

## ВИЗНАЧЕННЯ ДЕЯКИХ НЕЙРОМЕДІАТОРІВ У НЕРВОВІЙ ТКАНИНІ

*Рекомендується точний і швидкий метод електрофоретичного визначення таких нейромедіаторів, як  $\gamma$  аміномасляна кислота, глутамінова кислота, а також визначення аспарагінової кислоти в тканині мозку.*

Регуляція життєдіяльності багатоклітинних організмів значною мірою залежить від хімічних сигналів, що передаються від одних клітин до інших. Одним з основних засобів такої комунікації є секреція гормонів у кров'яне русло. Значно менше вивчений процес хімічного обміну інформацією між нервовими клітинами. Тому нейрохімія тепер стала одним з основних напрямків біохімії [1].

З іншого боку останнім часом об'єктом численних досліджень служать амінокислоти, що викликано величезною роллю, яку вони відіграють у процесах життєдіяльності організмів [2].

В теперішній час добре вивчені такі нейромедіатори, як катехоламіни - дофамін, норадреналін, адреналін. У мозку всіх ссавців і безхребетних тварин виявлений нейромедіатор серотонін, який утворюється з амінокислоти триптофану [3].

Крім згаданих нейромедіаторів, тепер встановлено, що роль посередників відіграють також  $\gamma$ -аміномасляна і глутамінова кислоти.

$\gamma$ -Аміномасляна кислота є продуктом декарбоксілювання глутамінової кислоти. Ці кислоти містяться у великій кількості у всіх ділянках мозку, хоча концентрація  $\gamma$ -аміномасляної кислоти в окремих частинах мозку може різко відрізнятися.

Глутамінова кислота є одним з основних компонентів усіх тваринних тканин. Але в мозку її концентрація особливо висока.

$\gamma$ -Аміномасляна кислота є сильним гальмівним медіатором [2,3]. Наявність  $\gamma$ -аміномасляної кислоти в центральній нервовій системі потрібна для нормального протікання обміну речовин. Під її впливом посилюються енергетичні процеси, підвищується дихальна активність тканини мозку, покращується засвоєння глюкози мозком, активуються багато ферментів дихання, поліпшується кровопостачання головного мозку, стимулюється видалення з мозку токсичних продуктів. Глутамінова кислота є одним з найважливіших збудливих медіаторів у центральній нервовій системі. Думають, що аспарагінова кислота є також нейромедіатором.

Введення глутамінової кислоти в кору мозку методом мікроінофорезу викликає сильну реакцію збудження. Така ж картина спостерігається при введенні аспарагінової кислоти, яка при декарбоксілюванні дає в-аланін [2].

Отже, розробка швидкої і точної методики визначення  $\gamma$ -аміномасляної, глутамінової і аспарагінової кислот становить значний прагматичний інтерес.

Суть опрацьованого нами методу полягає в тому, що амінокислоти є амфотерними сполуками і залежно від реакції рН середовища поведуть себе, як аніони або катіони, які з різною швидкістю рухаються в електричному полі до анода і катода [4,5].

Для проведення дослідження ми брали наважку мозку кролика в кількості 1 г., розтирали в ступці з невеликою кількістю меленого скла, додаючи порціями по 2 мл. хлороформу (3-4 рази). Розтерту масу переносили в центрифужні пробірки. Після 10 хвилин центрифугування при 3000 обертів за хвилину центрифугат зливали в інші пробірки, а осад двічі промивали 5 мілілітрами хлороформу. Центрифугати об'єднували доливали 5 мл. дистильованої води, добре змішували і залишали на добу в холодильнику. Після відстоювання і розшарування хлороформу і води, верхній водний шар пастерівською піпеткою переносили у випарувальні чашки і випарювали на водяній бані. Сухий залишок розчиняли в 1 мл. суміші фенолу і бутанолу (6:4), переносили в центрифужні пробірки. Після 10-ти хвилинного центрифугування надосадкову рідину наносили мікропіпеткою на стрічки електрофореграм розміром 2,5x30 см. в центральній частині в кількості з розрахунку 0,01-0,02 г. тканини мозку.

Електрофоретичне розділення амінокислот проводили протягом 3 год, під напругою постійного струму 200 вольт при силі струму 0,4-0,5 мА на 1 см ширини стрічки в ацетатно-піридиновому буфері з рН=5,2-5,3 (змішували 5 об'ємів 1% розчину оцтової кислоти з 1 об'ємом 10% розчину піридину).

По закінченні електрофорезу фореграми фіксували в термостаті при 90<sup>0</sup>С, фарбували 1% розчином нінгідрину в ацетоні і сушили 15 хв. При 60<sup>0</sup>С. на проявлених електрофореграмах амінокислоти розподіляються на 5 фракцій (див. Фото.)

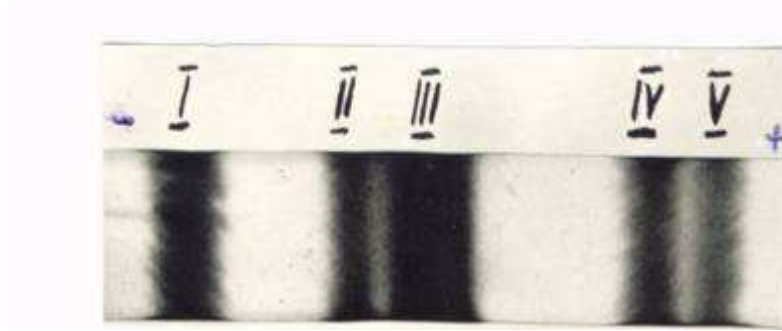


фото: Електрофореграма амінокислот мозку.

- I- основні амінокислоти (лізин, гістидин, аргінін);
- II-  $\gamma$ - аміномасляна кислота;
- III- нейтральні амінокислоти (з однією аміно- і однією карбоксильною групами);
- IV- глутамінова кислота;
- V- аспарагінова кислота.

Як видно з електрофореграми, основні амінокислоти (I) розташувались ближче до катоду. За ними знаходились  $\gamma$ - аміномасляна кислота (II), нейтральні амінокислоти (III). Ці амінокислоти залишаються на місці нанесення досліджуваної рідини (інколи трішки зміщені до катода). До анода від місця нанесення розташувались глутамінова (IV), а за нею аспарагінова (V) кислоти.

Ідентифікуються ці амінокислоти на електрофореграмах за стандартними розчинами амінокислот –“свідків”.

Ділянки зафарбованих нейромедіаторів  $\gamma$ - аміномасляної, глутамінової кислот, а також аспарагінової кислоти вирізали з електрофореграм, поміщали в пробірки і елюювали 5 мл. насиченого розчину  $\text{CuSO}_4$  в 75% етанолі.

Кількісний вміст вказаних амінокислот визначали фотоколориметрично за калібрувальними графіками, побудованими з допомогою стандартних розчинів  $\gamma$ -аміномасляної, глутамінової і аспарагінової кислот.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Мецлер Д. Биохимия. - М.: Мир,1980. – 487 с.
2. Майстер. А. Биохимия аминокислот. - М.: Издательство иностранной литературы, 1961. - 530 с.
3. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия - М.: Медицина, 1983.-750 с.
4. Духин С.С., Дерягин Б.В. Электорофорез. - М.: Наука, 1976.-327 с.
5. Трускавецкий Е.С. Содержание свободных аминокислот в желудочном соке // Журнал Лабораторное дело. - М.: Медицина, 1968. -№9.-557-559 с.

Матеріал надійшов до редакції 29.12.2000 р.

#### ***Трускавецький Є.С. Определение некоторых нейромедиаторов в нервной ткани.***

*Предлагается точный и быстрый метод электрофоретического определения таких нейромедиаторов как  $\gamma$ -аминомасляная кислота, глутаминовая кислота, а также определение аспарагиновой кислоты в ткани мозга.*

#### ***Truskavetsky Ye.S. Determination of Certain Neuromediators in the Nerve Tissue.***

*A quick and accurate method is offered for electrophoresis determination of such neuromediators as  $\gamma$ -aminobutyric and glutamic acids, and also for determination of aspartic acid in the cerebral tissue.*