

© Н.В. ГУРЕЕВА
nataliiv@mail.ru

УДК 577.152.14:541.124

ДЕЗАМИНИРОВАНИЕ МОНОАМИНОВ В ПРЕПАРАТАХ ПЕЧЕНИ И МОЗГА РАЗНЫХ ВИДОВ ДИКИХ ПТИЦ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ПЕРОКСИДНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

АННОТАЦИЯ. Установлено, что дезаминирование серотонина, триптамина, бензиламина в печени и мозге птиц идет избирательно и угнетается ингибиторами моноаминоксидазы. Выявлена антиоксидантная активность серотонина и триптамина. Рассмотрена роль моноаминоксидазы в регуляции уровня антиоксидантов при стрессе.

SUMMARY. It was shown that deamination of thrombotonine, tryptamine and benzylamine has substrate specificity in birds' liver and brain and is suppressed by monoamine oxidase inhibitors. Antioxidant activity of thrombotonine and tryptamine is revealed. The role of monoamine oxidase in regulation of antioxidant level under stress is studied.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА. Птицы, моноамины, дезаминирование, антиоксиданты.

KEY WORDS. Bird, biogenic monoamines, monoaminoxidase, lipid peroxidation, antioxidants.

Дезаминирование моноаминов осуществляется под влиянием фермента моноаминоксидазы (КФ 1.4.3.4). Серотонин является специфическим субстратом А моноаминоксидазы, триптамин дезаминируется А и Б ее формами, бензиламин — субстрат Б моноаминоксидазы [1; 2]. Сравнительное исследование обмена моноаминов у различных видов животных может дать информацию о видовой изменчивости и приблизить к пониманию способов регуляции ферментативных процессов в организме птиц. Кроме того, молекулярные формы ферментов, как выразители потенциалов генома, могут служить инструментом биохимической систематики и экологии.

В связи с тем, что моноаминоксидаза является липидзависимым ферментом, прочно связанным с наружной мембраной митохондрий [3], предполагается, что, регулируя уровень биогенных моноаминов, она может оказывать влияние на процесс пероксидного окисления липидов мембран [4].

Окислительное дезаминирование моноаминов под влиянием моноаминоксидазы у диких птиц не изучено, а между тем можно ожидать, что в организме этих гомотермных животных, имеющих постоянно высокую температуру тела (38–41°C), данный процесс идет интенсивнее, чтобы утилизировать избыток моноаминов, участвующих в термогенезе. При этом возрастает биологическая роль моноаминоксидазы. Считают, что ее активность может быть стрессовым показателем, а субстраты — биогенные моноамины — стрессреализующими факторами [4], [5]. В настоящей работе представлялось возможным проверить некоторые из этих предположений.

Методы исследования. Процесс дезаминирования моноаминов изучали в митохондриальной фракции и гомогенатах ткани печени 8 птиц, обитающих в Западной Сибири: пустельги обыкновенной (*Cerchneis tinnunculus*), канюка

мохноногого (*Buteo Lagopus*), чайки серебристой (*Labus argentatu*), турухтана (*Philomachus pugnans*), снегирия (*Puffhula puffhula*), синицы большой (*Parus major*), голубя сизого (*Columba Livia*), глухаря (*Tetrao urogallus*). Использовались особи обоего пола, добытые путем отстрела. Исследуемый орган сразу после изъятия помещался на лед и хранился в морозильной камере не более 6 дней.

Активность моноаминоксидазы определяли по количеству аммиака [6]. В качестве субстратов использовали серотонин креатинин сульфат, триптамин гидрохлорид (Sigma, США) и бензиламин гидрохлорид.

Для определения скорости реакции окислительного деаминарования использовали способ преобразования уравнения Михаэлиса-Ментен в уравнение прямой и выявляли отклонения хода реакции от линейности [3]. Вычислялась средняя величина 5-6 опытов ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$). Для доверительных границ находили произведение $S_{\bar{x}} \cdot t$, а значение t находили при $P=0,05$.

Ингибирующее действие биогенных моноаминов на пероксидное окисление липидов исследовалось вольюмометрическим способом в системе инициированного окисления метилолеата [7]. Антиоксидантное действие оценивали по величине периодов индукции ($\tau_{инд}$).

Результаты и их обсуждение. Данные, полученные с использованием гомогенатов печени голубей, синиц, снегирей и мозга голубей приведены на рис. 1, 2.

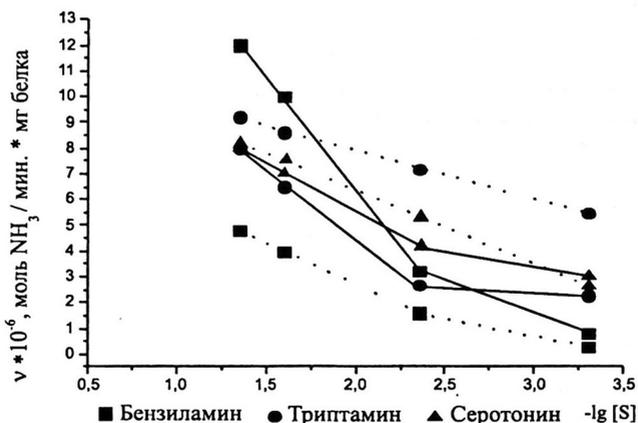


Рис. 1. Зависимость скорости деаминации от концентрации моноаминов митохондриальной фракции печени и мозга (пунктирная линия) голубя сизого

Примечание. Здесь и на рисунке 2, каждая точка на кинетических линиях — средний результат 3-х параллельных опытов, ошибка < 1,3%.

Можно видеть, что при использовании субстратов различных форм моноаминоксидаз процесс окислительного деаминарования наиболее активно идет в печени и мозге голубя сизого, синицы большой и снегирия. Также установлено, что скорость процесса зависит от структуры субстрата и вида птицы.

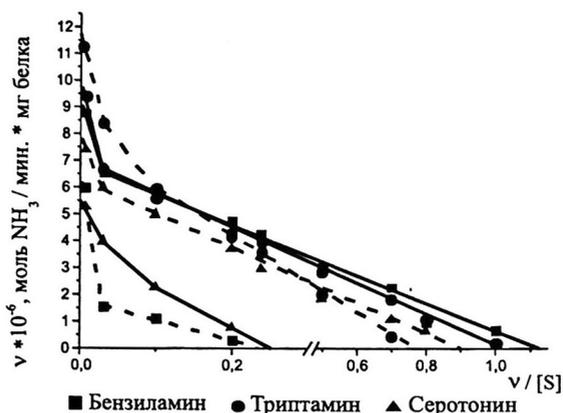


Рис 2. Зависимость скорости дезаминирования серотонина, триптамина, бензиламина от отношения скорости к концентрации этих субстратов [S] в митохондриальной фракции печени синицы большой (пунктирная линия) и снегиря (сплошная линия)

Примечания. 1) Отрезок, отсекаемый на оси X, обозначает отношение V_{\max} / K_m , а на ось Y — V_{\max} . 2) [S] составляла: 1×10^{-2} М; 5×10^{-3} М; $2,5 \times 10^{-3}$ М; $1,7 \times 10^{-3}$ М; $1,3 \times 10^{-3}$ М; 1×10^{-3} М.

Более высокие значения скорости ферментативного разложения серотонина, а также триптамина и бензиламина по сравнению с млекопитающими [8], были получены в гомогенатах печени глухаря, синицы, чайки, канюка, турухтана и в мозге голубя сизого (рис. 1, 2). Анализ скорости дезаминирования различных субстратов митохондриальной фракцией в зависимости от вида птиц показал, что при использовании насыщающих концентраций субстратов (10^{-3} моль/л) у одних видов птиц (канюк, синица, чайка, снегирь, турухтан) в печени лучше дезаминируется серотонин, а у других (пустельга, глухарь, голубь) — триптамин.

Интенсивность дезаминирования бензиламина и триптамина также различна у каждого вида птиц. В опытах на гомогенатах тканей было показано, что в печени синицы большой, мозге голубя сизого серотонин дезаминируется в 2,5 раза активнее, чем бензиламин. В гомогенатах печени снегиря скорость дезаминирования трех субстратов сравнима: от 3,1 до 5,8 нмоль/мин на 1 мг белка. Однако при сравнении скорости дезаминирования у разных видов птиц не выявлено зависимости от способа питания, образа жизни, среды обитания.

В разных тканях одного и того же вида (голубь сизый) отмечается так же, как и у млекопитающих [9], органная избирательность дезаминирования серотонина, триптамина и бензиламина. Например, у голубя сизого в ткани мозга скорость дезаминирования в ряду серотонин, триптамин, бензиламин убывает, а в печени этой птицы наибольшая активность фермента наблюдалась при разрушении триптамина (рис. 1).

Отличия интенсивности процессов дезаминирования в митохондриальной фракции тканей органов у млекопитающих и птиц оценивались по величине

отношения максимальной скорости к значению константы Михаэлиса этого процесса (V_{max}/K_M). Величина V_{max}/K_M определяет сродство фермента к субстрату в большей степени, чем величина K_M [3]. В литературе приводится значение отношения V_{max}/K_M в митохондриальной фракции мозга и печени млекопитающих, она колеблется от 1,0 до 3,6 нмоль/мин [9], а у птиц этот показатель находится в более широких пределах: от 0,4 до 5,0 (рис. 1).

На диаграмме (рис. 3) представлен сравнительный анализ активности моноаминоксидаз в гомогенатах печени и мозга млекопитающих и птиц.

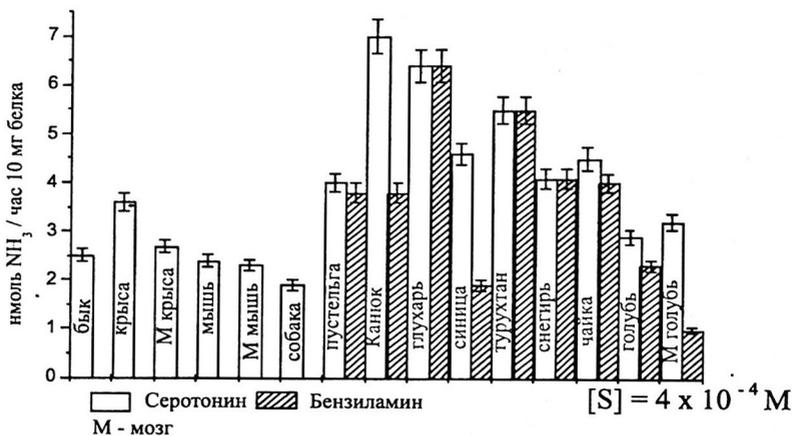


Рис 3. Сравнение активности моноаминоксидазы гомогенатов тканей печени, мозга птиц и млекопитающих

При использовании серотонина сродство фермента в печени глухаря, синицы, снегиря к процессу деаминации было достоверно выше, чем у млекопитающих (крыса, собака, бык). В целом процесс деаминации моноаминов в препаратах печени большинства птиц эффективнее, чем у млекопитающих.

При деаминации триптамина в митохондриальной фракции печени максимальное значение V_{max}/K_M было отмечено у голубя, глухаря, синицы. К субстрату бензиламину большее сродство фермента наблюдается в печени канюка и глухаря.

При исследовании зависимости скорости деаминации от концентрации моноаминов показано, что активность фермента резко возрастает с увеличением количества субстрата (рис. 1, 2). На рисунках видно, что при добавлении $4 \cdot 10^{-2}$ моль/л серотонина, триптамина и бензиламина графические линии резко поднимаются вверх. Это явление наблюдалось при деаминации моноаминов в печени и мозге голубя сизого, пустельги обыкновенной, синицы, снегиря. Отклонение от линейности хода реакции с ростом концентрации наблюдалось при использовании всех трех видов субстратов. Подобный эффект был и у млекопитающих (собак), но лишь при гипертермии [9]. У птиц, очевидно, фермент более лабилен, в связи с адаптацией к постоянно меняющимся условиям существования.

В данной работе изучено также влияние некоторых известных необратимых ингибиторов моноаминоксидазы на дезаминирование серотонина и бензиламина в печени промысловой птицы глухаря: гидразинового производного ниаламида и 2-изопропилгидразид п-хлорфеноксиуксусной кислоты (шифр XVI) [10], а также бензилиденаминоэтаноловых производных (шифры Б-1, Б-2 и Б-3) [11].

Выяснилось, что гидразиновые производные являются эффективными ингибиторами дезаминирования серотонина и бензиламина в гомогенатах печени глухаря и при концентрации 1×10^{-5} моль/л тормозят этот процесс на 45%-82% и 46%-51% соответственно. Ниаламид одинаково угнетает дезаминирование серотонина и бензиламина (46%), а препарат XVI более активен как ингибитор дезаминирования серотонина, чем бензиламина.

Производные бензилиденаминоэтанола снижают дезаминирование серотонина в гомогенатах печени глухаря от 37 до 65% в зависимости от их структуры. В данном случае менее активен препарат, у которого в пара-положении бензольного кольца находится диметиламиногруппа. Однако как ингибиторы дезаминирования бензиламина в гомогенатах печени глухаря бензилиденаминоэтанола более активны, угнетая этот процесс на 65% (Б-1) — 85% (Б-3) (табл. 1).

Таблица 1

Влияние ингибиторов на разрушение бензиламина в гомогенатах печени глухаря (*Tetrao urogallus*) в опытах *in vitro*

Препарат	Концентрация ингибитора, моль/л	Угнетение активности моноаминоксидазы, мкмоль выделившегося аммиака:		
		с ингибитором	Контроль — без ингибитора	Ингибирование, %
Ниаламид	1×10^{-6}	$3,72 \pm 0,04$	$6,71 \pm 0,01$	$44,78 \pm 0,64$
	1×10^{-5}	$3,62 \pm 0,06$	$6,71 \pm 0,01$	$46,0 \pm 0,42$
Препарат XVI	1×10^{-6}	$5,41 \pm 0,02$	$5,64 \pm 0,02$	$40,08 \pm 0,09$
	1×10^{-5}	$2,73 \pm 0,07$	$5,64 \pm 0,04$	$51,6 \pm 0,40$
Б-1	1×10^{-6}	$2,4 \pm 0,03$	$6,71 \pm 0,04$	$64,24 \pm 0,52$
	1×10^{-5}	$2,35 \pm 0,08$	$6,71 \pm 0,04$	$65,00 \pm 0,98$
Б-2	1×10^{-6}	$2,4 \pm 0,01$	$6,71 \pm 0,04$	$64,20 \pm 0,41$
	1×10^{-5}	$1,28 \pm 0,10$	$6,71 \pm 0,04$	$80,93 \pm 0,60$
Б-3	1×10^{-6}	$1,08 \pm 0,09$	$6,71 \pm 0,04$	$83,91 \pm 0,43$
	1×10^{-5}	$1,10 \pm 0,02$	$6,71 \pm 0,04$	$85,10 \pm 0,51$

Примечание. Приведены средние значения и их ошибки; $n=5$. Препарат XVI — 2-изопропилгидразид п-хлорфеноксиуксусной кислоты [10]; Б-1, Б-2, Б-3 — производные бензилиденаминоэтанола [11].

Таким образом, в данной работе установлен факт угнетения дезаминирования моноаминоксидазы в печени дикой птицы известными ингибиторами. В среде обитания птиц могут присутствовать различные загрязняющие вещества (удобрения, ядохимикаты, остатки ракетного топлива, другие химические агенты), проявляющие свойства ингибиторов моноаминоксидазы. Поэтому изучение

влияния химических агентов на активность фермента целесообразно с экологической точки зрения.

Известно, что ведущим звеном развития стрессорной реакции является усиление свободнорадикального окисления в мембранах клеток. Находясь в непосредственной связи с липидами, моноаминоксидаза может ускорять их окисление, так как увеличивает продукцию активной формы кислорода — H_2O_2 . Ее субстраты — биогенные моноамины тоже могут воздействовать на пероксидное окисление липидов [4].

Было изучено влияние биогенных моноаминов на процесс пероксидного окисления липидов (ПОЛ). Антиоксидантное (АО) действие моноаминов тестировалось в широком диапазоне концентраций в сравнении с известными (реперными) ингибиторами окисления природного (α -токоферол (α -ТФ), β -каротин) и синтетического происхождения (дibuнол).

Процесс окисления липидного субстрата (RH), может быть представлен схемой: *инициатор* $\longrightarrow 2r^* \xrightarrow{RH, O_2, W} RO_2^*$. При введении в систему АО фенольного

типа происходит обрыв цепи окисления по реакции: $InH + RO_2^* \xrightarrow{k_2} In^* + ROOH$, где InH и In^* — ингибитор и его радикал.

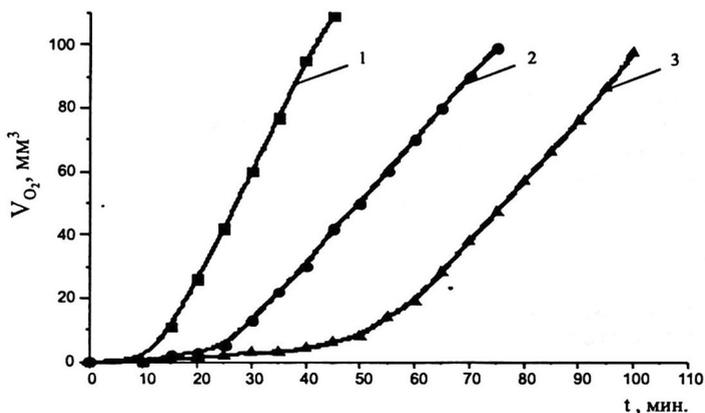


Рис. 4. Кинетические кривые инициированного окисления метилолеата (1) в присутствии триптамина (2) и серотонина (3). $C_{\text{АИБН}} = 3 \times 10^{-3}$ моль/л; $T = 60^\circ\text{C}$

На рис. 4 представлены кинетические кривые поглощения кислорода метилолеатом (МО) в присутствии серотонина и триптамина.

Видно, что введение в систему биогенных аминов увеличивает период индукции окисления МО, что свидетельствует об ингибирующей активности соединений. Зависимость периодов индукции от концентрации моноаминов носила экстремальный характер. Анализ данных по эффективности действия соединений (величина максимального периода индукции (τ_{max})) показал, что активность серотонина была в два раза выше, чем триптамина (табл. 2), но значительно уступала действию реперных АО (табл. 2): α -токоферолу в 18 раз, а β -каротину — практически в 4 раза.

Таблица 2

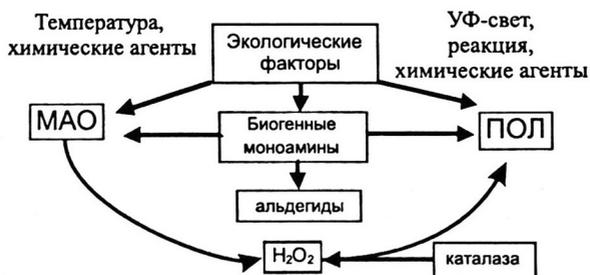
Антиоксидантная активность биогенных аминов в сравнении с ингибиторами различного происхождения. $C_{\text{АМН}} = 3 \times 10^{-3}$ моль/л; $T = 60^\circ\text{C}$

Антиоксидант	$C_{\text{max}} \times 10^4$, моль/л	τ_{max} , мин	АОА, $\frac{\tau_{\text{АО}} - \tau_{\text{МО}}}{\tau_{\text{МО}}}$, ($C_{\text{АО}} = 5 \times 10^{-4}$)
Триптамин (2-(β-индолил)этиламин)	5-8	32	0,75
Серотонин (2-(β-5'-гидроксииндолил)этиламин)	5-6	55	1,75
α-ТФ (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметил-2-фитилхроман)	25	980	48
β-каротин	0,02	200	4
Дибунол (2,6-дирет.бутил-4-метилфенол)	—	—	17,00

Наибольшим ингибирующим действием обладал дибунол, активность которого при $C = 5 \times 10^{-4}$ моль/л была выше, чем у триптамина и серотонина в 22,7 и 9,7 раза соответственно (табл. 2). Максимальная эффективность исследованных соединений проявлялась при концентрациях, различающихся на порядки: для β-каротина — 10^{-6} ; для серотонина и триптамина — 10^{-4} ; для α-ТФ — 10^{-3} моль/л (табл. 2). Необходимо отметить, что для веществ природного происхождения (моноамины) концентрационная кривая носит экстремальный характер, а для синтетического дибунола — зависимость линейная. Данный феномен, ранее описанный для многих биоАО, в том числе токоферолов, каротиноидов, флавоноидов, по-видимому, способствует поддержанию стационарного уровня окисления в организме.

Таким образом, серотонин, имеющий фенольный гидроксил, проявляет себя как классический АО, взаимодействующий со свободными радикалами. Относительно невысокая эффективность этого амина в сравнении с реперными АО связана с отсутствием экранирующих гидрокси-группу заместителей. Известно, что неэкранированные фенолы при окислении образуют высокоактивные феноксильные радикалы, способные реагировать с субстратом и продолжать цепи окисления [12].

На основании полученных и литературных данных предлагаем схему взаимосвязи биохимического процесса окислительного дезаминирования и ПОЛ через посредство биогенных моноаминов и регуляцию этих процессов под воздействием стресс-факторов.



На схеме показаны возможные направления приспособительных реакций при действии стресс-факторов различной природы. Активность фермента моноаминоксидазы, дезаминирующей стрессовые моноамины, зависит от влияния стресс-

факторов, что показано в опытах на рыбах [13], птицах и млекопитающих при гипертермии [9]. Побочный продукт реакции дезаминирования пероксид водорода, являющийся активной формой кислорода, стимулирует свободнорадикальное окисление липидов биологических мембран. Увеличение концентрации биогенных аминов, проявляющих свойства АО, может являться составной частью многоступенчатой системы защиты организма от стресса. Поэтому до наступления стадии полного истощения интенсивность процессов ПОЛ находится в пределах нормы.

Выводы

• Обнаружена субстратная и органная специфичность дезаминирования моноаминов в препаратах печени птиц и мозга голубя. Это может быть одним из признаков наличия у них множественных форм моноаминоксидазы.

• Процесс дезаминирования у птиц по сравнению с млекопитающими характеризуется более высокой скоростью и активируется в присутствии моноаминов в концентрациях от 10^{-4} до 10^{-2} М. Этот процесс у птиц тормозится, как и у других животных, ингибиторами моноаминоксидазы.

• Биогенные моноамины ингибируют пероксидное окисление липидов, проявляя антиоксидантный эффект. Эффективность серотонина выше, чем триптамина, но оба они уступают по активности классическим АО.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Suzuki, Q., Yagi, K. Distribution of type A and B monoamine oxidase activities in the central nervous system of rat and chick. // *Experientia*. 1976. V. 32. № 1. P. 13-14.
2. Nagy, J., Salach, J.I. Identity of the active site flavinpeptide fragment from the human «A»-form and «B»-form of monoamine oxidase // *Arch. Biochem and Biophys*. 1981. V. 208. № 2. P. 388-394.
3. Ленинджер А. Основы биохимии. Т. 1. М.: Мир, 1985. 957 с.
4. Бурлакова Е.Б, Губарева А.Е., Архипова Г.В., Рогинский В.А. Модуляция перекисного окисления липидов биогенными аминами в модельных системах // *Вопр. мед. химии*. 1992. № 2. С. 17-20.
5. Апполонова Л. А. Гипоксия как фактор адаптации при свободно-радикальных процессах // *Тез. докл. междунар. конф. Свободно-радикальные процессы: экологические, фармакологические, клинические аспекты*. СПб., 1999. С. 765-766.
6. Гуреева З.П., Мостяева Л.В. Сопряженные дианионы динитросоединений в качестве ингибиторов окислительного дезаминирования моноаминов // *Биохимия*. 1984. Т. 49. № 11. С. 1840-1846.
7. Сторожок Н.М., Крысин А.П., Гуреева Н.В. Антиоксидантное действие новых аналогов пробуккола и их композиций с α -токоферолом // *Вопр. мед. химии*. 2001. Т. 4. № 5. С. 517-525.
8. Гуреева З.П. Органические и видовые различия в действии производных гидразина и аминокпергидроакридина на окислительное дезаминирование серотонина // *Бюлл. эксп. биол. мед.* 1972. № 11. С. 36-39.
9. Гуреева З.П. Дезаминирование индолалкиламинов при гипертермии // *Украинский биохим. ж.* 1988. Т. 60. № 5. С. 20-24.
10. Гуреева З.П. Центральные фармакологические эффекты 2-изопропилгидразида п-хлорфеноксиуксусной кислоты // *Хим. фарм. журнал*. 1977 Т. 11. № 7. С. 11-13.
11. А.с. № 4415213/04. Бензилиденаминоэтанола в качестве ингибиторов моноаминоксидазы.
12. Nagaoka, S., Okauchi, Y., Urano, S. et al. Kinetic and ad initio study of the prooxidant effect of vitamin E. Hydrogen abstraction from fatty acid esters and egg yolk lecithin // *J. Am. Chem. Soc.* 1990. V. 122. № 24. P. 8921-8924.
13. Гуреева Н.В. Влияние температурного фактора на кинетику дезаминирования в печени рыб in vitro // *Сибирский экологический журнал*. 2008. № 1. С. 63-70.