

УДК 576.311.3-47+577.152.14

МОДИФИКАЦИЯ ЛИПИДНОЙ КОМПОНЕНТЫ НАРУЖНЫХ  
МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН ГОЛОВНОГО МОЗГА  
МЫШЕЙ И КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ  
МАО ПРИ ИЗМЕНЕНИИ АКТИВНОСТИ  
СЕРОТОНИНЭРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ВВЕДЕНИЕМ  
АНТИОКСИДАНТА

МОЛОЧКИНА Е. М., БОРОВОК Н. В., БУРЛАКОВА Е. Б.

Институт химической физики АН СССР, Москва

При облегчающем активацию серотонинергической системы действии антиоксиданта инозола изучены изменения липидов наружных митохондриальных мембран головного мозга мышей и кинетических свойств мембраносвязанной МАО. Через 18 ч после внутрибрюшинного введения инозола в дозе 20 мг/кг увеличиваются соотношения фосфолипиды/белок, фосфолипиды/общие липиды, снижается уровень холестерина, уменьшается микровязкость липидного бислоя (оцененная методом спинного зонда); происходит интенсификация ПОЛ; несколько изменяется процентный состав фосфолипидов.

В то время как субстратная зависимость скорости реакции дезаминирования тирамина подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен, в случае серотонина наблюдается сложная зависимость начальной скорости реакции от его концентрации и в опыте, и в контроле. Это проявляется в наличии промежуточного плато на начальном участке и двух максимумов—при низких и высоких концентрациях субстрата, связанных с присутствием двух типов МАО—А и Б. Для обоих типов фермента отмечается субстратное ингибирование, степень которого в опытных пробах меньше, чем в контроле. Для МАО типа А в опыте имеет место сдвиг субстратной зависимости в область более высоких концентраций серотонина. Для МАО типа А установлено, что при низких концентрациях субстрата скорость реакции в опыте ниже, чем в контроле, при высоких—наоборот. Особенности субстратной зависимости для серотонина объясняются с точки зрения наличия на мембране связывающих серотонин участков («рецепторов»), способных при связывании лиганда оказывать влияние на свойства фермента, локализованного в их окружении. Изменения свойств липидной фазы наружных митохондриальных мембран и кинетического поведения МАО обсуждаются с точки зрения их вклада в осуществление серотонинергической передачи.

Данная работа является частью исследований роли липидов клеточных мембран как модулятора активности серотонинергической нейромедиаторной системы. Предыдущие работы [1, 2] посвящены изучению роли липидов первичных окончаний (фракции синапсом головного мозга мышей), где сосредоточены собственно процессы восприятия и трансдукции серотонинового сигнала. Показано, что при ингибировании и активации серотониновой системы, оцениваемым по

соответствующим поведенческим тестам, имеют место существенные изменения в составе и структуре липидной компоненты, причем эти изменения не просто сопровождают процесс трансмиссии, а включены в него и являются для него существенными.

Не менее важными для функционирования серотониновой системы этапами являются процессы синтеза и деградации медиатора. Основным путем деградации серотонина является его окислительное дезаминирование MAO наружных митохондриальных мембран.

Целью настоящей работы было изучение роли состояния липидной компоненты этих мембран в функционировании локализованной в них MAO при изменении активности серотонинергической системы. В качестве воздействия, модулирующего активность этой системы, использовали антиоксидант (АО)—ингибитор свободнорадикального ПОЛ 4-метил-2,6-дитретбутилфенол (нонол).

### Материалы и методы

В работе использовали 320 беспородных мышей массой 18—23 г, содержавшихся на общесвиарном рационе.

Ионол вводили внутривентриально в дозе 20 мг/кг в дистиллированной воде. В качестве солюбилизатора использовали твин-80.

Для выделения митохондрий мышей быстро деканитировали, извлекали головной мозг и помещали на лед. Гомогенизацию и все дальнейшие операции проводили при 4°.

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования с очисткой от синапсом в градиенте плотности сахарозы [3]. Наружные мембраны митохондрий выделяли, используя осмотический шок и центрифугирование в градиенте плотности сахарозы [4].

Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [5], используя в качестве стандарта БСА.

Экстракцию липидов проводили методом, описанным Кейтсом [6].

Антиокислительную активность липидов определяли, используя метилолеатную окислительную модель [7].

Состав фосфолипидов наружных митохондриальных мембран определяли методом ТСХ на силикагеле. В качестве системы растворителей использовали смесь хлороформ:метанол:уксусная кислота:вода (50:30:8:4). Количество отдельных фракций фосфолипидов оценивали по содержанию Р<sub>i</sub> в снятых с пластинок пятнах [8].

Содержание общего холестерина в липидах определяли спектрофотометрически [9].

Мерой микровязкости липидной фазы наружных митохондриальных мембран было время корреляции вращения ( $\tau_c$ ) спинового зонда, представляющего собой меченную по карбоксильной группе нитроксильным радикалом жирную кислоту с цепочкой из 8 атомов углерода. Регистрацию спектров ЭПР проводили на ЭПР-спектрометре «Bruker» (ФРГ).  $\tau_c$  рассчитывали по формуле для быстро вращающихся зондов [10]:

$$\tau_c = 6,65 \cdot \Delta H \cdot (\sqrt{I_{+1} I_{-1}} - i) \cdot 10^{-10} \quad \text{с где}$$

$I_{+1}$  и  $I_{-1}$  —интенсивности низко- и высокопольной компоненты дифференциального спектра поглощения,  $\Delta H$  (гаусс)—расстояние между экстремумами высокопольной компоненты.

Активность MAO определяли в митохондриях мозга мышей (суб-

страт—серотонин гидрохлорид) по количеству выделившегося в результате реакции аммиака без его предварительной отгонки по методике, описанной нами в предыдущей работе [11]. Очищенную фракцию митохондрий суспендировали в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,6). Реакцию проводили в пробирках с притертыми пробками. Окисление вели кислородом воздуха при 37°, постоянно встряхивая. Среда инкубации содержала 0,5 мл суспензии митохондрий (0,5—0,7 мг белка), 0,3 мл фосфатного буфера. Реакцию начинали добавлением 0,1 мл раствора субстрата серотонина в том же буфере. Для фиксации реакции в среду инкубации (0,9 мл) добавляли 0,5 мл этанола («Мерск», ФРГ). Белок осаждали центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин), к супернатанту, количественно отделенному от осадка, добавляли 50 мкл реагента (раствора, содержащего в этом объеме по 10 мкмоль о-фталевого альдегида и 2-меркаптоэтанола). В «слепые» (или «нулевые») пробы этанол приливали до добавления субстрата. Пробы, закрытые пробками, оставляли на 2 ч в темном месте, после чего измеряли флуоресценцию при  $\lambda_{\text{возб.}} = 413$  нм,  $\lambda_{\text{исп.}} = 480$  нм. Для снятия калибровочных кривых использовали сернистый аммоний (ос. ч), который добавляли в «слепые» пробы, чтобы учесть влияние на флуоресценцию веществ, содержащихся в суспензии митохондрий. По соответствующим калибровочным кривым определяли количество выделившегося в реакции аммиака и рассчитывали активность фермента. Изучение кинетических кривых выделения аммиака в описанных выше условиях инкубации показало, что для корректного расчета начальной скорости реакции время инкубации не должно превышать 5 мин. При определении активности MAO все реактивы готовили на биодистиллированной воде.

Активность MAO наружных митохондриальных мембран с тирамином в качестве субстрата определяли методом изотермической отгонки выделившегося в результате реакции аммиака с последующей несселеризацией [20].

### Результаты и обсуждение

В предыдущих работах мы показали, что предварительное введение АО облегчало активацию серотонинергической системы п-хлорамфестином (п-ХА) [1, 2]. Активирующее действие п-ХА проявляется в возникновении специфического серотонинергического синдрома встряхивания головы у мышей [1]. На фоне предварительно введенного за 18 ч до п-ХА нонола этот синдром усиливался в 1,5 раза ( $35,7 \pm 1,6$  встряхиваний в мин после тестирующего введения п-ХА по сравнению с  $23,7 \pm 1,7$  у животных, не получавших нонол) [1].

Для выявления вклада липидной компоненты мембран в изменение активности серотонинергической системы через влияние на функционирование MAO мы изучали следующие за введением нонола изменения в составе и структуре липидной фазы наружных мембран митохондрий и изменения в кинетическом поведении MAO.

В табл. 1, 2 приведены данные об изменениях в липидах наружных мембран головного мозга мышей, наблюдавшиеся через 18 ч после введения 20 мг/кг нонола. Из таблиц видно, что после указанного воздействия при практически не изменившемся соотношении липиды/белок наблюдается существенное увеличение соотношения фосфолипиды/белок и двукратное увеличение содержания фосфолипидов в общих липидах. Содержание холестерина значительно падает, су-

Таблица 1

Изменение содержания фосфолипидов в наружных мембранах митохондрий головного мозга мышей через 18 ч после внутрибрюшинного введения 4-метил-2,6-дитретбутилфенола (инола) в дозе 20 мг/кг

Фракции фосфолипидов	Содержание фосфолипидов					
	% от суммы фосфолипидов			мкг / мг белка		
	**конт. роль	опыт	опыт / контроль	**конт. роль	опыт	опыт / контроль
Сфингомиелин	12,5±0,3	11,7±1,1	0,94	2,2±0,7	4,5±0,4	2,0*
Фосфатидилхолин	33,9±1,8	32,3±3,9	0,95	6,2±0,9	10,8±1,8	1,7*
Фосфатидилинозит - фосфатидилсерин	11,3±1,7	12,5±1,3	1,3*	2,6±0,7	6,8±0,5	2,6*
Фосфатидилэтаноламин	28,3±3,2	27,9±1,7	0,98	5,6±0,3	9,8±0,5	1,7*
Кардиолипин - фосфатидная кислота	8,7±1,2	7,1±1,6	0,81	2,0±0,2	2,2±0,6	1,1
Сумма фосфолипидов				18,2±2,3	34,1±3,8	1,9*

Примечание. В таблице представлены данные 4-х опытов; \*— $p \leq 0,05$ , \*\*—контрольным животным вводили Твин-80 (2%-ный раствор).

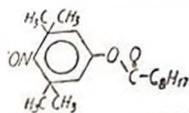
Таблица 2

Изменения в липидной компоненте наружных мембран митохондрий головного мозга мышей через 18 ч после внутрибрюшинного введения 4-метил-2,6-дитретбутилфенола (инола) в дозе 20 мг/кг

Параметры	Контроль**	Опыт	Опыт / Контроль
фосфолипиды (мкг Р)	10,7±2,5	21,3±1,1	2,0*
общие липиды (мг)			
фосфолипиды (мкг Р)	18,2±2,3	34,1±3,8	1,9*
белок (мг)			
общие липиды (мг/мг)	1,7±0,2	1,6±0,2	0,94
белок (мг/мг)			
холестерин (мкг/мг)	58±6	36,5±4,5	0,63*
общие липиды (моль/моль)			
холестерин (моль/моль)	0,25±0,03	0,1±0,02	0,35*
фосфолипиды (моль/моль)			
микровязкость при 25°C (с.с. **)	2,5±0,5	1,4±0,3	0,56*
АОА липидов (вал. ед.*** **)	-2200±400	-5500±900	-3300* (опыт) / контроль

Примечание. В таблице приведены данные 4-х опытов; \*— $p \leq 0,05$ , \*\*—контрольным животным вводили Твин-80 (2%-ный раствор),

\*\*\*—зонд



\*\*\*\*—АОА-антиокислительная активность липидов

щественно снижается и соотношение холестерина/фосфолипиды. Антиокислительная активность липидов наружных мембран митохондрий через 18 ч после введения нонола значительно уменьшена по сравнению с контролем, то есть можно предположить интенсификацию ПОЛ в митохондриях опытной группы. В соответствии с увеличением содержания общих фосфолипидов наблюдается увеличение количества отдельных фракций в расчете на мг белка. Что касается процентного содержания тех или иных фосфолипидов, то для большинства фракций оно практически не меняется. Исключение составляют фосфатидилсерин и фосфатидилинозит, суммарное содержание которых в общих фосфолипидах достоверно увеличивается. Описанным выше изменениям в составе фосфолипидов и их АОА соответствует и изменение структуры мембраны—микровязкость липидного бислоя (оцененная по  $\kappa$ , использованного спинного зонда) в опыте практически вдвое ниже, чем в контроле.

Таким образом, облегчающее активацию серотониновой системы введение антиоксиданта привело к выраженным изменениям в ряде параметров, характеризующих липиды наружных митохондриальных мембран головного мозга.

Будучи интегральным мембраносвязанным белком, MAO является липидзависимым ферментом, кинетические свойства которого зависят от состава и свойств липидного микроокружения. В рамках настоящей статьи, к сожалению, невозможно процитировать все касающиеся этого вопроса работы. Сошлемся только на результаты экспериментов, в которых, как и в данной работе, модификацию липидов митохондриальных мембран проводили введением  $n$ -нонола. Было исследовано влияние состава и структуры липидной компоненты на кинетические свойства MAO наружных митохондриальных мембран печени при использовании в качестве субстрата тирамина гидрохлорида [13]. Оказалось, что важными факторами, влияющими на средство мембраносвязанной MAO к субстрату,  $V$  и на степень характерного для этого фермента субстратного ингибирования, являются содержание кислых фосфолипидов, степень окисленности липидов, микровязкость липидного бислоя.

Используя в качестве субстрата тирамин, мы исследовали кинетические свойства MAO наружных мембран митохондрий мозга мышей после введения нонола. Оказалось, что для наружных мембран митохондрий мозга зависимость начальной скорости реакции от концентрации тирамина имеет такую же форму, как и в случае наружных мембран митохондрий печени, свидетельствующую об ингибировании «избытком» субстрата (рис. 1). Левая ветвь кривой подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Используя координаты Лайнувера-Берка и метод Корниш-Боудена [14], получили значения  $V$  в контроле и в опыте  $126 \pm 3$  и  $85 \pm 4$  нмоль  $\text{NH}_3/\text{мг}$  белка в мин и  $K_m$   $(4,0 \pm 0,1) \times 10^{-4}$  и  $(2,8 \pm 0,6) \times 10^{-4}$  М соответственно. Процент субстратного ингибирования при  $S_0 = 10$  мМ составлял в контроле 59%, в опыте—53%. Сопоставляя полученные после введения нонола изменения кинетических параметров MAO наружных мембран митохондрий мозга (субстрат тирамин) с изменениями в липидной компоненте и сравнив их с цитированными выше данными по ферменту, локализованному в митохондриях печени [13], можно заключить, что MAO мозга и печени идентичны в плане регуляторного влияния липидной фазы на кинетические свойства фермента. Это касается и связи  $\kappa$  с содержанием кислых фосфолипидов, и влияния микровязкости на  $\kappa$  и степень субстратного ингибирования, и трансформирующего влияния на активность MAO интенсификации ПОЛ.

Показав на примере тирамина в качестве субстрата, что MAO в печени и мозгу идентичны, приступили к изучению активности MAO митохондрий мозга по отношению к серотонину. Следует отметить, что при использовании тирамина определяли активность фермента в суспензии наружных мембран митохондрий, а при использовании серотонина—в суспензии целых митохондрий, имея в виду, что на поверхности митохондрий могут существовать рецепторы для серотонина, которые могут быть потеряны в процессе фрагментации митохондрий и очистки наружных мембран, а связывание серотонина с рецепторами может менять свойства мембран, что будет сказываться и на активности фермента.

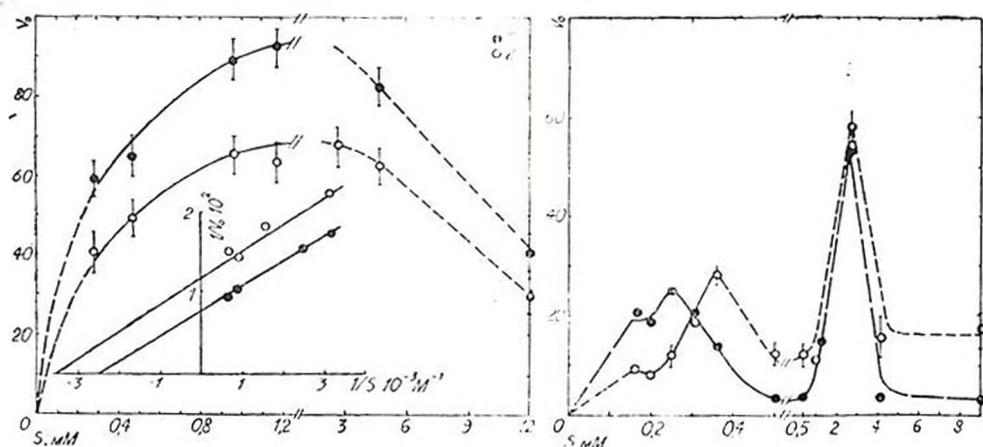


Рис. 1. Зависимость начальной скорости реакции окислительного дезаминирования тирамина гидрохлорида MAO наружных мембран митохондрий головного мозга мышей от концентрации субстрата (в имоль  $NH_3$ /мг белка·мин) 1—контроль, 2—опыт (18 ч после введения внутривенно мышам ионола в дозе 20 мг/кг). Среда инкубации содержала 1,0 мл суспензии наружных митохондриальных мембран (0,1 мг белка), 0,6 мл фосфатного буфера pH 7,6; 0,2 мл раствора тирамина гидрохлорида. Представлены результаты 4-х опытов. Для получения каждой точки проводили 3—4 параллельных определения

Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции окислительного дезаминирования серотонина гидрохлорида MAO митохондрий мозга мышей от концентрации субстрата (в имоль  $NH_3$ /мг белка·мин). 1—контроль, 2—опыт (18 ч после внутривенного введения ионола мышам в дозе 20 мг/кг). Среда инкубации содержала 0,5 мл суспензии митохондрий (0,5—0,7 мг белка), 0,3 мл фосфатного буфера pH 7,6, 0,1 мл раствора серотонина гидрохлорида в том же буфере. Представлены результаты 3-х опытов. Для получения каждой точки проводили 4—6 определений скорости реакции. Величины погрешности среднего арифметического вычислены для каждой точки, но на кривых они указаны в тех случаях, когда превышают диаметр выбранных символов

На рис. 2 представлена зависимость начальной скорости реакции окислительного дезаминирования MAO митохондрий мозга мышей контрольной и опытной группы от концентрации серотонина. Амплитуда изменений скорости при изменении концентрации субстрата, как видно из рисунка, в обоих случаях одна и та же. Это позволяет предположить, что количество ферментного белка одинаково в митохондриях опытной и контрольной группы, то есть введение животным ионола вряд ли сказалось на биосинтезе фермента. Из рис. 2

видно, что имеются области концентраций серотонина, где скорость реакции в опыте меньше, чем в контроле, есть участки, где, напротив, скорость реакции, катализируемой митохондриальной MAO опытной группы, превышает контрольный уровень. Эта разница позволяет сделать предположение о возможных различиях в кинетических параметрах MAO, связанных с различиями в микроокружении фермента.

Представленные на рис. 2 субстратные зависимости имеют очень сложный характер; они не являются тривиальными, что для такого сложного аллостерического фермента как MAO не удивительно. В литературе описаны случаи, когда авторы получали для локализованной в митохондриальной мембране MAO не менее сложную субстратную зависимость (и именно для субстрата серотонина) [15]. Как в опыте, так и в контроле на кривой субстратной зависимости обнаружено два выраженных максимума—в области относительно низких и в области относительно высоких концентраций субстрата. С чем это может быть связано?

В настоящее время считается, что MAO в мембранах представлена главным образом двумя типами фермента А и Б, отличающимися по субстратной специфичности, то есть по родству к соответствующим субстратам. Это не значит, что MAO типа А дезаминирует только свойственные ей субстраты (в том числе и серотонин), а MAO Б только «свой» субстрат. Степень участия того или иного типа MAO в дезаминировании зависит от концентрации субстрата-аминна [16]. Если родство MAO А по отношению к серотонину оценивается  $K_m$  примерно 0,07 мМ, то родство MAO Б к серотонину (не являющегося, как принято считать, ее субстратом)—  $K_m$  порядка 2 мМ [17]. Увеличение концентрации серотонина приводит, таким образом, к увеличению доли участия MAO типа Б в его дезаминировании [18].

Наличие «горбов» на кривой зависимости скорости реакции от концентрации серотонина, на наш взгляд, нельзя объяснить иначе, чем дезаминированием серотонина разными формами MAO. В области концентраций серотонина 0,1—0,5 мМ функционирует, по-видимому, форма А. Следует отметить, что именно эта область отражает реальное содержание серотонина в головном мозгу [20]. Этот факт подтверждает распространенное мнение, что в нормальной ситуации серотонин в мозгу дезаминируется исключительно MAO А, хотя количество MAO этого типа в серотонинергических нейронах очень мало [21].

Данные на рис. 2 кривые можно интерпретировать следующим образом. С увеличением концентрации серотонина активность MAO А сначала растет, затем падает, достигая минимального значения при  $S_0=0,5$  мМ. Это вполне соответствует известным из литературы данным об ингибировании MAO высокими концентрациями субстрата. При концентрации серотонина порядка 0,5 мМ активность фермента в большой степени зангибирована. При концентрациях, превосходящих 1,0 мМ, активность (теперь уже, по-видимому, только формы Б) снова возрастает, достигая максимума, затем снова наблюдается ингибирование высокими концентрациями субстрата.

В опыте и в контроле отмечается однопиковая зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. В области функционирования MAO Б кривые практически идентичны. Отличие состоит только в степени ингибирования субстратом. Из рис. 2 видно, что в опыте она меньше, чем в контроле. Характеризующее степень ингибирования отношение  $V$  при  $S_0=9$  мМ к  $V$  при  $S_0=3$  мМ

составляет в контроле 0,1, в опыте—0,28. Это соответствует полученным ранее данным (с тирамином в качестве субстрата) о снижении степени субстратного ингибирования MAO с уменьшением микровязкости липидного бислоя [13].

Наибольший интерес представляет сравнение субстратных зависимостей для опыта и контроля в области функционирования MAO А, так как, как уже говорилось выше, серотонин в мозгу дезаминируется исключительно этим типом фермента. Начальный участок полученных кинетических кривых, на наш взгляд, дает основание расценить их как так называемые кривые с промежуточным плато, наличие которого в субстратной зависимости описано для ряда аллостерических ферментов [22]. Чаще всего оно обусловлено существованием переходящих друг в друга форм фермента, отличающихся степенью кооперативности по эффектору-субстрату [22]. В каких же двух формах может существовать MAO типа А в мембране, чтобы это приводило к кривой с промежуточным плато? Нам кажется вероятным следующее объяснение. Помимо связывания серотонина на молекуле MAO (на каталитическом или аллостерическом эффекторном центре), может происходить связывание амина с расположенными на митохондриальной мембране участками связывания («рецепторами») серотонина. Нужно отметить, что такая возможность уже допускалась для объяснения сложного кинетического поведения митохондриальной MAO по отношению к серотонину [15]. Известно, что при связывании серотонина на митохондриальной мембране меняется структура липидного микроокружения «рецептора» [23]. Это должно сказаться на конформации расположенных вблизи молекул фермента, а это, в свою очередь, скажется на взаимодействии каталитических и эффекторных центров, то есть и на кинетической кооперативности. Общий пул молекул фермента складывается из молекул, локализованных вблизи «рецепторов» серотонина, и молекул, «удаленных» от них. Таким образом, мы можем иметь «смесь» двух форм фермента, отличающихся по кинетической кооперативности. Объяснив таким образом наличие промежуточного плато, рассмотрим различия, имеющиеся в субстратной зависимости MAO в опыте и в контроле. Как видно из рис. 2, различие прежде всего заключается в сдвиге субстратной зависимости для опыта в область более высоких концентраций серотонина. В соответствии с этим при концентрации амина меньшей 0,3 мМ скорость ферментативной реакции в опыте ниже, при концентрациях, больших 0,3 мМ—выше, чем в контроле. Интересно отметить, что по полученным нами данным (они будут приведены в другой публикации) количество серотонина в ткани головного мозга мышей через 18 ч после введения ипонола в 1,5 раза превышает уровень медиатора в мозгу контрольных животных. Обращает на себя внимание тот факт, что сдвиг субстратной зависимости в опыте по сравнению с контролем таков, что, начиная с концентрации субстрата примерно 0,2 мМ и, по крайней мере, до 0,35 мМ, скорость реакции в опыте и в контроле одинакова при концентрации серотонина в опыте примерно в 1,5 раза превышающей контрольный уровень (а это, как говорилось выше, как раз реально наблюдавшееся увеличение количества серотонина в мозгу мышей опытной группы). Можно себе представить, что именно этот сдвиг субстратной зависимости позволяет реализоваться повышенному уровню серотонина в опыте. При дальнейшем увеличении концентрации серотонина проявляется, по-видимому, компенсаторное увеличение скорости дезаминирования в опыте по сравнению с контролем. Таким образом, наблюдавшееся после действия ипонола изме-

нения кинетических свойств МАО могут вносить вклад в увеличенные количества серотонина (см. начальный участок рис. 2—уменьшенные скорости в опыте), реализацию действия этого увеличенного количества и возвращение его к нормальному уровню (увеличенные скорости в опыте по сравнению с контролем при «больших» концентрациях субстрата). Какое значение могут иметь при этом изменения в липидной компоненте мембраны? В случае введения мышам инола мы наблюдаем уменьшение микровязкости липидного бислоя (табл. 2). Известно, что текучесть липидной фазы влияет на связывание серотонина с рецепторами на синаптических мембранах. Согласно концепции «вертикального перемещения», с уменьшением вязкости (увеличением текучести) уменьшается доступность связывающих участков для лиганда [24]. Такую ситуацию мы и имеем после введения инола. Изменения в связывании серотонина отразятся на соотношении форм фермента, расположенных в зоне и вне зоны действия рецептора. Если принять это во внимание, то не вызывает удивления наблюдаемый в опыте сдвиг субстратной зависимости. В изменение скорости реакции может вносить свой вклад изменение интенсивности ПОЛ (проявляющееся в уменьшении АОА) мембранных липидов митохондрий опытной группы за счет уменьшения количества эффективных каталитических участков вследствие их трансформации [20]. Известно, что интенсификация ПОЛ ингибирует рецепторное связывание серотонина [25], что также может проявиться в форме и положении кривой субстратной зависимости. Большая текучесть липидной фазы «опытных» мембран может обеспечить меньшую степень ингибирования «избытком» субстрата [13], что будет способствовать нормализации увеличенного уровня серотонина.

Все вышесказанное позволяет заключить, что модификация липидов митохондриальных мембран головного мозга, изменяя кинетические свойства МАО, может вносить вклад в реализацию стимулирующего действия АО на серотонинергическую систему. Этим подтверждается важная роль липидной компоненты клеточных мембран на различных этапах функционирования данной нейромедиаторной системы.

## CHANGES OF MOUSE BRAIN MITOCHONDRIAL OUTER MEMBRANE LIPID PHASE AND KINETIC PROPERTIES OF MEMBRANE-BOUND MONOAMINE OXIDASE (MAO) AFTER THE ADMINISTRATION OF AN ANTIOXIDANT IN VIVO

MOLOCHKINA YE. M., BOROVOK N. V., BURLAKOVA YE. B.

Institute of Chemical Physics, USSR Academy of Sciences, Moscow

Changes of mouse brain mitochondrial outer membrane lipid phase were studied after the activation of the serotonergic system by an antioxidant. Eighteen hours after the administration of ionol (20 mg/kg) we observed an increase in the phospholipid/protein and phospholipids/total lipids ratio. The level of cholesterol decreased and lipid bilayer fluidity (evaluated by the spin probe technique) decreased as well. Lipid peroxidation intensified and some changes in the level of phospholipids were noted. The relationship between the substrate concentration and the reaction rate was hyperbolic with tyramine as a substrate but a complex and non-standard with serotonin, i. e., the curve had a plateau

and two maxima—one at low and the other at high substrate concentration. These maxima are attributed to two MAO types —A and B. Both MAO types are substrate-inhibitable, but the inhibition was less in the experimental group, than in the control one. After ionol injection the curve shifted towards higher serotonin concentrations for MAO type A. Mitochondrial type A MAO of animals, which received AO, deaminated serotonin slower at low substrate concentrations and faster at high substrate concentrations as compared with control mitochondria. The type of substrate dependence is discussed from the point of view of a possible existence of serotonin „receptors“ on the mitochondrial membrane. Changes in mitochondrial outer membrane lipid phase and kinetic properties of MAO are discussed in terms of their contribution to serotonergic transmission.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Боровок Н. В., Молочкина Е. М., Дубинская Н. И., Бурлакова Е. Б. Нейрохимия, т. 7, № 2, с. 178—188, 1988.
2. Боровок Н. В., Молочкина Е. М. — В сб.: II Международная школа-конф. молодых ученых соц. стран «Молекулярные основы биотехнологии», с. 51—52, Пушкино, 1987.
3. Методы биохимических исследований (под ред. Прохоровой М. П.), Л., Изд-во ЛГУ, 1982.
4. Schinatlman C., Ervin V. G., Greenwalt J. W. J. Cell. Biol., v. 32, № 2, p. 729—735, 1967.
5. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall K. J. J. Biol. Chem., v. 193 № 1, p. 423—434, 1951.
6. Кейтс М. Техника липидологии, М., Мир, 1975.
7. Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М., Пальмина Н. П., Храпова Н. Г. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте, М., Наука, 1975.
8. Биохимическое исследование мембран (под ред. Мэдди Э.), М., Мир, 1979.
9. Sperry W. H., Webb M. J. Biol. Chem., v. 187, p. 96—106, 1950.
10. Кузнецов А. Н. Метод спинного зонда, М., Наука, 1976.
11. Молочкина Е. М., Боровок Н. В. Нейрохимия, т. 8, № 2, с. 311, 1989.
12. Бурлакова Е. Б. — В сб.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ, с. 23—25, М., Наука, 1981.
13. Бурлакова Е. Б., Кайране Ч. Б., Молочкина Е. М., Хохлов А. П. Вopr. мед. химии, т. 30, № 1, с. 66—72, 1984.
14. Корниш-Боден Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 1979.
15. Васильевых Л. Т., Горкин В. З., Каган З. С. Биохимия, т. 44, № 9, с. 1542—1550, 1979.
16. Murphy D. L., Garrick N. A., Cohen R. M. -In: Antidepressants, p. 209—227, Elsevier Science Publ., 1983.
17. Pearce I. B., Roth J. A. Biochem. Pharmacol., v. 33, p. 1809—1811, 1984.
18. Вережкина И. В., Асина В. В., Горкин В. З., Машковский М. Д. Нейрохимия, т. 6, № 3, с. 332—339, 1987.
19. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.
20. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине, М., Медицина, 1981.

21. Denney R. M., Denney C. B. *Pharmac. Ther.*, v. 30, p. 227—259, 1985.
22. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты, М., Наука, 1978.
23. Rosenberg P. H. *Arch. Pharmacol.*, v. 307, p. 199—203, 1979.
24. Heron D. S., Shinitzky M., Hershkovitz S. D. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA, Biol Sci.*, v. 77, p. 7463—7467, 1980.
25. Либс М. Л., Богданова Е. Д., Розенберг А. Е., Прилико Л. П., Козлов Ю. П., Каган В. Е. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 92, № 11, с. 552—554, 1981.

Поступила 10.XI.1989

---

*Neurobiology of Invertebrates Transmitters, Modulators and Receptors (Symposia Biologica Hungarica 36) eds. J. Székely, K. S-Rózsa, Akadémiai Kiadó, Budapest, 750 p., 1988.*

*Нейробиология транмиттеров, модуляторов и рецепторов беспозвоночных.*

Настоящее издание содержит материалы симпозиума, входящего в рамки II Международного конгресса по нейрохимии, охватывающие широкий спектр исследований нейронов мозга и поведения беспозвоночных животных. К ним относятся физиология, фармакология и локализация специфических химических соединений, пептидергические механизмы, проблемы модуляции, интеграции и обучения, равно как и ионные каналы и внутриклеточные механизмы процессов, происходящих в мозгу моллюсков и членистоногих. В книге обсуждаются такие аспекты исследования нейротрансмиттеров, как взаимодействие транмиттеров и модуляторов, взаимосвязь между химическими веществами и ионными каналами, роль внутриклеточных процессов в ходе и после действия транмиттеров, равно как и иммунохимическое детектирование локализации транмиттеров. Новые результаты, полученные с помощью простых модельных систем, расширяют основы знаний, полезных для понимания сходных процессов в ЦС высших животных и человека. Значительный интерес к рассматриваемым в сборнике материалам симпозиума вызывает и то обстоятельство, что они представлены широким кругом авторитетных исследователей из 15 стран мира.