



УДК 577.157:577.152

ОСОБЕННОСТИ МАО МОЗГА СЕРЕБРИСТО-ЧЕРНЫХ
ЛИСИЦ С НАСЛЕДСТВЕННО ЗАКРЕПЛЕННОЙ
НИЗКОЙ АГРЕССИВНОСТЬЮ

ВОЙТЕНКО Н. Н., САВИНKOVA Л. К., МОСКВИТИНА Т. А., ГОРКИН В. Э.

Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск;
*Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

С применением метода колоночной хроматографии на аффинном сорбенте АН-сефароза-4В проведено сравнительное исследование препаративно разделяемых множественных форм МАО (I, II α , II β , III) солюбилизованных митохондриальных фракций гомогенатов стволовой части мозга животных, существенно различающихся по особенностям поведения: диких лисиц промышленной популяции и ручных лисиц, селекционированных на отсутствие агрессии к человеку. По сравнению с дикими лисицами, у ручных лисиц обнаружена убыль МАО-III при одновременном нарастании суммарной МАО-II (α и β) головного мозга. Предполагается возможное участие множественных форм МАО головного мозга (МАО-II, МАО-III) в регуляции поведения животных.

Ранее были получены указания на существование в тканях головного мозга быка [1] и человека [2] ряда множественных форм МАО (КФ 1.4.3.4), обозначенных символами I, II α , II β , III. По субстратной специфичности [3] и чувствительности к действию ингибиторов [4] эти формы МАО, полученные в очищенном от балластных белков виде, не идентичны постулируемому общепринятой «бинарной» классификацией МАО типов А и Б [5]. Нарушения функций ЦНС, например, при шизофрении, приводят к существенному изменению ряда физико-химических и каталитических свойств МАО-II β головного мозга человека [6, 7]. В тканях головного мозга людей, которые при жизни страдали шизофренией, МАО-III либо отсутствовала полностью, либо была резко (в среднем, на 75%) снижена по сравнению с головным мозгом людей, не страдавших психическими заболеваниями [8].

Известно, что процессы метаболизма биогенных аминов и активность непосредственно участвующих в этих процессах ферментов (в частности МАО) значительно изменяются в зависимости от особенностей поведения человека [9] и животных [10—13].

Целью настоящей работы было исследование множественных форм МАО (I, II α , II β , III) головного мозга животных, существенно различающихся между собой по особенностям поведения. Поскольку моде-

лирование патологических форм поведения у животных, обычно используемых в биохимических лабораториях, сопряжено с большими трудностями [14], в наших экспериментах были проведены сравнительные исследования MAO митохондриальных фракций стволовой части головного мозга диких лисиц, которым свойственно агрессивное поведение по отношению к человеку, и ручных (доместицированных) лисиц с генетически детерминированным отсутствием агрессии по отношению к человеку [11, 12]. Ранее у доместцицированных лисиц, по сравнению с лисицами, агрессивными по отношению к человеку, было отмечено снижение серотониндезаминазной активности в тканях мозга [13].

Материалы и методы

Работа была проведена на 9-месячных самцах серебристо-черных лисиц, четко различающихся по их отношению к человеку. В первую группу были включены ручные животные, селекционированные на протяжении 25 поколений на отсутствие агрессивной реакции по отношению к человеку. Во вторую группу были включены дикие, полученные из промышленной популяции животные, которые не были селекционированы на отсутствие агрессивной реакции по отношению к человеку.

Митохондриальную фракцию гомогената ствола головного мозга, извлеченного через 5—10 мин после умерщвления животных, получали путем дифференциального центрифугирования [15]. Осадки митохондрий промывали 0,01 М K^+ , Na^+ -фосфатным буфером, pH 7,4, и хранили при -20° . В каждом эксперименте (2—с дикими и 3—с ручными лисицами) использовали объединенные митохондриальные фракции гомогенатов ствола головного мозга 6 особей.

Солюбилизацию мембраносвязанных MAO осуществляли обработкой суспензии митохондриальных фракций (10 мг белка в 1 мл; 0,01 М K^+ , Na^+ -фосфатный буфер, pH 7,4) смесью неионного детергента тритон X-100 («Serva», ФРГ) и мочевины (конечные концентрации 1,3% и 1,3 М соответственно) в течение 30 мин при 2° с последующим центрифугированием (4000 g, 60 мин) и отделением осадка [1]. Разделение множественных форм MAO проводили путем колоночной хроматографии на биоспецифическом сорбенте АН-сефарозе-4В («Pharmacia», Швеция), при скорости элюции 60 мл/ч. После промывания 0,01 М K^+ , Na^+ -фосфатным буфером pH 7,4 колонки (К-16/40, «Pharmacia», Швеция), содержащей 60 мл сорбента, на который наносили 60 мг белка, элюировали MAO-I при помощи 0,1 М K^+ , Na^+ -фосфатного буфера, pH 7,4, MAO-II (MAO-II α и MAO-II β) элюировали 0,1 М K^+ , Na^+ -фосфатным буфером, pH 7,4, и градиентом концентрации тритона X-100 (от 0 до 0,25%). MAO-III элюировали 0,4 М K^+ , Na^+ -фосфатным буфером, pH 7,4, и 0,25%-ным тритоном X-100 [1]. В собранных фракциях (по 5 мл) определяли содержание белка [16] с поправками на присутствие неионного детергента в пробах), а также активность MAO с 4-нитрофенилаэтиламино-НСI (отечественного производства) в качестве

субстрата. Пробы (конечный объем 3 мл), содержавшие K^+ , Na^+ -фосфатный буфер, рН 7,4—0,22 ммоль, тритон X-100—75 мг, субстрат $5 \cdot 10^{-5}$ М, инкубировали при 37° в течение 30—60 мин. Единицей активности MAO считали такое количество фермента, в присутствии которого отмечали повышение оптической плотности при 450 нм на 0,01 ($l = 10$ мм), что соответствует освобождению 1 нмоль аммиака на пробу за время инкубации [1, 5].

Результаты и обсуждение

Судя по величинам У. А. MAO, в исходной митохондриальной фракции гомогената стволовой части мозга ручных лисиц скорость дезаминирования 4-нитрофенилэтиламина в среднем на 20% ниже, чем скорость этой реакции в митохондриях стволовой части мозга диких лисиц (таблица).

Таблица

Множественные формы MAO в стволовой части мозга диких ($n = 12$; над чертой) и ручных ($n = 18$; под чертой) лисиц

Фракции	Общий объем, мл	Белок, мг/общий объем	Активность MAO		
			ед/общий объем	ед/мг белка	ед/мл
Митохондрии	80,5	841	16462	19,5	204,5
	62,6	768	11956	15,5	191
Солюбилизованная MAO	43,5	103	2044	17,9	47
	45,6	155	1232	10,9	27
MAO-II (x-3)	55	4,8	277	57,7	5,0
	70	6,0	333	87,5	7,6
MAO-III	50	5,5	1290	236,7	25,8
	42	5,6	564	100,2	13,3

Полученные данные согласуются с результатами исследований активности MAO головного мозга серебристо-черных лисиц при селекции по поведению [12]. В этих исследованиях было отмечено, что у ручных лисиц, по сравнению с дикими, скорость дезаминирования серотонина была снижена в среднем на 17,5%, а бензиламина—на 35%.

Использование методики препаративного разделения множественных форм митохондриальных MAO головного мозга путем хроматографирования солюбилизованных митохондриальных фракций на колонке с аффинным сорбентом АН-сефароза-4В позволило не только подтвердить данные, полученные в экспериментах с нефракционированными митохондриальными фракциями, но и получить совершенно новую информацию. Так, сопоставление величин У. А. MAO-III у диких и ручных животных указывает на снижение скорости дезаминирования 4-нитрофенилэтиламина у ручных лисиц в среднем на 57%. Но наиболее разительное отли-

чисе MAO головного мозга диких и ручных лисиц, которое не могло быть обнаружено без препаративного разделения множественных форм MAO, было установлено путем сопоставления общей активности фермента во фракциях MAO-III и MAO-II (α и β) (таблица). Если у диких лисиц соотношение MAO-III/MAO-II было равно в среднем 4,65, то у ручных лисиц эта величина составляла в среднем 1,06.

Во фракции MAO-I ни у диких, ни у ручных лисиц в опытах с 4-нитрофенилэтиламином в качестве субстрата ферментативной активности обнаружить не удалось. Ранее подобные результаты были получены при исследованиях MAO-I ствольной части мозга быка [3] и человека [2].

Таким образом, у ручных лисиц в солюбилизированном препарате митохондриальных MAO была обнаружена значительно более высокая активность MAO-III (почти в 5 раз), чем MAO-II, хотя содержание белка во фракции MAO-III лишь в 1,14 раз выше, чем в MAO-II.

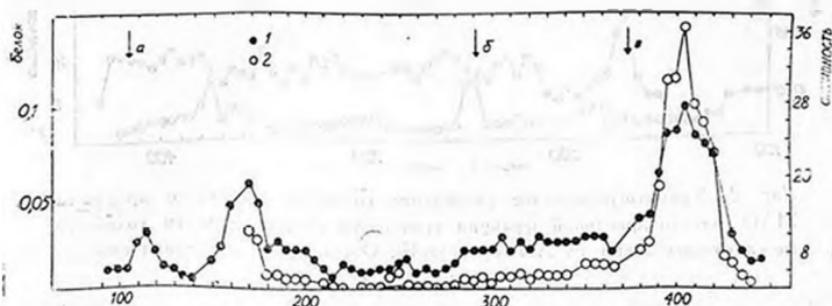


Рис. 1. Хроматографическое разделение солюбилизированного препарата MAO митохондриальной фракции гомогената ствольной части головного мозга диких лисиц на АН-сефарозе-4В. По оси абсцисс—номера фракций; по оси ординат: слева—содержание белка, мг/мл (●); справа—активность MAO; субстрат: 4-нитрофенилэтиламин, ед/мл (○). Стрелками указаны моменты начала элюции: а—0,1 М K^+ , Na^+ -фосфатным буфером, рН 7,4 и градиентом концентрации тритона X-100 от 0 до 0,25% (MAO-II; α и β); б—0,1 М K^+ , Na^+ -фосфатным буфером рН 7,4 и 0,25% тритоном X-100; в—0,4 М K^+ , Na^+ -фосфатным буфером, рН 7,4 и 0,25% тритоном X-100 (MAO-III). Представлены результаты опыта с объединенным материалом от 6 лисиц

Эту закономерность подтверждают опыты, представленные на рис. 1 и 2. На хроматограмме солюбилизированного препарата MAO митохондриальной фракции гомогената ствольной части головного мозга диких лисиц (рис. 1) при измерениях содержания белка были обнаружены отчетливо выраженные пики, соответствующие фракциям MAO-II (α и β) и MAO-III, при этом активность MAO была сосредоточена преимущественно в MAO-III. На хроматограмме солюбилизированного препарата MAO митохондриальной фракции гомогената ствольной части головного мозга ручных лисиц (рис. 2) белковый пик, соответствующий MAO-III, не был выражен; активность MAO была представлена во фракциях MAO-II (α и β) и MAO-III в приблизительно равной мере.

Таким образом, изменения особенностей поведения (доместикации) животных сопровождались как снижением активности MAO-III, так и повышенным суммарной активностью MAO-II (α и β). Снижение активности MAO-III было отмечено ранее [8] при сравнительных исследованиях разделяемых методом колоночной аффинной хроматографии на АН-сефарозе-4В митохондриальных MAO головного мозга людей, страдавших, по данным Института клинической психиатрии ВЦ психического здоровья АМН СССР, шизофренией, в сопоставлении с MAO головного мозга людей, у которых при жизни не были диагностированы психические заболевания. Одновременное повышение суммарной активности MAO-II (α и β) у животных, характер поведения которых был коренным образом изменен в результате селекции на отсутствие оборотительной реакции на человека [12], обнаружено нами в настоящей работе впервые.

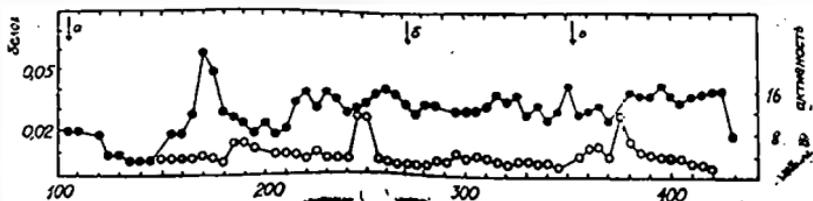


Рис. 2. Хроматографическое разделение солюбилизованного препарата MAO митохондриальной фракции гомогената стволовой части головного мозга ручных лисиц на АН-сефарозе-4В. Обозначения и условия опыта — как на рис. 1

Повышение в тканях головного мозга общей активности MAO-II (особенности MAO-II α) при одновременной убыли активности MAO-III могло бы привести, судя по особенностям субстратной специфичности этих форм MAO [2, 3], к изменению соотношений скоростей дезаминирования серотонина и фенилалкиламинов (тирамин, β -фенилэтиламин, дофамин) и, следовательно, к изменению функций серотонинергических и дофаминергических нейронов.

Значение полученных нами данных трудно определить, поскольку химическая природа и биологические свойства множественных форм MAO головного мозга изучены пока лишь в самых общих чертах [17, 18]. Тем не менее, учитывая хорошо обоснованные положения о роли MAO в синдромах изменений нарушениями метаболизма серотонина [10, 19], сведения о воздействии селекции по поведению на реакции ферментативного дезаминирования моноаминов в тканях головного мозга животных [11—13] и данные о каталитических свойствах MAO-II (α и β) и MAO-III [2, 3], можно предположить, что препаративно разделяемые путем аффинной хроматографии на биоспецифическом сорбенте АН-сефароза-4В множественные формы MAO стволовой части головного мозга, воздействуя на состояние серотонинергических систем головного мозга, участвуют в регуляции поведения животных.

PECULIARITIES OF MAO FROM THE BRAIN OF GRAY FOXES WITH HEREDITARY LOW AGGRESSIVENESS

VOITENKO N. N., SAVINKOVA L. K., MOSKVITINA T. A., *GORKIN V. Z.

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Comparative study has been carried out by means of affinity chromatography on AH-Sepharose 4B of multiple forms of monoamine oxidase (MAO) (I, IIa, II^b, III) in solubilized mitochondrial fractions from brain stem homogenates of animals which were quite different in their behavioural patterns: wild foxes and domesticated foxes. As compared with the wild foxes, in the domesticated foxes we have noted a decrease in activity of MAO-III and, at the same time, an increase in the total activity of MAO-II (MAO-IIa and MAO-II^b) in the brain stem. Data obtained suggest that the multiple forms of brain MAO (MAO-II, MAO-III) may be involved in the regulation of animal behaviour.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moskvitina T. A., Kamyshanskaya N. S., Garishvili T. G., Gorkin V. Z. Preparative Biochemistry, v. 9, № 2, p. 171—196, 1979.
2. Камышанская Н. С., Москвитина Т. А. Вопр. мед. химии, т. 27, № 2, с. 261—266, 1981.
3. Москвитина Т. А., Кучина Н. Е., Горкин В. З. Вопр. мед. химии, т. 28, № 5, с. 127—130, 1982.
4. Москвитина Т. А., Кучина Н. Е., Горкин В. З. Биохимия, т. 48, № 1, с. 119—124, 1983.
5. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине, М., Медицина, 1981.
6. Москвитина Т. А., Камышанская Н. С., Смирнов А. В., Прилипко Л. Л., Горкин В. З. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 99, № 6, с. 671—672, 1985.
7. Gorkin V. Z., Moskvitina T. A., Kamyshanskaya N. S., Smirnov A. V., Prilipko L. L., Lideman R. R. Biogenic Amines, v. 3, № 3, p. 229—240, 1985.
8. Горкин В. З., Москвитина Т. А., Камышанская Н. С. Вести. Акад. мед. наук СССР, № 8, с. 55—59, 1984.
9. Fowler C. J., von Knorring L., Orelund L. Psychiatry Res, v. 3, № 2, p. 273—279, 1980.
10. Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г. Серотонин и поведение, Новосибирск, Наука, 1978.
11. Попова Н. К., Войтенко Н. Н., Трунг Л. Н. Докл. АН СССР, т. 223, № 6, с. 1489—1500, 1975.
12. Войтенко Н. Н. Докл. АН СССР, т. 252, № 1, с. 245—248, 1980.
13. Войтенко Н. Н. Изв. Сиб. отд. АН СССР. Серия биол.-мед. наук, № 3, с. 114—119, 1985.
14. Kolpakov V. G., Barykina N. N., Shepkasov I. L., Alekhina T. A., Parvez H. — In: Methods in Biogenic Amine Research (ed. S. Parvez, T. Nagatsu, J. Nagatsu H. Parvez), p. 997—1020. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1983.

15. Gray E. C., Whittaker V. P. *J. Anat.*, v. 96, № 1, p. 77—87, 1962.
16. Lowry O. H., Rosebrugh N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
17. Горкин В. З. *Нейрохимия*, т. 4, № 1, с. 68—79, 1985.
48. Smith D., Filipowicz C., McCauley R. *Biochim. et biophys. acta.*, v. 831, № 1, p. 1—7, 1985.
19. Kahn D. M., Murphy D. L., Youdim M. B. H.—In: *Structure and Functions of Amide Oxidases* (ed. B. Mondovi), p. 231—248, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1985.

Поступила 3. X 1987

В издательстве «НАУКА» в IV квартале 1989 г. (№ 673) выйдет книга Перцевой М. Н. «Молекулярные основы развития гормонокомпетентности» (отв. ред. чл.-корр. АН СССР Ю. В. Наточин).

Книга посвящена актуальной проблеме современной биологии—молекулярным механизмам передачи в клетку эндокринной информации. В ней излагаются достижения последних лет в изучении мембранных гормонокомпетентных систем в эукариотической клетке, а также закономерности их становления в ходе онто- и филогенеза, выявленные впервые автором.

В первой части книги рассматриваются принципы организации системы трансмембранной передачи гормонального сигнала. Во втором разделе излагаются закономерности ее этапного формирования в процессе онтогенеза. Третья часть посвящена проблеме возникновения и эволюции системы гормон-гормональный рецептор, рецепторно-циклазного комплекса, а также вторичных мессенджеров в ряду позвоночных и беспозвоночных животных. В заключительной главе анализируются принципы эволюции функции гормонокомпетентной системы.

Книга предназначена для биохимиков, физиологов, эндокринологов, биологов, исследующих процессы развития и других специалистов, занимающихся возрастными и эволюционными аспектами проблемы механизмов гормонального действия.

Заказы направлять по адресу: 117192, Москва, Мичуринский проспект, 12, магазин «Книга—почтой» центральной конторы «Академкнига»; 197345, Ленинград, Петрозаводская ул., 7, магазин «Книга—почтой» Северо-западной конторы «Академкнига» или в ближайший магазин «Академкнига», имеющий отдел «Книга—почтой».