ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ. ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР. БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
т. XXII, № 2, 1969

УДК 591.1 : 612.89 : 615.778.3

О. М. АВАКЯН

ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ ИНТЕНСИВНОСТЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ СОСУДИСТЫХ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН И КОНЦЕНТРАЦИЕЙ НОРАДРЕНАЛИНА В ПЕРФУЗИРУЕМОЙ СРЕДЕ

Наличие норадреналина в стенках артерий впервые было показано Шмитерлоу в 1948 г. Изучение клеточной локализации норадреналина в артериях получило особый размах после появления гистохимического метода Фалька [3, 4, 8, 9]. Суть этого метода заключается в том, что при обработке высушенных срезов тканей парами формальдегида катехоламины превращаются в ярко флуоресцирующие вещества. В настоящей работе приводятся данные об изменении интенсивности флуоресценции нервных образований стенок артерий в зависимости от концентрации норадреналина в перфузируемой среде.

Методика. Опыты ставились по методу Ландэ и Ранда [16], слегка модифицированному в лаборатории Гиллеспи [1, 5]*.

Под нембуталовым наркозом в центральную артерию уха кролика вводилась полиэтиленовая канюля и отрезок артерии длиной 3—4 см помещался в баню для изолированных органов. Насосом постоянного объема через канюлю нагнетался насыщенный кислородом (95% O_2 + +5% CO_2) раствор Кребса. Уровень перфузии колебался от 3,6 до 7,2 мл/мин. Затем в течение 10 мин. раствор Кребса заменялся раствором, содержащим норадреналин. В конце десятой минуты вырезался фрагмент артерии длиной 3—4 мм (для гистохимического исследования методом Фалька), а вся артерия вновь перфузировалась свежим раствором Кребса в течение 15 мин. Затем снова вводился норадреналин в бо́льшей концентрации и т. д. Таким образом, норадреналин перфузировался в концентрациях, варьирующих от 100 ммкг в 1 мл до 1 мг в 1 мл.

Для выяснения влияния адренолитиков на усвоение норадреналина в части опытов независимо от норадреналина в течение всего опыта перфузировались феноксибензамин в концентрации 50 мкг в 1 мл и пропранолол в концентрации 10 мкг в 1 мл. Интенсивность флуоресценции симпатических нервных волокон, расположенных на наружной стенке артерии, измерялась методом Гиллеспи и Гамильтона [6]. С этой целью на люминесцентном микроскопе фирмы Лейтц был приспособлен фотоумножитель, позволяющий измерять интенсивность флуоресценции

* Эксперименты проводились в Институте физиологии университета Глазго в лаборатории д-ра Дж. Гиллеспи, за что выражаю ему глубокую благодарность.

с ограниченных участков (до 5 μ) среза сосудов. Симпатические нервные волокна, вернее срезы ярко флуоресцирующих варикозных утолщений этих волокон, обычно занимали 60-70% площади измеряемого участка.

В настоящей работе рассматриваются данные, полученные при изучении 32 отрезков центральной артерии уха кролика. С каждого отрезка готовились несколько микроскопических срезов толщиной 5 μ и измерялась флуоресценция шести варикозных утолщений, что позволяло провести математическую обработку полученных результатов.

Результаты опытов приведены в виде рисунков. Как видно из рис. 1, инфузия норадреналина в концентрации 10 мкг/мл приводит к резкому повышению интенсивности флуоресценции нервных волокон. Однако

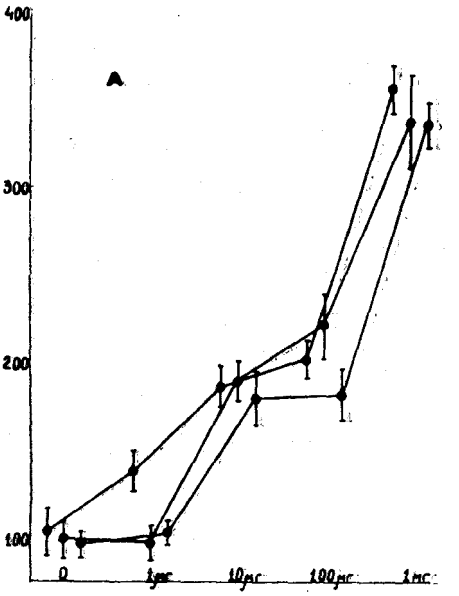

Рис. 1. Изменение интенсивности флуоресценции нервных волокон центральной артерии уха кролика при перфузии норадреналина в конц. 1 мкг, 10 мкг, 100 мкг и 1 мг в 1 мл. По оси абсцисс—изменение интенсивности флуоресценции нервных волокон в процентах. За 100% принята интенсивность флуоресценции контрольных срезов.

последующее десятикратное увеличение концентрации перфузируемого норадреналина не приводит к статистически достоверному сдвигу интенсивности флуоресценции. Создается впечатление, что произошло относительное насыщение процесса усвоения норадреналина нервными окончаниями. Для выяснения этого мы еще десятикратно увеличили концентрацию перфузируемого норадреналина. Оказалось, что это вновь приводит к скачкообразному повышению интенсивности флуоресценции. Таким образом, в этих контрольных опытах мы как бы имели два пика *усвоения норадреналина* периартериальными нервными образованиями. Первый наступает при концентрации 10 мкг в 1 мл, а второй—1 мг в 1 мл.

Данные двух опытов, в которых артерия уха кролика независимо от введения норадреналина все время перфузировалась раствором Кребса, содержащим феноксибензамин в концентрации 50 мкг/мл приведены на рис. 2. Как видно из рисунка, инфузия норадреналина в конц. 1 мкг, 10 мкг и 100 мкг в 1 мл не приводит к значительному повышению интенсивности флуоресценции. Однако в этих опытах, при концентрации норадреналина 1 мг в 1 мл интенсивность флуоресценции нервных волокон не отличалась от интенсивности контрольных опытов.

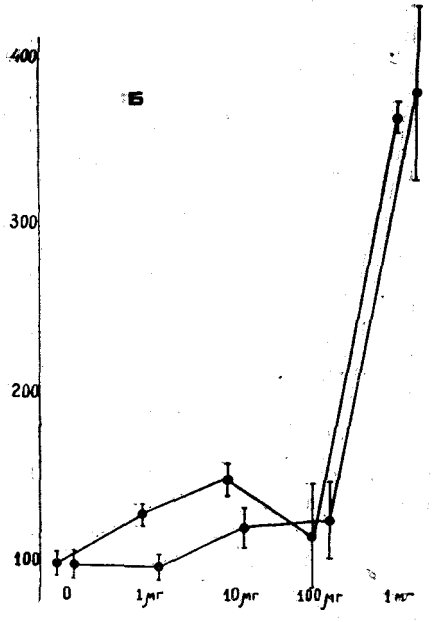

Рис. 2. Изменение интенсивности флуоресценции нервных волокон центральной артерии уха кролика при перфузии норадреналина на фоне действия феноксибензамина в конц. 50 мкг в 1 мл. Обозначения как на рис. 1.

В течение всего опыта раствор Кребса, содержащий феноксибензамин (50 мкг в 1 мл) с пропранололом (10 мкг в 1 мл) перфузировался через эти две артерии уха кролика (рис. 3). Как видно из рисунка, первый пик усвоения в этих опытах полностью отсутствует, а второй—значительно угнетен.

Обсуждение. Как известно, одним из важных механизмов физиологической инактивации адреналина и норадреналина является их усвоение симпатическими нервными элементами [2, 7, 10, 13, 14, 15]. Для изучения этого процесса экспериментаторами были использованы различные методические приемы. Относительно простой флуориметрический метод определения катехоламинов позволял провести обширные исследования процесса усвоения с использованием фармакологических анализаторов и специальных приемов (пре- и постганглионарная денервация, иммуносимпатэктомия и т. д.) изучения. Использование меченых катехоламинов позволяло изучить их усвоение при очень низких, почти физиологических концентрациях (5—10 ммкг/мл), а также определить

чистое количество (net uptake) усвоенного адреналина и норадреналина. Гистохимический метод Фалька уже дал возможность изучить процесс усвоения катехоламинов отдельными клеточными структурами. Однако в отличие от биохимического и радиохимического методов использование гистохимического метода до недавнего времени позволяло получить только качественные сведения [17, 18].

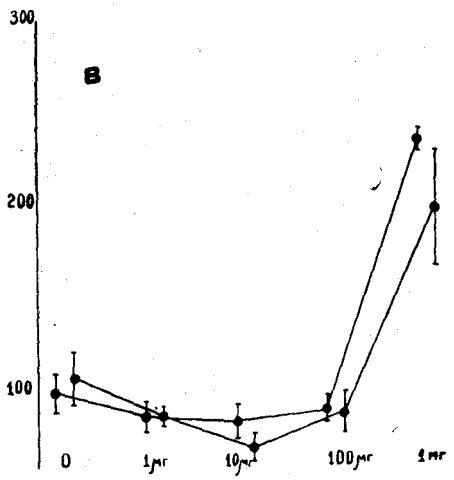

Рис. 3. Изменение интенсивности флуоресценции нервных волокон центральной артерии уха кролика при перфузии норадреналина на фоне действия феноксибензамина в конц. 50 мкг в 1 мл и пропранолола в конц. 10 мкг в 1 мл. Обозначения как на рис. 1.

Гиллеспи и Гамильтон в 1966 г. предложили метод количественной оценки содержания норадреналина в срезах селезенки путем измерения интенсивности флуоресценции.

В настоящей работе, пользуясь этим методом, показано, что интенсивность флуоресценции симпатических нервных волокон центральной артерии уха кролика находится в зависимости от концентрации перфузируемого норадреналина. Как видно из полученных результатов, при измерении концентрации норадреналина от 100 ммкг в 1 мл до 1 мг в 1 мл наблюдаются два пика интенсивности флуоресценции. Один наступает при концентрации *10 мкг в 1 мл, а второй—при* последующем стократном *увеличении* концентрации норадреналина. Эти данные напоминают факты, полученные Айверзином при изучении усвоения норадреналина изолированным сердцем крысы. Айверзином было показано, что в зависимости от концентрации перфузируемого норадреналина появляются два различных процесса усвоения, как он назвал условно—усвоение 1 и усвоение 2 [11—13].

Усвоение 1 функционирует при концентрациях норадреналина и адреналина 0,01—0,5 мкг/мл. При этом норадреналин усваивается лучше адреналина и большое значение имеет стереохимическая специфичность препарата: левовращающие изомеры усваиваются лучше правовращающих. Метараминол является хорошим ингибитором усвоения 1. Усвое-

ние 2 включается при 20—100-кратном повышении концентрации перфузируемого катехоламина, не проявляет стереохимическую специфичность, лучше происходит при перфузии адреналина и совсем не изменяется под влиянием метараминола.

В опытах на изолированном сердце крысы Айверзином было показано, что в концентрации 1.10^{-5} М адренолитик феноксибензамин угнетает усвоение 1 на 89%, а усвоение 2 на 55%. Таким образом, феноксибензамин проявляет свое блокирующее действие преимущественно на усвоение 1. В наших опытах феноксибензамин резко уменьшает интенсивность флуоресценции, развивающейся при перфузии норадреналина в конц. 10 и 100 мкг/мл, и существенно не влияет на очень резкий подъем интенсивности флуоресценции, наступающий при концентрации норадреналина 1 мг/мл. Таким образом, судя по развитию интенсивности флуоресценции нервных образований центральной артерии уха кролика и по блокирующему действию феноксибензамина на этот процесс, нами обнаружены два следующих друг за другом процесса усвоения, очень напоминающих усвоение 1 и усвоение 2 Айверзина. То обстоятельство, что в наших опытах первый и второй пики усвоения развиваются при больших концентрациях норадреналина (примерно в 100 раз), чем это наблюдается при усвоении 1 и усвоении 2 Айверзина, можно объяснить различием экспериментальных моделей и методов количественной оценки катехоламинов.

Выводы

1. Интенсивность флуоресценции нервных образований изолированной центральной артерии уха кролика находится в зависимости от концентрации перфузируемого норадреналина.

2. При перфузии норадреналина в концентрациях, варьирующих от 100 ммкг до 1 мг в 1 мл, наблюдаются два пика интенсивности флуоресценции.

3. Феноксибензамин заметно угнетает первый пик и существенно не влияет на второй.

4. На фоне действия феноксибензамина вместе с пропранололом происходит выраженная блокада процесса усвоения норадреналина нервными образованиями стенок артерий.

5. Высказывается предположение, что первый пик усвоения соответствует усвоению 1, а второй пик—усвоению 2, выявленных Айверзином в опытах на изолированном сердце крысы.

Институт тонкой органической химии
АН АрмССР

Поступило 25.VIII 1967 г.

Հ. Մ. ԱՎԱԳՅԱՆ

ԱՆՈՒԱՅԻՆ ՆԵՐՎԱԹԵԼԵՐԻ ՖԼՅՈՒՈՐԵՍՑԵՆՑԻԱՅԻ ԻՆՏԵՆՍԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՊԸ ՆԵՐԱՐԿՎՈՂ ԼՈՒԾՈՒՅԹՈՒՄ ԳՏՆՎՈՂ ՆՈՐԱԴՐԵՆԱԼԻՆԻ ՔԱՆԱԿԻ ՀԵՏ

Ա մ փ ո փ ո ւ մ

Ֆալկի հիստոքիմիական մեթոդը հնարավորություն է տալիս ուսումնասիրելու կատեխոլամինների յուրացումը բջջի առանձին բաղադրիչ մասերի կողմից։ Սակայն, ի տարբերություն ռադիոքիմիական և բիոքիմիական մեթոդների, հիստոքիմիական մեթոդը մինչև վերջերս կիրառվում էր միայն որակական տեղեկություններ ստանալու համար։

1966 թվականին Գիլեսպին և Համիլտոնը, չափելով շուրջ 5 միկրոն տրամագիծ ունեցող դաշտերի ֆլյուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը, առաջարկեցին կատեխոլամինների քանակական գնահատման նոր մեթոդ։ Օգտագործելով այդ մեթոդը, Գլազգոյի համալսարանի ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտում մենք ուսումնասիրեցինք ճագարի ականջային զարկերակի ներվաթելերի ֆլյուորեսցենցիայի ինտենսիվության կապը ներարկվող լուծույթում գտնվող նորադրենալինի քանակի հետ։

Պարզվեց, որ նորադրենալինի լուծույթի ներարկումը առաջացնում է ներվաթելերի արտածման ինտենսիվության մեկը մյուսին հաջորդող երկու ուժեղացում։ Ֆենօքսիբենզամինը (50 միկրոգրամ 1 մլ.) ընկճում է առաջին ուժեղացումը և չի ազդում երկրորդի վրա։

Այսպիսով, ելնելով ֆլյուորեսցենցիայի ինտենսիվության զարգացումից և նրա վրա ֆենօքսիբենզամինի ցուցաբերած արգելակող ազդեցությունից, մեզ հաջողվել է բացահայտել յուրացման երկու միմյանց հաջորդող երևույթներ, որոնք մեծապես հիշեցնում են առնետի անջատված սրտի վրա դրա փորձերում Այվերսենի կողմից հայտնաբերված № 1 և № 2 յուրացումները։

ЛИТЕРАТУРА

1. Avakian V. M., Gillespie J. S. Proceedings of physiological Society, April, 1966.
2. Von Euler U. S., Lishajko F. Int. J. Neuropharmacol, 4, 273—280, 1965.
3. Falck B. Acta physiol. scand. 56, suppl. 197, 1962.
4. Fuxe K., Sedvall G. Acta physiol. scand. 64, 1—2, 75—86, 1965.
5. Gillespie J. S. J. physiol. (Lond.), 187, 2, 2—4P, 1966.
6. Gillespie J. S., Hamilton D. N. H. Nature (Lond.) 212, 5061, 524—525, 1966.
7. Gillespie J. S., Kirpekar S. M. J. physiol. (Lond.) 176, 2, 205—227, 1965.
8. Gillespie J. S., Kirpekar S. M. J. physiol. (Lond.) 179, 1, 46P, 1965.
9. Hamberger B., Malmfors T., Norberg K. A., Sachs C. Biochem. Pharmac. 13, 6, 841—844, 1964.
10. Hertting G., Axelrod J.. Kopin I. J., Whitby L. G. Nature (Lond.) 189, 4758, 66, 1961.
11. Iversen L. L. Br. J. Pharmac. Chemother. 25, 1, 18—33, 1965.
12. Iversen L. L. J. Pharm. Pharmac. 17, 1, 62—64, 1965.
13. Iversen L. L. Advances in drug research 2, 1—46, 1965,

14. Iversen L. L., Growinski J., Axelrod J. Nature (Lond.) 206, 4990, 1223, 1965.
15. Iversen L. L., Glowinski J., Axelrod J. J. Pharm. exp. Ther. 150, 2, 173—183, 1965.
16. Lande I. S. de L. Rand M. J. Aust. J. exp. Biol. Med. Sci. 43, 639, 1965.
17. Malmfors T. Acta physiol. scand. 64, suppl. 248, 1965.
18. Norberg K—A., Hamberger B. Acta physiol scand. 63, suppl, 238, 1964.
19. Schmiterlow C. G. Acta physiol scand. 16, suppl. 56, 1948.