

УДК 612.8.015

БИОХИМИЯ

Н. А. Есаян, Л. Н. Аракелян

Влияние гамма-аминомасляной кислоты на субклеточное распределение норадреналина в мозгу крыс

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 9/VII 1968)

Выяснение существующих взаимоотношений между эндогенными нейрoактивными веществами—ацетилхолином, норадреналином (НА), серотонином (5-ГТ), дофамином и гамма-аминомасляной кислотой (ГАМК), представляет большой интерес. С этой точки зрения заслуживают внимания исследования, проведенные в нашей лаборатории по выявлению действия ГАМК на сдвиги катехоламинов (КА) и 5-ГТ в мозгу (1, 2). В настоящей работе изучено влияние ГАМК на содержание НА в субклеточных частицах мозговой ткани. Проведены также сравнительные исследования с резерпином и фенамином, истощающими запасы НА.

Гистохимические исследования (3) показали, что НА в мозговой ткани локализуется, в основном, в варикозных утолщениях нервных окончаний, но небольшая его часть находится также в аксонах и тельцах клетки. При одновременном применении дифференциального центрифугирования и электронной микроскопии (4, 5) обнаружено разрушение клеточной мембраны во время гомогенизирования мозговой ткани в изотонических растворах, в результате чего внутриклеточные образования распределяются в разных слоях в зависимости от их молекулярного веса. Выявлено также, что нервные окончания—синаптосомы, довольно устойчивы, вследствие чего они не разрушаются и вместе с содержащимися в них нейрoактивными веществами обнаруживаются в митохондриальной фракции. Источником НА, определяемого в надосадочной фракции, вероятно, являются аксоны, тельца клеток и, в некоторой степени, разрушенные синаптосомы. Известно истощающее действие резерпина на КА адренергических нервных окончаний, аксонов и телец нейронов. Отсутствие симпатического эффекта под действием резерпина при этом объясняется инактивацией НА митохондриальной моноаминоксидазой внутри клетки до того, как он достигает адренергических рецепторов. Действие ряда симпатомиметических аминов—фенамина, тирамина, фенилэтиламина осуществляется через высвобождение НА из синаптосомальных везикул. Выделенный НА инактивируется в основном катехолоксиметилтрансферазой после действия его на рецепторы.

Исследования проводили на белых крысах (самцах) весом 100—150 г, содержащихся на обычном пищевом рационе. Животных убивали декапитированием. Мозг быстро извлекали, промывали в дистиллированной воде на льду и сразу гомогенизировали в холодном растворе 0,32М сахарозы, содержащем 1% этилендиаминтетраацетата, в соотношении 1:5. Для изучения субклеточного распределения НА в мозгу крыс использовали гомогенизатор с фторопластовым пестиком с зазором 0,25 мм. Скорость вращения пестика 840 об/мин. Гомогенизацию по продолжительности и движению пестика вверх и вниз производили двумя путями: движение пестика 12 раз вверх и вниз в течение 2-х минут и движение пестика вверх и вниз 4 раза в течение 40 секунд. Субклеточные частицы были разделены дифференциальным центрифугированием в центрифуге с охлаждением. Ядерная фракция осаждалась двукратным центрифугированием при 900 g в течение 10 минут, митохондриальная— при 50.000 g в течение 60 минут, а в некоторых опытах при 13.000—40.000 g—40—90 минут. В опытах *in vivo* крысам внутрибрюшинно вводили 5 мг/кг ГАМК, 3 мг/кг резерпина и 20 мг/кг фенамина. В опытах *in vitro* к гомогенату, после удаления из него ядерной фракции, добавляли 10, 100, 200 и 1000 мкг/мл ГАМК и инкубировали при 37°—30 мин. НА определяли в неочищенной митохондриальной и надосадочной фракциях по Бертлеру и др. (6).

Как видно из результатов проведенных исследований (рис. 1), разные вариации скорости и времени дифференциального центрифугирования (13.000—50.000 g, 40—90 мин) не действуют на распределение НА в

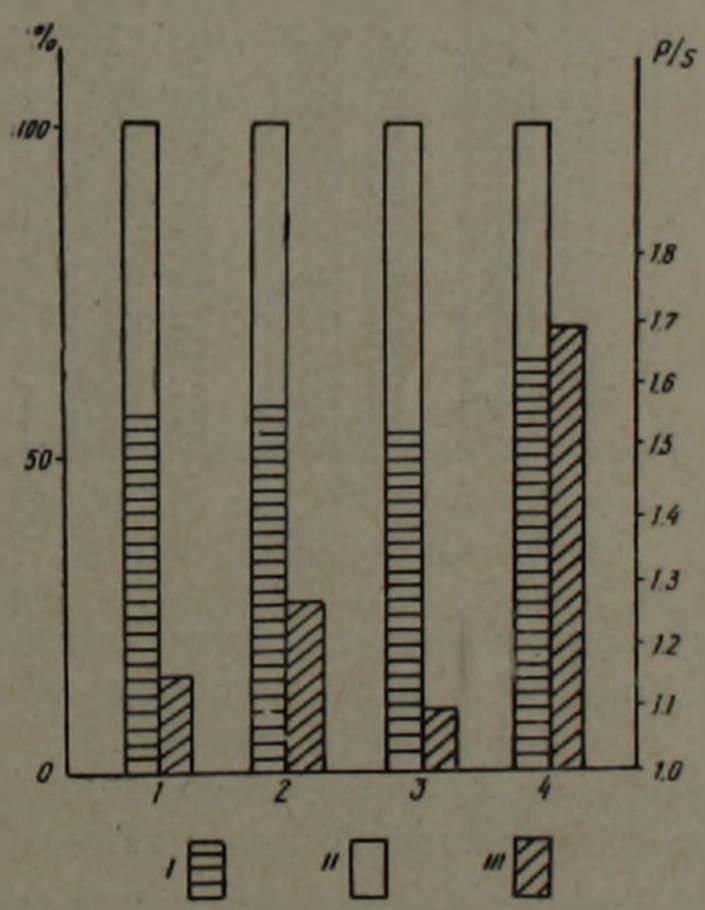


Рис. 1. Субклеточное распределение НА в мозгу крыс при разных условиях гомогенизирования и центрифугирования.
 I — гомогенизация 2 мин, 12 движений пестика, центрифугация при 13000g 40 мин; II — гомогенизация 2 мин., 12 движений пестика, центрифугация при 17000g 60 мин; III — гомогенизация 2 мин, 12 движений пестика, центрифугация при 40000g 90 мин; IV — гомогенизация 40 сек, 4 движения пестика, центрифугация при 50000g 60 мин, I — фракция P; II — фракция S; III — соотношение P/S.

неочищенной митохондриальной фракции (Р) и в надосадочной фракции (S). В этих опытах соотношение Р/S, т. е. НА неочищенной митохондриальной фракции и НА надосадочной фракции, не меняется. С другой стороны, применение разных видов гомогенизирования меняет картину. При относительно мягкой гомогенизации (4-й столбик) наблюдается лучшее сохранение НА в синапсомемах во фракции Р и заметное повышение соотношения Р/S. При сравнительно продолжительном гомогенизировании из синапсомемах НА в большем количестве выделяется во фракцию S.

В наших предыдущих исследованиях (1) было показано, что ГАМК вызывает понижение содержания НА в мозгу и периферических органах. Для физиологической оценки полученного эффекта необходимо было изучить действие ГАМК на субклеточные изменения в содержании НА. С этой целью в следующей серии исследований мы изучили действие ГАМК на содержание НА во фракциях Р и S при более мягком гомогенизировании. В этих опытах действие ГАМК (5 мг/кг) сравнивали с действием резерпина (3 мг/кг) и фенамина (20 мг/кг). Полученные результаты (рис. 2) показали, что резерпин приводит к сильному пониже-

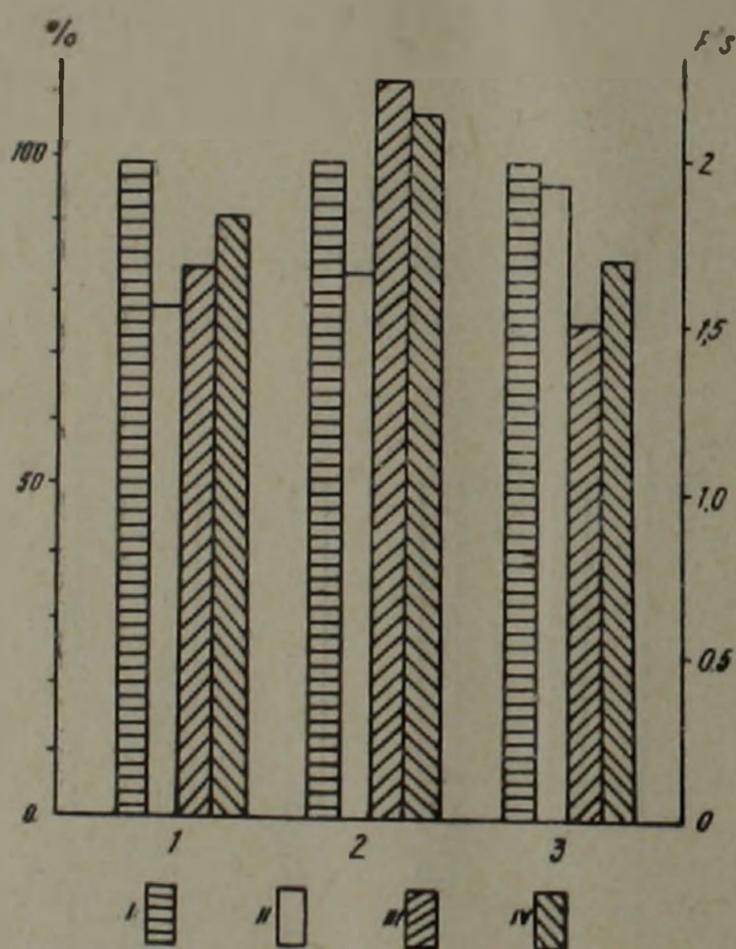


Рис. 2. Действие ГАМК по сравнению с действием резерпина и фенамина на субклеточное распределение НА в мозгу крыс через 40 мин после ее внутривенного введения.

I — фракция Р; 2 — фракция S; 3 — соотношение Р/S. I — контроль; II — резерпин 3 мг/кг; III — фенамин 20 мг/кг; IV — ГАМК 5 мг/кг.

нию содержания НА в мозгу в обеих фракциях, вследствие чего соотношение Р/S по сравнению с контролем почти не меняется. Фенамин вызывает незначительное понижение уровня НА в мозгу, однако под его действием содержание НА во фракции Р понижается, а во фракции S — повышается. В результате этого соотношение Р/S уменьшается. Подобное изменение, но менее выраженное, отмечается под действием ГАМК. Полученные данные позволяют заключить, что высвобождение НА из мозга крыс под влиянием ГАМК также происходит из фракции нервных окончаний.

В наших предыдущих исследованиях (1) было также показано, что ГАМК оказывает непосредственное воздействие на высвобождение НА из мозговых срезов. Осуществляется ли оно на уровне клеточной мембраны или мембраны везикул, содержащих НА, остается неясным. Для выяснения этого вопроса необходимо было изучить непосредственное действие ГАМК на содержание НА субклеточных частиц. Процесс спонтанного высвобождения НА из гранул надпочечников, адренергических нервных окончаний и мозга не одинаков. Он хорошо изучен в отношении надпочечных гранул и гранул нервных окончаний. Известно, что заметное высвобождение НА из гранул надпочечника происходит только при 37°C, в то время как адренергические нервные окончания в этих условиях высвобождают почти весь запас НА. Поэтому изучение действия какого-либо вещества на высвобождение НА из надпочечных гранул целесообразно изучать при 37°C, а из адренергических нервных окончаний — при низкой температуре (20°C). Изучение спонтанного высвобождения НА из мозговых фракций P и S показало, что в течение 30-минутной инкубации при 20°C около 23% НА высвобождается из фракции P, а при 37°C — 34%. Исходя из этих данных, в последующих исследованиях мы изучили непосредственное действие разных количеств ГАМК на высвобождение НА из неочищенной митохондриальной фракции в течение 30-минутной инкубации при 37°C. В таблице показано, что ГАМК в дозе 10, 100, 200 и 1000 мкг/мл не оказывает влияния на количество НА ни P, ни S фракций, что говорит против предполагаемого действия ГАМК на высвобождение НА из внутриклеточных гранул — везикул.

Таблица

Действие гамма-аминомасляной кислоты на высвобождение норадреналина из фракции P мозга крыс через 30 минут инкубации при 37°C (мкг/мл свежей ткани)

Условия опыта	Ф р а к ц и и			
	P+S	P	S	P/S
Контроль	0,375 ± 0,012 (5)*	0,151 ± 0,0124 (5)	0,224 ± 0,0088 (5)	0,66 ± 0,0077 (5)
10 мкг/мл	0,345 ± 0,0057 (4)	0,140 ± 0,0259 (4)	0,205 ± 0,0165 (4)	0,68 ± 0,01 (4)
100 мкг/мл	0,366 ± 0,0173 (4)	0,145 ± 0,0045 (4)	0,221 ± 0,0136 (4)	0,66 ± 0,028 (4)
200 мкг/мл	0,393 ± 0,0074 (4)	0,154 ± 0,0039 (4)	0,239 ± 0,0033 (4)	0,63 ± 0,0187 (4)
1000 мкг/мл	0,381 ± 0,0153 (4)	0,153 ± 0,0059 (4)	0,229 ± 0,0099 (4)	0,64 ± 0,024 (4)

* Количество опытов.

Данные наших исследований показывают, что главным фактором, действующим на субклеточное распределение НА в мозговой ткани, является степень гомогенизации. Степень же центрифугирования не влияет на этот процесс. Изменение содержания НА во фракциях S и P, от-

меченное нами при воздействии резерпином, мы склонны интерпретировать как показатель однородного действия этого препарата на процессы высвобождения НА из везикул нервных окончаний телец и аксонов, а также связывания его этими частицами. С другой стороны, уменьшение количества НА во фракции Р с одновременным повышением его уровня во фракции S, при применении фенамина и ГАМК, по-видимому, обуславливается специфическим действием этих препаратов на НА нервных окончаний, которые, как известно, принимают непосредственное участие в синаптической передаче. Интересно отметить, что действие ГАМК на высвобождение НА не осуществляется при его добавлении к гомогенату мозговой ткани. Сопоставляя эти данные с результатами наших предыдущих исследований, показавших непосредственное влияние ГАМК на мозговые срезы, можно прийти к выводу, что ее действие осуществляется на уровне клеточных мембран.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Ն. Հ. ԵՍԱՅԱՆ, Լ. Ն. ԱՌԱՔԵԼՅԱՆ

Գամմա-ամինոկարգաթթվի ազդեցությունը առնետի ուղեղի նորադրենալինի ենթաբջջային տարաբաշխման վրա

Ուղեղում գտնվող նեյրոակտիվ նյութերի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը կարող է նպաստել նրանց ֆիզիոլոգիական դերի պարզաբանմանը: Այս ուղղությամբ մեր լաբորատորիայում կատարված նախկին ուսումնասիրությունները (1,2) ցույց են տվել, որ գամմա-ամինոկարգաթթուն (ԳԱԿԹ) որոշակի ազդեցություն ունի ուղեղի նորադրենալինի (ՆԱ) և սերոտոնինի մակարդակների վրա: Ներկա աշխատանքում ուսումնասիրվել է ԳԱԿԹ-ի ազդեցությունը առնետի ուղեղի ՆԱ-ի ենթաբջջային տարաբաշխման վրա: *In vivo* փորձերը ցույց տվեցին, որ ԳԱԿԹ-ի (5 մգ/կգ) ներորովայնային ներարկումը ֆենամինի (20 մգ/կգ) նման իջեցնում է ՆԱ-ի քանակը ներվային վերջույթների ֆրակցիայում, մինչդեռ ռեպրպինը (3 մգ/կգ) իջեցնում է ՆԱ-ի քանակը ներվային վերջույթներում և վերնստվածքային ֆրակցիաներում՝ հավասարապես *In vitro* ԳԱԿԹ-ի 10—1000 մկգ/մլ քանակների անմիջական ավելացումը ոչ-մաքրված միտոքոնդրիալ ֆրակցիայի վրա, որը պարունակում է ներվային վերջույթներ, ոչ մի ազդեցություն չի թողնում այդ ֆրակցիայի ՆԱ-ի քանակի վրա: Ստացված արդյունքները խոսում են այն մասին, որ ԳԱԿԹ-ն ազդում է ներվային վերջույթների հատվածում գտնվող ՆԱ-ի վրա և որ այդ ազդեցությունը իրականանում է ոչ թե հատիկների, այլ՝ բջջի թաղանթի մակարդակի վրա:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

¹ Н. А. Есаян, А. Р. Арменян и Л. Н. Аракелян, Вопросы биохимии мозга АН АрмССР, 3, 313, 1967. ² Н. А. Есаян и А. Р. Арменян, Вопросы биохимии мозга АН АрмССР, 4, 258, 1968. ³ В. Falck, Biogenic amines, 8, 28 (1964). ⁴ V. P. Whittaker, Progress in Biophysics and molecular biology, vol. 15, Pergamon Press, Oxford, p. 39, 1965. ⁵ E. De Robertis, Pharm. Rev., 18, 1, 413 (1966). ⁶ A. Bertler, A. Carlsson, E. Rosengren, Acta Physiol. Scand., 44, 293 (1958).