

## УЧАСТИЕ МОНОАМИНОКСИДАЗ В ОБРАЗОВАНИИ КОМПОНЕНТА ТРИБУЛИНА А 4-ГИДРОКСИФЕНИЛЭТАНОЛА.

Н.Г.ПАНОВА, Н.В.ВЕСЕЛОВСКАЯ, А.Е. МЕДВЕДЕВ

НИИ биомедицинской химии РАМН, 119832, Москва Погодинская ул., 10, факс: (095)245-08-57.

Исследовали пути образования 4-гидроксифенилэтанол в мозге быка. Инкубация гомогенатов мозга быка с тирамином или тирозином увеличивала содержание 4-гидроксифенилэтанол. Этот эффект более выражен при использовании тирамина. Препараты тирозина не содержат примесей последнего, что свидетельствует в пользу образования 4-гидроксифенилэтанол NADH-зависимым путем как из тирамина, так и из тирозина. Преинкубация гомогенатов с 0,1 мМ паргилином полностью ингибирует активность моноаминоксидаз А и Б и NADH-зависимое образование 4-гидроксифенилэтанол из тирамина. Последнее свидетельствует в пользу того, что в образовании 4-гидроксифенилэтанол из тирамина участвует, MAO.

Ключевые слова: моноаминоксидаза, эндогенные ингибиторы, мозг, трибулин, 4-гидроксифенилэтанол, тирамин, тирозин

**Введение.** Трибулин - эндогенный небелковый ингибитор MAO и связывания бензодиазепиновых рецепторов (см обзор [1]) обнаружен в тканях и биологических жидкостях млекопитающих и человека [2]. Его содержание обычно увеличивается при различных состояниях тревоги и стресса что, по-видимому, имеет важное регуляторное значение.

О содержании трибулина обычно судят по ингибированию активности MAO тест-систем, содержащих в качестве субстрата тирамин [1-3], который является общим субстратом для обоих типов моноаминоксидаз (А и Б) [4]. Использование серотонина и фенилэтиламина в концентрациях, специфичных для моноаминоксидаз А и Б, соответственно, позволило выявить существование MAO-A и MAO-B ингибиторные компоненты трибулина (трибулин А и Б), которые по-разному изменяются в условиях стресса [5-7].

Химическую структуру отдельных компонентов трибулина стали идентифицировать лишь в последнее время. Первым очищенным компонентом трибулина оказался изатин [8], который избирательно тормозит активность MAO типа Б [8-10]. Недавно были очищены и идентифицированы MAO А ингибиторные компоненты трибулина из мочи человека и мозга млекопитающих [11-12]. В мозге млекопитающих основным соединением трибулина А оказался 4-гидроксифенилэтанол [12]. Он ингибировал активность моноаминоксидазы А неконкурентно по отношению к субстрату серотонину с величиной  $K_i$ , равной 1,4 мМ и совершенно не влиял на активность моноаминоксидазы Б в диапазоне концентраций 0,001-1 мМ. Его эффект был обратим и не зависел от времени преинкубации. Возможны несколько путей образования 4-гидроксифенилэтанол: из тирозина или тирамина. В первом случае образование 4-гидроксифенилэтанол могло бы происходить по пути образования 4-гидроксифенилпирувата, с его последующим декарбоксилированием. Нельзя исключить также образования 4-гидроксифенилэтанол из тирамина, когда 4-гидроксифенилуксусный альдегид, образующийся в ходе катализируемого моноаминоксидазой окислительного дезаминирования тирамина, восстанавливается до 4-гидроксифенилэтанол [12].

Целью настоящей работы было исследование путей образования 4-гидроксифенилэтанол в мозге быка.

**Методика.** Мозг быка гомогенизировали в 10 мМ фосфатном буфере pH 7,4. 20% гомогенат, приготовленный из 2,5 г мозга, инкубировали 45 мин при 37°C 1 мМ тирамином или 1 мМ тирозином в присутствии 0,01 мМ NADH. В ряде экспериментов пробы инкубировали без NADH. Для ингибирования активности моноаминоксидаз гомогенат преинкубировали с 0,1 мМ паргилином 30 мин при 37°C, потом добавляли тирамин+NADH или тирозин+NADH и инкубировали еще 45 мин при той же температуре. Реакцию останавливали добавлением равного объема 2 М HCl. В контрольные пробы тирамин (+NADH), тирозин (+NADH) и в ряде экспериментов паргиллин добавляли после остановки реакции. Гомогенаты центрифугировали при 10 000 g в течении 30 мин для осаждения белка. Надосадочную жидкость экстрагировали двумя объемами этилацетата [11-12]. Органическую фазу промывали дистиллированной водой (2 x 50 мл) до pH 7. Растворитель удаляли в вакууме или под азотом. Для удаления примесей липидов пробы растворяли в 5 мл этилацетата и наносили на Waters Sep-Pack plus картридж с липофильным сорбентом Florisil, который затем промывали этилацетатом [13]. В предварительных экспериментах было установлено, что 4-гидроксифенилэтанол не сорбируется на этом типе картриджей [13]. Использование данного метода выделения основного химического компонента трибулина А мозга - 4-гидроксифенилэтанола позволяет существенно упростить подготовку образца для газохроматографического - масс спектрометрического анализа, разработанного нами ранее [12].

После удаления растворителя пробы анализировали методом газовой хроматографии - масс спектрометрии [12, 13]. Сухой остаток растворяли в этаноле (300 мкл). Аликвоты (200 мкл) выпаривали досуха. К сухому остатку добавляли 25 мкл бис(триметилсилил)трифторацетамида. Пробы дериватизировали 60 мин при 75 и затем анализировали на масс спектрометре Hewlett-Packard 5971 A (MSD), соединенном с газовым хроматографом Hewlett-Packard 5890 серии II. Для идентификации 4-гидроксифенилэтанола определяли группу из четырех фрагмент-ионов, характерных для дитриметилсилил-производного 4-гидроксифенилэтанола [13]. Возможное наличие примеси тирамина в коммерческом препарате тирозина исследовали методом тонкослойной хроматографии в системе 96,5% этанол-вода (7 : 3, по объему) [14] которая дает хорошее разделение этих соединений ( $R_f = 5$  и  $65$  для тирамина и тирозина, соответственно). Активность моноаминоксидаз А и Б определяли как описано ранее [15], используя 0,1 мМ [ $^{14}\text{C}$ ]серотонин (удельная радиоактивность 2,5 Ки/моль) и 5 мкМ [ $^{14}\text{C}$ ]фенилэтиламин (удельная радиоактивность 12,5 Ки/моль), в качестве селективных субстратов А и Б форм фермента, соответственно. Митохондрии мозга быка выделяли как описано ранее [16].

В работе использованы: [ $^{14}\text{C}$ ]серотонин (5 гидрокситриптамин), [ $^{14}\text{C}$ ] фенилэтиламин фирмы "Amersham" (Англия), отечественные органические растворители, Waters Sep-Pack plus Florisil картриджи фирмы "Millipore", (США), пластины с силикагелем 60  $F_{254}$  для тонкослойной хроматографии фирмы "Merk" (Германия). Остальные реактивы получены от фирмы "Sigma" (США).

**Результаты и обсуждение.** Инкубация гомогената мозга быка с 1 мМ тирамином или тирозином не влияет на содержание 4-гидроксифенилэтанола. При добавлении в среду инкубации 0,01 мМ NADH вместе с тирамином содержание 4-гидроксифенилэтанола в пробах увеличивается в 10-15 раз (Таблица 1). В аналогичных экспериментах с тирозином содержание 4-гидроксифенилэтанола увеличивалось в гораздо меньшей степени (в 3-4 раза). По данным тонкослойной хроматографии препарат тирозина, использовавшийся в наших экспериментах, не содержит примесей тирамина. Это позволило исключить возможное объяснение NADH-зависи-

мого образования 4-гидроксифенилэтанола из тирозина за счет примесей тирамина.

Таблица 1

Влияние тирамина и тирозина на образование 4-гидроксифенилэтанола в препаратах мозга быка

N	Условия опыта	Содержание 4-гидроксифенилэтанола в пробе	
		нг	%
1	Контроль	35,00±10,00	100
2	Тирамин	23,85±2,25	68
3	Тирамин & NADH	414,8±13,2	1185
4	Тирозин	31,4±5,2	90
5	Тирозин & NADH	111,2±11,88	318

Представлены данные из 2-5 опытов.

Преинкубация гомогенатов мозга с 0,1 мМ паргилином полностью ингибирует активность моноаминоксидазы А и Б, измеренной в выделенных митохондриях мозга. Хорошо известно, что паргилин относится к числу т.н. необратимых механизм-активируемых ингибиторов моноаминоксидаз, образующих ковалентные аддукты с флавиновым компонентом фермента [17]. Однако, фазе необратимой инактивации моноаминоксидазы предшествует промежуток времени, когда добавление обратимых конкурентных ингибиторов (или субстратов) защищает фермент от инактивации.

Последующая инкубация гомогенатов с тирамином или тирозином не влияла на торможение моноаминоксидаз паргилином. Отсутствие реактивации фермента во время выделения митохондрий в обоих вариантах эксперимента свидетельствует о необратимом ингибировании моноаминоксидаз. В этих условиях инкубация гомогенатов мозга с тирамином не вызывала увеличения содержания 4-гидроксифенилэтанола (Таблица 2). Последнее свидетельствует в пользу участия моноаминоксидаз в его образовании как из тирамина.

Таблица 2

Влияние паргилина на NADH-зависимое образование 4-гидроксифенилэтанола при инкубации гомогенатов мозга с тирамином

Условия инкубации	без паргилина	с 0,1 мМ паргилином
Контроль	31,3 ± 5,9 (7)	21,7 ± 12,3 (2)
Тирамин & NADH	414,8 ± 6,7 (4)	26,3 ± 2,7 (3)

Результаты представлены в нг 4-гидроксифенилэтанола в пробе. В скобках - количество опытов.

Ранее было показано, что 4-гидроксифенилэтанол, идентифицированный в качестве основного компонента трибулина А, по эффективности ингибирования моноаминоксидазы А уступает многим другим известным эндогенным регуляторам, включая эфиры органических кислот, идентифицированные в составе трибулина А мочи [11-12]. Поэтому очевидно, что 4-гидроксифенилэтанол может оказывать регуляторное влияние только при условии его достаточно высоких локальных концентраций вблизи моноаминоксидазы (А). В случае образования 4-гидроксифенилэтанола из тирамина это условие выполняется. Результаты многолетних исследований указывают, что низкие концентрации тирамина (и других так называемых следовых аминов) в значительной степени обусловлены высокой доступностью моноаминоксидазе [18, 19]. После ингибирования моноаминоксидаз различными селективными ингибиторами содержание следовых аминов в мозге становится сопоставимо с уровнем основных нейромедиаторов-моноаминов, содер-

жание которых увеличивается в гораздо меньшей степени [18, 19]. Результаты настоящей работы свидетельствуют в пользу того, что МАО осуществляет окислительное дезаминирование тирамина, а образующийся 4-гидрокифенилуксусный альдегид превращается в 4-гидроксифенилэтанол. Зависимость от NADH предполагает участие в этом процессе алкогольдегидрогеназ, сродство которых к ароматическим альдегидам существенно выше чем к ацетальдегиду [20].

Зависимость образования 4-гидроксифенилэтанола из тирозина от NADH позволяет предположить возможность (под действием декарбоксилазы ароматических кислот) превращения тирозина в тирамин, который затем превращается в 4-гидроксифенилэтанол. Однако доказательство этого утверждения нуждается в экспериментальном подтверждении.

Таким образом, результаты экспериментов *in vitro*, свидетельствуют о возможности образования 4-гидроксифенилэтанола NADH-зависимым путем как из тирозина, так и из тирамина. Для выяснения вопроса о том, какой из вышеописанных путей преобладает *in vivo* необходимы дополнительные эксперименты.

Тирамин относится к числу следовых аминов, выполняющих функции нейромодуляторов в центральной нервной системе [18]. Нарушение обмена следовых аминов обнаружено при ряде нервно-психических расстройств [21, 22]. Возможно, что увеличение содержания компонентов трибулина-продуктов обмена следовых аминов отражает важные ранее неизученные функции следовых аминов.

Работа проведена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант No 94-04-11531).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Медведев А.Е.* (1996) *Вопр. мед. химии*, 42, 95-103.
2. *Glover, V., Reveley, M.A., and Sandler, M.* (1980) *Biochem. Pharmacol.*, 29, 467-470.
3. *Bhattacharya, S.K., Clow, A., Przyborowska, A., Halket, J., Glover, V., and Sandler, M.* (1991) *Neurosci Lett.*, 132, 44-46.
4. *Tipton, K.F., Fowler, C., and Houslay, M.D.* (1982) in *Monoamine Oxidase: Basic and Clinical Frontiers* (Kamijo, K., Usdin, E., and Nagatsu, T., eds), *Excerpta Medica*, Amsterdam, pp. 87-99.
5. *Medvedev, A.E., Gorkin, V.Z., Fedotova, I.B., Semiokhina, A.F., Glover, V., and Sandler, M.* (1992) *Biochem. Pharmacol.*, 47, 1209-1210.
6. *Clow, A., Kimber, J., Sandler, M., Halstrom, C., Hawley, C., and Glover, V.* (1993) *British Association for Psychopharmacology Meeting*. Cambridge., A58.
7. *Pang, E-Y., Doyle A., Huckenbridge, F. H., Evans P., and Clow A.* (1995) *J. Psychopharmacol.*, 9, Suppl. 3, A19.
8. *Glover, V., Halket, J.H., Watkins, P.J., Clow, A., Goodwin, B.L., and Sandler, M.* (1988) *J. Neurochem.*, 51, 656-659.
9. *Medvedev, A.E., Goodwin, B.L., Clow, A., Halket, J., Glover, V., and Sandler, M.* (1992) *Biochem. Pharmacol.*, 44, 590-592.
10. *Medvedev, A.E., Ivanov, A.S., Kamyshanskaya, N.S., Kinkel, A.Z., Moskvitina T.A., Gorkin, V.Z., Li, N.Y., and Marshakov, V.Yu.* (1995) *Biochem. Mol. Biol. Internat.*, 36, 113-122.
11. *Medvedev, A.E., Halket, J., Goodwin, B.L., Sandler, M., and Glover, V.* (1995) *J. Neural Transm. [P-D Sect.]*, 9, 225-237.
12. *Медведев А.Е., Камышанская Н.С., Халкет Д., Гловер В., Сандлер М.* (1995) *Биохимия*, 60, 659-667.
13. *Панова Н.Г., Веселовская Н.В., Медведев А.Е.* (1996) *Вопросы мед. химии*, 42, 168-171.
14. *Шталь Э.* (1975) *Хроматография в тонких слоях*, Мир, М.

15. Medvedev, A.E., Kinkel, A.Z., Kamyshanskaya N.S., and Gorkin, V.Z. (1993) *Int. J. Biochem.*, 25, 1791-1799.
16. Medvedev, A.E., Rajgorodskaya, D.I., Gorkin, V.Z., Fedotova, I.B., and Semiokhina, A.F. (1992) *Mol. Chem. Neuropathol.*, 16, 187-201.
17. Singer, T.P. (1987) *J. Neural Transm.*, Suppl. 23, 1-23.
18. Boulton, A.A. (1984) in *Neurobiology of the Trace Amines*. (Boulton, A.A., Baker, G.B., Dewhurst, W.G., and Sandler, M. eds) Humana Press, Clifton, pp.13-24.
19. Blau, K. (1989) in *Mass Spectrometry*. (Lawson, A.M. ed) Berlin, New York, Walter de Gruyter, pp.127-173.
20. Островский Ю.М., Сатановская В.И., Островский С.Ю., Селевич М.И., Лелевич В.В. (1988) *Метаболические предпосылки и последствия потребления алкоголя*, Наука и Техника, Минск.
21. Mousseau, D.D. (1993) *Metabolic Brain Disease*, 8, 1-43.
22. Davis B.A., and Boulton A.A. (1994) *Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol.Psychiat.*, 18, 17-45.

#### INVOLVEMENT OF MONOAMINE OXIDASES IN FORMATION OF 4-HYDROXYPHENYLETHANOL, MAJOR COMPONENT OF TRIBULIN A.

N.G. PANOVA, N.V. VESELOVSKAYA, A.E. MEDVEDEV

Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya str. 10, Moscow, 119832,  
fax: (095) 245-08-57

Pathways of 4-hydroxyphenylethanol formation were studied in the bovine brain. Incubation of brain homogenates with tyramine or tyrosine increased 4-hydroxyphenylethanol content only in the presence of NADH. Tyramine produced more pronounced augmentation of 4-hydroxyphenylethanol content than tyrosine. Tyrosine preparations were not contaminated with tyramine. This suggests that 4-hydroxyphenylethanol may be formed from tyramine and tyrosine in NADH-dependent process. Preincubation of homogenates with 0.1 mM pargyline completely inhibited monoamine oxidases A and B and prevented NADH-dependent formation of 4-hydroxyphenylethanol from tyramine. The latter suggests that MAO is involved in formation of 4-hydroxyphenylethanol.

**Key words:** monoamine oxidase, endogenous inhibitors, brain, tribulin, 4-hydroxyphenylethanol, tyramine, tyrosine.