

Г. Х. БУНЯТЯН, Б. А. КАЗАРЯН

О СВЯЗАННЫХ И СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТАХ МОЗГА

Функциональная деятельность головного мозга обусловлена многочисленными факторами, в числе которых особое место занимают так называемые свободные аминокислоты.

Уровень свободных аминокислот в мозгу поддерживается двумя путями: благодаря наличию специфических механизмов синтеза аминокислот и путем поступления аминокислот из крови. Концентрация свободных аминокислот в головном мозгу значительно выше, чем в плазме крови. Однако между мозговой тканью и плазмой крови поддерживаются высокие концентрационные градиенты аминокислот, т. е. из плазмы крови они поступают в мозг против концентрационного градиента. По сравнению с плазмой в мозгу значительно больше содержится глутаминовой, аспарагиновой кислот, треонина и меньше лейцина, изолейцина, валина, лизина и аргинина, что подчеркивает специфичность процессов, связанных с потреблением аминокислот мозгом [3].

Несмотря на многочисленные исследования аминокислотного обмена в литературе весьма мало освещается вопрос о связанных формах аминокислот, за исключением работ, относящихся к гамма-аминомасляной кислоте (ГАМК), проводимых в основном в лаборатории Эллиотта [6, 7]. Как показывают исследования, связанные формы аминокислот свойственны не только ГАМК, но почти всем аминокислотам, встречающимся в мозгу в свободной форме. Частью этого вопроса является изучение количества свободных и связанных форм аминокислот в целом мозгу и в его различных отделах. Исследования некоторых из них являются целью настоящей работы.

Методика. Опыты поставлены на крысах-самцах весом 150—200 г. Количество свободных и связанных аминокислот в мозгу определяли по методу Эллиотта и сотр. [15] с некоторыми изменениями, внесенными нами.

После декапитации животных быстро извлекали мозг и удаляли сосудистую оболочку. Препарирование и последующую обработку ткани проводили при 0°. Исследуемые участки мозга немедленно переносили в заранее взвешенные гомогенизаторы с ледяным Рингер-фосфатным буфером с рН 7, в количестве 3 мл. С момента декапитации эта манипуляция длилась не более 1,5—2 мин. О количестве взятой пробы судили по разнице повторного взвешивания гомогенизатора с тканью. Ткань гомогенизировали и суспензию центрифугировали при 15 000 об/мин. в центрифуге с охлаждением в течение 30 мин. Надосадочную жидкость,

содержащую свободные аминокислоты, переносили в пробирку с 3-кратным объемом 96° спирта. Осадок промывали в 1 мл Рингер-фосфатного буфера, повторно центрифугировали в центрифуге с охлаждением и надосадочную жидкость переносили в пробирку, содержащую аминокислоты. На осадок, содержащий связанные аминокислоты, добавляли Рингер-фосфатный буфер в первоначальном объеме и полученную суспензию нагревали в кипящей водяной бане в течение 15 мин., затем охлаждали, центрифугировали, надосадочную жидкость переносили в пробирку с 3-кратным объемом спирта. После часового стояния оба спиртовых раствора центрифугировали, надосадочные жидкости сливали в фарфоровые чашки и выпаривали, осадок растворяли в 1 мл воды, центрифугировали при 10 000 об/мин. и в надосадочной жидкости определяли связанные и свободные аминокислоты. С этой целью пользовались двумя методами разделения аминокислот на бумаге—электрофоретическим и хроматографическим.

Электрофорез проводили в течение 7—8 час. в пиридин-ацетатном буфере с pH 4 при напряжении 6 в/см по методу Гроссмана и сотр. [11] с некоторыми изменениями, описанными нами ранее [1], с целью определения количества ГАМК, глутаминовой и аспарагиновой кислот. После окрашивания электрофореграмм 0,5% раствором нингидрина и высушивания их помещали на 20 мин. в термостат при 70—80°С для четкого выявления пятен.

Хроматографию проводили на бумаге FN-1 (ГДР). В качестве подвижных растворителей были использованы системы н. бутанол—уксусная кислота—вода в соотношении 4 : 1 : 5.

Электрофореграммы и хроматограммы проявляли 0,5% раствором нингидрина в ацетоне. Окрашенные пятна аминокислот вырезали и элюировали в 5 мл 0,005% раствора сернокислой меди в 75% этаноле. Интенсивность окраски измеряли фотоколориметрически на аппарате ФЭК-М при длине волны 530 мкм. Калибровочные кривые строили для каждой изучаемой аминокислоты.

Полученные данные и их обсуждение. Исследованиями Эллиотта [6, 7, 15] было установлено наличие двух форм ГАМК в мозгу—свободной и связанной. Эти две формы можно обнаружить в мозговой ткани при соблюдении некоторых правил методического характера. Дело в том, что связанная ГАМК при охлаждении, нагревании, мягком, кислом или щелочном гидролизе и при изменении pH среды в сторону кислого или щелочного легко высвобождается, проявляясь в качестве свободной ГАМК. При обработке ткани через определенный промежуток времени после декапитации животных при комнатной температуре наблюдается увеличение свободной ГАМК, что объясняется изменением pH ткани в сторону кислого, вследствие активации тканевых протенназ, чем создаются благоприятные условия для активации декарбоксилазы глутаминовой кислоты [4]. Эти сдвиги наступают через 1 мин. после декапитации, а с третьей минуты, доходя до определенного уровня, особым изменениям не подвергаются. Однако по данным Эллиотта и Ловелла [8] при сохра-

нении ткани мозга крыс при 0°C в течение 30 мин. изменения уровня свободной ГАМК не наблюдается, в то время как ее связанная форма частично высвобождается [6].

Наши исследования свидетельствуют, что кроме ГАМК, связанные и свободные формы свойственны почти всем аминокислотам, встречающимся в мозгу в свободной форме. Наибольший интерес среди них представляют глутаминовая, аспарагиновая кислоты и ГАМК.

Таблица 1

Содержание свободных и связанных форм глутаминовой, аспарагиновой кислот и ГАМК в целом мозгу белых крыс в мг %

Глутаминовая кислота			Аспарагиновая кислота			ГАМК		
свободная	связанная	% связанной	свободная	связанная	% связанной	свободная	связанная	% связанной
89,7±9,7 (12)*	33,0±2,1	27,0	36,1±2,8	14,6±1,1	28,0	20,0±1,2	7,9±0,9	30,0

* В скобках указано количество опытов.

Как свидетельствуют данные, приведенные в табл. 1, связанные формы рассматриваемых аминокислот составляют ощутимую величину: глутаминовой кислоты около 27, аспарагиновой кислоты—28, ГАМК—30%. Причем это в том случае, когда в отличие от предложенного метода Эллиотта и сотр. [6, 15], первоначальный осадок тканевого экстракта промывался солевым раствором (1 мл Рингер-фосфатный буфер) с целью полного извлечения свободных аминокислот из центрифугата, при котором, по мнению авторов, даже часть связанных аминокислот может переходить в свободные.

Эти данные дают основание полагать, что такие количества связанных форм аминокислот не могут не играть существенной роли в обменных процессах мозга. По-видимому, в отличие от других тканей, мозговая ткань обладает свойством депонировать часть образовавшихся и поступивших аминокислот в виде их связанной формы, играющей существенную роль при возникновении различных функциональных состояний.

По нашему мнению, под действием различных судорожных и тормозящих агентов, а также при различных функциональных состояниях мозга сдвиги в содержании свободных аминокислот обусловлены не только их действием на ферментативные системы синтеза и распада аминокислот, но и их действием на взаимоотношение связанной и свободной формы. Об этом свидетельствует тот факт, что для образования ГАМК декарбоксилазная активность глутаминовой кислоты в мозгу представлена весьма низко. По некоторым данным [2, 13, 14, 16], около 90% глутаминовой кислоты, посредством переаминирования, превращается в аспарагиновую кислоту и лишь около 10% подвергается декарбоксилированию с образованием ГАМК. Следовательно, сдвиги ГАМК

в мозгу при тех или иных функциональных состояниях обуславливаются, по-видимому, взаимопревращением ее свободных и связанных форм. Эллиотт и ван Гелдер [9] показали, что различные судорожные агенты по-разному действуют на связанные и свободные формы ГАМК. Так, введение крысам тиосемикарбазида в малых дозах уменьшает количество ГАМК в связанной форме, а большие дозы уменьшают и связанные и свободные формы. Гипоксия, гидроксиламин, ипрониазид более заметно уменьшают свободную форму ГАМК. По-разному действуют также метразол, пикротоксин и другие агенты. Сдвиги в содержании свободных и связанных форм аминокислот под действием различных других конвульсантов, анестетиков или психотропных лекарств недостаточно изучены и представляют определенный интерес.

В подтверждение наших исследований, Эллиотт и сотр. [6, 10], как свидетельствуют их последние работы, в мозгу также находят в больших количествах связанные формы не только ГАМК, но и глутаминовой, аспарагиновой кислот, аланина, глутамина, N-ацетиласпарагиновой кислоты. Интересно, что при сравнительном изучении мозга, печени и почек они обнаружили, что мозговой ткани наиболее свойственно содержание связанных форм аминокислот, чем тканям вышеуказанных органов. По данным Гоммонда и сотр. [12], связанные аминокислоты в больших количествах обнаружены также в семенниках и семенной плазме домашних птиц.

Представляет интерес сравнительное изучение связанных и свободных аминокислот в различных областях мозга. Приведенные в табл. 2 данные показывают, что связанные формы аминокислот в коре составляют: глутаминовой кислоты—21, аспарагиновой кислоты—23, ГАМК—17%, а в гипоталамусе соответственно—23, 23, 20%. Наряду с тем, что гипоталамус содержит почти в два раза больше свободной ГАМК, по сравнению с корой, в больших количествах содержит и связанную ГАМК.

Таким образом, различные участки мозга в количественном отношении отличаются по содержанию свободных и связанных аминокислот, хотя связанные формы в процентном отношении составляют почти одинаковую величину.

Дальнейшее исследование связанных и свободных аминокислот может пролить свет на изучение химической архитектоники, а также выяснение функциональной значимости различных отделов центральной нервной системы.

Не меньший интерес представляют также и другие аминокислоты. Тщательное изучение показало, что обработка ткани солевым раствором по описанной методике позволяет из тканевого осадка разделить путем бумажной хроматографии почти все аминокислоты в связанной форме, которые встречаются в мозгу в свободном состоянии.

Некоторые из них, количество которых в мозгу варьирует в различных пределах, подвергли фотометрическому измерению.

Таблица 2

Содержание свободных и связанных форм глутаминовой, аспарагиновой кислот и ГАМК в коре и гипоталамусе белых крыс в мг %

	Глутаминовая кислота		Аспарагиновая кислота		ГАМК	
	свободная	связанная	свободная	связанная	свободная	связанная
Кора	112±9,7 (10)	30±2,1	47,3±3,6	14,5±1,1	19,0±1,3	3,7±0,8
% связанной		21,0		23,0		17,0
Гипоталамус	86,7±4,3 (10)	22,8±1,8	51,3±4,6	15,1±1,4	32,2±2,2	8,7±1,1
% связанной		23,0		23,0		20,0



Рис. 1. Хроматограммы свободных и связанных аминокислот в целом мозгу белых крыс. А — свидетель аминокислот; В — свободные формы аминокислот; С — связанные формы аминокислот. 1 — цистин с цистеином; 2 — лизин; 3 — гистидин; 4 — аргинин; глутамин и аспарагиновая кислота, 5 — серин; 6 — глицин; 7 — глутаминовая кислота; 8 — треонин; 9 — аланин; 10 — тирозин; 11 — ГАМК.

Данные табл. 3 показывают, что количество связанных форм гистидина, серина, глицина, треонина, аланина, тирозина соответственно составляет 26, 30, 20, 22, 20, 15%.

Таблица 3

Содержание свободных и связанных форм гистидина, серина, глицина, треонина, аланина и тирозина в целом мозгу белых крыс в мг %

	Гистидин		Серин		Глицин		Треонин		Аланин		Тирозин	
	свободная	связанная	свободная	связанная	свободная	связанная	свободная	связанная	свободная	связанная	свободная	связанная
	$0,94 \pm 0,2$ (8)	$0,34 \pm 0,1$	$8,4 \pm 0,6$	$3,8 \pm 0,2$	$8,6 \pm 0,5$	$2,1 \pm 0,4$	$5,2 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,3$	$7,6 \pm 1,3$	$1,9 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,1$
% свя- занной		26		30		20		22		20		15

Таким образом, наряду со свободными аминокислотами мозговая ткань содержит в больших количествах связанные аминокислоты, функция которых подлежит выяснению.

Весьма существенным также является выяснение механизма химической связи связанных аминокислот. Некоторые данные дают основание полагать, что связанные аминокислоты по своим связям отличаются от таких веществ, какими являются связанные формы ацетилхолина, адреналина, норадреналина и серотонина. В течение разделения субцеллюлярных частиц в сахарозной среде последние длительное время остаются в связанной форме, в то время как изучаемые аминокислоты в этих условиях почти полностью высвобождаются [6, 9]. Эллиотт и сотр. [6] предполагают, что ГАМК находится в связанном состоянии в двух формах. Одна, которая остается в осадке, приготовленном в сахарозном растворе, связана с субцеллюлярными частицами, в частности с определенными частицами нервных окончаний или везикулами. Другая форма адсорбирована на мембранной поверхности и интимно связана с электролитами. Отсутствие или уменьшение электролитов особенно Na или Ca или, наоборот, увеличение концентрации K приводит к высвобождению связанной ГАМК. Такой же механизм связанных форм допускается в отношении других аминокислот. Подсбное предположение представляет большой интерес в исследованиях, проведенных в лаборатории Бунятяна, где установлено, что ГАМК оказывает определенное влияние на мембранную проницаемость клеток, в частности повышает проницаемость тканей в отношении глюкозы [5].

По нашему мнению, нельзя не учитывать также существования водородных связей между связанными аминокислотами и высокополимерными соединениями клеточных структур.

Выяснение химических связей с субцеллюлярными частицами, а также роли связанных аминокислот при различных функциональных со-

стояниях центральной нервной системы являются предметом дальнейших исследований.

В ы в о д ы

1. Электрофоретическим и хроматографическим методами получены данные, которые дают основание считать, что связанные формы аминокислот свойственны почти всем аминокислотам, встречающимся в мозгу в свободном состоянии, группу которых подвергли фотометрическому измерению (глутаминовая, аспарагиновая, гамма-аминомасляная кислоты, гистидин, серин, глицин, треонин, аланин и тирозин).

2. Проведены сравнительные исследования по содержанию связанных и свободных форм глутаминовой, аспарагиновой и гамма-аминомасляной кислот как в целом мозгу, так и в коре и гипоталамусе белых крыс.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 31.V 1967 г.

Հ. Խ. ԲՈՒՆՅԱՆ, Բ. Ա. ՂԱԶԱՐՅԱՆ

ՈՒՂԵՂԻ ԿԱՊԱՍԾ ԵՎ ԱԶԱՏ ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ու մ

Մեր հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ ուղեղում գտնվող գրեթե բոլոր ազատ ամինաթթուները ունեն նաև իրենց կապված ձևերը: Եղած գրականական տվյալները վկայում են, որ կապված ամինաթթուները սպիտակուցային մոլեկուլների հետ առնչվում են որոշակի ոչ կայուն կապերով:

Այդ ամինաթթուներից մի խումբ՝ գլյուտամինաթթու, ասպարագինաթթու, գամմա-ամինակարագաթթու, հիստիդին, սերին, գլիցին, տրեոնին, ալանին և թիրոզին, որոնց քանակը ամբողջական ուղեղում գտնվում է տարբեր մակարդակների վրա մեր կողմից ենթարկվել են քանակական որոշման ինչպես իրենց ազատ, այնպես և կապված ձևերով:

Ուսումնասիրված են նաև գլյուտամինաթթվի, ասպարագինաթթվի և գամմա-ամինակարագաթթվի ազատ և կապված ձևերը ուղեղի կեղևում և հիպոթալամուսում:

Ստացված տվյալները հիմք են տալիս մտածելու, որ ուղեղային հյուսվածքը օժտված է որոշակի առանձնահատկությամբ կապելու ամինաթթուներ, որոնց նշանակությունը ուղեղի տարբեր ֆունկցիոնալ վիճակների դեպքում շատ կարևոր են:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бунятян Г. Х., Казарян Б. А., Карагезян К. Г. и Гулян Э. А. ДАН АрмССР, 60, 5, 289, 1965.
2. Бунятян Г. Х. Сб.: Роль гамма-аминомасляной кислоты в деятельности нервной системы. Из-во ЛГУ, 9, 1964.

3. Мак-Ильвейн Г. Биохимия и центральная нервная система. Из-во иностр. литер., М., 1962.
4. Мусаелян С. С. Труды 3 Всесоюзн. конф. по биохимии нервн. системы. Ереван, 175, 1963.
5. Buniatian H. Ch. Studies of the role of gamma-aminobutyric acid in carbohydrate metabolism. Erevan, 1961.
6. Elliott K. A. C., Tariq Khan T., Bilodeu F. and Lovell R. A. *Canad. J. Biochem.*, 43, 407, 1965.
7. Elliott K. A. C., Van Gelder N. M. *J. Neurochem.*, 10, 479, 1963.
8. Elliott K. A. C., Lovell R. A. *Fed. Proc.*, 21, 364, 1962.
9. Elliott K. A. C. and Van Gelder N. M. *J. phis.*, 153, 423, 1960.
10. Gaitonda M. K., Dahl D. R. and Elliott K. A. C. *Biochem J.*, 94, 345, 1965.
11. Grossman W., Haning E. and Plocke M. *Z. phis. chem.*, 299, 258, 1965.
12. Homond M., Boon M. A., Barnett B. D. *J. reproduct. and Fertiliti* 10, 2i, 1965.
13. Haslam B. I., Kreps H. A. *Biochem. J.*, 88, 566, 1963.
14. Kreps H. A., Bellamy D. *Biochem. J.*, 75, 523, 1960.
15. Lovell R. A. and Elliott K. A. C. *J. Neurochem.*, 10, 479, 1963.
16. Sellinger O. L., Catanzaro R., Chain E. B. Pocchiari F., *Proc. Roy. Soc. B.*, 156, 148, 1962.