

З.А.Розанова

Кінетика поглинання ізольованою сітківкою бика ^{14}C -ГАМК та її кон'югатів з деякими вітамінами групи В

Поглощение сетчаткой быка физиологических концентраций ПАЛФ-ГАМК нарастает в течение 2-32 мин инкубации в отличие от ГАМК и ее неметаболизируемых конъюгатов, которые максимально накапливаются в первые минуты: пикамилон > ПАЛФ-ГАМК > пантогам > биотинил-ГАМК. Кинетика транспорта ГАМК и ее конъюгатов в сетчатку имеет сложный характер, при увеличении концентрации от 33 до 528 мкмоль/л, она линейна для пикамилона, отражая диффузию и нелинейна для ГАМК, ПАЛФ-ГАМК и пантогама, отражая различные системы их транспорта. При этом только транспорт ГАМК активируется ионами натрия.

ВСТУП

Нейротрансмітерна гальмівна функція ГАМК у синапсах сітківки людини та тварин добре відома і пов'язана з амакриновими та іншими гліальними клітинами з високою активністю глутаматдекарбоксілази і значним вмістом ГАМК [4 - 9, 11]. Система ГАМК-шунта і в головному мозку, і в сітківці може також виконувати функції метаболічної компенсації при гіпоксії. Враховуючи, що гіпоксія є основною причиною відмирання фоторецепторних клітин при відшаруванні сітківки та травматичних пошкоджень ока, є актуальним розроблення фармагентів направленої дії на інтенсивність реакцій ГАМК-шунта в ній, як це вже здійснюється для захисту клітин головного мозку [10]. В експериментально-клінічних дослідженнях з цією метою вже використовуються ГАМК та деякі її похідні (фенібут, пантогам, пікамілон), а також γ -оксибутират як ноотропні засоби [1]. Дія цих сполук на транспорт і метаболізм ГАМК у сітківці не вивчена. В попередній нашій роботі було встановлено, що нікотиноіл-ГАМК-[1-C^{14}] (пікамілон) у фізіологічних концентраціях поглинається сітківкою *in vitro* в більших кількостях, ніж ГАМК-[1-C^{14}] [2].

Мета цієї роботи – порівняти особливості динаміки та кінетики поглинання сітківкою ока бика ГАМК та її нових В-вітамінних кон'югатів з перспективою обґрунтування використання даних фармагентів в офтальмології.

МЕТОДИКА

У роботі використовували препарат ГАМК-[1-C^{14}] (Institute of isotopes, Угорщина, питомою радіоактивністю $440 \text{ МБк}\cdot\text{ммоль}^{-1}$) та синтезовані з нього в радіоізотопній лабораторії ОДУ ім. Мечникова ПАЛФ-ГАМК-[1-C^{14}] (пірідоксальфосфат-ГАМК), нікотиноіл-ГАМК-[1-C^{14}], пантоіл-ГАМК-[1-C^{14}] і біотиніл-ГАМК-[1-C^{14}] за методиками запропонованими НВО "Вітаміни" з питомою радіоактивністю 240, 18,8, 31,5 та $60,4 \text{ МБк}\cdot\text{ммоль}^{-1}$ відповідно. Очі биків брали в дослід через 2 год після забою (транспортування при $0\text{-}4^\circ\text{C}$). Очі розтинали, збирали водянисту вологу, ізолювали сітківку та круглим пробійником вирізали з неї стандартні за площею ділянки діаметром 15 мм, що складало в середньому 8,5 мг сухої маси тканини. Сітківку занурювали в інкубаційне середовище, що складалося з 0,2 мл водянистої вологи (чи $0,15 \text{ ммоль/л}$

NaCl, чи 0,15 моль/л KCl) та 0,05 мл розчину досліджуваного міченого препарату і інкубували на водяній бані при 37°C у шутельапараті протягом 2-32 хв при вивченні динаміки поглинання (концентрація мічених препаратів – 66 мкмоль/л). У разі вивчення кінетики поглинання сітківку інкубували впродовж 4 хв при концентрації мічених препаратів від 33 до 528 мкмоль/л. Після інкубації сітківку діставали і відмивали від розчину препарату, зануренням на 1 с у фізіологічний розчин NaCl (5 мл). У частині експериментів досліджували також вихід загальної мітки з відмитої сітківки в 2,0 мл ізотонічного розчину NaCl чи KCl протягом перших 30 с (тричі) та наступних 10 хв (двічі). Відмиту сітківку розміщували на попередньо зважені мішені з нержавіючої сталі, підлучували додаванням 0,1 мл 0,1 моль/л NaOH. Висушували при 90°C та зважували на аналітичних терезах. Підрахунок радіоактивності сухої сітківки та інкубаційних середовищ проводили на газопроточному лічильнику 2154-1-1М “Протока”, визначаючи число імпульсів за 60 с чи за 100 с на 10,0 мг сухої сітківки та кількість поглинутої сітківкою з інкубаційних середовищ мітки. Розраховували швидкість поглинання препаратів у наномолях на 1 г вологої маси тканини. Результати обробляли статистично.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати вивчення динаміки поглинання сітківкою близьких до фізіологічних еквімолярних концентрацій ГАМК та її досліджених кон'югатів з вітамінами та коферментом показали, що ГАМК та її сполуки, що неметаболізуються, максимально накопичуються в сітківці в перші 4 хв інкубації, а далі їх вміст не змінюється. За цих умов, при такому ж вмісті в інкубаційному середовищі (66 мкмоль/л)

ПАЛФ-ГАМК (коензим-субстратний комплекс у вигляді основи Шиффа) накопичується в сітківці в зростаючих концентраціях протягом усього терміну 32-хвилинної інкубації (рис.1). Цей факт свідчить про більш тривале та інтенсивне включення в метаболізм ПАЛФ-ГАМК порівняно з вільною ГАМК у клітинах сітківки. Ці результати мають і практичне значення для оцінки ПАЛФ-ГАМК як фармагента в офтальмології. В цілому слід відмітити, що в перші 2-4 хв поглинання сітківкою нікотиноіл-ГАМК найбільш інтенсивне та більш ніж вдвічі перевищує інші досліджувані сполуки: ПАЛФ-ГАМК > ГАМК > пантогам. У наступні 16-32 хв ця закономірність зберігається (крім ПАЛФ-ГАМК). Враховуючи ці результати для подальших досліджень кінетики транспорту ГАМК та її кон'югатів, ми використовували 4-хвилинну інкубацію, і згідно з літературними даними - концентрації ГАМК в інкубаційному середовищі від 33 до 528 мкмоль/л, максимальна з яких на порядок менша від концентрації ГАМК у головному мозку та сітківці щурів [10].

Дослідження кінетики транспорту в сітківку ГАМК та ПАЛФ-ГАМК показали, що

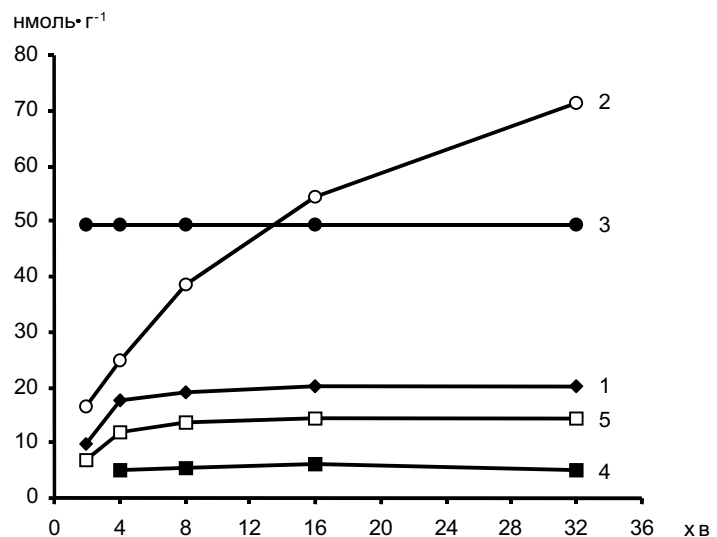


Рис. 1. Динаміка поглинання сітківкою бика ГАМК-[1-C¹⁴] (1), ПАЛФ-ГАМК-[1-C¹⁴] (2), нікотиноіл-ГАМК-[1-C¹⁴] (3), пантоіл-ГАМК-[1-C¹⁴] (4) та біотиніл-ГАМК-[1-C¹⁴] (5) за їх концентрації в інкубаційному середовищі – 66 мкмоль/л. P < 0,05 порівняно з ГАМК-[1-C¹⁴]; n = 10-18.

при концентраціях ГАМК та її коензим-субстратного комплексу, близьких до фізіологічних (33-132 мкмоль/л), спостерігається повільне збільшення швидкості транспорту, а при терапевтичних концентраціях сполук в інкубаційному середовищі (198-528 мкмоль/л) спостерігається висока швидкість транспорту, що відображає в основному дифузійні процеси та сорбцію (рис.2).

Ці ж закономірності спостерігаються і у разі транспорту пантоїл-ГАМК (пантогам) у сітківку і лише транспорт нікотиноїл-ГАМК (пікамілону) майже лінійно збільшується з концентрацією його в інкубаційному середовищі відображаючи дифузію.

У спеціальних дослідженнях вивчали вплив іонного складу інкубаційного середовища на транспорт ГАМК-[1- C^{14}] і ПАЛФ-ГАМК-[1- C^{14}] в сітківку, порівнюючи водянисту вологу, яка містить вітаміни та інші сполуки, з розчинами 0,15 моль/л NaCl чи 0,15 моль/л KCl. При цьому визначали також вихід загальної мітки з сітківки при послідовній інкубації в розчинах NaCl або KCl (об'єм 2 мл) тричі по 10 с, та двічі по 5 хв, з урахуванням в динаміці загальної мітки в цих

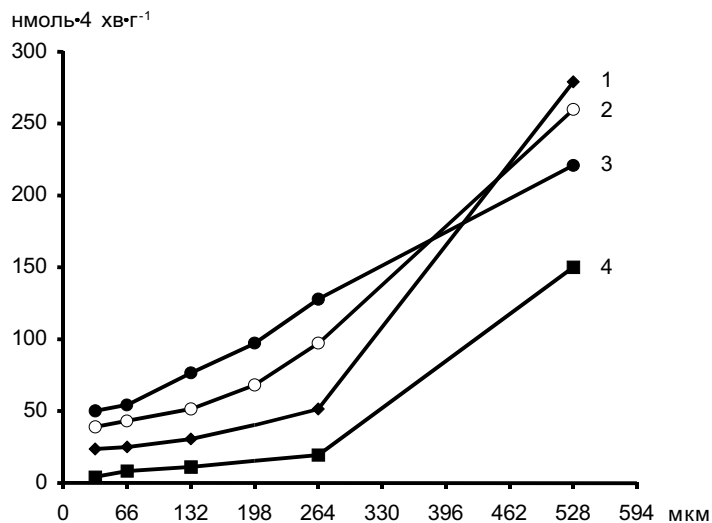


Рис. 2. Кінетика транспорту ГАМК-[1- C^{14}] (1), ПАЛФ-ГАМК-[1- C^{14}] (2), нікотиноїл-ГАМК-[1- C^{14}] (3) та пантоїл-ГАМК-[1- C^{14}] (4) з водянистої вологи в сітківку бика за 4 хв інкубації при 37 °C. $P < 0,05$ порівняно з ГАМК-[1- C^{14}]; $n = 10-18$.

розчинах. У цих дослідах брали очі одного бика, сітківка одного з яких використовувалася для визначення кількості поглинутих мічених сполук, а другого – для визначення виходу загальної мітки в промивні розчини. Останнє було технічно можливим після преінкубації протягом 4 хв висічки сітківки в середовищах з концентрацією мічених сполук 528 мкмоль/л та їх високою питомою радіоактивністю. Результати цих дослідів показали (таблиця), що при заміні водянистої вологи на 0,15 моль/л NaCl швидкість транспорту в сітківку ГАМК-[1- C^{14}] достовірно збільшується, а транспорт ПАЛФ-ГАМК-[1- C^{14}] не залежить від катіонного складу промивних середовищ. Важливо відмітити, що навіть при тривалій постінкубації (10,5 хв) з п'ятикратною заміною промивних розчинів у сітківці ще залишаються 11-20% загальної мітки ГАМК та 13-25% - ПАЛФ-ГАМК, при цьому більша частина мітки виходить з сітківки в перші 30 с.

Механізми транспорту в сітківку не вивчені навіть для ГАМК, хоч відомо, що при інкубації сітківки щурів з 3H -ГАМК у концентрації нижчій від фізіологічної її вихід у перфузат незначний і не збільшується після додавання стократної концентрації неміченої ГАМК [5], що різні клітини ізольовані з сітківки щурів поглинають 3H -ГАМК з неоднаковою швидкістю [11] і що в нейроструктурах мозку ідентифіковані два класи ГАМК-рецепторів пов'язаних з хлорним каналом синапсів [3].

Динаміка та кінетика поглинання сітківкою бика кон'югатів ГАМК з вітамінами кількісно та якісно відрізняються від ГАМК, зокрема ПАЛФ-ГАМК, транспорт якого в сітківку підвищується зі збільшенням часу інкубації, що можливо пов'язано з взаємодією його з ПАЛФ-залежними ферментами зовнішньої мембрани епітелію, транспортно-метаболичні функції якої добре відомі. Кінетика поглинання пікамілону сітківкою бика відображає дифузію

Вплив іонного складу інкубаційних середовищ на поглинання сітківкою бика доданих до концентрації 528 нмоль/л ГАМК-[1- C^{14}] або ПЛФ-ГАМК-[1- C^{14}] за 4 хв, та їх вихід у промивні розчини за 10,5 хв при 37°C (n=8-10)

Склад інкубаційного середовища	Поглинання препарату, нмоль·г ⁻¹	Вихід загальної мітки нмоль/л в промивні розчини 0,15 моль/л NaCl або 0,15 моль/л KCl за				
		10 с	10 с	10 с	5 хв	5 хв
ГАМК						
Водяниста волога	310±15					
NaCl 0,15 моль/л	396±18*	123±95**	37,2±4,8	24,2±3,5**	96,2±9,1**	46,3±6,0
KCl 0,15 моль/л	304±16	73,3±8,0	46,1±5,9	13,4±2,0	76,0±8,5	34,0±5,3
ПЛФ-ГАМК						
Водяниста волога	282±22					
NaCl 0,15 моль/л	290±21	123±9,7**	34,5±5,4	24,9±5,7	51,0±7,2	15,8±3,8
KCl 0,15 моль/л	275±23	99,3±8,6	27,2±5,1	15,6±3,5	42,5±6,6	22,0±4,3

P < 0,05 порівняно з водянистою вологою; ** P < 0,05 порівняно з NaCl і KCl.

(неспецифічну сорбцію), це ж спостерігається і для пантоїл-ГАМК і самої ГАМК при терапевтичних концентраціях в інкубаційному середовищі (водяниста волога). В цілому механізми транспорту ГАМК-кон'югатів і специфічної їх рецепції потребують відповідних досліджень на ізольованих з сітківки клітинах і мембранних нейроструктурах.

Z.O.Rozanova

KINETICS OF ABSORPTION BY THE BOVINE RETINA OF 1- C^{14} -GABA AND ITS B-VITAMINS PREPARATIONS

Absorption by the bovine retina of physiological concentration of PLP-GABA increase clearing 2-32 minutes of incubation in difference of GABA and its non metabolic preparations, which store up as much as possible in first minutes: picamilon > PLP-GABA > GABA > panthogam > biotinil – GABA. Kinetics of transport of GABA and its preparations into retina has a complex character. By the growth of concentration from 33 mM to 528 mM, it is linear for picamilon, showing diffusion, and not linear for GABA, PLP-GABA and panthogam, showing differently systems of its transport. And only GABA transport is activated by Na-ions.

Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy named by Filatov, AMS of Ukraine, Odessa

Наук.-досл. ін-т очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Копелевич В.М., Сытинский И.А., Гунар В.И. Современный подход к созданию ноотропных средств на основе γ -аминомасляной кислоты // Хим.- фарм. журн. – 1981. – 15, № 5. – С. 27-39.
2. Логай И.М., Леус Н.Ф., Розанова З.А. Особенности поглощения сетчаткой меченых препаратов пикамила и ГАМК // Физиол. журн. – 1991. – 37, № 2. – С. – 116-118.
3. Хухо Ф. Нейрохимия. Основы и принципы. – М.: Мир, 1990. – С. 230, 292-294
4. Brunn A., Ehinger B, Tornquist K. Neurotransmitter in the retina of the mudpuppy. Necturus maculosus // Cells and Tissue Res. – 1984. – 238, № 1. – P.13-18.
5. Lake N., Voaden M.J. Exchange versus net uptake of exogenously-applied γ -aminobutyric acid in retina // J. Neurochem. – 1976. – 27, № 6. – P. 1571-1573.
6. Milan A.H., De Leeuw A.M., Sauz V.P., Saari T.C. Immunolocalisation and or a subpopulation of GABA-positive amacrine cells in retinas of different species // J. Compar. Neurol. – 1990 – 226, № 1. – P.123-129
7. Miller R.F., Frumkes I.E., Slaughter M., Dacheux R.R. Physiological and pharmacological basis of GABA and glycine action on neurons of mudpuppy retina. 11. Amacrine action and ganglion cells // J. Neurophysiology. – 1981,45. – № 4. P.764-782.
8. Miller R.F., Dacheux R.R., Frumkes I.E. Amacrine cells in nectures retina: evidence of independent γ -aminobutyric acid and glycine-releasing neurons // Science. – 1977, 198, № 4. – P.478-486.
9. Pourcho R.G., Goebel D.T. Colocalisation of substance P and γ -aminobutyric acid in amacrine cells of the cat retina // Brain. Res. – 1988.- 447, № 1. – P. 164-168.
10. Rozanov V.A. GABA-ergic mechanisms of brain protection against hypoxia. – In: Abst. 2 nd Int. Symp on Hyroxia. – Berlin, 1991. – P.13-14.
11. Schaeffer J.M. Biochemical characterization of isolated rat retinal cells the γ -aminobutyric acid system // Ex. Eye Res. – 1982. – 34, №5. – P. 715-726.

Матеріал надійшов до редакції 30.08.99