]$, представляющий собой прямую, которая на оси ординат пересекается в точке, равной w_{\max} , а на оси абсцисс – в точке w_{\max}/K_M . В отличие от графика Лайнуивера – Берка, данный график позволяет выявить отклонения хода реакции дезаминирования от линейности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследована кинетика дезаминирования серотонина и триптамина в митохондриальной фракции печени рыб в качестве источ-

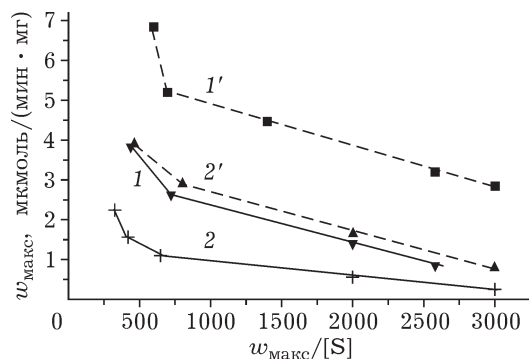


Рис. 1. Зависимость w_{\max} от $w_{\max}/[S]$ при окислительном дезаминировании серотонина (1, 1') и триптамина (2, 2') при температурах 20 (1, 2) и 38 °С (1', 2') в митохондриальной фракции печени карася серебряного. Здесь и на рис. 3, 4: количество опытов $n = 5$, ошибка средней величины составляет $\leq 5\%$.

ника фермента. На рис. 1 показаны результаты расчетов величин w_{\max} и K_M по графику Эди – Хофсти. Видно, что для образцов печени карася серебряного при 20 и 38 °С сродство фермента к серотонину выше, чем к триптамину. Аналогичные выводы были сделаны ранее при исследовании печени карася золотого [2].

Из анализа результатов кинетических исследований следует, что при повышении температуры сродство фермента по отношению к субстрату увеличивается.

Кроме того, установлено, что с увеличением температуры от 20 до 38 °С для образцов печени карася золотого [2], например, отношение w_{\max}/K_M , характеризующее степень сродства фермента к субстрату, при дезаминировании серотонина возрастает в 2 раза, а в случае триптамина – в 4.5 раза. Величина w_{\max}/K_M для образцов печени ставриды при 38 °С в 3 и 5 раз выше таковой при 20 °С в случае использования в качестве субстратов серотонина и триптамина соответственно (см. табл. 1). Следовательно, при 38 °С фермент печени карася обладает большим сродством к триптамину как субстрату моноаминоксидазы А и Б типа, а в случае печени ставриды – к серотонину по сравнению с таковым при 20 °С.

Из данных рис. 1 видно, что для митохондриальной фракции печени карася серебряного, как и для карася золотого [2], дезаминирование серотонина и триптамина активи-

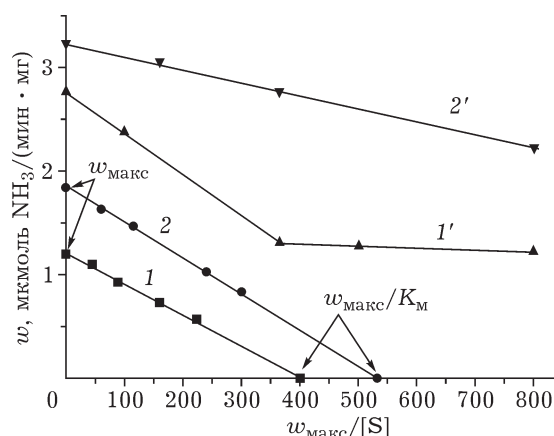


Рис. 2. Дезаминирование триптамина (1, 1') и серотонина (2, 2') в митохондриях печени собак без гипертермии (1, 2) и при гипертермии (1', 2'). Точка – средний результат трех опытов.

руется при увеличении их концентрации в пределах порядка 10^{-2} моль/л.

Аналогичные результаты получены ранее [8] при исследовании представителей млекопитающих (собак). Нами рассчитаны кинетические параметры окислительного дезаминирования в печени собак по графику Эди – Хофсти (рис. 2). Установлено, что в случае, когда животные не подвергались гипертермии, наблюдается линейный ход реакции окислительного дезаминирования серотонина и триптамина в митохондриальной фракции печени собак [8], однако при гипертермии (повышении температуры тела до 40.3–42 °С) линейность хода этой реакции нарушается.

Далее нами изучена активность дезаминирующего фермента у птиц. Необходимо отметить, что птицы служат природной “гипертермической моделью”, поскольку температура их тела в норме гораздо выше, чем у млекопитающих, и варьирует в пределах 38–45.5 °С (среднее около 42 °С). Как следствие, для птиц характерна более высокая скорость обмена веществ по сравнению с млекопитающими.

Нами установлено, что окислительное дезаминирование действительно активно протекает в печени и в мозгу голубя сизого, а также в печени синицы большой и снегиря (рис. 3). При этом скорость дезаминирования увеличивается с ростом концентрации субстратов, причем в печени большинства птиц этот процесс идет интенсивнее по сравнению с млекопитающими (см. табл. 1).

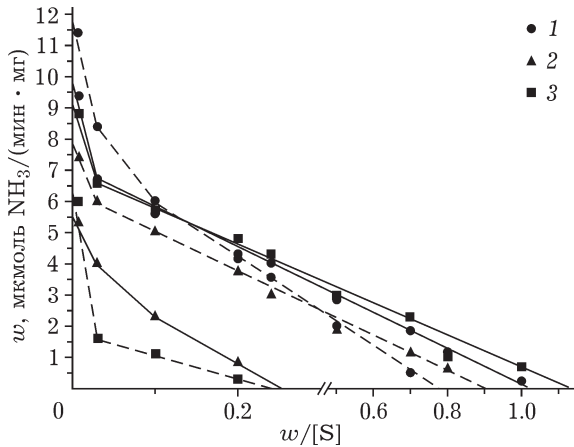


Рис. 3. Зависимость скорости дезаминирования серотонина, триптамина, бензиламина от ее отношения к концентрации этих субстратов $w/[S]$ в митохондриальной фракции печени снегиря (сплошная кривая) и синицы большой (штриховая кривая): 1 – серотонин, 2 – триптамин, 3 – бензиламин.

Активацию моноаминоксидазы при повышении концентрации субстратов отмечали и другие авторы. Так, в работе [9] данное явление объясняется наличием аллостерических центров у разных типов моноаминоксидаз.

Полученные данные указывают на возможность субстратной и видовой изменчивости моноаминоксидаз у птиц. Вместе с тем дезаминирование серотонина в печени большинства видов изученных птиц (глухаря, синицы, снегиря и чайки), а также в препаратах мозга голубя происходит интенсивнее, нежели у млекопитающих. На это указывают

кинетические параметры процесса дезаминирования не только серотонина, но триптамина и бензиламина (см. табл. 1).

Исследование процесса дезаминирования субстратов в митохондриальной фракции мозга и печени млекопитающих, птиц и рыб показало, что для фермента, дезаминирующего серотонин в митохондриальной фракции мозга и печени некоторых млекопитающих, отношение $w_{\text{макс}}/K_M$ варьирует незначительно – от 1.0–2.1. Для птиц этот показатель изменяется в большей степени: от 0.4 (для турухтана) до 5.0 (для глухаря). Для рыб соотношения примерно такие же, как и для млекопитающих (см. табл. 1).

При дезаминировании триптамина значение параметра $w_{\text{макс}}/K_M$ для образцов печени млекопитающих и рыб сопоставимо с таковым для серотонина; для птиц это отношение по триптамину изменяется в более широких пределах (0.25–5.0).

В опытах с субстратом бензиламином установлено, что самое большое сродство фермента к нему из птиц наблюдается в случае печени канюка мохноногого и глухаря (4.1).

Максимальное значение параметра K_M характерно для фермента, дезаминирующего бензиламин, во фракции митохондрий печени синицы большой ($6.7 \cdot 10^{-3}$ моль/л). В целом значение K_M для митохондриальной фракции печени большинства птиц меньше по сравнению с таковым для млекопитающих (см.

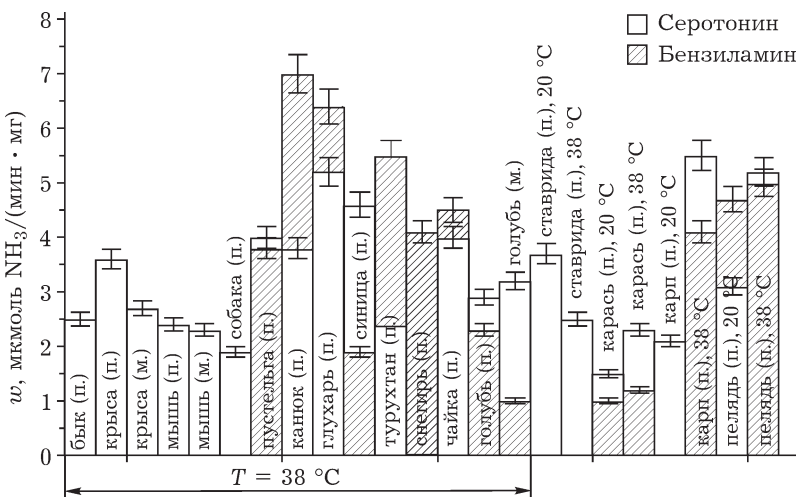


Рис. 4. Сравнение активности моноаминоксидазы в митохондриальной фракции печени (п.) и мозга (м.) млекопитающих, птиц и рыб в зависимости от субстрата и температуры (у рыб).

табл. 1). Следует также отметить, что по сравнению с изученными млекопитающими у птиц фермент моноаминоксидаза более активен.

Из данных рис. 4 видно, что при одной и той же насыщающей концентрации субстратов активность моноаминоксидаз в печени и мозге представителей млекопитающих, птиц и рыб различается. Вместе с тем для карпа и пеляди установлено, что при неестественных для них температурных условиях (38 °С) активация дезаминирующих ферментов в печени сопоставима с таковой для птиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследована эффективность катализа моноаминов – субстратов моноаминоксидаз в митохондриальной фракции – у эволюционно удаленных представителей животного мира. У птиц и рыб обнаружена субстратная избирательность дезаминации в митохондриальной фракции печени, на птицах показана

органный специфичность этого процесса. Обнаружены некоторые особенности этого катализа: отклонение хода реакции дезаминации от линейности в печени представителей рыб, птиц и млекопитающих при повышении концентрации субстратов или температуры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Смолинская Ю. Ю., Веселовский А. В., Иванов А. С. // Биомед. химия. 2004. Т. 50, Вып. 5. С. 451.
- 2 Гуреева Н. В. // Сиб. экол. журн. 2008. № 1. С. 63.
- 3 Gureeva N. V. // Contemp. Problems of Ecol. 2011. Vol. 4, No. 1. P. 84.
- 4 Вальдман Е. А., Капица И. Г., Неробкова Д. Н., Аксенова Л. Н., Бунеева О. А., Медведев А. Е. // Биомед. химия. 2004. Т. 50, Вып. 5. С. 509.
- 5 Внутренние болезни по Тенсли Р. Харрисону. М.: Практика. 2002. Т. 2. С. 3029.
- 6 Машковский М. Д. Лекарственные средства. 14-е изд. М.: Новая волна, 2003. Т. 1. С. 539.
- 7 Гуреева З. П., Мостяева Л. В. // Биохимия. 1984. Т. 49, Вып. 11. С. 1840.
- 8 Гуреева З. П. // Укр. биохим. журн. 1988. Т. 60, № 5. С. 20.
- 9 Бурлакова Е. Б., Губарева А. Е., Архипова А. Г., Рогинский В. А. // Вопр. мед. химии. 1992. № 2. С. 17.