

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ γ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В СЕТЧАТКЕ ТЕМНОАДАПТИРОВАННОЙ ЛЯГУШКИ (*RANA RIDIBUNDA* И *RANA TEMPORARIA*)

Ж. Э. АРУТЮНЯН, А. М. ПЕТРОСЯН, П. П. ЗАК, Т. В. ЛЕЛЕКОВА

Исследовано распределение γ -аминомасляной кислоты в сетчатке двух видов лягушек (*R. ridibunda*, *R. temporaria*) в условиях темновой адаптации. Для этой цели использовался метод расслоения сетчатки при помощи микротомы в условиях замораживания. Показано, что у обоих видов лягушек γ -аминомасляная кислота распределена примерно одинаково; наибольшим содержанием этой аминокислоты в сетчатке отличаются горизонтальные и амакриновые клетки.

Ключевые слова: сетчатка, распределение ГАМК, темноадаптированная лягушка.

В настоящее время накопился большой экспериментальный материал, подтверждающий значение γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) как одного из тормозных медиаторов в сетчатке позвоночных. В частности, много данных относительно различных аспектов участия ГАМК как медиатора в синаптической передаче в сетчатке лягушки [1, 2, 4—7, 10]. Методом радиоавтографии как на изолированной сетчатке [8], так и при введении меченой ГАМК в глазное яблоко [4], а также на основании данных послойного анализа распределения меченой ГАМК [5] установлен нейтральный тип захвата этой аминокислоты в сетчатке лягушки. Выяснилось, что меченая ГАМК в основном накапливается в телах горизонтальных, амакриновых и ганглиозных клеток, а также во внутреннем и наружном синаптических слоях. При исследовании влияния уровня освещенности установлено усиление выходящего потока ^{14}C -ГАМК из изолированной сетчатки лягушки при затемнении и уменьшение его при освещении постоянным светом [1]. Методом электрофизиологии установлено участие ГАМК в организации рецептивных полей ганглиозных клеток сетчатки лягушки [4, 5]. Показано также, что содержание этой аминокислоты в сетчатке лягушки зависит от ее функционального состояния. По сравнению с темновой адаптацией при освещении количество ГАМК в сетчатке лягушки повышается на 60—70% [2, 7]. Однако, кроме одной работы [6], других детальных исследований по распределению эндогенной ГАМК в сетчатке лягушки не имеется. Поэтому мы попытались детально исследовать распределение эндогенной ГАМК в сетчатке темноадаптированной лягушки.

Материал и методика. Опыты проводили на лягушках *R. ridibunda* и *R. temporaria* в декабре. Лягушки *R. ridibunda* были пойманы в окрестностях Еревана, а *R. temporaria*—в окрестностях Москвы. После адаптации к темноте при 20—21° в течение 12—18 ч лягушек декапитировали, удаляли глаз при слабокрасном освещении, разрезали его по экваторной линии ножницами, удаляли хрусталик и выделяли сетчатку в холодном Krebs-бикарбонатном буфере [8], pH 7,4. Затем сетчатку наружными сегментами вниз помещали на предметное стекло и расправляли. Далее ее равномерно прикладывали к ровной поверхности льда, который непрерывно замораживался при помощи прибора ТОС-2. На эту процедуру старались тратить как можно меньше времени. Срезы замороженной сетчатки были получены при помощи саиного микротомы МС-2. Более подробное описание подготовки и получения срезов сетчатки имеется в работе [3]. Данные морфометрии и порядок взятия срезов сетчатки приводятся в табл. 1. Как следует из этой таблицы, образцы брали выборочно во избежание загрязнения каждого образца соседними. Согласно работам, проведенным ранее с использованием расслоения сетчатки [3], разделительная зона в 15 мкм гарантирует образцы от загрязнения. Образцы наружных сегментов (НС), внутренних сегментов (ВС) горизонтальных клеток (ГК), амакриновых клеток (АК), внутренний синаптический слой (ВСС) отделены друг от друга зазором не менее 15 мкм, что позволяет разрешить градиент распределения ГАМК в этих областях. Образец биполярной клетки (БК) может быть загрязнен примесями как ГК, так и АК вследствие того, что разделительные зоны вынужденно малы—10 и 8 мкм соответственно. Выборочный гистологический контроль показал, что при зазоре менее 10 мкм возможная примесь может составлять в среднем 10—15%.

Для накопления достаточного количества отдельных фракций тангенциальные срезы сетчатки в процессе получения срезов замораживались в отдельных контейнерах, находящихся на сухом льду. Полученные фракции после быстрого взвешивания гомогенизировались в перхлорной кислоте. После экстракции в течение часа при 12° содержание ГАМК в образцах определялось флуориметрическим методом [9]. Для сетчатки специфичность этого метода была отконтролирована в специальных экспериментах.

Результаты и обсуждение. В первой серии опытов было определено общее содержание ГАМК в целой сетчатке. Оно оказалось примерно одинаковым для обоих видов лягушек: 3,56 мкМ/г влажной массы для *R. ridibunda* и 3,00 мкМ/г — для *R. temporaria*.

Далее мы попытались установить локализацию ГАМК и ее концентрацию в различных структурах сетчатки. В слое фоторецепторных клеток были взяты наружные и внутренние сегменты. Наружный синаптический слой был взят вместе с наружной границей внутреннего ядерного слоя. Эта фракция содержит преимущественно тела горизонтальных клеток, пресинаптические окончания фоторецепторов, пре- и постсинаптические окончания горизонтальных клеток и постсинаптические окончания биполярных клеток. Следующую фракцию составляла средняя часть внутреннего ядерного слоя, богатая телами биполярных клеток с небольшой примесью амакриновых клеток и их отростков. Внутренняя граница внутреннего ядерного слоя с небольшим кусочком внутреннего синаптического слоя, содержащая преимущественно тела и отростки амакриновых клеток, составляла пятую фракцию. Внутренняя часть внутреннего синаптического слоя—последняя фракция. В эту фракцию входят пресинаптические окончания разных типов амакриновых и биполярных клеток, а также постсинаптические отростки ганглиозных кислот. Согласно общеизвестным морфологическим данным, во

Таблица 1

Зоны слоев сетчатки, использованные в опытах

Обозначение слоя		Rana temporaria толщина и глубина слоя, мкм			Координаты образца	Rana ridibunda толщина и глубина слоя, мкм			Координаты образца
Фоторецеп- торы	НС	27±3		(0)	0—46 (НС+ВС)	62±3		(0)	15—30 (НС)
	ВС	19±2		(27)		12±3		(62)	62—77 (ВС)
	ядра	10±5		(46)		22±3		(74)	
	наружный синаптический слой	6±1		(56)		10±2		(96)	
					57—67 (ГК)				96—111 (ГК)
Внутренний ядерный слой	тела клеток наружной зоны	10		(62)	77—87 (БК)	10		(106)	
	тела клеток средней зоны	19	39±6	(72)		18	38±5	(116)	121—131 (БК)
	тела клеток внутренней зоны	10		(91)		10		(134)	139—154 (АК)
Внутренний синаптический слой		39±7		(101)	125—140 (ВСС)	56±5		(144)	169—184 (ВСС)
Слой ганглиозных клеток		10±2		(140)		10±2		(200)	
Внутренняя пограничная мембрана		15±3		(151)		15±3		(211)	
Толщина всей сетчатки		166±29 мкм				226±26 мкм			

всех взятых образцах, за исключением наружных сегментов, должна присутствовать приблизительно равномерная примесь глиальных клеток—мюллеровских клеток, которые располагаются по всей толщине сетчатки. Координаты каждого слоя и субслоя сетчатки *R. temporaria* были определены ранее [3], для *R. ridibunda* морфометрические данные были определены в процессе выполнения этой работы и приведены в табл. 1.

В табл. 2 приведены данные о содержании ГАМК в слоях сетчатки обоих видов лягушек. В сетчатке этих видов ГАМК содержится преимущественно в клетках внутреннего ядерного слоя. Как следует из этой

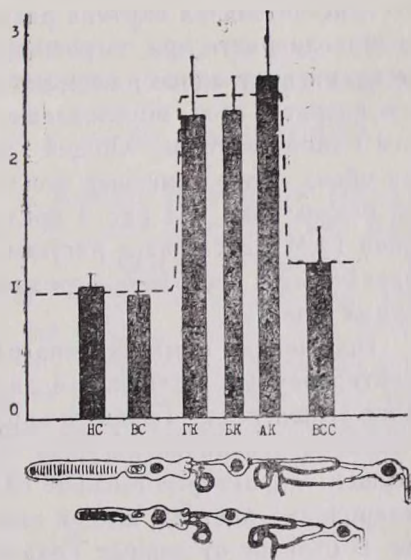
Таблица 2
Содержание ГАМК в слоях сетчатки, мкМ/г сырой массы

Обозначение образца	<i>Rana ridibunda</i> (n=4)	<i>Rana temporaria</i> (n=3)
НС* ВС	2,264±0,179 2,149±0,360 2,207	2,00±0,260
ГК БК АК	4,209±1,085 4,701±1,357 4,983 6,040±1,345	5,045±1,403 5,288±0,796 5,090 5,000±1,629
ВСС	3,284±1,570	1,758±0,314

* Сокращения см. в тексте, n—количество опытов.

таблицы и рис. 1, существуют достоверные различия в содержании ГАМК в клетках внутреннего ядерного слоя, фоторецепторных клетках и внутреннем синаптическом слое; не выявлено достоверных

Рис. 1. Сводная диаграмма (по 7 опытам) послойного распределения ГАМК в сетчатке лягушек *R. ridibunda* и *R. temporaria*. По оси абсцисс обозначены слои сетчатки; по оси ординат—содержание ГАМК в относительных единицах (объяснение в тексте).



различий в содержании ГАМК в пределах внутреннего ядерного слоя. Вместе с тем следует указать, что в некоторых опытах в сетчатке обоих видов лягушек отмечалось два максимума содержания ГАМК, которые приходились на образцы горизонтальных и амакриновых клеток (рис 2). В слое биполярных клеток в этих опытах содержание ГАМК было

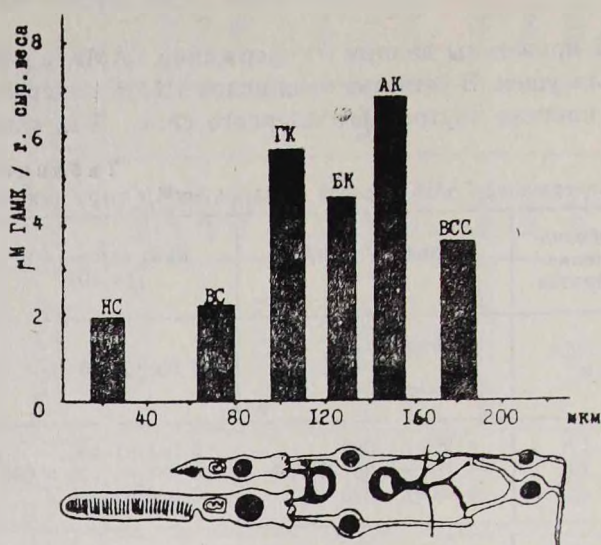


Рис. 2. Распределение ГАМК в сетчатке лягушки *R. temporaria* с двумя максимумами ее содержания во внутреннем ядерном слое (в ГК и АК). По оси абсцисс—толщина сетчатки в мкм, под ней—расположение клеточных элементов сетчатки в том же масштабе; по оси ординат—содержание ГАМК, мкМ/г вл. массы.

ниже. На рис. 2 приведены усредненные результаты этих опытов. Если это действительная картина распределения ГАМК в сетчатке, то ее легко-снивелировать при погрешностях разрезания сетчатки на слои. В то же время полученное распределение с двумя максимумами во внутреннем ядерном слое, обусловленное ошибками такого рода, представляется маловероятным. Общий характер распределения ГАМК в сетчатках обоих видов лягушек весьма близок, что позволяет суммировать эти результаты. На рис. 1 представлена сводная диаграмма распределения ГАМК в сетчатке лягушек. Данные нормированы по наименее вариабельной величине—среднему содержанию ГАМК в фоторецепторных клетках.

Полученная нами картина распределения ГАМК в сетчатке темноадаптированных лягушек указанных видов (табл. 2, рис. 1, 2), подобна ранее выявленной Граамом картине распределения ГАМК в сетчатке темноадаптированной лягушки *Rana pipiens* [6]: для всех трех видов лягушек характерно высокое содержание ГАМК в горизонтальных и амакриновых клетках, но при этом имеются также существенные различия. В отличие от данных Граама [6] в нашем эксперименте содержа-

ние ГАМК во внутреннем синаптическом слое лягушек значительно ниже по сравнению с таковыми в телах горизонтальных и амакриновых клеток. Возможно, эти различия носят сезонный характер, так как содержание ГАМК в сетчатке лягушки сильно зависит от функционального состояния сетчатки [2, 7].

Таким образом, ГАМК содержится преимущественно в тормозных нейронах: горизонтальных и амакриновых клетках, что соответствует представлению о ее тормозной медиаторной роли в сетчатке.

Институт биохимии АН Армянской ССР, Институт химической физики АН СССР,
Московский государственный университет, биологический факультет

Поступило 20.V 1981 г.

Գ-ԱՄԻՆԱԿԱՐԱԳԱԹՔՎԻ ԲԱՇԵՈՒՄԸ ՄԹՈՒԹՅԱՆ ՀԱՐՄԱՐՎԱԾ
ԳՈՐՏԻ ՑԱՆՑԱԹԱՂԱՆԹՈՒՄ (RANA RIDIBUNDA,
RANA TEMPORARIA)

Ժ. Է. ՀԱՐՈՒՅՈՒՆՅԱՆ, Ա. Մ. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ, Պ. Պ. ՉԱԿ, Տ. Վ. ԼԵԼԵԿՈՎԱ

Ցանցաթաղանթի դյուրին շերտավորումը հորիզոնական հարթության մեջ կապված նրա կառուցվածքային առանձնահատկության հետ, հնարավորություն է բնծնոում ստանալու առանձին բջջային էլեմենտներով հարստացված ենթաշերտեր: Սառեցնող միկրոտոմի օգնությամբ ստացված ցանցաթաղանթի վեց ենթաշերտերում Գ-ամինակարագաթթվի պարունակության չափման արդյունքները վկայում են երկու տեսակ գորտերի մթության հարմարված ցանցաթաղանթներում այդ ամինաթթվի բաշխման նմանության մասին: Գ-ամինակարագաթթվում մեծ մասամբ կուտակված է ցանցաթաղանթի ներքին կորիզային շերտում, որը, հավանաբար, պայմանավորված է այդ ամինաթթվի րարձր քանակներով հորիզոնական և ամակրին բջիջներում:

DISTRIBUTION OF GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID IN THE DARK
ADAPTED FROG RETINA (RANA RIDIBUNDA, RANA TEMPORARIA)

J. E. HARUTJUNYAN, A. M. PETROSYAN, P. P. ZAK, T. V. LELEKOVA

Because of its ordered structure it is possible to slice the retina in a tangential plane and to obtain fractions enriched in specific cell structures. These fractions were obtained by the freezing microtome. The retina was microdissected into six layers. When sectioning has been done the retinal layers are analyzed for the GABA content. The distribution of GABA in dark-adapted frog retina was approximately the same in both species. Peak levels were found in the inner nuclear layer. Within inner nuclear layer probably the most part of GABA was concentrated in the horizontal and amacrine cells.

1. Арутюнян Ж. Э., Геворкян Г. А., Петросян А. М. Журн. эвол. биохим. и физиол., 17, 1981.
2. Арутюнян Ж. Э., Петросян А. М. Мат-лы II конф. мол. уч. Инст. эксп. биол. АН Арм. ССР, 1980.
3. Зак П. П., Лелекова Т. В., Островский М. А. Физиол. ж. СССР, 60, 1397—1403, 1974.
4. Bonaventure N., Roussel G., Haehnel A. C. K. Acad. Sci. Paris, 284, 1329—1332, 1977.
5. Bonaventure N., Wloland N. Doc. Ophthalmol. Proc. Ser., 15, 251—255, 1978.
6. Graham L. T. Jr. Brain Res., 36, 476—479, 1972.
7. Graham L. T., Jr., Baxter C. F. & Lolley R. N. Brain Res., 20, 379—388, 1970.
8. Kennedy A. J. & Voaden M. J. J. Neurochem., 22, 63—71, 1974.
9. Undenfriend S. in: Fluorescence Assay in Biology and Medicine, Acad. Press New York, 185, 1962.
10. Voaden M. L., Marshall J. & Murant N. Brain Res., 67, 115—132, 1974.