НЕЙРОХИМИЯ
т. 4, № 2, 1985

УДК 612.58:612.822.1.015.1:577.152.143

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ МАО И УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ХОЛОДОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

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

Научно-исследовательский биологический институт Госуниверситета им. М. А. Суслова, Ростов-на-Дону

В условиях холодового стресса снижается активность и изменяется субстратная специфичность МАО типа А в митохондриальной фракции мозга, что сопровождается появлением моноаминдезаминазной активности в цитоплазме. Электронно-микроскопическое исследование выявило набухание митохондрий и просветление их матрикса. Полученные данные свидетельствуют о нарушении структуры и проницаемости мембран при холодовом воздействии.

Ранее установлено, что в условиях холодового стресса происходит изменение субстратной специфичности митохондриальной МАО [амин: кислород-оксидоредуктаза (дезаминирующая) (флавинсодержащая), КФ 1.4.3.4], ключевого фермента моноаминергических медиаторных систем, и показана возможная роль этих изменений в механизме холодового повреждения [2, 3]. Различают две формы фермента: МАО А, субстратами которой являются серотонин и норадреналин, ингибитором—хлоргилин, и МАО Б, субстраты—β-фенилэтиламин, бензиламин, метилгистамин, ингибитор—депренил [4, 5]. МАО является типичным митохондриальным ферментом, локализованным на наружной мембране митохондрий и рассматриваемым в качестве маркерного фермента этой мембраны [6].

С целью изучения влияния холода на структуру и проницаемость мембран была исследована возможность выхода митохондриальной МАО в цитоплазму и проведено электронно-микроскопическое исследование структур мозга в условиях холодового стресса.

Материалы и методы

Объектом исследования служили взрослые беспородные белые крысы обоего пола массой 150—180 г. Опыты проводили в зимние месяцы (январь—февраль). Животных помещали в холодовую камеру при 2° на 1, 3 и 45 суток. На 3-и сутки наиболее выражена стрессовая реакция, к 45-м суткам наступает адаптация к холоду [3, 7]. Контролем служили крысы, взятые из этой же группы и содержавшиеся

такое же время в условиях вивария при температуре 20—22°. Обе группы крыс получали одинаковый рацион.

Животных декапитировали и всю дальнейшую обработку ткани мозга проводили на холоду. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [8]. Активность МАО определяли в митохондриальной фракции и супернатанте, содержащем микросомы, лизосомы и растворимые компоненты. О дезаминировании серотонина и глюкозамина судили по образованию аммиака после инкубации суспензии митохондрий или супернатанта с одним из субстратов. Серотонинкреатининсульфат использовали в конечной концентрации 2,5 мМ, глюкозамин-гидрохлорид—10 мМ. Инкубацию проводили в воздушной среде при 37,5° и pH 7,45 в течение 30 мин [9]. Содержание аммиака определяли спектрофлуориметрическим методом на флуориметре «Hitachi 650-60» [10] после изотермической отгонки [11]. Белок определяли модифицированным методом Lowry и соавт. [12].

При исследовании влияния ингибиторов МАО хлоргилина и депренила суспензию митохондрий или супернатант преинкубировали с одним из ингибиторов в течение 15 мин при 20°. Ингибиторы использовали в концентрации 10^{-6} М, при которой они обладают максимально избирательным действием [4]*.

Электронно-микроскопические исследования проведены на животных только в условиях холодового стресса на 1- и 3-и сутки воздействия. Кусочки мозга объемом до 1 мм³ из области коры больших полушарий и крыши среднего мозга фиксировали в глутаральдегиде на фосфатном буфере, а затем в OSO_4. Заливку материала проводили в эпон-аралдите. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме BS 490 A «Tesla», дополнительно окрашивали в солях свинца и в уранил-ацетате [13]. Срезы исследовали в электронном микроскопе B S-242 E «Tesla».

Результаты и обсуждение

При кратковременном действии холода (3-е суток) установлено снижение активности МАО А (субстраты серотонин и норадреналин) в митохондриальной фракции мозга на 28—29% и изменение субстратной специфичности фермента. МАО приобретает способность дезаминировать глюкозамин со скоростью, являющейся величиной одного порядка с интенсивностью дезаминирования моноаминов (табл. 1).

Таблица 1

Дезаминирование азотистых соединений митохондриями и супернатантом мозга крыс при действии холода (нмоль азота аммиака/мг белка/мин)

Условия опыта	Митохондрии			Супернатант	
	Серотонин	Глюкозамин	Норадреналин	Серотонин	Глюкозамин
Контроль	8,00±0,47 (18)	0,21±0,09 (18)	5,46±0,44 (13)	0,44±0,18 (19)	0,09±0,05 (20)
3 суток, 2°	5,73±0,42 (16)	3,54±0,46 (14)	3,85±0,65 (12)	1,56±0,15 (22)	1,64±0,23 (17)
p	<0,01	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001
Изменения к контролю, в %	−28%	+1563%	−29%	+251%	+1683%
45 суток, 2°	6,56±0,70 (9)	0,29±0,19 (10)	3,69±0,30 (19)	0,16±0,10 (19)	0,32±0,12 (10)
p	>0,05	>0,05	<0,01	>0,05	>0,05

Примечание. В скобках указано число опытов

* Ингибиторы МАО депренил и хлоргилин, полученные, соответственно, от д-ра К. Мадьяр (институт фармакологии медицинского университета, Будапешт, Венгрия) и д-ра Г. Д. Барбер (фирма «May and Baker», Англия), были любезно предоставлены проф. В. З. Горкиным.

Значительно увеличивается и интенсивность дезаминирования путресцина и ГАМК, в норме не являющихся субстратами МАО [3]. Активность МАО Б (субстрат п-нитрофенилэтиламин) не изменяется при 3-суточном действии холода [3].

Таким образом, в условиях холодового стресса (при 3-суточном действии холода) имеет место изменение каталитических свойств МАО. В результате этого снижается интенсивность дезаминирования моноаминов, и фермент приобретает способность дезаминировать другие азотистые соединения, в норме не относящиеся к числу субстратов МАО. Такое изменение свойств МАО обнаружено при других патологических состояниях, сопровождающихся стимуляцией перекисного окисления липидов: лучевом поражении, гипервитаминозе $Д_2$, злокачественных опухолях [14], гипероксии [15], гипоксии [16].

Изменение активности и субстратной специфичности МАО при холодовом стрессе позволяет предположить, что одной из причин этого может быть нарушение связи фермента с мембраной митохондрий. В связи с этим исследовали ультраструктуру митохондрий и активность фермента в супернатанте после их удаления.

У интактных животных активность МАО в супернатанте отсутствовала у 11 животных из 19 исследованных или была очень низка, в среднем в 20 раз ниже, чем в митохондриальной фракции. Не наблюдалось также дезаминирования глюкозамина в супернатанте (табл. 1).

В условиях холодового стресса (3 суток, 2°), наряду со снижением активности МАО А в митохондриях, наблюдается усиление моноаминдезаминазной активности в супернатанте. Интенсивность дезаминирования серотонина в супернатанте возрастает в 3,5 раза и становится величиной одного порядка с активностью фермента в митохондриальной фракции. При этом в супернатанте появляется способность дезаминировать глюкозамин, интенсивность которого превышает контрольный уровень почти в 18 раз.

В условиях холодовой адаптации (45 суток, 2°) моноаминоксидазная активность в митохондриях увеличивается по сравнению с холодовым стрессом, но не достигает контрольного уровня. При этом субстратная специфичность фермента нормализуется, о чем свидетельствует отсутствие способности дезаминировать глюкозамин. В супернатанте у адаптированных к холоду животных уровень дезаминирования как серотонина, так и глюкозамина достоверно не отличается от контроля (табл. 1).

В условиях холодового стресса преинкубация с хлоргилином препятствует появлению способности митохондриальной МАО дезаминировать глюкозамин в супернатанте и митохондриальной фракции (табл. 2). Ингибитор МАО Б депренил такой способностью не обладает. Это показано при гипоксии [16], гипероксии [17] и ряде других воздействий, сопровождающихся изменением субстратной специфичности МАО [18].

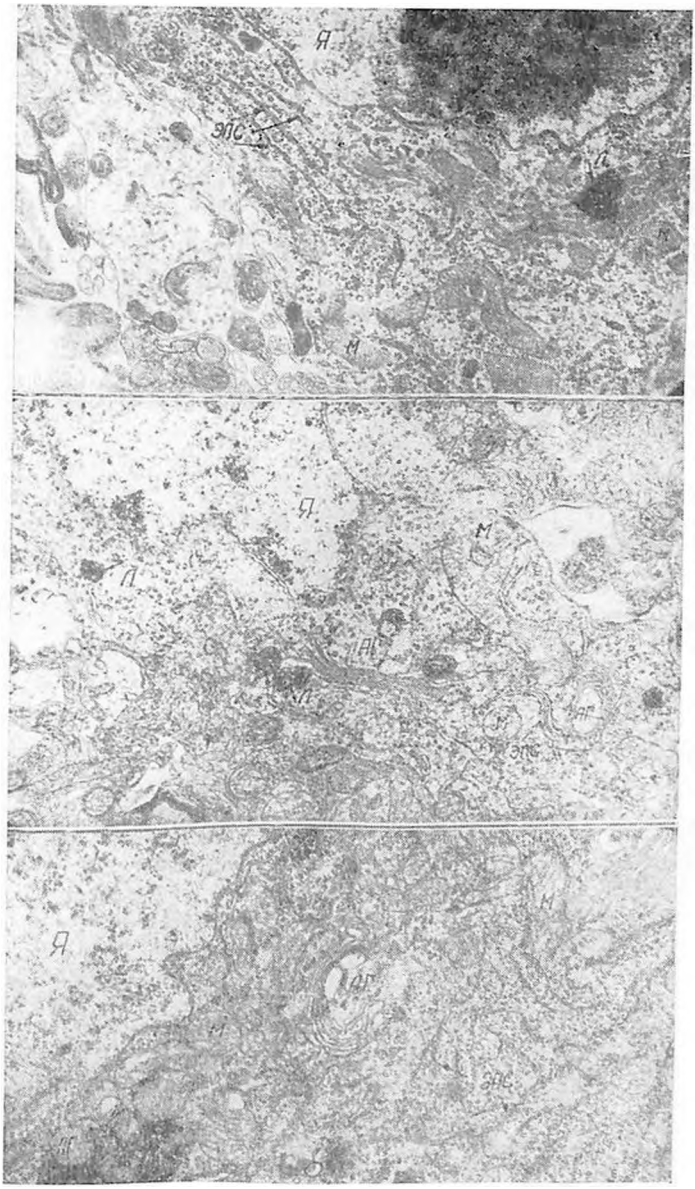

Рис. Нейроны крыши среднего мозга крысы. *а*—контроль, *б*—после 1-суточного холодового воздействия, *в*—после 3-суточного холодового воздействия. × 35 000. *АГ*—аппарат Гольджи, *Л*—лизосома, *ЛГ*—липофусциновая гранула, *М*—митохондрия, *ЭПС*—эндоплазматическая сеть, *Я*—ядро.

Электронные микрофотографии нейронов мозга животных после односуточного действия холода выявили некоторые изменения ультраструктуры внутриклеточных органоидов. Наиболее заметные изменения обнаружены в митохондриях (рис., *б*). Почти все они выглядели набухшими, их матрикс менее электроноплотен, число крист значительно меньше, чем в контроле (рис., *а*). Канальцы эндоплазматической сети (ЭПС) несколько расширены. Размер лизосомоподобных структур меньше, чем в норме, их диаметр лежит в пределах $1—2 \cdot 10^{-7}$ м (в норме—$2—5 \cdot 10^{-7}$ м).

Таблица 2

Влияние ингибиторов МАО на дезаминирование азотистых соединений митохондриями и супернатантом мозга крыс при кратковременном действии холода (нмоль азота аммиака/мг белка/мин)

Состав проб	Митохондрии		Супернатант	
	Серотонин	Глюкозамин	Серотонин	Глюкозамин
Без ингибитора	5,100±0,610 (10)	4,79±0,55 (11)	1,228±0,293 (8)	1,538±0,177 (8)
Хлоргилин	0,40±0,27 (10)	0,84±0,39 (10)	0,038±0,026 (7)	0,071±0,038 (8)
p	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001
Депренил	4,26±0,85 (9)	3,94±0,54 (10)	—	—
p	>0,05	>0,05	—	—

Примечание. В скобках указано число опытов

После 3-суточного действия холода характер набухания митохондрий изменился: наряду с ненабухшими в нейронах встречаются частично набухшие митохондрии (рис., *в*). Заметного расширения канальцев ЭПС в этих случаях нами не отмечено. Диаметр лизосом меньше, чем в предыдущем случае и равен $5—10 \cdot 10^{-8}$ м. Довольно часто встречаются липофусциновые гранулы диаметром около $1 \cdot 10^{-6}$ м, отмечаемые некоторыми авторами как разновидность лизосом [19].

Характер и направленность ультраструктурных изменений в нейронах изученных разделов коры больших полушарий и крыши среднего мозга одинаковы, хотя степень их несколько выше в среднем мозгу.

Снижение в условиях холодового стресса активности МАО в митохондриях и появление активности в цитоплазме позволяют предположить, что одним из механизмов ингибирования фермента может быть нарушение его связи с митохондриальными мембранами. В пользу этого предположения можно отнести отмеченный нами факт набухания митохондрий и просветления их матрикса, так как, по мнению ряда авторов [20, 21], с набуханием митохондрий связано изменение проницаемости их мембран.

Изменение субстратной специфичности МАО происходит, по-видимому, в результате окисления сульфгидрильных групп фермента с

последующим нарушением третичной структуры и изменением конфигурации активного центра [14], что в значительной степени обусловлено липидными перекисями. При холодовом воздействии увеличение интенсивности перекисного окисления липидов в мозгу наблюдается в первые сутки пребывания на холоду, достигая максимума на 3-и сутки [1], то есть именно тогда, когда обнаруживается изменение субстратной специфичности МАО в митохондриях и появление моноаминдезаминазной активности в супернатанте.

С усилением перекисного окисления липидов связано, вероятно, и увеличение при холодовом стрессе количества липофусциновых гранул, обнаруженное электронно-микроскопическими исследованиями. Связь между увеличением отложения липофусцина в нервных клетках и интенсификацией перекисного окисления липидов показана при шизофрении [22].

Дезаминирование глюкозамина, входящего в состав гликопротеидов и гликолипидов, модифицированной МАО, может являться одной из причин нарушения структуры и проницаемости мембран при экстремальных воздействиях. Таким образом, с одной стороны, повреждение мембран является одним из факторов изменения мембраносвязанных ферментов, в том числе МАО, а с другой стороны, изменение каталитических свойств МАО может, в свою очередь, способствовать дальнейшему нарушению мембранных структур.

В условиях холодового стресса обнаружено снижение уровня кислых пептидгидролаз в лизосомной фракции и увеличение их активности в надосадочной фракции [1], что в сопоставлении с отмеченным нами значительным уменьшением размеров лизосом, по-видимому, свидетельствует об изменении проницаемости лизосомных мембран.

Холодовой стресс вызывает также увеличение проницаемости мембран эритроцитов, следствием чего является возрастание в сыворотке крови активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, уровня внеэритроцитарного гемоглобина и суммарной пероксидазной активности [23].

Таким образом, можно считать, что характерным для холодового стресса является нарушение мембранных структур всех типов с изменением их проницаемости и свойств мембраносвязанных ферментов.

Адаптация к холоду, напротив, способствует стабилизации мембранных структур, о чем свидетельствуют как наши данные по исследованию митохондриальной МАО (табл. 1), так и имеющиеся в литературе сведения о состоянии лизосомных ферментов [24].

RAT BRAIN MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY AND BRAIN ULTRASTRUCTURES UNDER EXPOSURE TO COLD

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

Research Institute of Biology, Rostov-on-Don State University

Exposure to cold induced decrease in monoamine oxidase type A activity and altered the enzyme's substrate specificity in rat brain mitochondrial fraction. These changes were accompanied by appearance of monoamine oxidase activity in the supernatant fraction. Electron-microscopic study reveals swelling of mitochondria. Data obtained point to the membrane structure damage under cold stress.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ломакина Л. В.* Укр. биохим. журн., т. 52, № 3, с. 305—308, 1980.
2. *Горошинская И. А., Кричевская А. А., Броновицкая З. Г.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 41, № 4, с. 431—433, 1981.
3. *Горошинская И. А., Грабовскова Л. Л., Броновицкая З. Г., Кричевская А. А.,* Физиол. журн. СССР, т. 67, № 11, с. 1611—1616, 1981.
4. *Yang H.—Y., Neff N. H.* J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 187, p. 365—371, 1973.
5. *Waldmeier P. C., Feldtrauer J.—J., Malter L.* J. Neurochem., v. 29, № 5, p. 785—790, 1977.
6. *Creenawalt J. W., Schnaitman C.* J. Cell. Biol., v. 46, № 1, p. 173—179, 1970.
7. *Козина Л. С., Шугалей В. С.* Физиол. журн. СССР, т. 63, № 8, с. 1189—1202, 1977.
8. *Москвитина Т. А.*—В кн.; Современные методы в биохимии (под ред. В. Н. Ореховича), с. 22—26, М., Медицина, 1977.
9. *Горкин В. З., Веревкина И. В., Гриднева Л. И., Жердева (Брусова) Л. В., Кляшторин Л. Б., Кривченкова 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.
10. *Sugawara K., Oyama F.* J. Biochem., v. 89, № 3 p. 771—774, 1981.
11. *Seligson D., Seligson H.* J. Lab. Clin. Med., v. 38, p. 324—330, 1951.
12. *Schacterle G. R., Pollack R. L.* Anal. Biochem., v. 51, № 2, p. 654—655, 1973.
13. *Гайэр А.* Электронная гистохимия, М., Мир, 1973.
14. *Горкин В. З.* Молекуляр. биология, т. 10, № 4, с. 717—736, 1976.
15. *Горошинская И. А., Броновицкая З. Г.* Вопр. мед. химии, т. 22, № 4, с. 558—562, 1976.
16. *Горошинская И. А., Броновицкая З. Г., Кричевская А. А., Кабарухина Е. Г.* Нейрохимия, т. 1, № 3, с. 282—286, 1982.
17. *Coroshinskaya I. A., Bronovitzkaya Z. G., Gorkin V. Z.* Communications in Psychopharmacology, v. 1, № 1, p. 39—47, 1977.
18. *Горкин В. З.* Хим.-фармацевт. журн., т. 11, № 1, с. 6—13, 1977.
19. *Питерс А., Палей С., Уэбстер У.* Ультраструктура нервной системы, М., Мир, 1972.
20. *Машанский В. Ф., Виниченко Л. Н., Комисарчик Я. Ю., Мосевич Т. К., Дукаева С. Е.*—В сб.: Материалы V Всесоюзн. симпозиума по биохимии митохондрий, с. 8—18, М., Наука, 1971.
21. *Нейфах С. А., Немчинская В. Л., Ганухоки Н. С., Ганелина П. Ш.* Докл. АН СССР, т. 154, с. 1202—1205, 1964.

22. *Андерс В. Н., Орловская Д. Д.* Журн. нейропатол. и психиатрии, т. 82, № 7, с. 1071—1077, 1982.
23. *Горошинская И. А., Ананян А. А., Цветненко Е. З., Кричевская А. А.*—В сб.: Важнейшие теоретические и практические проблемы терморегуляции, с. 75—76, Новосибирск, 1982.
24. *Горошинская И. А., Ломакина Л. В., Ананян А. А., Шугалей В. С.*—В сб.: Адаптивные функции головного мозга, с. 61, Баку, 1980.

Поступила 10. XI. 1984