

УДК 615.832.9.015.42:612.82.015.3

ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ НА ПОГЛОЩЕНИЕ
АМИНОКИСЛОТ СРЕЗАМИ МОЗГА

ЭМИРБЕКОВ Э. З.

Исследована интенсивность поглощения меченых C^{14} -глутамата, аспартата, ГАМК, валлина, гистидина и аминокислотной кислоты срезами мозга охлажденных (20°) крыс. Инкубация срезов мозга при 37° у охлажденных крыс не приводила к выраженным сдвигам по сравнению с нормотермическими животными. Инкубация срезов мозга гипотермических животных при 20° снижала интенсивность поглощения аминокислот по сравнению с инкубацией при 37° . Результаты показали, что соотношение максимального поглощения аминокислот (за исключением аминокислотной кислоты и гистидина) при температуре инкубации срезов 37° и 20° у гипотермических крыс возрастало по сравнению с таковым у нормотермических животных. У охлажденных до 20° крыс поглощение каждой отдельной аминокислоты срезами мозга изменяется в различной степени в зависимости от времени инкубации (5, 10, 15 и 30 мин).

Аминокислоты в мозгу играют полифункциональную роль [1—4]. Содержание аминокислотного фонда в ткани мозга зависит от активности их транспорта и метаболизма. Компартиментализация аминокислот определяется избирательным транспортом и различной способностью клеточных структур поглощать аминокислоты [5, 6]. Установлено, что по транспортному механизму в срезах мозга аминокислоты делятся на 18 различных классов [5—7]. Такое многообразие обусловлено длиной углеродной цепи, местом расположения и характером функциональных групп в молекуле аминокислот, а также ингибирующим влиянием их самих на поглощение из среды [8]. Важной характеристикой транспорта аминокислот в срезах мозга является установление равновесия их поглощения в динамике времени инкубации [5, 9]. Срезы мозга аккумулируют аминокислоты в зависимости от присутствия K^{+} , Na^{+} и содержания АТФ [8]. Для транспорта всех аминокислот характерна температурная зависимость [9, 10]. Общее охлаждение теплокровного организма приводит к значительному изменению в мозгу энергетического обмена и аминокислотного фонда [11, 12], что может сказаться на клеточном транспорте аминокислот в тканях мозга. В то же время ранее нами не был обнаружен эффект гипотермии на транспорт аминокислот из циркулирующей крови в мозг [13].

Целью работы явилось изучение влияния глубокой гипотермии на поглощение аминокислот срезами мозга в зависимости от температуры и времени инкубации.

Эксперименты проведены на крысах линии Вистар массой 250—275 г. До начала опытов животным внутрибрюшинно в течение 30 мин вводили хлоралгидрат (380 мг/кг массы тела). Охлаждали крыс в ледяной воде. Температуру измеряли ректально и в среднем ухе, а после обезглавливания в самой ткани мозга. При пребывании в холодной воде 50—55 мин температура среднего уха и мозга снижалась до 20°, а ректальная при этом была на 2—3° ниже [13]. Для опытов использовали только тех животных, у которых температура ткани мозга после декапитации равнялась 20°. В отдельной серии экспериментов в кровь охлажденных крыс вводили синий Иванс. При температуре мозга, равной 20°, выход краски не наблюдался, следовательно, в данных условиях мозг механически не повреждался. Контрольных и подопытных крыс декапитировали, быстро извлекали мозг (без мозжечка), очищали от крови. Из обонх полушарий головного мозга готовили срезы (0,4 мм) при помощи микротомы Мак-Ильвейна. Срезы инкубировали в среде, содержащей в мМ: NaCl—119; KCl—5,0; CaCl₂—0,75; MgCl₂—12; NaH₂PO₄—1,0; глюкозы—10 и N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфаниловой кислоты—25 [9]. Добавлением NaOH pH среды доводили до 7,35.

Инкубацию срезов мозга (~140 мг ткани на 5 мл среды) проводили в водяной бане при 37° и 20°. Через 30 мин в среду добавляли меченые C¹⁴-аминокислоты (0,05 мкК_в/5 мл) фирмы «New England Nucleag» при конечной концентрации 1 мМ для L-аспартата, L-валина, D-глутамата, ГАМК, L-гистидина и 2 мМ для α-аминоизомасляной кислоты. Выбор указанных аминокислот для исследования продиктован тем, что изучены динамическое равновесие, кинетические параметры и энергия активации поглощения этих аминокислот в срезах мозга intactных животных [10]. Все выбранные 5 аминокислот и аналог ГАМК—аминоизомасляная кислота относятся к отдельным транспортным классам по длине углеродной цепи, месту расположения, характеру и количеству функциональных групп [6, 8].

Для определения интенсивности поглощения аминокислот инкубацию срезов продолжали 5, 10, 15 и 30 мин [9]. После инкубации срезы мозга фильтровали, замораживали с помощью сухого льда, навешивали, гомогенизировали в 2 мл 3% раствора хлорной кислоты и через 15 мин центрифугировали. 0,5 мл надосадочной жидкости добавляли к 15 мл сцинтилляционной жидкости [8] и измеряли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике Intertechnique SL 30, Teledyne (США). Величину поглощения аминокислот срезами мозга выражали в мкмоль меченых аминокислот, включенных в ткань мозга. Для вычисления внеклеточного пространства использовали меченое инулин и определяли его параллельных опытах с добавлением немеченого инулина определяли содержание воды высушиванием срезов при 95° (48—72 ч) до постоянного веса. Концентрацию поглощенной аминокислоты вычисляли согласно

для аминокислоты—в 4,6, ГАМК—4, гистидина—2,9, глутамата и аспартата—2 раза.

Мы вычисляли соотношение поглощения аминокислот срезами мозга у нормо- и гипотермических крыс (табл. 2) при температуре инкубации 37° и 20°. Оказалось, что за исключением аминокислоты глутамата и гистидина для всех аминокислот у нормо- и гипотермических

Таблица 2

Соотношение поглощения аминокислот срезами мозга у нормо- и гипотермических (20°) крыс при температуре инкубации 37° и 20° (время инкубации 30 мин)

Аминокислоты	Соотношение поглощения аминокислот у нормо- и гипотермических крыс	
	Температура инкубации срезов	
	37°	20°
Глутамат	0,98	1,20
Аспартат	0,88	1,95
ГАМК	0,97	1,74
Аминокислоты		
Аминокислоты	1,08	0,53
Валин	0,68	0,90
Гистидин	0,81	0,88

ских крыс при температуре инкубации 20° оно было гораздо выше, чем при 37°. При этом из сильнокислых аминокислот в большей степени повышалось соотношение поглощения аспартата. Видимо, охлаждение организма изменяло транспортную систему аминокислот, связанную с длинной углеродной цепи [6], что приводило к снижению сродства поглощения аминокислоты с короткой углеродной цепью. Значительно увеличилось при температуре инкубации 20° соотношение поглощения ГАМК у нормо- и гипотермических крыс. В то же время степень повышения этого соотношения для валина была гораздо ниже, чем для ГАМК (табл. 2). По-видимому, снижение температуры тела оказывало неодинаковый эффект на транспортный механизм нейтральных аминокислот (ГАМК и валина). В литературе имеются сведения о том, что на транспортную систему аминокислот влияет место расположения аминогруппы в ее молекуле [6]. Соотношение поглощения аминокислоты с гетероциклической цепью—гистидина срезами мозга при температуре инкубации 20° у нормо- и гипотермических крыс увеличивалось незначительно (на 0,07) по сравнению с таковым при температуре инкубации 37°.

Полученные результаты показали, что различная степень влияния гипотермии на поглощение аминокислот срезами мозга, видимо, объясняется не только прямым эффектом низкой температуры тела на различные чувствительные системы клеточного транспорта аминокислот, но и косвенным влиянием ее на метаболизм аминокислот в тканях мозга [12]. Как видно (табл. 1 и 2), поглощение метаболически

инертной аминокислоты в срезах мозга охлажденных крыс значительно отличалось от поглощения аминокислот, обладавших высокой метаболической активностью в тканях головного мозга [1—4]. Известно, что на транспорт аминокислот *in vitro* влияют эндогенные превращения аминокислот [6].

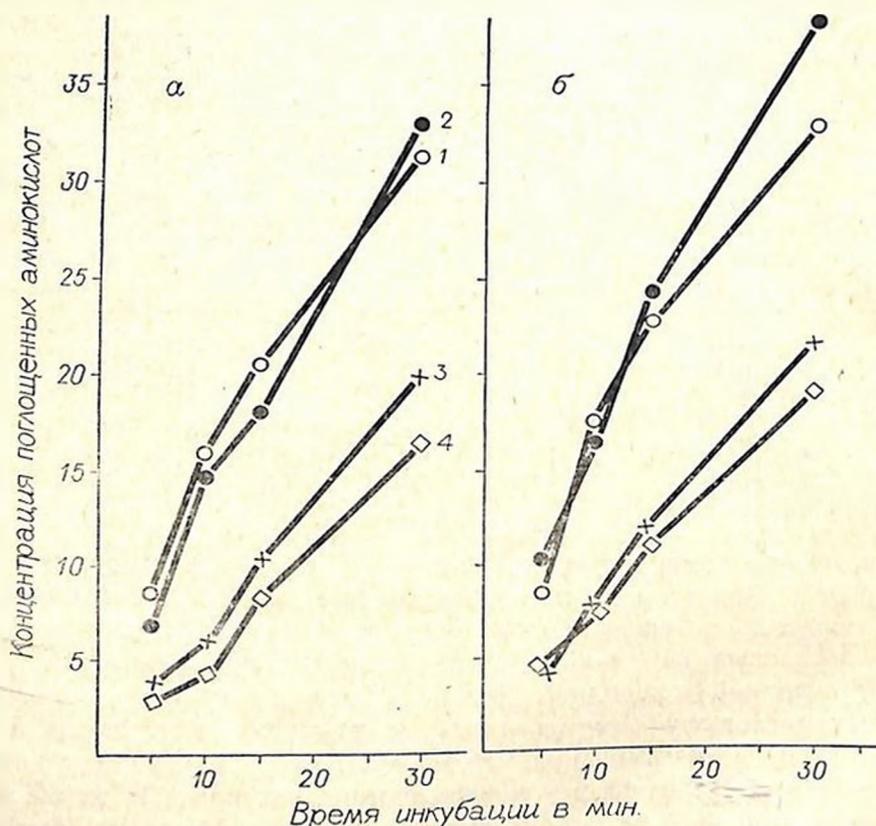


Рис. 1. Зависимость поглощения глутамата (а) и аспартата (б) срезами мозга контрольных (нормотермических) и охлажденных до 20° (гипотермических) крыс (мкмоль/мл внеклеточной жидкости) от времени и температуры инкубации. Здесь и на рис. 2: 1—контрольные животные, 2—гипотермические (инкубация при 37°); 3—контрольные, 4—гипотермические (инкубация при 20°)

В этом отношении интерес представляют результаты по измерению активности поглощения аминокислот срезами мозга охлажденных крыс в динамике инкубации (рис. 1, 2). Динамика транспорта глутамата, аспартата, ГАМК и гистидина в срезах мозга в течение 5, 10, 15 и 30 мин у нормотермических и охлажденных (20°) крыс при температуре инкубации 37° и 20° различалась. Для глутамата поглощение срезами мозга контрольных и охлажденных животных при инкубации 37° в течение всего периода инкубации не подвергалось существенным сдвигам (рис. 1). При инкубации срезов в условиях 20° гипотермия приводила к снижению интенсивности поглощения глутамата во время

всего периода инкубации. Поглощение аспартата в срезах контрольных и охлажденных животных при температуре 37° и 20° нарастало в одинаковой степени в течение всего периода инкубации.

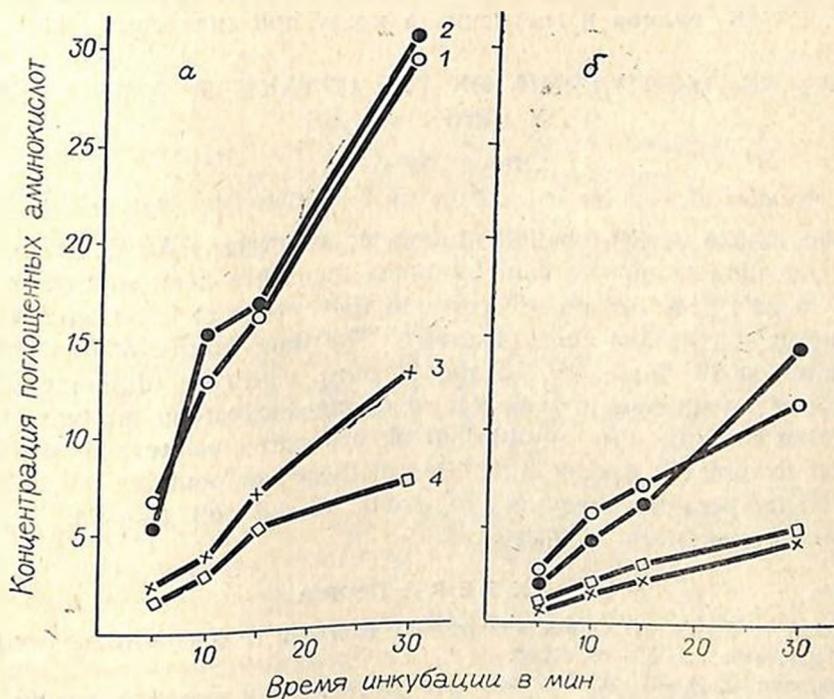


Рис. 2. Зависимость поглощения ГАМК (а) и гистидина (б) срезами мозга контрольных (нормотермических) и охлажденных до 20° (гипотермических) крыс (мкмоль/2 мл внутриклеточной жидкости) от времени и температуры инкубации

У охлажденных крыс срезы мозга при 37° поглощали ГАМК из среды с той же интенсивностью, что у контрольных животных (рис. 2) через 5, 15 и 30 мин инкубации. К 10-й мин инкубации срезы мозга охлажденных крыс при этом несколько больше поглощали ГАМК, чем срезы intactных животных. При температуре инкубации 20° в срезах мозга как нормо-, так и гипотермических крыс в течение 5, 10 и 15 мин поглощение ГАМК нарастало в одинаковой степени, затем к 30-й мин инкубации оно у гипотермических животных значительно снижалось по сравнению с нормотермическими.

Инкубация срезов мозга при 37° у контрольных и охлажденных (20°) крыс приводила почти к одинаковому поглощению основной аминокислоты—гистидина в течение 5, 10 и 15 мин, при дальнейшей инкубации до 30 мин оно происходило в срезах мозга гипотермических крыс более интенсивно, нежели у контрольных.

На сохранение относительно высокой способности поглощения аминокислот срезов мозга охлажденного организма в условиях низкой температуры инкубации (20°), по всей вероятности, оказывают влияние сложные метаболические превращения дикарбоновых аминокислот, ГАМК, валина и гистидина в мозгу при гипотермии [12].

EFFECT OF HYPOTHERMIA ON THE UPTAKE OF AMINO ACIDS BY BRAIN SLICES

EMIRBEKOV E. Z.

Laboratory of Neurochemistry, Dagestan State University, Makhachkala

The uptake of C¹⁴-labelled glutamate, aspartate, GABA, valine, histidine and aminoisobutyric acid by brain slices has been studied in rats cooled to 20°. The certain decrease in the uptake of these compounds (incubation at 20°) has been observed. The time course of this process (incubation at 20° for 5, 10, 15 and 30 min) varies for different amino acids tested. A change in temperature of the incubation mixture to 37° produces a shift in the equilibrium of aspartate, valine and histidine transport toward the greater quantities of these compounds.

The temperature-dependent regulation of the cell transport system in normothermal brain is suggested.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бунятыя Г. Х.—В кн.: Обмен аминокислот (под ред. П. А. Кометиани), Тбилиси, Мецниереба, с. 85—98, 1968.
2. Кометиани П. А.—В кн.: Вопросы биохимии нервной и мышечной системы. Тбилиси, Мецниереба, 2, с. 101—113, 1972.
3. Палладин А. В. Вопросы биохимии нервной системы, Киев, Наукова думка, 184 с., 1965.
4. Maker H. S., Clarke D. D., Lajtha A.—In: Basic Neurochemistry (Eds. Siegel G. J., Albers R. W., Katzman R. and Agranoff B. W.), Little, Brown and Company, Boston, p. 279—307, 1976.
5. Neidle A., Kandra J., Lajtha A. Arch. Biochem. and Biophys., 169, 397—405, 1975.
6. Blasberg R., Lajtha A. Brain Res., 1, 86—104, 1966.
7. Lajtha A.—In: Aromatic Amino Acids in the Brain, Elsevier, Excerpta Medica North-Holland, Amsterdam, p. 25—49, 1974.
8. Banay-Schwartz M., Teller D. N., Gergely A., Lajtha A. Brain Res., 71, 117—131, 1974.
9. Banay-Schwartz M., Lajtha K., Sershen H., Lajtha A. Neurochemical Res., 2, 695—706, 1977.
10. Cohen S. R. J. Membr. Biol., 22, 53—72, 1975.
11. Эмирбеков Э. З. Функциональная нейрохимия, Махачкала, ДГУ, 125 с., 1980.
12. Абдуллаев Р. А., Эмирбеков Э. З. Вопросы мед. химии, 6, 802—807, 1980.
13. Emirbekov E. Z., Sershen H., Lajtha A. Brain Res., 125, 187—191, 1977.
14. Banay-Schwartz M., Piro L., Lajtha A. Arch. Biochem. and Biophys., 145, 199—210, 1971.
15. Бейли Н. Математика в биологии и медицине, М., Мир, 326 с., 1970.

Проблемная лаборатория нейрохимии
ДГУ, Махачкала

Поступила 14.X 1981