

А. А. ГАЛОЯН, Р. Ф. МАНАСЯН

К МЕТОДУ ВЫЯВЛЕНИЯ СУКЦИНДЕГИДРАЗЫ
В МИКРОСТРУКТУРАХ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ
И НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ ЕЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ
ВОЗДЕЙСТВИЯХ

В настоящее время установлена взаимосвязь между окислительно-восстановительными и физиологическими процессами в нервно-рефлекторных звеньях организма [1]. Формирование нервного импульса в рецепторах зависит от состояния биологического окисления в этих участках [2]. Однако весьма скудны литературные данные относительно выяснения взаимосвязи между отдельными ферментативными процессами сложной системы биологического окисления и теми структурами, в которых организуется нервный импульс. Такое положение объясняется с одной стороны специфичностью и сложностью биологического окисления в разных синаптических зонах и отсутствием надежных и весьма специфичных методов цито- и гистохимического исследования.

В настоящем исследовании мы задались целью изучить изменения сукциндегидразы — одного из важнейших ферментов сукциноксидазной системы, в микроструктурах центральной нервной системы, путем воздействия факторов, изменяющих, в той или иной форме, основные нервные процессы в синапсах (ионы кадмия, коффеин, гексенал). Выбор данного фермента объясняется тем, что этот фермент играет чрезвычайно важную роль в лимоннокислом цикле Кребса, столь важного звена энзимохимического образования и превращений передатчиков нервного возбуждения в нервной системе. Сукциндегидраза является феррофлавопротеином и в составе своего протенна содержит сульфгидрильные группы.

На большом фактическом материале мы стремились найти всевозможные причины помех при определении сукциндегидразы на свежих замороженных срезах и попытались видоизменить существующие методы с целью полнее выявить активность сукциндегидразы во всех отделах центральной нервной системы.

Методическая часть

Принцип всех методов гистохимического определения активности сукциндегидразы заключается в том, что разные соли тетразолия, такие как хлорид-трифенил-тетразол (ХТГ), тетразолиум синий (ТС), неотетразолиум (НТ), тетразилиум нитро ВТ, имеют способность восстанавливаться водородом, образуемым от янтарной кислоты под действием сукциндегидразы. При этом в местах локализации фермента образуются фор-

мазаны разного цвета. Используемый в реакционной смеси янтарнокислый натрий дает основание думать, что реакция катализируется сукциндегидразой. Однако не исключена возможность, что другие дегидразы могут также в определенной степени катализировать расщепление водородных ионов от сукцината.

Вероятно отсутствием строгой неспецифичности этой реакции можно объяснить большую диффузность образования кристаллов формазана при определении сукциндегидразы. Как показали наши наблюдения, диффузность распределения кристаллов формазана не одинакова в разных отделах центральной нервной системы. Больше всего диффузность кристаллов видна в коре головного мозга, затем в спинном мозгу, корковом слое мозжечка, в продолговатом мозге и гипоталамусе. Несмотря на это кристаллы накоплены в основном в нейронах именно в цитоплазме. Сукциндегидразная активность клеточного ядра весьма мала. Существенным недостатком определения сукциндегидразы на свежемороженых срезах является то, что все существующие методы определения сукциндегидразы солями тетразолия не дают закономерных результатов. Нередки случаи, когда на срезах клетки не выявляются или едва бывают заметны их контуры. Наш опыт показывает, что важное значение имеет способ замораживания, точный учет времени оттаивания, глубина замораживания и т. д. Так, например, при длительном замораживании углекислым газом, или при долгом оттаивании на срезах часто полностью отсутствует сукциндегидразная реакция.

Некоторые авторы [3] причину отсутствия реакции объясняют тем, что в случае тонких срезов (8—10 микр) разрушается структура клеток, отчего исчезает активность сукциндегидразы. Однако трудно согласиться с тем, что только этим можно объяснить исчезновение активности фермента, так как часто в наших опытах мы на отдельных срезах наблюдали полное или почти полное отсутствие активности сукциндегидразы, даже в тех случаях, когда толщина срезов была 30—40 микр.

Как показали наши опыты, следует обратить внимание на то обстоятельство, что определенные реакционные смеси, приведенные в разных методиках, не одинаково хорошо выявляют активность сукциндегидразы в разных отделах центральной нервной системы. Вероятно, это касается и разных паренхиматозных органов.

Так, например, реакционная смесь Шелтона и Шнайдера [4], в состав которой входят: 0,1 М фосфатный буфер рН 7,6, 0,1% неотетразелиум, 0,1 М сукцинат натрия, дистиллированная вода в соотношении (1 : 1 : 1 : 1), удовлетворительно выявляет сукциндегидразу в коре у крыс при инкубации 37° в течение 1 ч. Однако для спинного, продолговатого мозга, мозжечка, гипоталамуса, как показали наши опыты, более пригодным является реакционная смесь следующего состава: 0,1 М фосфатный буфер рН 7,3, 0,2% неотетразолиум, 0,1 М сукцинат натрия 1 : 1 : 1 при инкубации в аэробных условиях, + 37° в течение 1 ч.

Важное значение имеют высушивающие и температурная обработка срезов. Об этом в описании методики отсутствуют соответствующие ука-

зания. Наши многочисленные опыты с очевидностью показали, что длительное 2—3-часовое высушивание при 20° или над термостатом (+56°) в течение 40—45 мин. (после реакции), количество выявляемых клеток в несколько раз увеличивается, а в нейронах более интенсивно накапливаются кристаллы формазана. Такая обработка оказалась пригодной для всех отделов центральной нервной системы. На рис. 1 показана активность сукциндегидразы в шейном утолщении спинного мозга крыс после высушивания на воздухе. Как видно из рис. 1, количество выявленных



Рис. 1. Шейное утолщение спинного мозга крысы. Гистохимическая реакция на сукциндегидразную активность. Высушивание на воздухе. Об. 12, ок. 10.

клеток незначительно, а большие мотонейроны спинного мозга вообще не выявляются. Другая картина отмечается при температурной 56° обработке в течение 45 мин. Как видно из рис. 2, при этом количество видимых клеток в несколько раз увеличивается. Интенсивно окрашиваются мотонейроны, затем клетки вегетативной нервной системы и чувствительные нейроны задних рогов спинного мозга.

При помощи второй реакционной смеси и после температурной обработки достаточно хорошо выявляется сукциндегидраза в ядрах гипоталамуса (рис. 3), в продолговатом мозгу (рис. 4), мозжечке (рис. 5). Следует отметить, что в ядрах *N. Supraopticus* и *N. paraventricularis* сукциндегидраза находится в достаточно больших количествах. Однако она не строго локализована в клеточных структурах, в то время как в ядрах заднего гипоталамуса, а также в ядрах продолговатого мозга кристаллы формазана главным образом сосредоточены в нейронах.

В большинстве наших опытов срезы были изготовлены на замораживающем микротоме, столик был полупроводниковым (создавалась постоянная температура). Это обстоятельство улучшило качество срезов, резко



Рис. 2. Шейное утолщение спинного мозга крысы — гистохимическая реакция на сукциндегидразную активность. Высушивание над термостатом (45 мин., 56°). Об. 12, ок. 10.

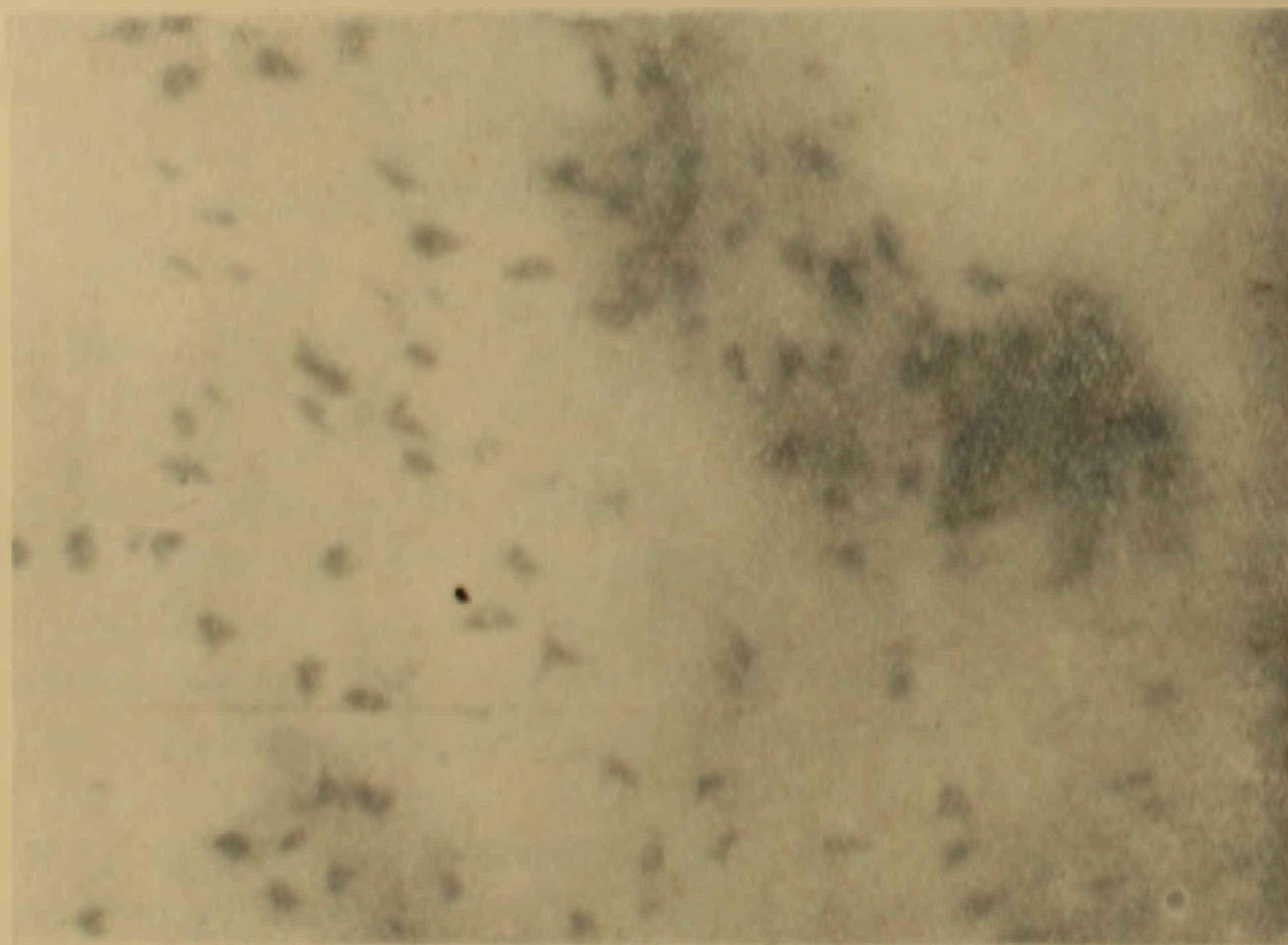


Рис. 3. Ядро заднего гипоталамуса. Гистохимическая реакция на сукциндегидразную активность. Об. 12, ок. 10.

уменьшая разницу проявления активности формазана на разных срезах.

Таким образом при гистохимическом определении сукциндегидразы необходимо учитывать следующие факторы.

1. Приготовить срезы на креостатах или на специальных столиках, благодаря чему колебание температуры замораживания незначительны. Причиной исчезновения реакции в отдельных, в частности тонких срезах,

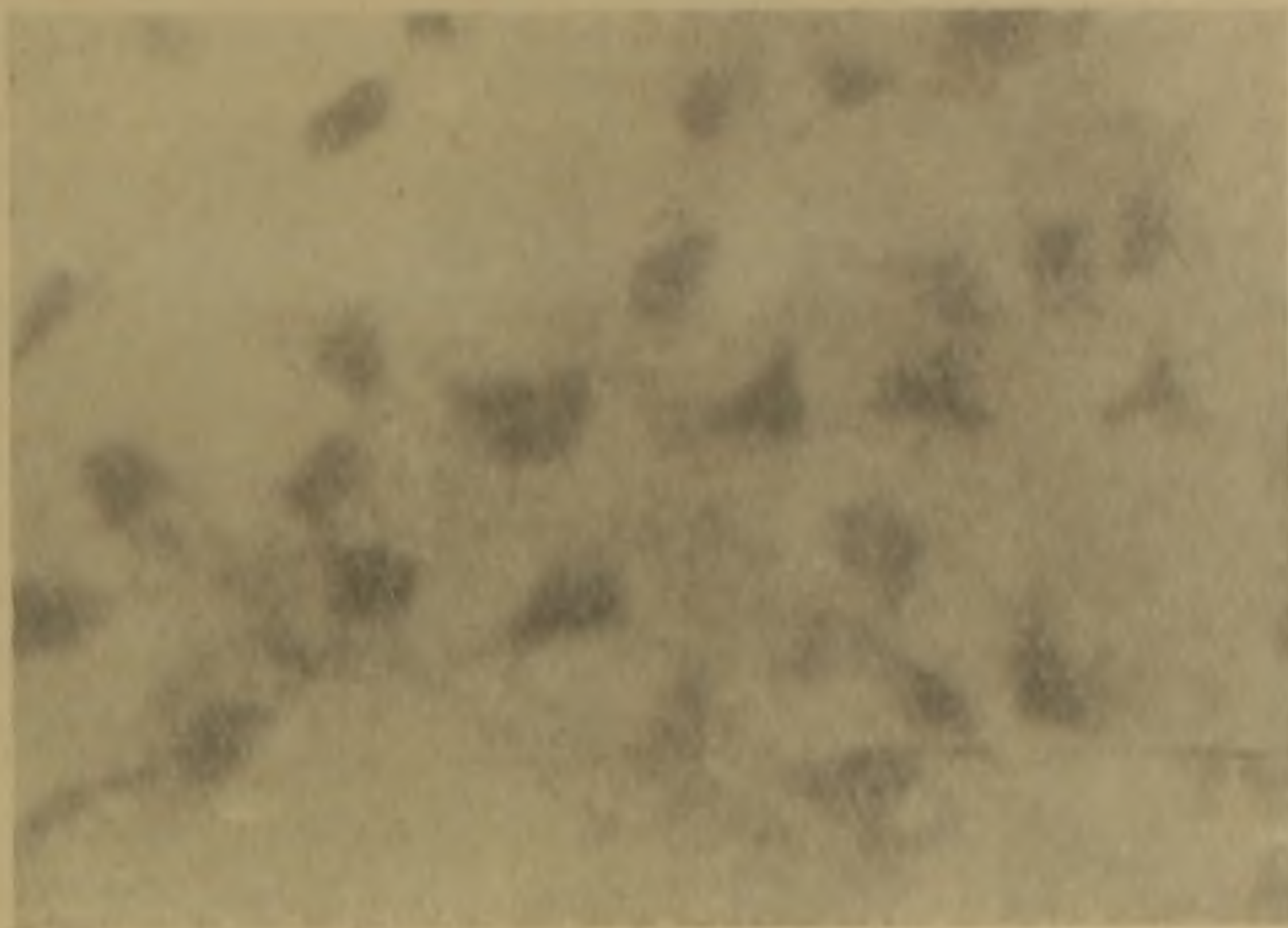


Рис. 4. Ядро продолговатого мозга. Гистохимическая реакция на сукциндегидразную активность. Об. 45, ок. 10.

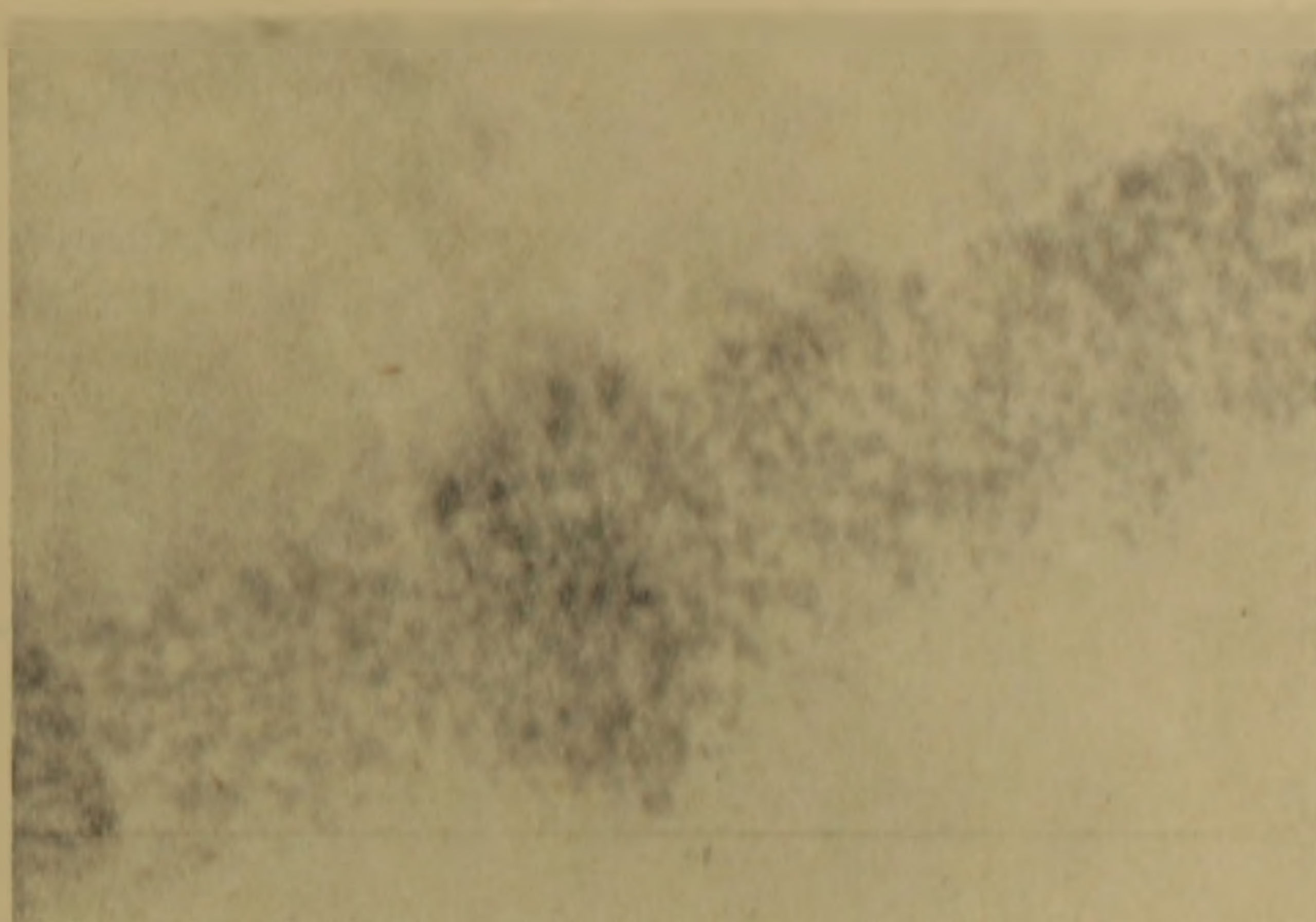


Рис. 5. Мозжечок — граница серого и белого вещества. Гистохимическая реакция на сукциндегидразную активность. Об. 45, ок. 10.

следует объяснить в основном колебаниями температуры замораживания.

2. Для выявления активности сукциндегидразы коры головного мозга крыс рекомендуется использовать I реакционную смесь, а для спинного, продолговатого мозга, гипоталамуса, а также мозжечка II смесь.

3. Надо придавать очень важное значение высушиванию и в особенности «температурной» обработке при -56° над термостатом в течение 40—45 мин. Такая обработка необходима для всех отделов центральной нервной системы.

Изменения активности сукциндегидразы в микроструктурах центральной нервной системы под влиянием ионов кадмия, гексенала и кофеина

Методика исследования

В исследованиях были использованы крысы самцы весом 150—200 г. Гексенал вводился подкожно из расчета 15—17 мг на 100,0 веса. При такой концентрации животные засыпали через 5—10 мин. в течение 1,5 ч. приняв боковое положение.

В некоторых случаях для продления времени наркоза через 1,5 ч. повторно вводился гексенал и этим самым общее время наркоза длилось 3 ч. Кофеин (*coffeini natrii benzoici*) также вводился подкожно из расчета 5—10 мг на 100,0 веса крыс, 2 раза в течение 2 ч. Были испытаны дозы ионов кадмия, вызывающие выпадение выработанных условных рефлексов [5, 6], а также характерные изменения в системе гипоталамус-гипофиз [7, 8] (1 мг на 100,0 веса животного). Определялась активность сукциндегидразы как через 3 ч., так и через 1—2 дня после 2-кратного подкожного введения ионов кадмия. Активность сукциндегидразы определялась по методу Шелтона и Шнайдера, учитывая вышеупомянутые модификации. Толщина срезов была от 30—50 микр.

Результаты опытов

При введении животным гексенала повышается активность сукциндегидразы, а также количество выявленных клеток в нейронах шейного

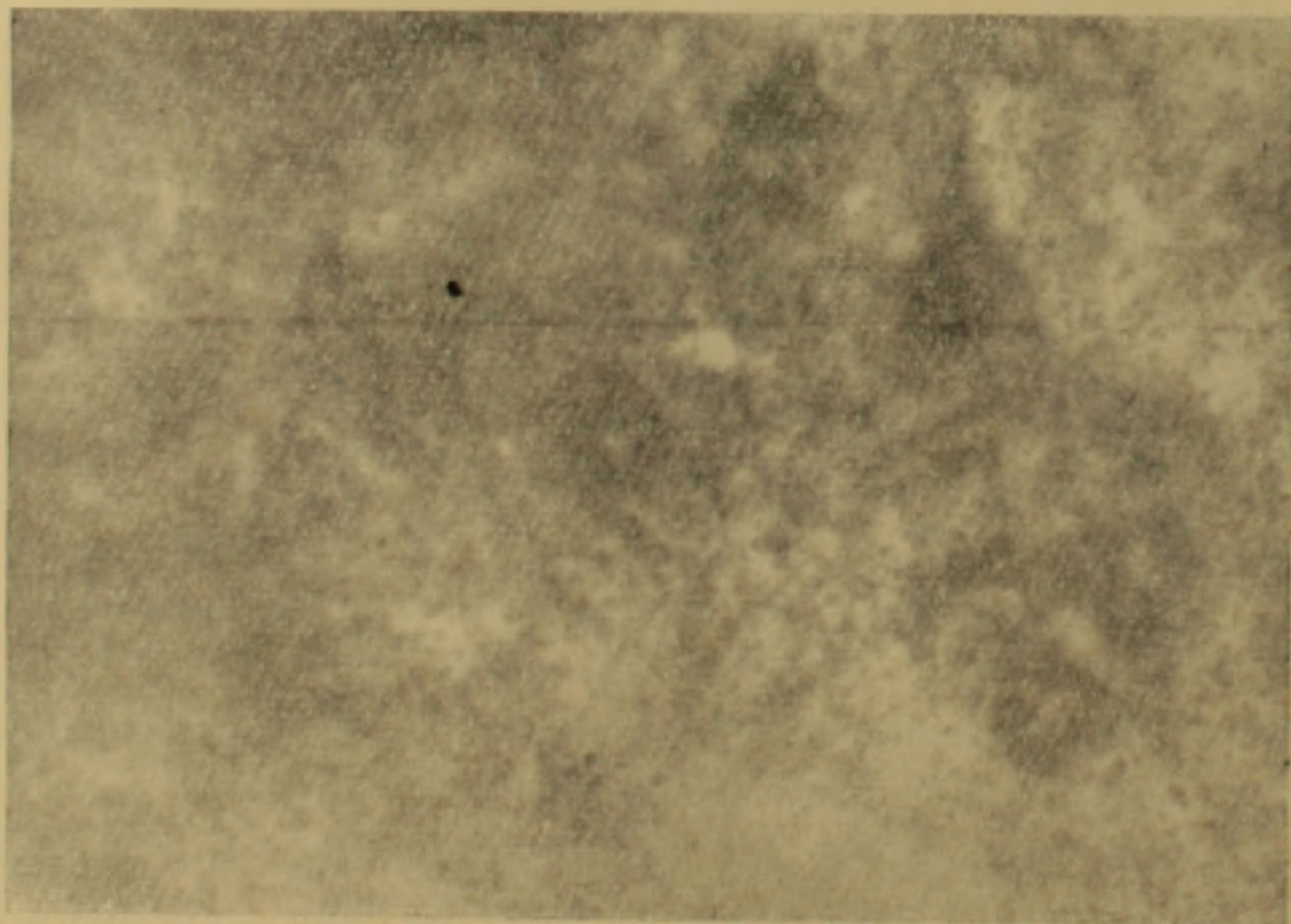


Рис. 6. Шейное утолщение спинного мозга. Мотонейроны переднего рога спинного мозга. Гистохимическая реакция на сукциндегидразную активность при введении гексенала. Об. 45, ок. 10.

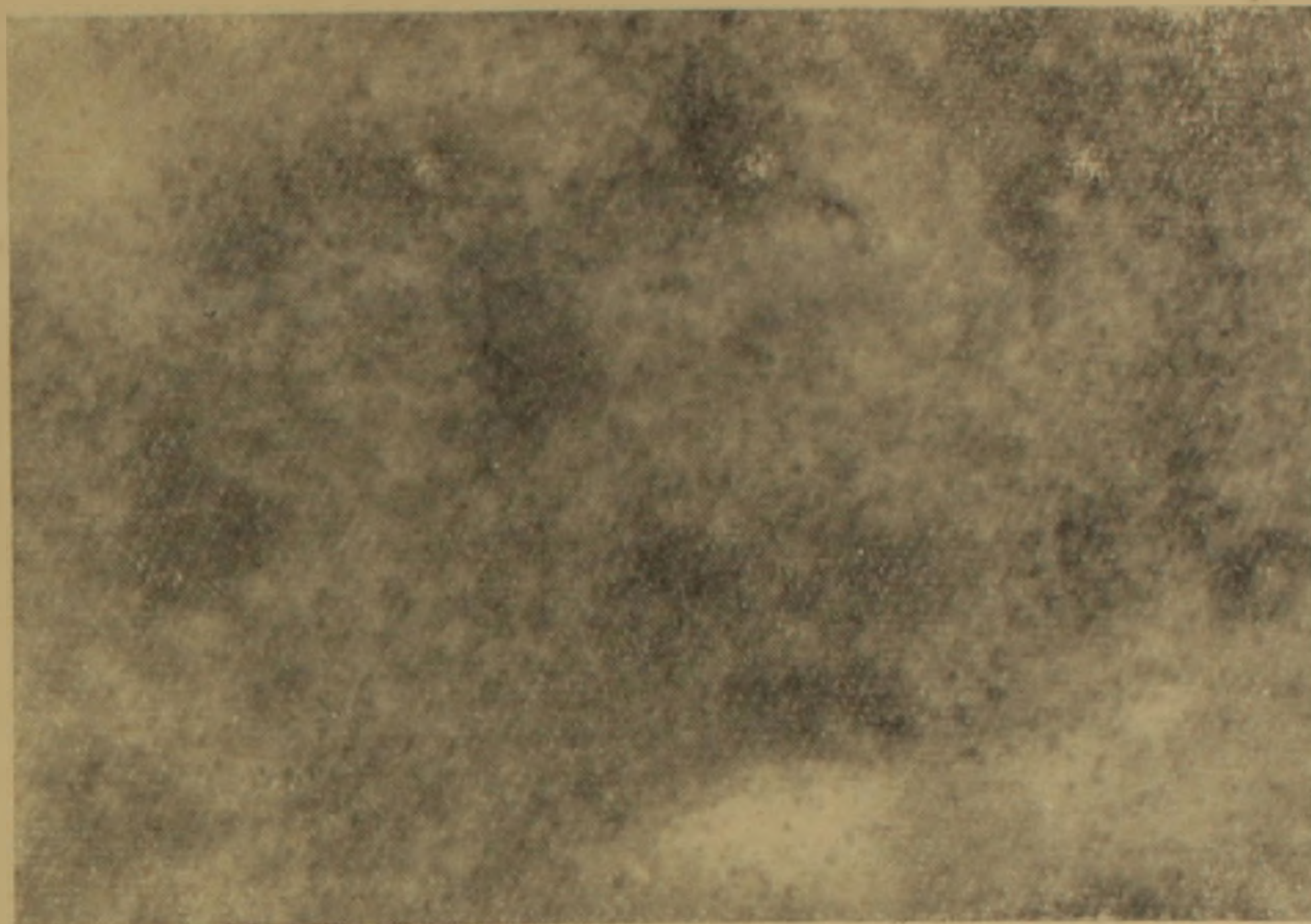


Рис. 7. Шейное утолщение спинного мозга. Мотонейроны переднего рога спинного мозга. Гистохимическая реакция на сукциндегидразную активность при введении ионов кадмия. Об. 45, ок. 10.

утолщения спинного мозга (рис. 6, 7). В отношении коры гексенал несколько уменьшал активность сукциндегидразы.

Следует заметить, что на контрольных срезах коры нам удалось обнаружить отдельные слои пирамидальных клеток и клетки Беца по интенсивности окраски; при воздействии гексенала уменьшается активность сукциндегидразы и трудно было найти границы этих клеток.

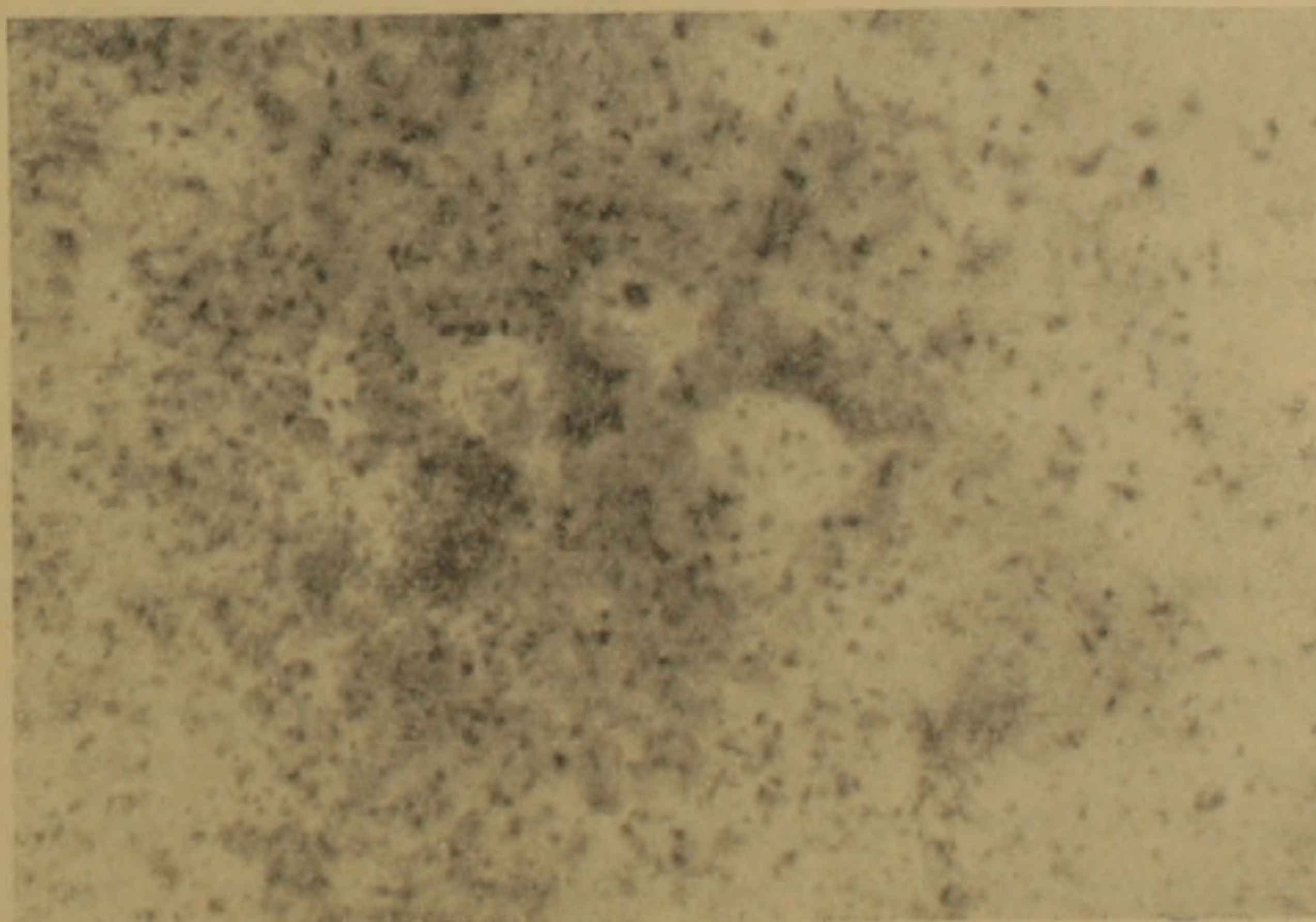


Рис. 8. Шейное утолщение спинного мозга. Мотонейроны переднего рога спинного мозга. Гистохимическая реакция на сукциндегидразную активность. Контроль. Об. 90, ок. 10.

Кофени не вызывает заметных изменений в активности сукциндегидразы в нейронах спинного мозга, а в коре значительно увеличивает активность фермента.

Ионы кадмия через 3 ч. после введения, по сравнению с контролем, (рис. 8) увеличивают активность сукциндегидразы в основном в мотонейронах передних рогов шейного утолщения спинного мозга (рис. 7). В последующие дни этот факт не отмечается, а скорее имеется некоторое снижение активности сукциндегидразы в разных отделах центральной нервной системы. В разных отделах центральной нервной системы одни и те же фармакологические агенты могут оказывать различное воздействие.

Приведенный фактический материал позволяет предполагать, что вероятно фармакологическое торможение корковых центров может индуцировать процесс возбуждения в нижележащих отделах центральной нервной системы.

В отношении эффекта кадмия интересно то, что в первый период своего действия ионы кадмия способствуют активации сукциндегидразы в нейронах спинного мозга. Выяснение механизма этого эффекта будет иметь важное значение если учесть, что ионы кадмия принято считать тиоловым ядом, а сукциндегидразу как тиоловый фермент.

Сектор биохимии
АН АрмССР

Поступило 15.VI 1960 г

Ա. Ա. ԳԱԼՈՅԱՆ, Ռ. Ֆ. ՄԱՆԱՍՅԱՆ

ԿԵՆՏՐՈՆԱԿԱՆ ՆՅԱՐԴԱՅԻՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳՈՒԹՅԱՆ ՄԵՋ
ՍՈՒԿՑԻՆԴԵԳԻԴՐԱԶԱՅԻ ՀԱՅՏՆԱԲԵՐՄԱՆ ՄԵԹՈԴԻ ՇՈՒՐՋԸ
ԵՎ ՎԵՐՋԻՆԻՍ ՓՈՓՈԽՄԱՆ ՄԻ ՔԱՆԻ ՏՎՅԱԼՆԵՐԻ ՏԱՐԲԵՐ
ԱԶԳԱԿՆԵՐԻ ԴԵՊԲՈՒՄ

Ա մ ֆ ո փ ու մ

Ներօրային իմպուլսի կազմակերպումը ռեցեպտորներում կախված է այդ հատվածներում բիոլոգիական օքսիդացման վիճակից: Սակայն չափազանց քիչ են դրական ավյալները, որոնք ցույց տալիս առանձին ֆերմենտատիվ սխտեմաների և բարդ բիոլոգիական օքսիդացման կապը այն մորֆոլոգիական միավորների հետ, որոնց մեջ կազմակերպվում է այդ իմպուլսը: Դա մասամբ բացատրվում է բջջա- և հիստոքիմիական սպեցիֆիկ ու հուսալի մեթոդների բացակայությամբ:

Ներկա հետազոտությունը մենք ուսումնասիրել ենք սուկցինդեհիդրազայի փոփոխությունը կենտրոնական նյարդային համակարգում տարբեր բջիջներում այն ազդակների ազդեցության տակ, որոնք այս կամ այն կերպ փոփոխում են ներօրային հիմնական պրոցեսները սինապսներում (կադմիումի իոններ, կոֆեին, հեքսենալ): Մենք կատարել ենք մեթոդական փոփոխություններ, որոնք հնարավորություն են տվել կենտրոնական նյարդային համակարգում բոլոր հատվածներում ալելի ցայտուն կերպով հայտնաբերելու ալելի շատ բջիջներ: Առանձնակի ուշադրություն ենք դարձրել ռեակցիոն

խառնուրդների pH-ի, վերջիններիս կոնցենտրացիաների, ինչպես նաև ջերմաչին գործոնի վրա:

Ցույց են տրված այն օպտիմալ պայմանները, որոնք լրիվ կերպով հայտնաբերում են նշված ֆերմենտի ակտիվությունը:

Մեթոդական վերափոխությունները հնարավորություն են տվել ավելի լավ հայտնաբերելու բջիջներում տեղի ունեցող փոփոխությունները տարբեր ազդակների ներգործության դեպքում:

Օրինակ, կադմիումի իոնների ներարկումից 3—4 ժամ հետո բարձրանում է ֆերմենտի ակտիվությունը ողնուղեղի բջիջներում: Հեքսենալի ազդեցության տակ բարձրանում է ֆերմենտի ակտիվությունը ողնուղեղի բջիջներում, իսկ ուղեղի կեղևի բջիջներում, ընդհակառակը, իջնում է:

Կոֆեինը բարձրացնում է ֆերմենտի ակտիվությունը ուղեղի բջիջներում, իջեցնում է վերջինիս ակտիվությունը ողնուղեղի բջիջներում:

Բերված ամփոփումները թույլ են տալիս եզրակացնելու, որ ֆարմակոլոգիական արգելակումը կեղևային կենտրոններում կարող է ինդուկցիայի ենթարկել զրգուման պրոցեսները կենտրոնական նյարդային համակարգության պերիֆերիկ հատվածներում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Flexner L. B. Biochemistry of the developing nervous system. Ed. Wallcehh New York, 1955.
2. Португалов В. В. и Яковлев В. А. ДАН СССР, 113, 1955.
3. Seligman A. M. Rutenberg A. M. Science, 113, 1951.
4. Shelton E. and Schneider W. Anat. Record, 112, 1951.
5. Галоян А. А. ДАН АрмССР, 1956.
6. Галоян А. А. Тр. науч. конференции Украинского научно-исследовательского института по проблеме „Тиоловые соединения в медицине“. Киев, 1959.
7. Галоян А. А. Проблемы эндокринологии и гормонотерапии. 1, 1960.
8. Галоян А. А. Проблемы эндокринологии и гормонотерапии. 6, 1959.