

УДК 612.821.7

КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕАКЦИИ ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ СЕРОТОНИНА И БЕНЗИЛАМИНА В МИТОХОНДРИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ЗИМОСПЯЩИХ СУСЛИКОВ

ВОИТЕНКО Н. Н., ПОПОВА Н. К.

Изучали дезаминирование серотонина и бензиламина в неочищенной фракции митохондрий ствола головного мозга у бодрствовавших, засыпавших и находившихся в зимней спячке сусликов, в также влияние этих физиологических состояний на зависимость скорости дезаминирования от концентрации субстрата. Обнаружено дезаминирование серотонина и бензиламина МАО митохондрий в стволе головного мозга у бодрствующих, засыпающих и спящих сусликов. Интенсивность дезаминирования серотонина и кинетические характеристики этой реакции претерпевали изменения в период засыпания, когда дезаминирование бензиламина еще существенно не отличалось от периода бодрствования. Во время зимней спячки подавлялись оба процесса, однако дезаминирование серотонина и $V_{\text{макс}}$ превращения МАО-серотонин комплекса снижались более резко, чем дезаминирование бензиламина и $V_{\text{макс}}$. МАО-бензиламин комплекса. При этом установлено увеличение сродства МАО как к серотонину, так и к бензиламину. Предполагается, что в экстремальных условиях зимней спячки изменяется механизм действия МАО.

Известно, что зимоспящие животные в условиях низких температур и пониженного содержания кислорода в организме сохраняют достаточно высокий уровень дезаминирования серотонина [1, 2]. На основании этого возникло предположение о том, что у зимоспящих животных по сравнению с незимоспящими МАО (оксидоредуктаза, дезаминирующая, флавиносодержащая, КФ 1. 4. 3. 4) обладает отличающимися свойствами, обеспечивающими дезаминирование жизненно важных биогенных аминов в экстремальных условиях зимней спячки.

МАО животного организма представлена двумя формами фермента: МАО А и МАО Б, отличающихся субстратной специфичностью и различной чувствительностью к ингибиторам [3] и выполняющих, как предполагают, разные физиологические функции [4]. Активность МАО и кинетические характеристики реакции дезаминирования серотонина и бензиламина, как известно, зависят от температурных условий проведения эксперимента [5], фосфолипидного окружения, целостности мембран, в которые вмонтирована МАО [6].

В литературе нет данных ни о формах МАО у зимоспящих животных, ни об изменениях активности различных форм МАО в условиях спячки. Цель настоящей работы заключалась в изучении активности

МАО и кинетических характеристик реакции дезаминирования серотонина и бензиламина в митохондриях ствола головного мозга зимоспящих сусликов в состоянии бодрствования, засыпания, спячки.

Материалы и методы

Работа выполнена на самцах краснощеких сусликов (*Citellus erythrogenus*), отловленных летом в Новосибирской области. Осенью животных помещали в подвал, где температура поддерживалась в пределах 2—6°. В опытах использовали бодрствующих сусликов с ректальной температурой 37°, сусликов в переходный период от бодрствования к спячке, когда животные уже не реагировали на взятие их в руки, с ректальной температурой 11—15°, и спящих сусликов, находящихся в течение 4 месяцев в состоянии глубокого зимнего оцепенения, с ректальной температурой 2—6°.

Животных декапитировали и отделяли ствол головного мозга. Фракцию митохондрий, полученную центрифугированием 10%-ного гомогената ствола головного мозга в 0,32 М сахарозе [7], хранили при —20°. Для определения дезаминирования серотонина митохондрии суспендировали в фосфатном буфере, pH 8,5 [8], для определения дезаминирования бензиламина использовали боратный буфер, pH 9,2 [9]. В качестве специфических субстратов использовали серотонин-креатининсульфат (МАО А) и бензиламин-гидрохлорид (МАО Б) [3, 10, 11]. Величины удельной активности МАО рассчитаны по начальным скоростям реакции, так как при используемых серотонине и бензилаmine в течение 30 мин инкубации накопление аммиака во времени протекало линейно. Графики строили, используя метод двойных обратных величин Лайнуивера-Бэрка, K_m и V_{\max} определяли по Корнлиш-Боудену [12]. Инкубацию митохондрий (30 мин) проводили при температуре, соответствующей температуре тела животных, то есть 37° у бодрствующих, 11°—у засыпающих, 7°—у спящих. Активность МАО выражали в нмоль аммиака/мг белка. Аммиак определяли методом изотермической отгонки [13] с последующим применением реактива Несслера, а белок по Lowry и соавт. [14, 15].

Результаты и обсуждение

Как видно из приведенных в таблице данных, у краснощеких сусликов при всех изучавшихся физиологических состояниях под влиянием МАО в митохондриальной фракции ствола головного мозга дезаминировались как серотонин, так и бензиламин. Изучение реакции дезаминирования серотонина и бензиламина показало, что у бодрствующих сусликов при температуре инкубации, соответствующей температуре тела (37°), дезаминирование серотонина протекает значительно интенсивнее, чем дезаминирование бензиламина, максимальная скорость превращения МАО-серотонин комплекса выше скорости превращения МАО-бензиламин комплекса, и сродство МАО к серотонину несколько более выражено, чем сродство МАО к бензиламину.

У находившихся в глубокой зимней спячке сусликов при инкубации препарата митохондрий при 7° дезаминирование серотонина и бензиламина по сравнению с бодрствующими животными было снижено. Уровень дезаминирования серотонина снизился более чем в 10 раз, а бензиламина — только в 3 раза. В период спячки уменьшалась скорость превращения MAO-серотонин комплекса, при этом скорость превращения MAO-бензиламин комплекса также понижалась и резко возросло сродство MAO к бензиламину (табл.).

При впадении в зимнюю спячку, когда температура тела снижалась до 11—15° и животные становились неподвижными, дезаминирование серотонина и бензиламина протекало неодинаково. Дезаминирование серотонина уже в первый день оцепенения снижалось до тех значений, которые наблюдались у спящих животных. Дезаминирование бензиламина существенно не отличалось от такового у бодрствующих сусликов. При этом скорость превращения MAO-серотонин комплекса понижалась почти до той, которая наблюдалась у спящих сусликов, при почти неизменной величине сродства фермента к серотонину. Скорость превращения MAO-бензиламин комплекса оставалась еще на уровне бодрствующих животных, хотя сродство MAO к бензиламину заметно снижалось.

Построенные по методу двойных обратных величин Лайнуивера-Бэрка графики зависимости скорости дезаминирования серотонина и бензиламина MAO митохондрий замороженной-оттаявшей фракции ствола головного мозга бодрствующих, засыпающих, спящих сусликов от концентрации этих субстратов подчиняются уравнению Михаэлиса-Ментен, как это было отмечено на замороженных-оттаявших митохондриях крыс [5]. Прямые, характеризующие зависимость скорости дезаминирования от концентрации субстрата в обратных величинах, построенные для бодрствующих, засыпающих, спящих сусликов как в случае дезаминирования серотонина, так и в случае дезаминирования бензиламина, не пересекаются и не накладываются друг на друга (рис. 1, 2).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что у краснощеких сусликов, в каком бы физиологическом состоянии они не находились, в митохондриальной фракции ствола головного мозга происходит дезаминирование серотонина и бензиламина. Можно полагать, что у сусликов, как и у крыс, в дезаминировании серотонина участвует MAO типа А, а бензиламина—MAO типа В, поскольку при примененных нами низких концентрациях этих субстратов серотонин специфически дезаминируется MAO А [16], а бензиламин—MAO В [17]. Так как активность MAO А у бодрствующих сусликов выше активности MAO В, вполне вероятно, что у бодрствующих сусликов функциональная активность MAO А, связанная с митохондриями синапсом [8, 10], превалирует над функциональной активностью MAO В, связанной с митохондриями перикарионов [18]. У бодрствующих сусликов дезаминирование серотонина превышает дезаминирование бензиламина

Таблица

Влияние зимней спячки на активность MAO (нмоль аммиака/мг белка/мин), K_M и V_{\max} реакции дезаминирования серотонина и бензиламина во фракции митохондрий ствола головного мозга сусликов

Субстраты	Бодрствование, температура инкубации 37°		Засыпание, температура инкубации 11°		Спячка, температура инкубации 7°	
	серотонин	бензиламин	серотонин	бензиламин	серотонин	бензиламин
Активность фермента	5,21±0,41 (4)	1,72±0,19 (4)	0,69±0,07* (4)	1,41±0,18 (4)	0,49±0,02* (4)	0,57±0,15* (4)
K_M	161,3±12,2	221,7±17,3	141,0±6,7	543,3±70,3*	54,02±15,50*	8,88±5,50*
V_{\max}	5,67±0,09	2,26±0,08	0,77±0,01*	2,96±0,24	0,58±0,02*	0,68±0,03

Примечание. Серотонин и бензиламин применяли как субстраты MAO в концентрации 1 мкмоль/мл. K_M выражено в нмоль/мл, V_{\max} в нмоль аммиака/мг белка/мин. В скобках указано количество животных. В каждом опыте поставлены две повторные пробы. * $p < 0,01$ по сравнению с бодрствующими животными

на, по-видимому, за счет более высокой максимальной скорости превращения MAO А-серотонин комплекса. Более высокое сродство MAO к серотонину способствует увеличению максимальной скорости превращения MAO-серотонин комплекса при более низких концентрациях субстрата по сравнению с бензиламином.

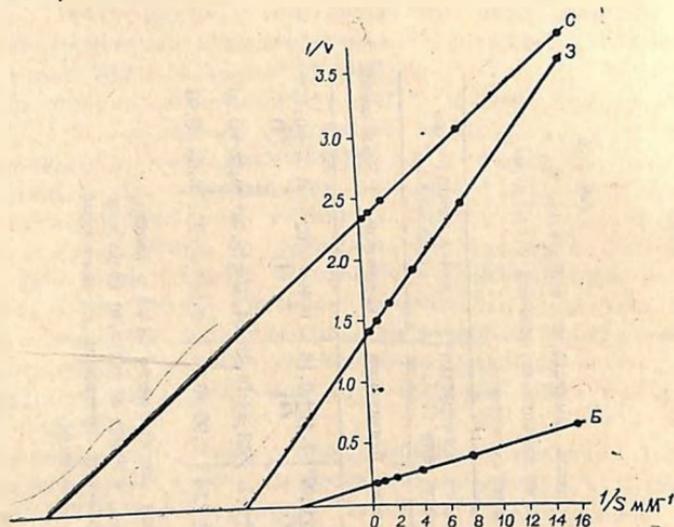


Рис. 1. Влияние различных физиологических состояний зимоспящих сусликов на зависимость скорости дезаминирования от концентрации серотонина в обратных величинах по Лайнуверу-Бэрку во фракции митохондрий ствола головного мозга. Б—бодрствующее, температура тела 37°; З—засыпающее, температура тела 11—15°; С—спящее, температура тела 2—6°

У спящих сусликов обнаружено более резкое понижение дезаминирования серотонина по сравнению с бензиламином (табл.). Это свидетельствует об относительно высокой активности MAO Б, сохраняющейся во время зимней спячки, хотя функциональная значимость ее не вполне ясна. Повышение сродства MAO к обоим субстратам у спящих сусликов, вероятно, является существенным моментом в механизмах спячки, поскольку максимальная скорость дезаминирования аминов у них может быть обеспечена при очень низких концентрациях субстрата. В проведенном нами ранее исследовании [2] на гомогенате ствола головного мозга сусликов было показано, что активность MAO по отношению к серотонину у спящих сусликов снижается гораздо меньше, чем в неразделенной митохондриальной фракции. Можно предположить, что во время спячки дезаминирование серотонина разными фракциями изменяется в неодинаковой степени и в неразделенную митохондриальную фракцию переходит значительно меньше MAO А, а большая часть ее остается в отброшенных более тяжелых или более легких по сравнению с ней фракциях [7, 10, 16].

Приведенные графики зависимости скорости дезаминирования серотонина и бензиламина от концентрации этих субстратов, построенные по методу двойных обратных величин Лайнуивера-Бэрка, показывают, что как в случае дезаминирования серотонина, так и в случае бензиламина график, полученный для бодрствующих сусликов (1, Б; 2, Б), не пересекается с графиками, полученными для спящих (1, С; 2, С) или для засыпающих (1, З; 2, З), как следовало ожидать при наличии ингибиторов, снижающих активность фермента. Прямые, характеризующие зависимость скорости дезаминирования от концентрации субстратов в обратных величинах, не накладываются друг на друга, что можно было бы ожидать от последствий только прямого воздействия низких температур, вызывающих снижение количества активных молекул и числа активных соударений [19]. Наши предыдущие исследования [2], показавшие более высокие значения Q_{10} в пределах температур (22—7°) у спящих сусликов по сравнению с бодрствующими, дают еще одно основание для заключения об изменении каталитических свойств МАО при спячке.

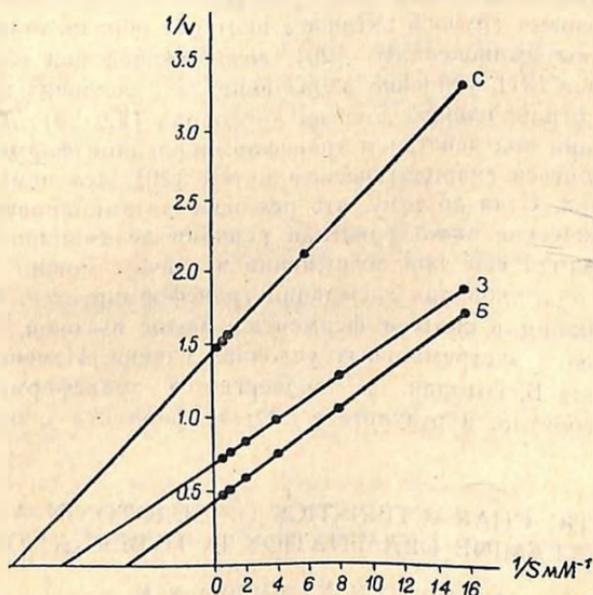


Рис. 2. Влияние различных физиологических состояний зимоспящих сусликов на зависимость скорости дезаминирования от концентрации бензиламина в обратных величинах по Лайнуиверу-Бэрку во фракции митохондрией ствола головного мозга. Обозначения те же, что и на рис. 1

Следует полагать, что активность МАО у засыпающих и спящих сусликов снижается не под влиянием ингибиторов или прямого воздействия низких температур, а в силу изменения механизма действия МАО под влиянием условий спячки.

Необходимо заметить, что экстремальные условия спячки неодинаково влияют на активность А и В форм МАО. В особенности эти различия проявляются при погружении в спячку, когда температура тела еще не достигла той, которая характерна для спящих животных. Деаминация серотонина и максимальная скорость превращения МАО-серотонин комплекса снижается уже в переходный период до тех значений, которые наблюдались у спящих животных, длительное время находившихся в глубокой зимней спячке. Деаминация бензиламина и максимальная скорость превращения МАО-бензиламин комплекса при погружении в спячку остаются еще на уровне бодрствующих сусликов и снижаются, по-видимому, позднее, так как у спящих животных деаминация бензиламина и максимальная скорость превращения МАО-бензиламин комплекса снижены. Эти факты дают основание предположить, что роль МАО А и МАО В в механизмах спячки неодинакова, как неодинаковы и изменения в механизме действия МАО А и МАО В под влиянием условий спячки.

Известно, что каталитические свойства МАО А могут подвергаться качественным изменениям или трансформации вследствие мягкого окисления тиоловых групп в активном центре и образования сульфеновокислой формы аммонооксидазы [20], возникающей под влиянием перекисей липидов [21], усиленно образующихся в условиях пониженных температур и ограниченного доступа кислорода [22, 23]. Деаминация серотонина под действием трансформированной формы МАО может осуществляться гидролитическим путем [20], что немаловажно в условиях спячки. Судя по тому, что реальное деаминация серотонина и кинетические характеристики реакции деаминации серотонина изменяются еще при погружении в спячку, можно допустить, что МАО А у сусликов при засыпании трансформируется, хотя не исключена возможность синтеза фермента с более высокой субстратной специфичностью в экстремальных условиях спячки. Изменение активности МАО типа В, которая не подвергается трансформации [24], происходит, вероятно, в результате синтеза фермента с измененными свойствами.

KINETIC CHARACTERISTICS OF SEROTONIN AND BENZYLAMINE DEAMINATION IN HYBERNATION

VOITENKO N. N., POPOVA N. K.

Laboratory of Behavioural Phenogenetics, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of USSR Academy of Sciences, Novosibirsk

The activity of monoamine oxydase has been studied in brain stem mitochondrial freeze-leavage undivided fraction of active, falling asleep and hibernating ground squirrels. The effect of these physiological states on deamination of serotonin and benzylamine has been also investigated. During hibernation, deamination of serotonin and conversion of МАО-serotonin complex decreased more drastically than benzylamine dea-

mination and MAO-benzylamine complex conversion. An increase in MAO affinity both to serotonin and benzylamine has been found. These changes in MAO-serotonin activity and in kinetic characteristics of serotonin deamination started at the period of falling asleep, when benzylamine deamination did not change significantly. The supposition is made that in natural hibernation the mode of MAO action is altered.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Novotna R., Janski L., Drahota L. Gen. Pharmacol., 6, 23—26, 1975.
2. Войтенко Н. Н. Физиол. ж. СССР, 65, 3, 359—364, 1977.
3. Johnston J. P. Biochem. Pharmacol., 17, 1285—1297, 1968.
4. Гурьянова А. Д., Буданцева А. Ю. Успехи совр. биол., 79, 2, 184—205, 1975.
5. Васильевых Л. Г., Горкин В. З., Каган Э. С. Биохимия, 44, 9, 1542—1550, 1979.
6. Naoi M., Yagi K. Archiv Biochem. Biophys., 202, 1, 18—26, 1980.
7. Gray E. G., Whittaker V. P. J. of Anatomy, 96, 1, 79—87, 1962.
8. Tabukoff B., Meyerson L., Allvisatos S. G. A. Brain Res., 66, 491—508, 1974.
9. Minamiura N., Yasunoby K. T. Biochem. Pharmacol., 27, 2737—2743, 1978.
10. Yang H.-Y. T., Neff N. H. J. of Pharmac. and Exper. Ther., 187, 2, 365—371, 1973.
11. Hauslay M. D., Tipton K. F. Biochem. J., 193, 645—652, 1974.
12. Корниш-Бойден Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир, с. 249—251, 1979.
13. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вопросы мед. химии, 8, с. 538—545, 1962.
14. Кочетов А. Г. Практическое руководство по энзимологии, М., Высшая школа, с. 314—315, 1971.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 1, 256—261, 1951.
16. Suzuel O. Biochem. Pharmacol., 3, 11, 1353—1358, 1981.
17. Lewinsonhn R., Glover V., Sandler M. Biochem. Pharmacol., 29, 9, 1221—1230, 1980.
18. Sekimoto S. Nipon Univ. J. Med., 16, 303—313, 1974.
19. Хаскин В. В.—В кн.: Зимняя спячка и сезонные ритмы физиологических функций, Новосибирск, Наука, с. 165—170, 1971.
20. Горкин В. З. Мол. биол., 10, 4, 717—736, 1976.
21. Рапава Э. А., Кляшторин Л. Б., Горкин В. З. Биохимия, 31, 6, 1216—1224, 1966.
22. Кебедмагомедова Х. А., Мельников Ю. Л., Владимиров Ю. А. Биофизика, 15, 1022—1028, 1970.
23. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М., Наука, с. 206, 1972.
24. Шатемирова К. К., Вережкина И. В., Горкин В. З. Бюл. exper. биол. и мед., 6, 669—670, 1977.

Лаборатория фенотипетики поведения
Института цитологии и генетики
СО АН СССР, Новосибирск

Поступила 13. V 1982