

К. Г. КАРАГЕЗЯН

## ПОГЛОЩЕНИЕ И ВЫДЕЛЕНИЕ ГОЛОВНЫМ МОЗГОМ СОБАКИ ФОСФОРНЫХ ЭФИРОВ ХОЛИНА, ЭТАНОЛАМИНА И СЕРИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ

Ранее проведенные исследования [2] с использованием метода артериовенозной разницы [3] показали, что при внутрикаротидных введениях гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), адреналина, инсулина и под действием электрокожного раздражения происходят чувствительные изменения в количестве липидного фосфора в крови, покидающей головной мозг. Такая реакция организма свидетельствует об определенных сдвигах в величине артериовенозной разницы изученных веществ, что в свою очередь указывает на соответствующие метаболические отклонения, которые развиваются в центральной нервной системе. Учитывая многочисленные литературные данные относительно важной в функциональном отношении роли липидов, в частности фосфолипидов, в деятельности центральной нервной системы, можно допустить, что они оставляют соответствующий след на картине крови, омывающей головной мозг. Исходя из подобного суждения и учитывая разнообразие веществ, принимающих участие в биосинтезе фосфолипидов, и, наоборот, образующихся из них в результате гидролитического расщепления при тех или иных функциональных состояниях, мы предприняли изучение артериовенозной разницы в содержании фосфорных эфиров азотистых оснований, входящих в состав основных фосфолипидов головного мозга—лецитинов, этаноламинфосфатидов и серинфосфатидов. Речь идет о фосфохолине (ФХ), фосфоэтаноламине (ФЭТ) и фосфосерине (ФС). Как известно, обладая высокой степенью обменяемости и метаболической активности, эти вещества являются одним из основных предшественников в синтезе фосфолипидов; с другой стороны, они образуются в результате распада липидов. Исследованиями Кометиани и сотр. [4—8, 10] была показана большая вариабильность в количестве ФХ и ФЭТ в различных отделах головного мозга, что, в свою очередь, свидетельствует о большой метаболической активности этих соединений, быстро включающихся в различные органические образования нервной ткани и, возможно, других органов. О том, что указанные эфиры в определенной степени скопляются в мозговом веществе, как метаболиты фосфолипидов, говорят результаты исследований Гейгера, Абуда, Кнауффа, Бёкка [11, 13, 14] и др. в условиях инсулиновой гипогликемии и при исключении глюкозы из состава жидкости, перфузируемой через головной мозг подопытных животных.

**Методика.** Опыты проводили на 4 собаках-самцах методом артериовенозной разницы, в хроническом эксперименте. ГАМК (2,5—5,0 мг/кг веса) и адреналин (0,025—0,05 мг/кг веса) вводили внутрикаротидно, а

инсулин (1,2—3,6 ед/кг веса) внутривенно, спустя 30 мин. брали пробы как артериальной, так и венозной крови, причем из последней с 14—17 сек. отставанием, что, согласно исследованиям Егян [1], соответствует времени полного кровосращения в мозгу.

Из 10 мл цельной крови готовили ацетоновый порошок, который служил исходным материалом. Выделение ФХ, ФЭТ и ФС производили по методике, разработанной Кометиани и сотр. [10]. Экстракт, содержащий смесь указанных эфиров, подвергали электрофоретическому разделению по Гаррисону [9] в течение 4—5 час. при силе тока 2—3 мА, напряжением в 400 в в среде пиридин-ацетатного буфера. Электрофореграммы сушили на воздухе и затем опрыскивали 5% раствором нингидрина на ацетоне. Пятна, соответствующие ФЭТ и ФС, хорошо проявлялись своим темно-лиловым окрашиванием. Электрофореграммы опускали в раствор Ишервуда, состоящий из смеси 5 г молибденовокислого аммония, 38,6 мл дистиллированной воды, 27,8 мл 57% раствора перхлорной кислоты, 150 мл концентрированной химически чистой соляной кислоты, доведенной в мерной колбе ацетоном до объема 500 мл, и сушили в вытяжном шкафу. В конце электрофореграммы проявлялись пятна ФХ темно-синего цвета на бледно-голубом фоне бумаги. Одновременно ставили параллельные опыты со стандартами изученных эфиров, производства Sigma Chemical Company. Пятна, соответствующие каждому из

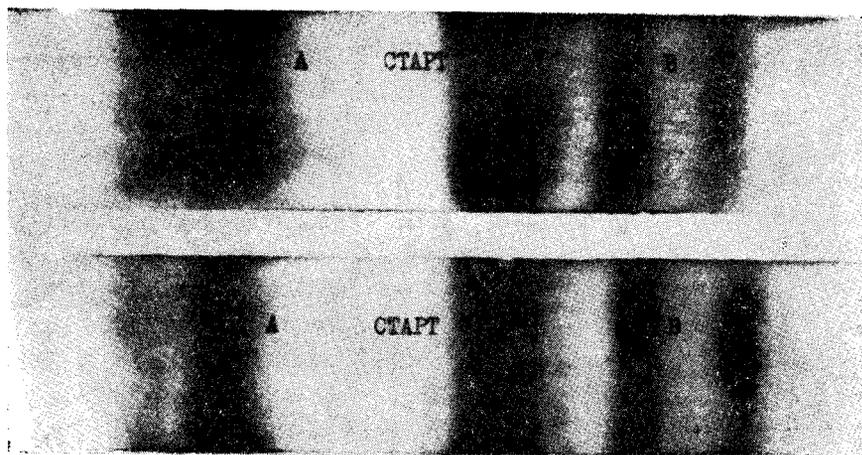


Рис. 1. Электрофореграмма ФС (А) и ФЭТ (В) стандартной смеси (вверху) и экстракта ацетонового порошка цельной крови собаки (внизу).

изученных веществ, трижды элюировали в отдельности 1,5—2,0 мл 0,5N раствором соляной кислоты на метаноле. Элюаты выпаривали в кипящей водяной бане досуха и остаток сжигали в среде 5N раствора серной кислоты (0,3 мл) и концентрированной азотной кислоты (2—3 капли) при  $T^{\circ}=175-180^{\circ}$  до полного обесцвечивания содержимого. Затем ставили цветную реакцию на минерализованный эфирный фосфор по Фиске и Суббароу [12]. Количественный расчет фосфора производили путем со-



поставления результатов колориметрирования опытных и стандартных проб.

**Результаты исследований.** В нормальных условиях, как видим, существует определенная отрицательная артериовенозная разница в содержании фосфора ФЭТ, которая колеблется в пределах 130—160 мкг%. Меньшие различия проявляются в уровне фосфора ФХ и ФС в крови, питающей головной мозг и оттекающей от него, составляющие 100—90 мкг% и 90—80 мкг%. Полученные данные показывают, что под действием 2,5—5,0 мг/кг ГАМК имеет место понижение абсолютного уровня фосфора всех изученных фосфорных эфиров: если в контрольных опытах артериовенозная разница содержания фосфора ФЭТ в среднем составляла 30 мкг%, то под действием ГАМК она понижается как в артериальной, так и, в большей степени, в венозной крови, в результате чего разница стирается и уровень фосфора в крови обеих систем устанавливается в пределах 100 мкг%.

Фосфор ФХ в крови, питающей мозг, понижается в своем количестве со 100 (контроль) до 75 мкг%, а в крови, оттекающей от головного мозга, не подвергается заметным изменениям и поддерживается в пределах примерно 90 мкг%. Таким образом, отмеченная в контрольных опытах слабовыраженная артериовенозная разница (положительная) в количестве фосфора ФХ (примерно 10 мкг%) через 30—60 мин. после введения ГАМК сменяется слабовыраженной отрицательной артериовенозной разницей его содержания, составляющей 15 мкг%.

Наиболее яркие изменения в величине артериовенозной разницы наблюдаются со стороны фосфора ФС. Его уровень в крови обеих систем понижается по сравнению с исходным, причем в венозной крови несравненно больше. В результате этого в контрольных опытах слабовыраженная положительная артериовенозная разница в количестве фосфора ФС через 30—60 мин. после введения ГАМК становится особенно четкой: в артериальной крови его уровень колеблется в пределах 90 мкг%, а в венозной—резко понижается и достигает 60 мкг%, демонстрируя при этом артериовенозную разницу в 30 мкг%. Таким образом, если количество фосфора ФЭТ под действием ГАМК подвергается определенному понижению (в вене больше, чем в артерии) и имевшаяся артериовенозная разница сглаживается, то фосфор ФХ не испытывает заметных изменений, а фосфор ФС чувствительно убывает только в крови, оттекающей от головного мозга, что, по нашему предположению, может быть следствием его поглощения головным мозгом.

Введенный внутрикратидно в количестве 0,025—0,05 мг/кг веса адреналин вызывает одностороннее действие ГАМК понижение уровня фосфора ФЭТ в крови обеих систем соответственно до 80—85 мкг%. Как видно из рис. 2, разница указанных цифр (5 мкг%) представляет собой незначительную величину, которой можно пренебречь. Количество фосфора ФХ также понижается, однако этот сдвиг в крови, оттекающей от головного мозга, происходит намного сильнее: через 30 мин. после введения адреналина фосфор ФХ от 90 мкг% понижается до 50 мкг%, т. е.

уменьшается почти вдвое, тогда как за тот же промежуток времени его уровень в артериальной крови составляет около 75 мкг%, вследствие чего в содержании фосфора ФХ возникает заметная положительная артериовенозная разница.

По истечении вышеуказанного времени еще более существенный сдвиг обнаруживается в уровне фосфора ФС; имеет место закономерное возрастание отрицательной артериовенозной разницы в его величине. Так, если его контрольный уровень в артериальной и венозной крови со-

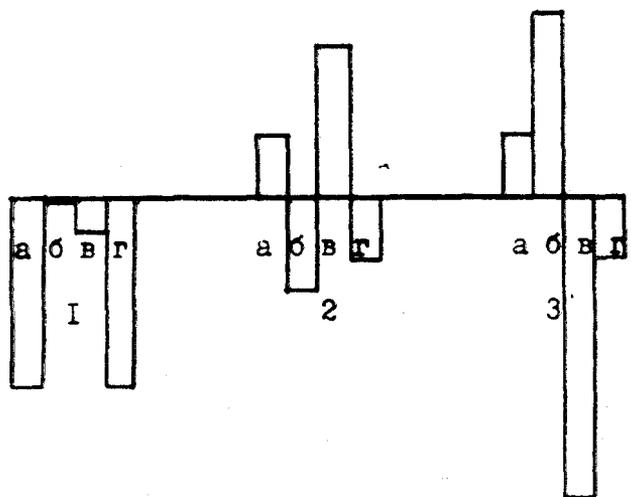


Рис. 2. Величина артериовенозной разницы (мкг%) в содержании ФЭТ (1), ФХ (2) и ФС (3) в норме (а) и через 30—60 мин. после введения ГАМК (б), адреналина (в) и инсулина (г):

1а = -30 мкг%	2а = +10 мкг%	3а = +10 мкг%
1б = 0 "	2б = -15 "	3б = +30 "
1в = -5 "	2в = +25 "	3в = -60 "
1г = -30 "	2г = -90 "	3г = -10 "

ставляет 90—80 мкг%, то спустя 30 мин. после введения изученных доз адреналина количество фосфора ФС в крови, питающей мозг, прогрессивно понижается с 90 до 60 мкг%, в то время как в крови, оттекающей от мозга, оно претерпевает противоположный сдвиг и за то же время достигает 120 мкг%. Таким образом, если при функциональных состояниях, разыгрывающихся в условиях внутрикаротидного введения изученных доз адреналина, не происходит существенных изменений в артериовенозной разнице содержания фосфора ФЭТ, то этого нельзя сказать в отношении фосфора ФХ и ФС, а именно, в первом случае развивается заметная положительная артериовенозная разница, а во втором—более существенная, но отрицательная артериовенозная разница.

Исходя из результатов исследований Абуда и др. [11], Гейгера [13], Кнауффа и Бёкка [14], показавших значительное скопление фосфорных эфиров холина, этаноламина и серина в нервной ткани погибших в условиях тяжелой гипогликемической комы, было интересно проследить за

содержанием этих веществ в крови, омывающей головной мозг в хроническом эксперименте в условиях ярко выраженной инсулиновой гипогликемии. Было показано, что гликемическая кривая у собак претерпевает максимальное падение примерно через 30 мин. после внутривенного введения 1,2—3,6 ед. инсулина/кг веса. Исходя из характера гликемической кривой, мы решили определить артериовенозную разницу в содержании изучаемых эфиров также через 30 мин. после введения инсулина. В указанное время отмечается чувствительная отрицательная артериовенозная разница в содержании фосфора ФЭТ; его уровень в артериальной крови в среднем составляет 105, а в венозной—135 мкг%, т. е. на 30 мкг% больше. Что касается фосфора ФХ и ФС, то его уровень в артериальной и венозной крови через 30 мин. колеблется в пределах 90—100 мкг% и 100—110 мкг% соответственно.

На основании полученных результатов становится понятным, что ГАМК, адреналин (внутрикаротидные введения) и инсулин (внутривенные введения) вызывают интересные изменения в артериовенозной разнице содержания фосфора ФЭТ, ФХ и ФС в крови, питающей мозг и оттекающей от него. Внутрикаротидное введение ГАМК сопровождается увеличением содержания фосфора нейтральных фосфолипидов в крови, оттекающей от мозга, при одновременном уменьшении уровня фосфора кислых фосфолипидов, среди которых серинфосфатиды занимают доминирующее положение. Тогда нами было высказано предположение о возможном захвате этих липидов головным мозгом, где они, по-видимому, выполняют важную в функциональном отношении роль. Если это действительно так, то можно допустить, что вышеотмеченное увеличение отрицательной артериовенозной разницы в количестве ФС, наблюдающееся при тех же функциональных состояниях, является результатом его адсорбции головным мозгом, где, как известно, ФС принимает активное участие в метаболизме нервной ткани. Мы показали, что количество фосфора лецитинов и этаноламинфосфатидов в тех же условиях в значительной степени возрастает в крови, оттекающей от головного мозга собак. Наряду с этим было замечено полное понижение и стирание артериовенозной разницы в содержании фосфора ФЭТ, отмечавшейся в контрольных опытах. При этом уровень фосфора ФЭТ устанавливается в пределах 100 мкг%.

Что касается фосфора ФХ, то, как указывалось выше, на протяжении 30—60 мин. после введения ГАМК он не подвергается заметным колебаниям и показывает картину слабо выраженной артериовенозной разницы (отрицательной—75 и 90 мкг% соответственно).

При адреналиновом возбуждении, сопровождающемся увеличением фосфора всех изученных нами фосфолипидов (кроме лизолецитинов), в крови, оттекающей от головного мозга, не наблюдается существенных различий в уровне фосфора ФЭТ в крови, питающей головной мозг и оттекающей от него. Количество фосфора ФС почти вдвое возрастает в венозной крови, демонстрируя картину ярко проявляющейся отрицательной артериовенозной разницы. Что же касается фосфора ФХ, то он,

наоборот, убывает в своем содержании из крови, оттекающей от мозга, составляя здесь около 50 мкг%, а в артериальной крови—75 мкг%. Этот факт, на наш взгляд, представляет определенный интерес, поскольку захват лизолецитинов и ФХ мозгом из периферической крови имеет прямое отношение к процессам синтеза лецитинов, уровень которых, как известно, при воздействии адреналином чувствительно возрастает в крови, оттекающей от головного мозга.

При инсулиновой гипогликемии, развивающейся через 30 мин. после внутривенных введений указанных доз инсулина наряду с чувствительным изменением уровня липидного фосфора лецитинов, этаноламинфосфатидов и серинфосфатидов, мы наблюдали также заметное возрастание количества фосфора ФЭТ в крови, оттекающей от головного мозга, при относительной незначительности и стабильности артериовенозной разницы уровней ФХ и ФС.

Если сравнить артериовенозную разницу в содержании фосфора ФЭТ в контрольных опытах и в условиях инсулиновой гипогликемии, то в подавляющем большинстве случаев она выражается почти одинаковыми или близкими цифрами, создающими впечатление, что инсулиновая гипогликемия не меняет картины поглощения или выделения ФЭТ головным мозгом. Однако подобное суждение представляется ошибочным в основном потому, что абсолютный уровень указанных веществ значительно повышается как в крови, питающей мозг, так и покидающей его, хотя величина артериовенозной разницы (приблизительно 30 мкг%) поддерживается в пределах постоянных цифр. По всей вероятности, такое закономерное постоянство в отмеченной разнице изученных нами эфиров при выраженных формах инсулиновой гипогликемии определяется рядом биологических особенностей, специальное изучение которых заслуживает большого внимания. На основании проведенных исследований нам представляется, что в животном организме в условиях инсулиновой гипогликемии роль ФЭТ измеряется не одним только его участием в качестве соответствующего источника в синтезе фосфолипидов, ацетилхолина и прочих соединений, но и тем, что ФЭТ может служить исходным материалом для образования большого количества свободного этаноламина, обладающего высокой степенью биостимулирующего воздействия на организм.

В наших исследованиях было показано, что спустя 30—60 мин. после введения ГАМК и инсулина происходит смена картины слабовыраженной артериовенозной разницы количества фосфора ФЭТ (10 мкг%), характерной для контрольных опытов, на слабовыраженную, но отрицательную артериовенозную разницу, которая в случае действия ГАМК составляет 15 мкг%, а инсулина—10 мкг%. Однако, несмотря на то, что наблюдаемый конечный эффект выглядит как слабовыраженная реакция, тем не менее нельзя пренебречь глубиной изменений, возникающей в величине артериовенозной разницы содержания ФЭТ. Так можно было бы поступить только в случае нулевого контрольного фона, который однако в данном случае является слегка положительным и под действием

испытанных агентов становится слабо отрицательным. Следовательно, можно считать неоспоримым факт значительного сдвига в количестве фосфора ФЭТ, который, с одной стороны, приводит к стиранию исходной положительной артериовенозной разницы и с другой,—продолжая понижаться в крови, питающей головной мозг, служит основой для возникновения указанной отрицательной артериовенозной разницы; наряду с этим мы отмечаем определенное постоянство в величине фосфора ФХ в крови, оттекающей от головного мозга, под действием примененных раздражителей.

Таким образом, на основании результатов проведенных исследований мы находим определенную корреляцию между артериовенозными сдвигами, наблюдающимися в количестве фосфора изученных фосфолипидов (лецитины, этаноламинфосфатида, серинфосфатида) и фосфорных эфиров азотистых оснований, входящих в их состав (ФХ, ФЭТ и ФС). Эти данные согласуются с результатами исследований Абуда, Гейгера и др. авторов, показавших расщепление фосфолипидов в головном мозгу животных, переживающих гипогликемический кризис, одним из подтверждений которых является скопление фосфора указанных эфиров в нервной ткани.

Институт биохимии  
АН АрмССР

Поступило 30.XII 1967 г.

#### Կ. Գ. ՂԱՐԱԳՅԱՆՆԵՐ

### ՇԱՆ ՈՒՂԵՂԻ ԿՈՂՄԻՑ ՏԱՐՔԵՐ ՖՈՍՖՈՐԻՆԵՐԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ ԽՈՒՆԻ, ԷՔՍԱՆՈՒՄԻՆԻ ՈՒ ՍԵՐԻՆԻ ՖՈՍՖՈՐԱՅԻՆ ԷՍԹԵՐՆԵՐԻ ԿԼԱՆՈՒՄԸ ԵՎ ԱՐՏԱԶԱՏՈՒՄԸ

#### Ա մ փ ո փ ու մ

Կատարված հետազոտությունները ցույց են տվել, որ շների մոտ խրոնիկ էքսպերիմենտում բացակայում է ֆոսֆորային էսթերների պարունակության զգալի դարկերակ-երակային տարբերությունը էթանոլամինի, խոլինի և սերինի ֆոսֆորային էսթերների վերաբերյալ:

2,5—5,0 մգ զամմա-ամինակարագաթթվի/կգ կենդանի քաշին ներերակային ներարկումից ուսումնասիրված բոլոր էսթերների ֆոսֆորի մակարդակը իջնում է ուղեղը սնող և ուղեղից արտահոսող արյան մեջ ԳԱԿԹ-ի ներարկումից 30 րոպե անց արյան երկու սիստեմներում էլ ֆոսֆոէթանոլամինի (ՖէԹ) ֆոսֆորի քանակությունը տատանվում է 100 մկգ% -ի սահմաններում, ֆոսֆոխոլինի (Ֆխ) ֆոսֆորը ուղեղից արտահոսող արյան մեջ 15 մկգ%-ով գերազանցում է նրա մակարդակը զարկերակային արյան մեջ, իսկ ֆոսֆոսերինը (ՖՍ), նույն ժամանակամիջոցում, ցուցադրում է դրական զարկերակ-երակային տարբերության վառ արտահայտված պատկեր, կազմելով ուղեղը սնող արյան մեջ 90 մկգ%, իսկ ուղեղից հոսող արյան մեջ՝ 60 մկգ%:

0,025—0,05 մգ/կգ քաշին ադրենալինի ներարկումից 30 րոպե անց ՖէԹ-ի ֆոսֆորի քանակությունը իջնում է արյան երկու սիստեմներումն էլ,

նույնանման այն պատկերի, որը դիտվում էր  $^{32}\text{P}$ -ի ազդեցությունից: Ֆև-ի ֆոսֆորի պարունակությունը նույնպես իջնում է, բայց ավելի զգալիորեն այն նկատելի է ուղեղից արտահոսող արյան մեջ, որտեղ առաջ է գալիս դրական զարկերակ-երակային տարբերություն (75 մկգ% — 50 մկգ%): Չգալի տեղաշարժ նկատվում է նաև ՖՍ-ի ֆոսֆորի մակարդակի վերաբերյալ — առաջ է գալիս խիստ բացասական զարկերակ-երակային տարբերություն, կազմելով զարկերակային արյան մեջ 60 մկգ%, իսկ երակայինում երկու անգամ ավելի՝ 120 մկգ%:

Ինսուլինային հիպոգլիկեմիայի ֆոնի վրա (1,2—3,6 միավոր/կգ քաշին), 30—60 րոպե անց նկատվում է զգալի բացասական զարկերակ-երակային տարբերություն  $^{32}\text{P}$ -ի քանակության վերաբերյալ (105 մկգ% — 135 մկգ%), այն դեպքում, երբ նման բան հնարավոր չէ նկատել Ֆև-ի և ՖՍ-ի նկատմամբ, որոնց զարկերակ-երակային տարբերությունը կազմում է, համապատասխանաբար՝ 90 մկգ% և 100 մկգ% — 110 մկգ%:

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Егян В. Б. Изв. АН АрмССР (биол. науки), 13, 43, 1960.
2. Карагезян К. Г. ДАН СССР, 170, 4, 985, 1966.
3. Кедров А. А., Науменко А. И. и Дегтярева З. Я. Бюлл. эксп. биол. и мед., 9, 10, 1954.
4. Кометиани П. А. Биохимия нервн. системы, 98, Киев, 1954.
5. Кометиани П. А., Ткешелашвили Л. К. и Овсянко Т. А. Тр. I Закавказ. конф. мед. радиологии, 262, (Тбилиси, 1955), 1956.
6. Кометиани П. А., Ткешелашвили Л. К. и Овсянко Т. А. Вопр. биохим. нервной системы, 69, изд. АН УССР, Киев, 1957.
7. Кометиани П. А., Ткешелашвили Л. К. Тр. Всес. научно-техн. конф. по применению радиактивных и стабильных изотопов и излучений в народном хоз. и науке (4—12 апреля 1957), (Изучение животного организма, рыбное хоз., пищевая промыш.), Москва, 1958.
8. Кометиани П. А., Ткешелашвили Л. К. Укр. биох. журнал, 31, 913, 1959.
9. Кометиани П. А. Биохимия, 24, 4, 729, 1959.
10. Ткешелашвили Л. К. Сообщ. АН ГрузССР, XVII, 8, 1956.
11. Abood L. G., Geiger A. Amer. j. Physiol., 182, 557, 1955.
12. Fiske C. H., Subbarow J. J. Biol. Chem., 66, 375, 1925.
13. Geiger A. Physiol. Rev., 38, 17, 1958.
14. Knauff H. G., Böck F. J. Neurochem., 6, 171, 1961.