

УДК 577:615.547

## ИЗОФОРМНЫЙ СОСТАВ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ БЕНЗИЛАМИНОКСИДАЗЫ В НОРМЕ И ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

*А.Н. Фаттахова, Э.Р. Юсупова, Е.Н. Шахбазова*

### Аннотация

Из сыворотки крови условно здоровых людей и пациентов с диагнозом «шизофрения» с помощью хроматографии выделены изоформы купризонзависимой медьсодержащей бензиламинооксидазы. Сравнительный анализ значений константы Михаэлиса, каталитического отношения ( $V/K_m$ ) для бензиламина и константы ингибирования для купризона в выделенных фракциях показал, что в крови пациентов с диагнозом «шизофрения» изоформы с высоким каталитическим отношением отсутствуют. В сыворотке крови только условно здоровых людей обнаружены изоформы бензиламинооксидазы со значениями  $V/K_m$  от 0.88 до 6.0.

**Ключевые слова:** бензиламинооксидаза, изоформы, шизофрения.

### Введение

В тканях и жидкостях человека содержатся медьсодержащие аминоксидазы (АО). Мембранная форма АО называется семикарбазид-чувствительной аминоксидазой, а плазматическая – бензиламинооксидазой (БАО). В крови БАО связана с альбуминовой фракцией [1, 2].

Бензиламинооксидаза – плазматический гомеостазный фермент, участвующий в обмене нейромедиаторов, катаболизме эндогенных аминов и метаболизме соединительной ткани (эластина и гистамина) [3]. Уровень БАО считается клиническим показателем, поскольку выявлено, что при патологиях, таких как шизофрения, уровень БАО повышен по сравнению с нормой [4]. Известно, что при патологиях нервной и соединительной тканей активность БАО также повышена, поэтому, возможно, можно считать БАО одним из маркеров патологии этих тканей. Предполагается, что основной функциональной ролью БАО является контроль за целостностью внеклеточного матрикса при воспалительном процессе [5].

Согласно современным представлениям БАО присутствует в различных количествах во многих тканях млекопитающих [1]. Высокая активность БАО наблюдается в клетках сосудов гладкой мускулатуры, сердца, а также в жировой, легочной и хрящевой тканях. Фермент отсутствует в нервной ткани и глиальных клетках мозга, но присутствует в эндотелии капилляров мозга [6], что, возможно, вносит вклад в формирование гематоэнцефалического барьера. Несмотря на то что БАО не обнаружена в нервной ткани, считается, что фермент ассоциирован с нервными окончаниями в зубной пульпе [1].

Цель настоящего исследования – сравнительный анализ изоформного состава БАО в сыворотке крови условно здоровых людей и пациентов с диагнозом «шизофрения».

### Методика

В экспериментах использовалась коллективная сыворотка условно здоровых людей обоего пола в возрасте от 25 до 37 лет ( $n = 30$ ), любезно предоставленная лабораторией Центра мужского здоровья «Ираклис» (г. Казань), и пациентов с подтвержденным диагнозом F1-F9 «шизофрения» обоего пола в возрасте от 17 до 65 лет ( $n = 52$ ), находящихся в стационаре Республиканской психиатрической больницы (г. Казань). Активность БАО определяли в реакционных смесях, содержащих бензиламин HCl (фирма Sigma) [2]. При проведении ингибиторного анализа реакционные смеси содержали купризон (селективный ингибитор медь-содержащей бензиламиноксидазы) в дозах  $10^{-3} - 10^{-7}$  М. Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом [6]. Значения константы Михаэлиса ( $K_m$ ) и константы ингибирования ( $K_i$ ) вычисляли с помощью графического метода обратных величин.

Для выделения изоформ использовали сыворотки, в которые для предотвращения протеолиза фермента добавляли 5 мкл коктейля ингибиторов протеолиза на 10 мл сыворотки (Halt™ protease and phosphatase inhibitor single-use cocktail, Thermo Scientific, США). Фракции, содержащие активность купризонзависимой БАО, насыщали сульфатом аммония. С целью освобождения белковой смеси от низкомолекулярных примесей и  $(NH_4)_2SO_4$  выпавший осадок (2 мл) наносили на колонку с Sephadex G-200 (Sigma-Aldrich, США). Белки элюировали 0.05 М фосфатным буфером, pH 7.0. Фракции, содержащие активность купризонзависимой БАО, изучали с помощью ионообменной хроматографии на QAE ZETAPREP 15 DISK (Sigma-Aldrich, США). Белки элюировали Трис-HCl буфером 0.01 и 0.05 М, содержащим 0.5 или 0.2 М NaCl.

### Результаты

В результате проведенной гель-хроматографии сыворотки крови условно здоровых людей было получено 2 фракции, при разделении сыворотки пациентов с диагнозом «шизофрения» – 4 фракции, обладающие максимальной активностью купризонзависимой БАО. Фракции, содержащие активность купризонзависимой БАО, концентрировали и разделяли с помощью ионообменной хроматографии. В результате установлено, что сыворотка крови условно здоровых содержала 18 изоформ с активностью купризонзависимой БАО, тогда как сыворотка крови пациентов с диагнозом «шизофрения» – 17 изоформ.

Сравнительный анализ значений  $K_m$  для бензиламина в выделенных фракциях показал, что изоформы для каждого фенотипа можно условно разделить на высокоаффинные ( $K_m < 1$  мМ), среднеаффинные ( $K_m$  от 1 до 2 мМ) и низкоаффинные ( $K_m$  от 3 до 100 мМ) (табл. 1, 2).

БАО в сыворотке крови условно здоровых представлена высокоаффинными (66%) и низкоаффинными изоформами (22%).

Табл. 1

Сравнительный анализ Km пациентов с диагнозом «шизофрения»

Высокоаффинные изоформы БАО		Изоформы БАО со средней аффинностью		Низкоаффинные изоформы БАО	
№ фракции	Km, мМ	№ фракции	Km, мМ	№ фракции	Km, мМ
2.1	0.8	1.4	1.1	1.1	40
		2.2	1.4	1.2	10
		3.2	1.6	1.3	10
		3.3	1.7	1.5	20
				3.1	20
				3.4	5
				4.1	100
				4.2	10
				4.3	10
				4.4	5
				4.5	10

Табл. 2

Сравнительный анализ Km условно здоровых людей

Высокоаффинные изоформы БАО		Изоформы БАО со средней аффинностью		Низкоаффинные изоформы БАО	
№ фракции	Km, мМ	№ фракции	Km, мМ	№ фракции	Km, мМ
1.1	0.38	1.5	1,1	1.7	5
1.2	0.2	2.4	2	1.4	5
1.3	0.1			2.1	3.3
1.6	0.074			2.9	3.3
1.9	0.4				
1.8	0.5				
2.2	0.33				
2.5	0.5				
2.7	0.5				
2.3	0.045				
2.6	0.68				
2.8	0.2				

В сыворотке крови пациентов с диагнозом «шизофрения» обнаружили низкоаффинные изоформы БАО (69%) и изоформы со средней аффинностью (25%).

Сравнительный анализ значений каталитического отношения (V/Km) БАО в выделенных фракциях показал, что V/Km для всех изоформ БАО, содержащихся в сыворотке крови пациентов с диагнозом F1-F9 «шизофрения», не превышали 0.411, тогда как в крови условно здоровых людей присутствуют изоформы с каталитическим отношением от 0.02 до 6.0 (рис. 1). В сыворотке крови пациентов с диагнозом «шизофрения» отсутствуют изоформы БАО со значениями V/Km от 0.88 до 6.0 (рис. 1).

Таким образом, установленные различия кинетических параметров изоформ купризонзависимой БАО сыворотки крови условно здоровых людей и пациентов с диагнозом «шизофрения» свидетельствуют о глубоких гомеостатических нарушениях соединительной ткани и метаболизма моноаминов при шизофрении.

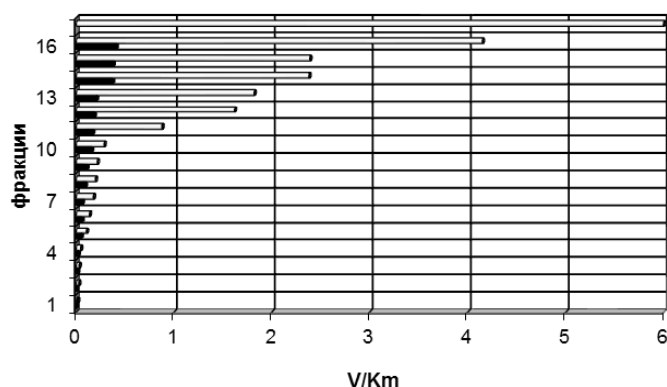


Рис. 1. Каталитическое отношение V/Km для изоформ БАО в сыворотке крови условно здоровых (белые столбы) и пациентов с диагнозом «шизофрения» (черные столбы)

### Литература

1. Buffoni F., Ignesti G. The copper-containing amine oxidases: biochemical aspects and functional role // *Mol. Genet. Metab.* – 2000. – V. 71, No 4. – P. 559–564.
2. Hernandez-Guillamon M., Solé M., Delgado P., García-Bonilla L., Giralt D., Boada C., Penalba A., García S., Flores A., Ribó M., Alvarez-Sabin J., Ortega-Aznar A., Unzeta M., Montaner J. VAP-1/SSAO plasma activity and brain expression in human hemorrhagic stroke // *Cerebrovasc. Dis.* – 2012. – V. 33, No 1. – P. 55–63. – doi: 10.1159/000333370.
3. Ullah K., Xie B., Iqbal J., Rasool A., Qing H., Deng Y. Arterial vascular cell line expressing SSAO: a new tool to study the pathophysiology of vascular amine oxidases // *Neural. Transm.* – 2013. – V. 120, No 6. – P. 1005–1013. – doi: 10.1007/s00702-013-1015-z.
4. Stober G., Ben-Shachar D., Cardon M., Falkai P., Fonteh A.N., Gawlik M., Glenthøj B.Y., Grunblatt E., Jablensky A., Kim Y.K., Kornhuber J., McNeil T.F., Müller N., Oranje B., Saito T., Saoud M., Schmitt A., Schwartz M., Thome J., Uzbekov M., Durany N., Riederer P. Schizophrenia: from the brain to peripheral markers. A consensus paper of the WFSBP task force on biological markers // *World J. Biol. Psychiatry.* – 2009. – V. 10, No 2. – P. 127–155. – doi: 10.1080/15622970902898980.
5. Buffoni F., Corte L.D., Hope D.B. Immunofluorescence histochemistry of porcine tissues using antibodies to pig plasma amine oxidase // *Proc. R. Soc. Lond. B.* – 1977. – V. 195, No 1120. – P. 417–423. – doi: 10.1098/rspb.1977.0018.
6. Obata T., Aomine M. Effect of antidepressant drug on semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) in dog brain // *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* – 2010. – V. 122–123, No 1–6. – P. 3–12.

Поступила в редакцию  
06.05.13

**Фаттахова Альфия Нурлимановна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: [afattakh@rambler.ru](mailto:afattakh@rambler.ru)

**Юсупова Эльвина Робертовна** – аспирант кафедры биохимии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: [yusupova.elvina@gmail.com](mailto:yusupova.elvina@gmail.com)

**Шахбазова Елена Николаевна** – заведующий лабораторией микробиологии, ГАУЗ «РЦПБ СПИД И ИЗ МЗ РТ», г. Казань, Россия.

E-mail: [shen88@rambler.ru](mailto:shen88@rambler.ru)

\* \* \*

**BENZYLAMINE OXIDASE ISOTYPES IN THE PLASMA OF HEALTHY AND SCHIZOPHRENIC PATIENTS***A.N. Fattakhova, E.R. Yusupova, E.N. Shakhbazova***Abstract**

The isotypes of copper-bearing cuprizone-dependent benzylamine oxidase were partly purified from the blood samples of healthy patients and patients with schizophrenia by gel-filtration and ion-exchange chromatography. The comparative analysis of the values of Michaelis constant ( $K_m$ ) and catalytic quotient ( $V/K_m$ ) for benzylamine used as a substrate and the values of inhibition constant ( $K_i$ ) for cuprizone revealed that the isotypes with high catalytic quotient were absent in the blood samples of schizophrenia patients. The isotypes with  $V/K_m$  values of 0.88–6 were detected only in the blood samples of healthy patients.

**Keywords:** benzylamine oxidase, isotypes, schizophrenia.

**References**

1. Buffoni F., Ignesti G. The copper-containing amine oxidases: biochemical aspects and functional role. *Mol. Genet. Metab.*, 2000, vol. 71, no. 4, pp. 559–564.
2. Hernandez-Guillamon M., Solé M., Delgado P., García-Bonilla L., Giralt D., Boada C., Penalba A., García S., Flores A., Ribó M., Alvarez-Sabin J., Ortega-Aznar A., Unzeta M., Montaner J. VAP-1/SSAO plasma activity and brain expression in human hemorrhagic stroke. *Cerebrovasc. Dis.*, 2012, vol. 33, no. 1, pp. 55–63. doi: 10.1159/000333370.
3. Ullah K., Xie B., Iqbal J., Rasool A., Qing H., Deng Y. Arterial vascular cell line expressing SSAO: a new tool to study the pathophysiology of vascular amine oxidases. *Neural. Transm.*, 2013, vol. 120, no. 6, pp. 1005–1013. doi: 10.1007/s00702-013-1015-z.
4. Stober G., Ben-Shachar D., Cardon M., Falkai P., Fonteh A.N., Gawlik M., Glenthøj B.Y., Grunblatt E., Jablensky A., Kim Y.K., Kornhuber J., McNeil T.F., Müller N., Oranje B., Saito T., Saoud M., Schmitt A., Schwartz M., Thome J., Uzbekov M., Durany N., Riederer P. Schizophrenia: from the brain to peripheral markers. A consensus paper of the WFSBP task force on biological markers. *World J. Biol. Psychiatry*, 2009, vol. 10, no. 2, pp. 127–155. doi: 10.1080/15622970902898980.
5. Buffoni F., Corte L.D., Hope D.B. Immunofluorescence histochemistry of porcine tissues using antibodies to pig plasma amine oxidase. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 1977, vol. 195, no. 1120, pp. 417–423. doi: 10.1098/rspb.1977.0018.
6. Obata T., Aomine M. Effect of antidepressant drug on semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) in dog brain. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 2010, vol. 122–123, no. 1–6, pp. 3–12.

Received  
May 6, 2013

---

**Fattakhova Alfiya Nurlimanovna** – PhD in Biology, Associate Professor, Department of Biochemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: [afattakh@rambler.ru](mailto:afattakh@rambler.ru)

**Yusupova Elvina Robertovna** – PhD Student, Department of Biochemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: [yusupova.elvina@gmail.com](mailto:yusupova.elvina@gmail.com)

**Shakhbazova Elena Nikolaevna** – Head of the Laboratory of Microbiology, Republican Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases under the Ministry of Health of the Republic of Tatarstan, Kazan, Russia.

E-mail: [shen88@rambler.ru](mailto:shen88@rambler.ru)