

Маргарете ОТТЕР

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕРТОНИНА И 5-ОКСИИНДОЛУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ СПЕКТРОФЛЮОРОМЕТРИЧЕСКИМ МИКРОМЕТОДОМ В РАЗНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

В последнее десятилетие в центре внимания ученых самого различного профиля неизменно находятся один из нейромедиаторов и тканевых гормонов — серотонин и отдельные продукты его обмена.

Известно, что серотонин обладает чрезвычайно широким диапазоном биологического действия на функции нервной, сердечно-сосудистой, эндокринной и мочеполовой систем, оказывает влияние на деятельность органов дыхания, желудочно-кишечного тракта, печени, селезенки (Курский, Бакшеев, 1974). Его считают не только нейромедиатором, но и одним из регуляторов внутриклеточного обмена веществ, кровяного давления, а также фактором роста и гемостаза.

Однако определение малых количеств серотонина в различных биологических объектах затруднено в связи с отсутствием соответствующих надежных методов. Большинство из них разработаны для определения серотонина только в одном определенном виде ткани (Плюшкис, Матулис, 1976; Surzon, Green, 1970; Welch, Welch, 1969). В настоящей статье предложен усовершенствованный, быстрый и специфичный спектрофлуорометрический микрометод определения содержания серотонина и продуктов его обмена во многих биологических тканях и жидкостях.

В настоящее время для определения серотонина используются биологические, колориметрические, газовые и тонкослойные хроматографические и спектрофлуорометрические методы, однако все большее распространение приобретают флуорометрические методы как самые доступные, достаточно специфичные и воспроизводимые.

Серотонин и другие 5-оксииндолы интенсивно флуоресцируют в нейтральных и слабокислых растворах при возбуждении ультрафиолетовыми лучами с длиной волны 295 нм и максимумом спектра флуоресценции при 330 нм (Maickel и др., 1968; Udenfriend и др., 1955). В сильных растворах соляной кислоты серотонин максимально флуоресцирует при 550 нм. Исходя из этого предложены некоторые методы анализа серотонина, основывающиеся на его флуоресцентных свойствах.

При рассмотрении флуорометрических методов выявилось, что 5-оксииндолы, в частности серотонин, образуют с орто-фталевым альдегидом (ОФА) в условиях нагревания и в присутствии сильной кислоты интенсивно флуоресцирующие вещества (Maickel и др., 1968). Эта реакция была использована для анализа в различных частях мозга серото-

Таблица 1

Содержание серотонина и 5-оксииндолуксусной кислоты в разных частях мозга крысы, мкг/г.

Количество животных и пол	Месяц и год анализа	Материал	Серотонин	Данные литературы	5-ОИУК	Данные литературы
6 ♂	V/1977	Целый мозг	0,78±0,07	0,83 (1) 0,45±0,03 (2) 0,54±0,04 (3)	0,20±0,07	0,35 (1) 0,47±0,02 (9)
8 ♂	VI/1977	Передний мозг	0,53±0,09	0,52±0,03 (1) 0,26±0,02 (2) 0,42±0,02 (4) 0,35 (5) 0,28±0,02 (6)	0,44±0,08	0,20±0,03 (1) 0,43±0,02 (4) 0,32±0,02 (6)
6 ♂	VII/1974	Межзачечный мозг	1,07±0,04	1,03±0,1 (1) 0,67±0,1 (2) 0,61±0,06 (4) 1,23 (5) 1,11 (7) 1,06 (8)	0,36±0,02	0,51±0,05 (1) 0,87±0,04 (4)
8 ♂	IV/1972	Ствол мозга	1,11±0,18	1,24 (1) 1,03 (5) 0,98 (7) 0,57 (8)	0,90±0,3	0,54±0,04 (1)
2 ♂	XI/1974	Задний мозг	0,64±0,06	0,81 (6), 0,67 (7) 0,88±0,06 (4)	0,63±0,08	0,54±0,05 (6) 0,75±0,07 (4)

Примечание: 1 — Curzon, Green, 1970; 2 — Butterworth и др., 1975; 3 — Ansel, Beeson, 1968; 4 — Cox Jr., Perhach Jr., 1973; 5 — Maickel и др., 1968; 6 — Haubrich, Denzer, 1973; 7 — Dahlström и др., 1973; 8 — Miller и др., 1970; 9 — Ho, Taylor, 1971.

Таблица 2

Содержание серотонина (мкг/мл) и 5-оксиндолуксусной кислоты (мкг/г) в разных тканях и жидкостях

Объект исследования	Кол-во опытов	Месяц и год анализа	Материал	Серотонин	Данные литературы	5-ОИУК	Данные литературы
Мыши	3	VI/1977	Целый мозг	0,73±0,06	0,70±0,85 (10)	0,84±0,03	0,37±0,09 (9)
Крысы	12	VI/1977	Поджелудочная железа	0,93±0,5		0,15±0,06	
Кролики	3	III/1972	Задний мозг	0,60±0,1		0,42	
	3	III/1972	Передний мозг	0,22±0,07		0,32±0,05	
	3	III/1972	Стриатум	0,44±0,16		0,59±0,19	
	3	III/1972	Мозжечок			0,14	
Кролики	15	XII/1974	Секрет поджелудочной железы	0,70±0,10	0,16—2,0 (12)		
Собаки	12	XII/1974	Секрет поджелудочной железы	0,32±0,10	0,55 (12)		
Люди	3	XII/1974	Слюна	0,05±0,01			
Люди	5	IV/1977	Цельная кровь	0,17±0,06	0,13—0,47 (13)		

Примечание: 9 — Но, Taylor, 1971; 10 — Welch, 1969; 11 — Тезалу, 1975; 12 — Ханрикус, 1976; 13 — Плошкис и др., 1976.

нина, позже ее начали употреблять и для определения содержания 5-оксиндолуксусной кислоты (5-ОИУК) (Miller и др., 1970). Некоторые авторы (Curzon, Green, 1970) применяли для анализа серотонина и 5-ОИУК в небольших частицах мозга крыс наряду с ОФА *l*-цистеин в целях повышения чувствительности флюоресценции.

Поскольку в последние годы поступает все больше данных о чрезвычайно широком диапазоне биологического действия серотонина и все больше начинают определять его содержание не только в мозге, но и в других органах и жидкостях животных, возникла необходимость в разработке универсальных методов определения его и его метаболитов. Исследованиями нашей лаборатории показано, что флюорометрический метод с использованием растворов ОФА и *l*-цистеина применим для определения серотонина не только в мозге крыс и его частях, но и в мозге других лабораторных животных (мышей, кроликов), а кроме того, в других животных тканях (например, в поджелудочной железе). После специальной подготовки материала эту методику в несколько модифицированном виде можно применить для определения содержания серотонина и 5-ОИУК в разных жидкостях (крови, слюне, желудочном соке). Полученные данные совпадают с результатами из литературы (табл. 1, 2).

Материал и методика

Исследовались различные отделы головного мозга крыс, мышей, кроликов, поджелудочная железа крыс, секрет поджелудочной железы кроликов и собак. Сразу после декапитации у животных извлекались мозг и железы и прополаскивались в ледяном растворе Рингера, затем подсушивались на фильтровальной бумаге, замораживались на микротомном столике, делились на исследуемые части, например передний мозг, межучасточный мозг, ствол мозга и т. д. (Алликметс, Жарковский, 1976). Затем после взвешивания полученные части мозга и железы до гомогенизирования держались в холодильнике при $-12...-15^{\circ}\text{C}$. Так как известно, что существует суточный ритм содержания серотонина в разных тканях (Snyder и др., 1967), декапитацию производили всегда в одно и то же время (примерно в 10 часов утра).

Анализ цельной крови начинали с ее гемолиза и осаждения белков каким-либо общеизвестным методом.

Все растворы реактивов готовили на бидистиллированной воде. Соли для буферного раствора (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4) дважды перекристаллизовывали. Органические растворители при необходимости промывали щелочью, кислотой и водой, а затем перегоняли. Реактивы Ново-Черкасского завода синтетических продуктов не требуют такой обработки. Следует отметить, что чистота органических растворителей является одним из основных факторов, определяющих величину контроля реактивов. Промывка является более эффективной процедурой очистки, чем перегонка. Все растворы реактивов из органических веществ готовили непосредственно перед употреблением. Стандартные растворы готовили с 100 мкг серотонина в 1 мл бидистиллированной воды и хранили в холодильнике защищенными от света. В опытах стандартный раствор серотонина разбавляют в 100 раз.

Для получения безбелковых экстрактов мозговую и железистую ткань гомогенизировали примерно в 10 объемах ледяного подкисленного бутанола (к 1 л *n*-бутанола добавляли 0,85 мл концентрированной соляной кислоты) на льду. Гомогенаты центрифугировали дважды в пластмассовых пробирках по 5 мин при 5000 об/мин (желательно в рефрижераторной центрифуге).

Для определения серотонина в пробирку I с притертой пробкой брали 2,5 мл экстракта бутанола, добавляли 5 мл *n*-гептана и 0,4 мл 0,1%-ного раствора *l*-цистеина в 0,1 н. HCl. Если позволяло количество экстракта, проводили 2—3 параллельных анализа. Пробирку встряхивали в течение 5 мин на электрической качалке и центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин.

Для определения серотонина из пробирки I брали по 0,1 мл водяной фазы в обыкновенные пробирки и добавляли 0,6 мл 0,004%-ного раствора ОФА в 10 н. HCl. Пробу тщательно перемешивали и помещали в термостат (100°) или в кипящую водяную баню на 15 мин. После охлаждения измеряли интенсивность флюоресценции на спектрофлуориметре с использованием спектра возбуждения при 360 нм и спектра флюоресценции при 470 нм.

В качестве внутреннего стандарта использовалось 0,3 мкг серотонина с добавкой всех реактивов. Из показателей опытов и стандартных растворов вычитали показатели неспецифической флюоресценции реактивов. В этих условиях интенсивность флюоресценции линейно возрастала с увеличением содержания серотонина от 0,01—0,025 до 2,5—3,5 мкг.

Для определения 5-ОИУК отсасывали 5 мл органической фазы *n*-гептана и перенесли в пробирку II с притертой пробкой, в которой находилось 0,6 мл 0,5 М фосфатного буферного раствора с pH 7,0, не содержащего органические ионы, встряхивали в течение 10 мин и центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин.

Из пробирки II отсасывали 0,2 мл буферной фазы и переносили в пробирки А и Б. Для окисливания 5-ОИУК в пробирку А прибавляли микропипеткой 0,02 мл 1%-ного раствора *l*-цистеина в бидистиллированной воде, а в пробирку Б — 0,02 мл 0,02%-ного раствора NaIO₄, потом встряхивали. Затем в обе пробирки добавляли по 0,4 мл концентрированной HCl, а в пробирку А еще и 0,02 мл 0,1%-ного раствора ОФА в метаноле и 0,02 мл 0,02%-ного раствора NaIO₄ и встряхивали. Через 30 мин в пробирку Б добавляли 0,02 мл 0,1%-ного раствора *l*-цистеина и 0,02 мл 0,1%-ного раствора ОФА в метаноле и встряхивали. Пробирки А и Б помещали в кипящую водяную баню на 10 мин, а затем охлаждали и измеряли флюоресценцию. Одновременно готовили стандартные растворы и пробы на реактивы. Стандартный раствор содержит 15 мкг/мл 5-ОИУК.

Интенсивность флюоресценции 5-ОИУК измеряли в микрокувете при длине волны возбуждения 360 нм и флюоресценции 470 нм. Результаты холостого опыта (из пробирки Б) вычитали из результатов, полученных в пробирке А, а затем вычитали показатели флюоресценции реактивов.

Содержание серотонина и 5-ОИУК рассчитывалось в микрограммах на 1 г сырого веса ткани.

Результаты и обсуждение

По изложенной выше методике в нашей лаборатории проводят серийные опыты для изучения специальных вопросов психофармакологии или физиологии, которые сопровождаются определением содержания серотонина и 5-ОИУК у контрольных животных. В этих исследованиях контрольные опыты с интактными животными отражают физиологически нормальное состояние их, биологическую норму содержания серотонина и 5-ОИУК в соответствии с видовыми и половыми различиями, сезонностью и т. д.

Сезонность аккумуляции индоламинов может быть одной из причин некоторого колебания данных о содержании серотонина в одних и тех же органах (табл. 1, 2). Конечно, немалую роль в этом играют и подопытные животные (их линии, вес, пол), а также техника проведения операции и анализа.

Колебание содержания серотонина во многих тканях и секретах животных и человека показывает, что решение очень многих биологических задач невозможно без определения кинетики серотонина как одного из индикаторов состояния организма. Для этого с успехом может быть использован описанный выше унифицированный быстрый флюорометрический метод. 16 замороженных проб можно проанализировать в течение 3 ч. Спектр флюоресценции, по нашим данным, линейно зависит от содержания серотонина в интервале 0,05—2,5 мкг. Флюоресценция 0,05 мкг серотонина была в 2—2,5 раза интенсивнее неспецифической флюоресценции реактивов. Выход как серотонина, так и 5-ОИУК в стандартных растворах был очень высоким (95—105%). Таким образом, описанный метод может быть рекомендован для самого обширного круга исследователей при изучении различных биологических материалов.

ЛИТЕРАТУРА

- Алликметс Л. Х., Жарковский А. М., 1976. Влияние Л-ДОФА на эмоциональные реакции и серотонин в мозге крыс. Бюл. экп. биол. мед. 74 (2) : 134.
- Курский М. Д., Бакшеев Н. С., 1974. Биохимические основы механизма действия серотонина. Киев.
- Плюшкин Ю. А., Матулис А. А., Мурза В. А., 1976. Способ определения связанного и свободного серотонина в различных биологических средах. Лаборат. дело (2) : 84.
- Тезсалу С. А., 1975. Регуляторная роль серотонина в деятельности поджелудочной железы. Автореф. докт. дис. мед. наук.
- Хинрикус Т. Х., 1976. Эндогенный серотонин сока поджелудочной железы кролика и ферментовыведительная функция. Мат. пятой биохим. конф. Прибалт. респ. и Белорусской ССР I : 38.
- Ansell, G. B., Beeson, M. F., 1968. A rapid and sensitive procedure for the combined assay of noradrenaline, dopamine and serotonin in a single brain sample. *Anal. Biochem.* 23 : 196.
- Butterworth, R. F., Landreville, F., Quitard, M., Barbeau, A., 1975. A reliable method for the simultaneous estimation of dopamine, noradrenaline and serotonin in discrete areas of brain. *Clin. Biochem.* 8 (5) : 298.
- Cox, R. H. Jr., Perhach, J. L. Jr., 1973. A sensitive, rapid and simple method for the simultaneous spectrophotofluorometric determination of norepinephrine, dopamine, 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in discrete areas of brain. *J. of Neurochem.* 20 : 777.
- Curzon, G., Green, A. R., 1970. Rapid method for the determination of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in small regions of rat brain. *Brit. J. Pharmacol.* 39 (3) : 653.
- Dahlström, A., Häggendal, J., Atack, C., 1973. Localization and transport of serotonin. In: *Serotonin and Behavior*. New York — London, Academic Press. Proceedings of a symposium on behavioral effects of changes in brain serotonin held at Stanford University, Stanford, California, January 16—17, 1972.
- Haubrich, D. R., Denzer, J. S., 1973. Simultaneous extraction and measurement of brain serotonin catecholamines, 5-hydroxyindoleacetic acid and homovanillic acid. *Anal. Biochem.* 55 : 306.
- Ho, B. T., Taylor, D., 1971. A method for simultaneous determination of 5-hydroxyindoleacetic acid and normetanephrine in the same brain extract. *Biochem. Med.* 5 : 521.
- Maickel, R. P., Cox, R. H. Jr., Saillant, J. Jr., Miller, F. P., 1968. A method for the determination of serotonin and norepinephrine in discrete areas of rat brain. *Internat. J. Neuropharmacol.* 7 : 275.
- Miller, F. P., Cox, R. H. Jr., Snodgrass, W. R., Maickel, R. P., 1970. Comparative effects of p-chlorophenylalanine, p-chloroamphetamine and p-chloro-N-metylamphetamine on rat brain norepinephrine, serotonin and 5-hydroxyindole-3-acetic acid. *Biochem. Pharmacol.* 19 : 435.

- Udenfriend, S., Weissbach, H., Clark, C. T., 1955. The estimation of 5-hydroxytryptamine in biological tissues. *J. Biol. Chem.* **215** : 520.
- Snyder, S. H., Axelrod, F., Zweig, M., 1967. Circadian rhythm in the serotonin content of the rat pineal gland: regulating factors. *J. Pharmacol. and Exptl Therap.* **158** (2) : 206.
- Welch, A. S., Welch, B. L., 1969. Solvent extraction method for simultaneous determination of norepinephrine, dopamine, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in a single mouse brain. *Anal. Biochem.* **30** : 161.

Тартуский государственный университет

Поступила в редакцию
3/X 1977

Margareete OTTER

SEROTONIINI JA 5-OIÄH SISALDUSE MÄÄRAMINE SPEKTROFOTO- FLUOROMETRILISE MIKROMEETODI ABIL

Resümee

Artiklis on kirjeldatud serotoniini ja tema põhilise metaboliidi 5-hüdroksüindooläädikhappe määramist kiire spektrofotofluoromeetrilise mikromeetodi abil mõningates bioloogilistes kudedes ja sekreetides ning esitatud sel meetodil saadud andmeid nimetatud ainete sisalduse kohta roti, hiire ja küüliku aju eri osades, roti pankrease koes, küüliku ja koera pankrease nõres ning inimese süljes ja veres. Katsetulemusi on võrreldud kirjanduse andmetega.

Tartu Riiklik Ülikool

Toimetusse saabunud
3. X 1977

Margareete OTTER

DETERMINATION OF SEROTONIN AND 5-HIAA BY A SPECTROPHOTOFUOROMETRIC MICROMETHOD

Summary

A rapid spectrophotofluorometric micromethod for the simultaneous determination of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in several biological tissues and secretes is described. Serotonin and 5-HIAA contents estimated by this method in discrete areas of rat, mouse and rabbit brain, in rat pancreas tissue, rabbit and dog pancreas secrete and human blood are reported. The results obtained are in good accord with data contained in relevant literature.

Tartu State University

Received
Oct. 3, 1977