

Т. А. ГОЙЛО, И. П. АШМАРИН, Л. Н. СИМАНОВСКИЙ, В. М. БРЕСЛЕР

## БИОХИМИЧЕСКОЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

(Представлено академиком Е. М. Крепом 26 XII 1974)

Пероксидазная активность тканей полушарий головного мозга не изучалась ни биохимическими, ни гистохимическими методами. Гистохимические исследования, касающиеся распределения пероксидазной активности и выяснения ее природы в нейронах других отделов нервной системы, крайне немногочисленны (<sup>1-4</sup>), а специально этому вопросу посвящена всего одна работа (<sup>2</sup>). Новиков с соавторами (<sup>1</sup>) впервые сообщили о наличии пероксидазной активности в нейронах. Это наблюдение было подтверждено в (<sup>2-4</sup>). В этих работах использовались блоки фиксированной ткани, а в качестве субстрата — 3,3'-диаминобензидин или диметилбензидин. В качестве контролей применялись неполные среды и предынкубационные воздействия ингибиторами: высокой температурой, ацетоном. Несмотря на наличие таких контролей, природа пероксидазной активности остается неясной: одни (<sup>2, 5</sup>) считают ее связанной и перекисями липидов, другие (<sup>3</sup>) — с наличием истинной пероксидазы. Неясна и биологическая роль пероксидазной активности в нейронах. Выяснению этих вопросов может способствовать подключение новых цитохимических методов определения пероксидазной активности на нативном материале и физиологический эксперимент. Для обеспечения максимальной нативности материала, очевидно, целесообразно использование переживающих блоков ткани, что определило и выбор нами метода выявления пероксидазной активности и технику микрофотографирования. Параллельно велось изучение активности пероксидазы в ткани мозга биохимическими методами. Исследования проводились на белых беспородных крысах весом 150—180 г. Для выделения пероксидазы из ткани мозга был использован метод Цгликципского с соавторами (<sup>6</sup>), применявшийся авторами для водно-солевой экстракции этого фермента из лейкоцитов. Крыс убивали декапитацией, извлекали большие полушария и тщательно отмывали их от крови. В части опытов использовали все ткани полушарий, в другой — их разделяли на серое и белое вещество. Ткань мозга гомогенизировали в дистиллированной воде при соотношении ткани к воде 1:8 (вес:объем). Гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин.; получали экстракт (Э<sub>1</sub>) и осадок, который дополнительно экстрагировали 6% раствором NaCl, гомогенизировали и оставляли на ночь на холоду. Пробу центрифугировали при 1800 об/мин 60 мин.; получали водно-солевой экстракт (Э<sub>2</sub>) и осадок, который был подвергнут кислотной экстракции 0,01 N HCl. Активность пероксидазы определяли в Э<sub>1</sub>, Э<sub>2</sub> и в кислотном экстракте (Э<sub>3</sub>) по методу Клебанова (<sup>7</sup>).

Из гомогената для определения активности фермента также была выделена (<sup>8</sup>) фракция, богатая лизосомами (ф.л.).

Гистохимические исследования проводились на переживающих блоках из полушарий головного мозга интактных крыс и крыс, тренированных к гипоксии в течение 2 мес. по методике З. И. Барбашовой (<sup>9</sup>). Крыс забивали обескровливанием, быстро извлекали головной мозг и острой бритвой из его полушарий нарезали блоки толщиной 3—4 мм, которые сразу же использовались для выявления пероксидазной активности аммоний-молиб-

дат-бензидиновым методом <sup>(1)</sup>, специально предназначенным для выявления лабильных оксидаз в нефиксированной ткани. Блоки инкубировали при комнатной температуре сначала 5 мин. в 1% растворе молибдата аммония на физиологическом растворе, а затем 10 мин. в насыщенном растворе бензидина, к которому перед инкубацией добавляли 0,2 мл 3%  $H_2O_2$  на 100 мл реактива. Поверхность блока начинала окрашиваться в синий цвет уже через 2—3 мин. инкубации, а через 6—10 мин. окраска достигала максимума. Блоки ополаскивались физиологическим раствором и подвергались контактной микроскопии в падающем белом свете с объективами ЛК 10×0,40, 25×0,75 и 43×1,0, а также с контактными эпиобъективами 10×0,30 и 20×0,60. Фотографирование производилось с помощью насадки ОЛК-2. При биохимическом определении активность пероксидазы в Э<sub>1</sub> и ф.л. обнаружена не была, в Э<sub>2</sub> — составляла в среднем 35 единиц активности на 1 мл экстракта в 1 мин., в Э<sub>3</sub> — в среднем 10 ед. Активность пероксидазы в сером и белом веществе оказалась практически одинаковой.

При гистохимическом исследовании у интактных крыс на поверхности блоков мозга при контактной микроскопии выявляется в просвете сосудов сильная пероксидазная активность в эритроцитах и гранулах сегментоядерных лейкоцитов. Отчетливая активность выявляется также в цитоплазме и ядрах многих нейронов; особенно часто и ясно пероксидазную активность обнаруживают нейроны в области аммонова рога (рис. 1а). В коре больших полушарий теменной и височной областей особенно частую и четкую активность обнаруживают нейроны пирамидной и ганглиозной пластинок (рис. 1б). Кроме того, активность выявляется в ядрах и цитоплазме некоторых клеток глии (рис. 1, а, б).

Оказалось, что у крыс, тренированных к гипоксии, и количество нейронов в коре, обнаруживающих пероксидазную активность, и интенсивность реакции в них больше, чем у интактных крыс. Распределение же активности по нейрону было одинаковым у интактных и гипоксических крыс. Пероксидазная активность в нейроне выявляется в виде слабого диффузного окрашивания тела, отростков и области ядра; наибольшая активность локализована в гранулах размерами 0,2—0,8 мкм, располагающихся преимущественно в периферических отделах цитоплазмы (рис. 1 в).

При отсутствии  $H_2O_2$  в инкубационной среде пероксидазная активность в нейронах не выявляется. При обработке блоков коры мозга формалином в течение 20 мин. активность обнаруживается только в эритроцитах, где она даже усиливается, и в гранулах сегментоядерных лейкоцитов, где она несколько ослабевает; никаких следов пероксидазной активности в нейронах при этом не обнаруживается.

Таким образом, для части нейронов коры головного мозга доказано наличие пероксидазной активности, чувствительной к формалину. Сам факт наличия пероксидазной активности и характер ее распределения совпадают с данными ряда авторов для нейронов других отделов нервной системы <sup>(1-3)</sup>. На основании размеров и локализации ярких гранул можно предполагать, что они или являются лизосомами, или, скорее всего, относятся к микротельцам. По данным <sup>(2)</sup>, пероксидазная активность в нейронах передних рогов локализуется в гранулах липофусцина, плотных тельцах и внутримитохондриальных гранулах, по данным <sup>(4)</sup> для нейронов ганглиев — скорее в лизосомах. Очевидно, здесь еще нужны дополнительные исследования, и предлагаемая нами техника работы на нефиксированных блоках ткани с помощью контактной микроскопии создает для них выгодные условия.

О химической природе пероксидазной активности в нейронах пока приходится судить с большой осторожностью. Пероксидазной активностью могут обладать собственно пероксидазы (т. е. ферменты типа милопероксидазы, глутатионпероксидазы, тиреоидной пероксидазы), многие другие гемопротейды (например, катализа, миоглобин, цитохром с), а также при определенных условиях ее могут, очевидно, имитировать перекиси липидов.

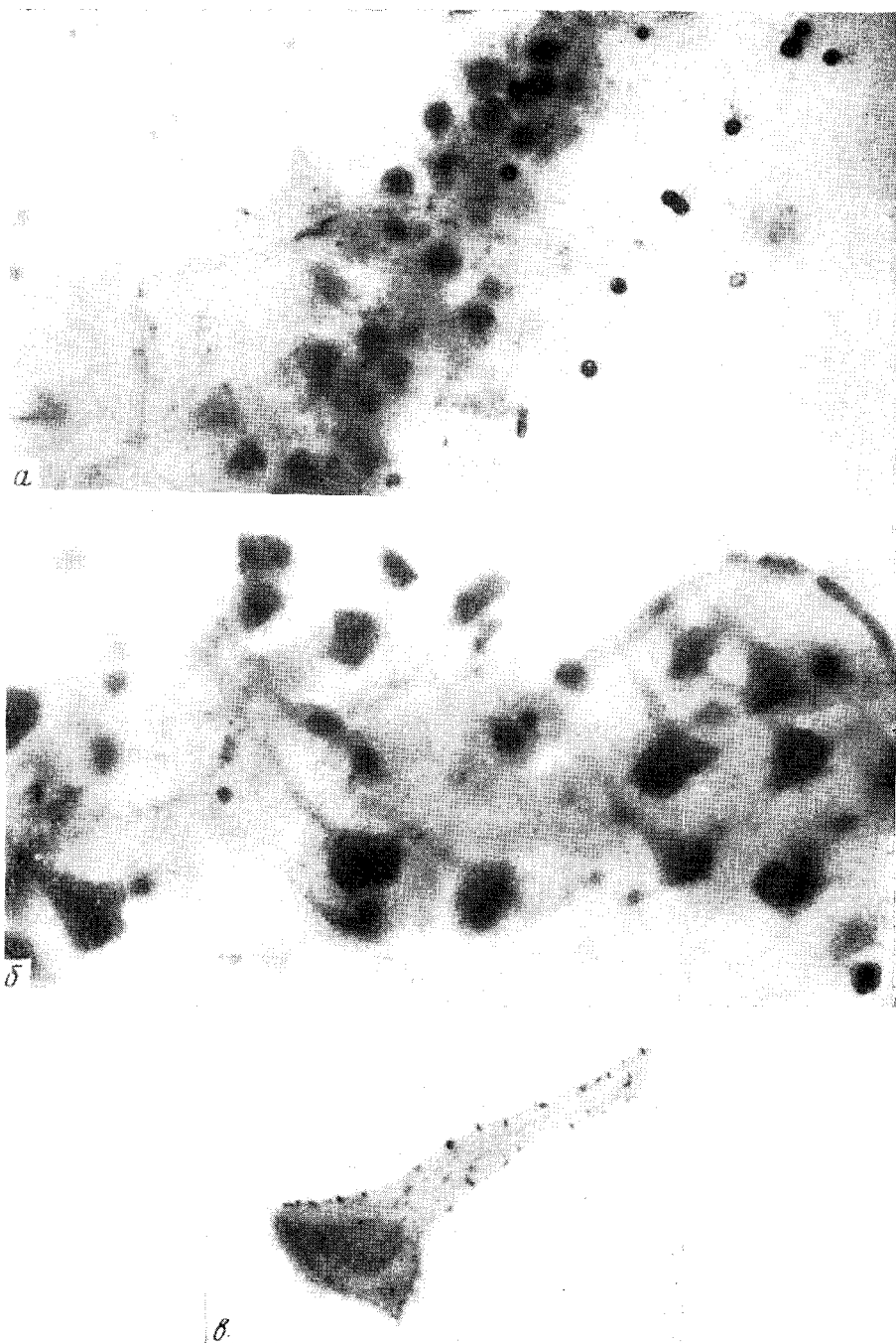


Рис. 1. Цитохимическое выявление пероксидазной активности на поверхности переживающего блока полушарий крыс. *a* — интактная крыса, область аммонова рога. Контактный эппобъектив  $20\times 0,60$ . *б* — крыса, тренированная к гипоксии, кора. Объектив ЛК  $25\times 0,75$ . *в* — крыса, тренированная к гипоксии, кора. Объектив ЛК  $43\times 1,0$

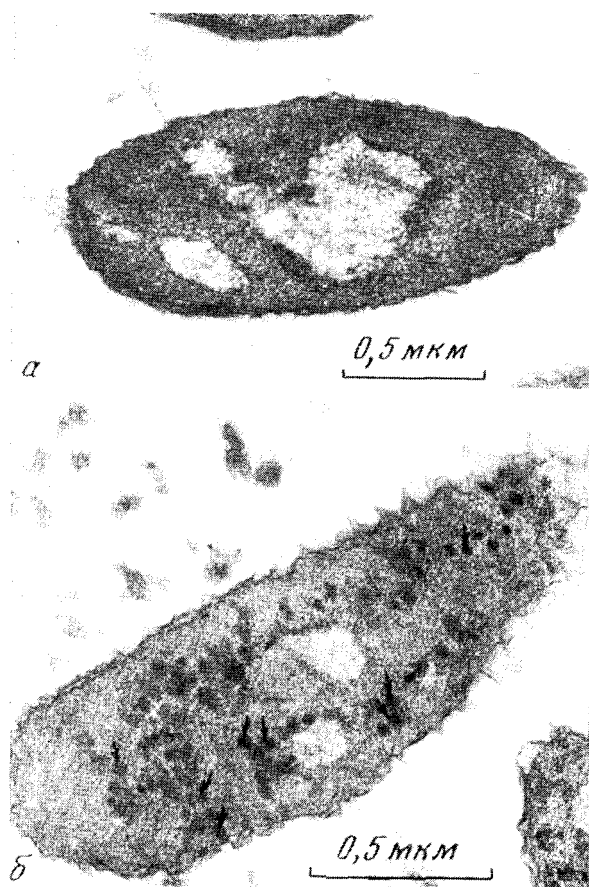


Рис. 2. *a* — ультратонкий срез *Ph. belozerskii* в начальный период культивирования (свечение отсутствует) и *б* — в период максимального свечения. Стрелками показаны гранулы

В случае нейрона она обусловлена, возможно, действием группы факторов. Быстрота проявления и высокая чувствительность к формалину пероксидазной активности, выявляемой по нашему методу, и значительная резистентность активности, выявленной Роговиным по его методу, наводит на мысль о том, что в нейроне могут функционировать разные по механизму активности оксидазные системы (например, истинная пероксидаза, гемопротейды, перекиси липидов), но выполняющие единую функцию. На важности этой функции указывает усиление пероксидазной активности в нейронах при тренировке к хронической гипоксии. В порядке рабочей гипотезы мы предполагаем, что пероксидазные системы нейрона могут осуществлять внемитохондриальное окисление субстратов и являются резервным путем биологического окисления и биоэнергетики, использующимся при адаптации к гипоксии.

Ленинградский государственный университет  
им. А. А. Жданова

Поступило  
3 XII 1974

Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И. М. Сеченова  
Академии наук СССР  
Ленинград

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> A. Novikoff, L. Viempica et al., J. Cell. Biol., v. 39, 100a (1968). <sup>2</sup> В. В. Роговин, Р. А. Муравьева, Л. А. Пурузян, Изв. АН СССР, сер. биол., т. 3, 453 (1971).  
<sup>3</sup> М. Okun, B. Donnellan et al., Histochemie, v. 25, 289 (1971). <sup>4</sup> E. Citkowitz, E. Holtzman, J. Histochem. and Cytochem., v. 21, 34 (1973). <sup>5</sup> В. В. Роговин, Р. А. Муравьева и др., Изв. АН СССР, сер. биол., № 4, 522 (1974). <sup>6</sup> J. Zgliczynski, T. Stelmarzynska et al., Europ. J. Biochem., v. 4, 540 (1968). <sup>7</sup> A. Klebanoff, Endocrinol., v. 76, 301 (1965). <sup>8</sup> H. Ragab, C. Beck et al., Biochem. et biophys. acta, v. 148, 501 (1967).  
<sup>9</sup> З. И. Барбашова, Акклиматизация к гипоксии и ее физиологические механизмы, М.—Л., 1960. <sup>10</sup> Р. Лилли, Патогистологическая техника и практическая гистохимия, М., 1969.