



# НЕЙРОХИМИЯ

т. 5, № 1, 1986

УДК 612.273.1:612.822.1:577.152.1.43

## АКТИВНОСТЬ МАО И УЛЬТРАСТРУКТУРА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ГИПЕРОКСИИ

КРИЧЕВСКАЯ А. А., ГОРОШИНСКАЯ И. А., ФЕДОРЕНКО Г. М.,  
ХОДАКОВА А. А.

Ростовский ордена Трудового Красного Знамени государственный  
университет им. М. А. Суслова

Электронно-микроскопическое исследование установило значительные изменения ультраструктуры нейронов коры больших полушарий и среднего мозга в судорожной фазе гипероксии, проявляющиеся в набухании митохондрий, снижении числа и дезориентации крист, исчезновении лизосом. В компенсаторной фазе гипероксии изменения в ультраструктуре нейронов менее выражены. Активность МАО типа А в митохондриальной фракции мозга снижается по мере усиления тяжести кислородной интоксикации, что сопровождается изменением субстратной специфичности фермента и выходом его в цитоплазму. Полученные данные свидетельствуют о нарушении структуры и проницаемости мембран при острой гипероксии.

Важнейшими пусковыми универсальными механизмами в развитии кислородной интоксикации являются усиление свободнорадикальных процессов и повышение интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ), ведущие прежде всего к изменению состояния мембранных структур и модификации свойств мембранных ферментов. Усиление ПОЛ при параллельном снижении антиокислительной активности липидов при гипероксии наблюдали в мозгу, легких, сердце, печени, почках, селезенке, эритроцитах [1, 2]. Ранее нами установлены в условиях гипероксии существенные изменения каталитических свойств МАО [амин:кислород-оксидоредуктаза (дезаминирующая) (флавинодержащая), КФ 1.4.3.4], ведущего фермента моноаминергических медиаторных систем [3]. МАО является типичным митохондриальным ферментом; он локализован на наружной мемbrane митохондрий и рассматривается в качестве ее маркерного фермента [4]. При гипероксии изменяется также активность других мембранных ферментов— $Mg^{2+}$ -ATРазы и  $K^+$ ,  $Na^+$ -ATРазы [5, 6].

В настоящей работе сопоставлены результаты электронномикроскопических исследований в структурах среднего мозга и больших полушарий головного мозга с активностью митохондриальной МАО.

Поскольку в мозгу различают две формы фермента—МАО типа А (ингибитор хлоргиллина, основные субстраты серотонин и норадреналин) и МАО типа Б (ингибитор депренила, субстраты бензиламина,  $\beta$ -фенилэтиламина и метилгистамина) [7], исследовали влияние гипероксии на активность обеих форм фермента.

### Материалы и методы

Эксперименты проводили на взрослых беспородных белых крысах обоего пола массой 150—180 г. Исследовали влияние на животных трех режимов гипероксии: 0,2 МПа  $O_2$  в течение 1 ч, 0,3 МПа  $O_2$  в течение 2 ч, 0,7 МПа  $O_2$  до наступления судорог (в среднем 30 мин). Заданные условия гипероксии создавали в специальной барокамере, снабженной щелочным поглотителем углекислоты, при постоянном режиме компрессии и декомпрессии 0,2 МПа в 1 мин.

Животных декапитировали и все последующие процедуры вели на холду. Для электронно-микроскопического исследования кусочки мозга объемом до 1  $mm^3$ , извлеченные из области коры больших полушарий и крыши среднего мозга, фиксировали в глутаральдегиде на фосфатном буфере по Зеренсену и затем в  $OsO_4$  по Миллонингу. Заливку материала проводили в эпон-аралдит. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме Bs-490 A («Tesla», ЧССР), дополнительно окрашивали в солях свинца по Рейнольтсу и в уранилацетате [8]. Срезы исследовали в электронном микроскопе Bs-242 («Tesla», ЧССР).

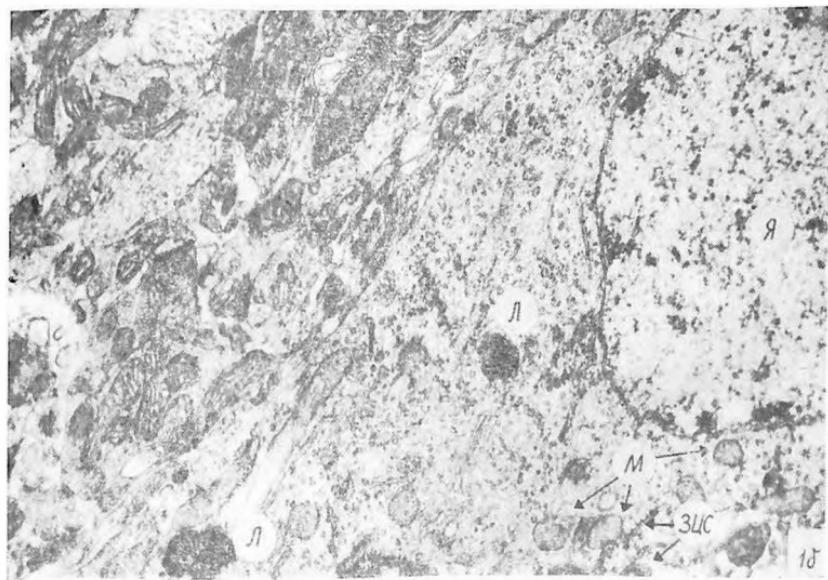
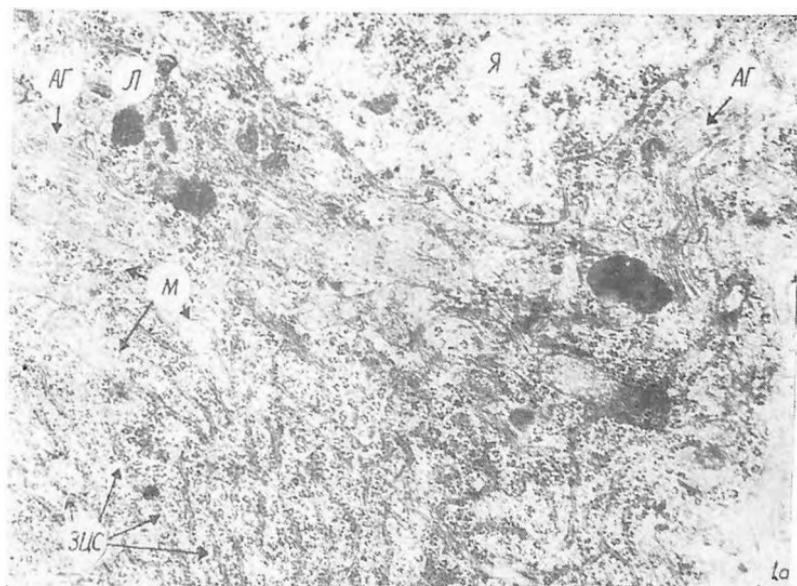
Активность МАО определяли в митохондриальной фракции и супернатанте, полученных после осаждения митохондрий при 20000 g, 20 мин. Мозг гомогенизировали в 0,2 M растворе сахарозы, приготовленном на 0,02 M фосфатном буфере рН 7,45. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [9]. В ряде опытов исследовали активность МАО в коре больших полушарий головного мозга и среднем мозгу. Мозг разделяли по Glowinski, Iversen [10]. Активность МАО типа А (субстраты серотонина и норадреналина), а также дезаминирование глюкозамина, пуресцина, ГАМК и АМР определяли по освобождению аммиака после инкубации суспензии митохондрий или супернатанта с одним из субстратов в насыщающей концентрации (для серотонина—2,5 mM, для остальных субстратов—10 mM). Инкубацию проводили в воздушной среде при 37,5° и рН 7,45 в течение 30 мин [11]. Содержание аммиака определяли спектрофлуориметрическим методом на флуориметре марки «Hilachis» 650—60 [12] после изотермической отгонки [13]. Активность МАО типа Б исследовали колориметрическим методом с использованием в качестве субстрата *n*-нитрофенилэтиламина [9]. Белок определяли по модифицированному методу Lowry [14].

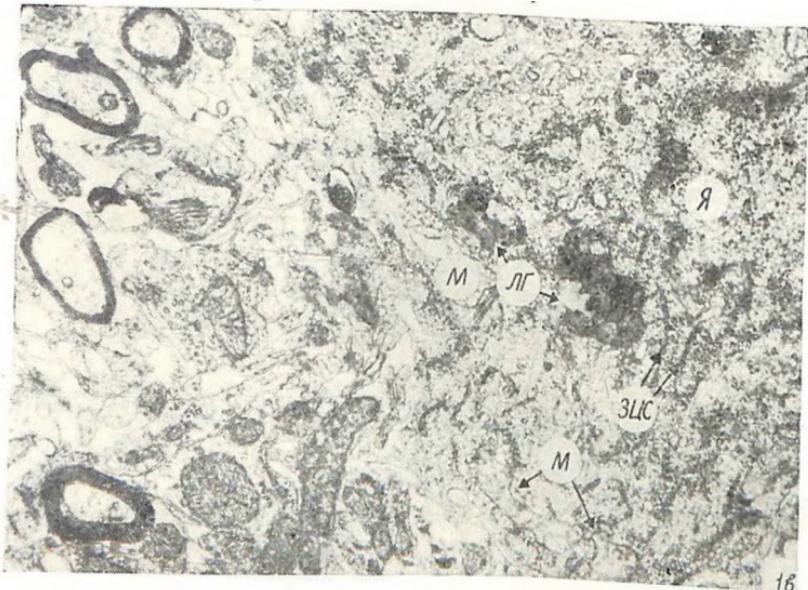
При исследовании влияния ингибиторов МАО хлоргиллина и депренила\* суспензию митохондрий или супернатант преинкубировали с одним из ингибиторов в течение 15 мин при 20°. Ингибиторы использовали в концентрации  $10^{-6}$  M, при которой они обладают максимально избирательным действием [7].

### Результаты и обсуждение

Электронно-микроскопические исследования показали, что при действии на животных 0,2 МПа  $O_2$  в течение 1 ч изменений в ультраструктуре нейронов как среднего мозга, так и коры больших полушарий не обнаруживается; лишь в отдельных клетках наблюдается незначительное набухание митохондрий.

\* Хлоргиллин и депренил были любезно предоставлены В. З. Горкиным (Институт биологической химии АМН СССР, Москва).





Пирамидный нейрон крыши среднего мозга крысы в контроле (а),  
после действия 0,3 МПа кислорода (б), 0,7 МПа кислорода (в)  $\times 35000$ .  
АГ—аппарат Гольджи, Л—лизосомы, ЛГ—линофусциональная гранула, М—  
митохондрия, ЗЦС—зернистая цитоплазматическая сеть, Я—ядро.

2-часовое воздействие 0,3 МПа  $O_2$  выявило существенные изменения ультраструктуры внутриклеточных органоидов (рис. 1, б). Митохондрии в большинстве своем выглядят более электронноплотными, чем в контроле (рис. 1, а). Канальцы эндоплазматической сети несколько набухшие, укорочены и беспорядочно расположены по всей цитоплазме. Уменьшается число небольших вакуолей, заполненных электронноплотным содержимым. Ядро выглядит более просветленным.

Наиболее выраженные изменения ультраструктуры нейронов обнаружены при анализе препаратов мозга в судорожной фазе кислородной интоксикации—при действии на животных 0,7 МПа  $O_2$  (рис. 1, в). Митохондрии набухают, число крист в них снижается, в некоторых митохондриях наблюдается полное разрушение крист, снижается электронная плотность матрикса. Лизосомоподобные структуры не отмечается, зато в изобилии встречаются липофусциновые гранулы размером до 2 мкм. Канальцы эндоплазматической сети немногочисленны и дезориентированы. Пузырьки и вакуоли эндоплазматической сети и аппарата Гольджи значительно набухают.

Следует отметить значительные различия в индивидуальной чувствительности животных к действию повышенного давления кислорода. Об этом свидетельствуют как различия во времени наступления судорог, так и результаты электронно-микроскопического исследования. Если у одних животных существенные повреждения внутриклеточных органоидов, степень выраженности которых в ряде случаев несовместима с жизнью, наблюдаются во всех исследованных клетках, то у других, паряду со значительно поврежденными клетками, встречаются отдельные нейроны с малоповрежденной структурой.

Существенные изменения в ультраструктуре нейронов коры больших полушарий и клеток печени в условиях острой гипероксии обнаружены также Масловой и соавт. [15]. Установлены также изменения под влиянием гипероксии ультраструктуры сердечной мышцы [16].

Результаты исследования активности МАО при разных режимах гипероксии представлены в табл. 1. Активность МАО типа А достоверно не изменяется при действии на животных 0,2 МПа  $O_2$  в течение 1 ч, а в условиях 2-часового действия 0,3 МПа  $O_2$  снижается на 41% с норадреналином в качестве субстрата и на 47%—с серотонином. В судорожную фазу кислородной интоксикации дезаминирование норадреналина снижается в среднем на 68%, серотонина—на 74%. причем почти у половины исследованных животных наблюдается полное ингибиция активности ферmenta. При этом выявлены различия чувствительности к гипероксии фермента в зависимости от локализации. В среднем мозгу наблюдается 100%-ное ингибирование активности МАО типа А у всех исследованных животных. В коре же больших полушарий лишь у 3-х животных из 12-ти имеет место полное ингиб-

рование активности фермента, у остальных же активность МАО типа А снижается в среднем на 29% ( $p < 0,02$ ):

Активность МАО типа Б, непосредственно не связанная с обменом медиаторов, не изменяется даже в судорожную фазу гипероксии. Ранее нами было показано, что снижение активности МАО типа А в предсудорожную и судорожную фазы кислородной интоксикации сопровождается появлением в митохондриальной фракции способности дезаминировать аминосахара, путресцин, ГАМК и двукратным усилением интенсивности дезаминирования АМР [3, 17].

Таблица 1  
Активность МАО типа А митохондрий мозга при гипероксии (в нмоль азота аминака/мг белка/мин)

Субстраты дезаминирования	Условия опыта			
	контроль	0,2 МПа, 1 ч	0,3 МПа, 2 ч	0,7 МПа, судороги
Серотонин	8,50±0,33 (18)	7,33±0,70 (10) $p > 0,05$	4,47±0,27 (8) $p < 0,001$	2,20±0,49 (19) $p < 0,001$
Норадреналин	5,57±0,17 (27)	4,93±0,57 (11) $p > 0,05$	3,30±0,30 (8) $p < 0,001$	1,76±0,45 (21) $p < 0,001$

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 в скобках указано число опытов.  $p$ —достоверность отличий от контроля.

Как видно из табл. 2, блокирование каталитического центра МАО типа А при преинкубации с избирательно действующим ингибитором МАО типа А хлорглицином, предотвращает усиление интенсивности дезаминирования глюкозамина и путресцина и не влияет на увеличение интенсивности дезаминирования АМР. Преинкубация с ингибитором МАО типа Б депренилом не оказывает влияния ни на дезаминирование глюкозамина и путресцина, ни на дезаминирование АМР. Следовательно, появление в митохондриальной фракции в условиях гипероксии глюкозамин- и путресцин-дезаминазной активности обусловлено качественным изменением каталитических свойств (трансформацией) МАО типа А, сходным с обнаруженным при целом ряде других патологических состояний: облучении, злокачественном росте, гипервитаминозе  $D_2$  [18], холодовом стрессе [19], гипоксии [20]. Усиление дезаминирования АМР в условиях гипероксии так же, как и при холодовом стрессе [19], не связано с МАО.

Изменение каталитических свойств МАО при гипероксии может быть обусловлено нарушением связи фермента с митохондриальными мембранными и выходом его в цитоплазму. В этой связи исследовали интенсивность дезаминирования серотонина и глюкозамина в супернатанте, полученном после осаждения митохондрий. Из табл. 3 видно, что в условиях гипероксии (судорожная фаза) в супернатанте появляется способность дезаминировать со значительной скоростью

серотонин и глюкозамин. Интенсивность дезаминирования серотонина возрастает более чем в 4 раза, дезаминирования глюкозамина — почти в 15 раз. Преинкубация с хлорглицином препятствует увеличению интенсивности дезаминирования серотонина и глюкозамина, что свидетельствует оmonoаминоксидазном происхождении индуцируемой в супернатанте активности. Активность МАО типа Б не изменяется в супернатанте при гипероксии.

Таблица 2

Влияние ингибиторов МАО (в нмоль азота аминака/мг белка/мин) на дезаминирование некоторых азотистых соединений митохондриями мозга при гипероксии (0,7 МПа судороги)

	С у б с т р а т ы, д е з а м и н и р о в а н и я				
	п-нитрофенил-этапмин	серотонин	глюкозамин	АМФ	путресцин
Контроль	3,43±0,16 (14)	8,42±0,54 (11)	0,54±0,24 (13)	2,45±0,31 (11)	0,59±0,24 (11)
Без ингибитора	2,78±0,20 (8)	4,85±0,58 (9)	5,48±0,95 (9)	5,09±0,62 (9)	2,48±0,48 (8)
Хлорглицин	2,72±0,20 (8)	0,011±0,007 (9)	1,72±0,72 (9)	5,71±0,68 (9)	1,06±0,23 (7)
Депренил	p>0,05 0,28±0,09 (8) p<0,001	p<0,001 4,05±0,49 (9)	p<0,01 4,35±1,00 (8)	p>0,05 5,72±0,66 (8)	p<0,05 2,21±0,28 (9) p>0,05

Процесс снижения активности МАО типа А в митохондриях и возникновение ее в супернатанте позволяет считать, что одним из механизмов ингибирования этого фермента в условиях гипероксии является его выход в супернатант в результате деструкции митохондриальных мембран. Отсутствие изменений активности МАО типа Б подтверждают имеющиеся в литературе данные о значительно большей зависимости МАО типа А по сравнению с МАО типа Б от липидного микроокружения и целостности митохондриальных мембран [21].

Полученные нами данные свидетельствуют о сопоставимости результатов электронной микроскопии и исследования активности МАО при разных режимах гипероксии. При 1-часовом воздействии 0,2 МПа О<sub>2</sub> не обнаружено ни нарушения ультраструктурды внутриклеточных органоидов, ни изменения активности маркерного фермента митохондрий. При 2-часовом воздействии 0,3 МПа О<sub>2</sub> наблюдаются как изменения в ультраструктуре нейронов, так и снижение активности МАО. Однако они относительно незначительны и, по-видимому, обратимы. Первый режим гипероксии повсеместно используется в клинической практике. Полученные нами данные подтверждают отсутствие структурных изменений в головном мозгу при данном режиме. Второй режим приводит организм в состояние компенсаторной фазы кислородной интоксикации и не вызывает несовместимых с жизнью изменений

в структуре и метаболизме клеток. В судорожной фазе кислородной интоксикации имеют место как ярко выраженное нарушение ультраструктуры внутриклеточных органоидов, так и значительное изменение каталитических свойств МАО. Судорожная фаза гипероксии приводит к гибели до 30% исследуемых животных. Продолжение экспозиции при данном режиме гипероксии вызывает гибель всех животных.

Таблица 3

Дезаминирование серотонина и глюкозамина в супернатанте мозга при гипероксии и влияние хлорглицина (в нмоль азота аминака/мг белка/мин)

Субстраты дезаминирования	Условия опыта		
	контроль	0,7 МПа, судороги	0,7 МПа, судороги+хлорглицин
Серотонин	0,347±0,12 (16)	1,49±0,12 (16) $p < 0,001$	0,03±0,01 (5) $p > 0,05$
Глюкозамин	0,13±0,04 (14)	1,82±0,23 (9) $p < 0,001$	0,21±0,11 (5) $p > 0,05$

Структуры среднего мозга более чувствительны к действию гипероксии по сравнению с корой больших полушарий, что подтверждают как данные электронной микроскопии, так и результаты исследования МАО. Это согласуется с ведущей ролью мезодиэнцефально-го отдела в развитии судорожной активности при гипероксии [22, 23].

Выраженные изменения ультраструктуры митохондрий наблюдаются только в соме нейронов; митохондрии, расположенные в отростках нейронов, не повреждаются. Это же отмечали и другие исследователи [15]. Следовательно, можно полагать, что под влиянием гипероксии изменяются в основном свойства МАО, локализованной в соме нейронов.

Изменение каталитических свойств МАО связывают с окислением сульфогидрильных групп фермента липидными перекисями [18]. Результаты данной работы, показавшие возможность выхода митохондриальной МАО в супернатант и ярко выраженные изменения ультраструктуры митохондрий, свидетельствуют об определенном вкладе в изменение каталитической активности МАО нарушения связи фермента с наружной митохондриальной мембраной, также, очевидно, обусловленного в значительной степени перекисным окислением мембранных липидов. На важную роль липидов наружной мембраны митохондрий в функционировании МАО в клетке указывают данные Бурлаковой и соавт. по изучению влияния модификации состава и свойств липидов на активность и кинетические параметры фермента [24].

В ходе реакций, катализируемых МАО, возможна инициация ПОЛ. При этом наиболее активная стимуляция ПОЛ имеет место в системе с субстратами МАО типа Б и с субстратами трансформированной МАО типа А; серотонин, напротив, дает антиоксидантный эффект [25]. Представленные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что в условиях гипероксии происходит трансформация МАО типа А, активность МАО типа Б остается на контролльном уровне, а дезаминирование серотонина в митохондриальной фракции резко снижается. Следовательно, при гипероксии создаются условия для усиления ПОЛ: системы, оказывающие стимулирующее действие на ПОЛ (дезаминирование МАО типа А необычных субстратов и субстратов МАО типа Б), активно функционируют, а система, обладающая антиоксидантным действием (дезаминирование серотонина), ингибируется. Таким образом, в условиях гипероксии возникает «порочный цикл», играющий важную роль в развитии патологий: инициация ПОЛ под действием активных форм кислорода вызывает трансформацию МАО, в результате чего усиливается ПОЛ, которое, в свою очередь, вызывает дополнительную трансформацию МАО, следовательно, лавинообразное накопление продуктов ПОЛ в биомембранах.

Обнаруженные изменения в ультраструктуре клеток головного мозга и каталитических свойствах МАО—одного из ключевых ферментов медиаторного обмена—отражают происходящие в организме нарушения метаболизма и вносят существенный вклад в развитие кислородной интоксикации.

## MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY AND BRAIN ULTRASTRUCTURE IN RATS UNDER DIFFERENT OXYGEN EXPOSITIONS

KRICHEVSKAYA A. A., GOROSHINSKAYA I. A., FEDORENKO G. M.,  
KHODAKOVA A. A.

State University, Rostov-on-Don

Electron-microscopic study of rat brain during convulsive phase of hyperbarooxygenation reveals significant changes in brain cortex and midbrain neuronal ultrastructure such as mitochondrial swelling, decrease in crist number, desorientation of cristae and disappearance of lysosomes. In compensator phase of hyperbarooxygenation changes in neuronal ultrastructure are less pronounced. Oxygen intoxication inhibits mitochondrial monoamine oxidase type A activity, alters its substrate specificity and leads to a leakage of mitochondrial enzyme in cytosol. Data obtained suggest membrane structure damage under hyperoxia.

## Л И Т Е Р А Т У РА

1. *Jerrett S. A., Jefferson D., Mengel C. E.* *Aerosp. Med.*, v. 44, p. 40—44, 1973.
2. Габибов М. М., Карагеян К. Г. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 91, с. 682—684, 1981.
3. Горошинская И. А. *Вопр. мед. химии*, т. 25, с. 328—329, 1979.
4. *Greenawalt J. W., Schnaiman C. J. Gell. Biol.*, v. 46, p. 173—179, 1970.
5. Мацынин В. В. *Укр. біохім. журн.*, т. 46, с. 561—563, 1974.
6. Шерстнева И. Я., Броновицкая З. Г. *Укр. біохім. журн.*, т. 48, с. 417—420, 1976.
7. *Yang H. Y., Neff N. A. J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, v. 187, p. 365—371, 1973.
8. Гайэр А. *Электронная гистохимия*, М., Мир, 1973.
9. Москвитина Г. А.—В кн.: *Современные методы в биохимии* (под ред. В. Н. Ореховича), с. 22—26, М., Медицина, 1977.
10. *Glowinski J., Iversen L. L. J. Neurochem.*, v. 13, p. 655—669, 1966.
11. Горкин В. З., Веревкина И. В., Гриднева Л. И., Жердева (Брускова) Л. В., Клишторин Л. Б., Кричченкова Р. С., Комиссарова Н. В., Леонтьева Г. А., Романова Л. А., Северина И. С., Фейгина С. М.—В кн.: *Современные методы в биохимии* (под ред. В. Н. Ореховича), с. 155—177, М., Медицина, 1968.
12. *Sugawara K., Oyama F. J. Biochem.*, v. 89, p. 771—774, 1981.
13. *Selegson D., Selegson H. J. Lab. Clin. Med.*, v. 38, p. 324—330, 1951.
14. *Schacterle G. R., Pollack R. L. Anal. Biochem.*, v. 51, p. 654—655, 1973.
15. Маслова М. Н., Озирская Е. В., Резник Л. В. *Цитология*, т. 15, с. 16—21, 1973.
16. Деклева Н. В.—В кн.: *Гипербарическая медицина. Материалы VII Международного конгресса*, Москва, 2—6 сентября 1981, т. 2, с. 122—125, М., Наука, 1983.
17. Горошинская И. А., Грабовская Л. Л., Броновицкая З. Г., Кричевская А. А. *Физиол. журн.*, т. 67, с. 1611—1616, 1981.
18. Горкин В. З. *Молекулярн. биология*, т. 10, с. 717—736, 1976.
19. Горошинская И. А., Кричевская А. А., Броновицкая З. Г. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 91, с. 431—433, 1981.
20. Горошинская И. А., Броновицкая З. Г., Кричевская А. А., Кабарухина Е. Г. *Нейрохимия*, т. 1, с. 282—286, 1982.
21. *White H. L., Stine D. K. J. Neurochem.*, v. 38, p. 1429—1436, 1982.
22. Зальцман Г. Л.—В сб.: *Гипербарические эпилепсия и наркоз*, с. 129—136, Л., Наука, 1968.
23. Агаджанян Н. А., Калюжный Л. В. *Успехи физиол. наук*, т. 1, № 2, с. 26—40, 1970.
24. Бурлакова Е. Б., Кайране Ч. Б., Молочкина Е. М., Хоклов А. П. *Вопр. мед. химии*, т. 30, с. 66—72, 1984.
25. Каеган В. Е., Смирнов А. В., Савов В. М., Горкин В. З. *Вопр. мед. химии*, т. 30, с. 112—118, 1984.

Поступила 19. VIII 1985.