

Г. Х. БУНЯТЯН, Э. Н. ОСИПОВА

К ВОПРОСУ ОБ УТИЛИЗАЦИИ ГАМК В МОЗГОВОЙ ТКАНИ

В настоящее время ведутся широкие исследования, касающиеся превращения и участия гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в обменных процессах. Несмотря на многочисленные исследования, многие вопросы, связанные с обменом ГАМК и ее утилизацией, остаются пока не выясненными.

Следует отметить, что большинство исследований было проведено с ГАМК без учета ее количественных сдвигов в инкубационной среде и в самой мозговой ткани, а также участия других аминокислот и глюкозы в обмене ГАМК, между тем, обмен дикарбоновых аминокислот и глюкозы тесно связан с обменом ГАМК.

Многими авторами [13—16] показано, что ГАМК образуется из глутаминовой кислоты (ГК) в результате декарбоксилирования последней, и что этим путем некоторая часть ГК через ГАМК-янтарную кислоту включается в цикл трикарбоновых кислот.

Однако данные ряда авторов [10, 11, 17] показали, что в мозговой ткани лишь незначительная часть ГК декарбоксилируется в ГАМК. Исследования, проведенные в нашей лаборатории на тканевых срезах коры головного мозга крыс [3], показали, что при $pH=7,4$ и $8,2$ из утилизированной ГК 86—87% окисляется в аспарагиновую кислоту (АК), при этом количество ГАМК почти не увеличивается. Даже при $pH=6,4$, наиболее благоприятной для активности декарбоксилазы, содержание ГАМК не увеличивается и идет заметное образование АК из ГК.

В более ранних исследованиях, проведенных на кошках, нами было показано, что при добавлении глюкозы вместе с ГАМК, последняя аккумулятировалась в мозговых срезах [2], что согласуется с данными Эллиота, Цукады и др. [9, 18]. Аккумуляция ГАМК в мозговых срезах в присутствии глюкозы, по-видимому, объясняется тем, что глюкоза в аэробных условиях способствует связыванию ГАМК с клеточными элементами.

В литературе имеются данные [19], согласно которым добавленная ГАМК в присутствии глюкозы поглощается срезами коры головного мозга крыс линейно в течение 120', после чего аккумуляция ГАМК срезами уменьшается. В отдельных экспериментах показано, что АК способствует утилизации ГАМК [6].

В настоящей работе перед нами была поставлена задача изучить количественные сдвиги ГАМК при добавлении глюкозы, ГК и АК, с обменом которых непосредственно связан ГАМК, и одновременно выяснить

как изменяется количество ГАМК в мозговых срезах и в инкубационной среде.

Методика исследований. Опыты ставили на белых крысах весом 150—220 г. Срезы коры головного мозга готовили на холоду по методу Мак-Ильвейна. Готовили также 10% гомогенат на фосфатном буфере при $\text{pH}=7,4$, который содержал: NaCl —98, KCl —27, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —1,2, KH_2PO_4 —4 и $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —17,5 ммоль.

2 мл среды, содержащей 200 мг срезов коры головного мозга или 2 мл гомогената инкубировали в присутствии кислорода в сосудиках Варбурга при 37°C . В инкубационную среду добавляли глюкозу 10 мкмоль, ГК, АК и ГАМК по 5,9 мкмоль, АТФ 7 мкмоль на 100 мг свежей ткани. После часовой инкубации центрифугированием отделяли ткань от среды. Мозговую ткань гомогенизировали в 15% трихлоруксусной кислоте, гомогенат центрифугировали, из надосадочной жидкости эфиром экстрагировали трихлоруксусную кислоту. ГАМК определяли электрофоретическим методом. Электрофорез проводили при $+1 +2^\circ$ в пиридин-ацетатном буфере, состоящем из 24 мл перегнанного пиридина, 90 мл ледяной уксусной кислоты в 3 л воды. Электрический ток подавали в 500 в (2,2 миллиампер на ленту). Использовали хроматографическую бумагу ватман I. Ленты проявляли 0,5% раствором нингидрина в ацетоне с добавлением 1,0 мл ледяной уксусной кислоты и 4 мл воды на 100 мл раствора.

Результаты опытов обработаны статистически методом Дж. У. Снедекора [5].

Результаты и обсуждение. Полученные нами данные показывают (табл. 1), что при инкубации ткани без добавления субстратов происходит некоторое уменьшение эндогенной ГАМК, что согласуется с литературными данными [6], причем это уменьшение частично связано с ее переходом из ткани в среду.

При добавлении глюкозы содержание ГАМК сохраняется на первоначальном уровне, т. е. тормозится и без того незначительная утилизация ГАМК при инкубации, причем выход ГАМК из ткани в среду задерживается. Это, по-видимому, объясняется тем, что глюкоза, как известно из предыдущих наших исследований [2] и литературных данных [9, 18], способствует связыванию ГАМК.

В присутствии добавленной ГК по сравнению с инкубированным контролем содержание ГАМК как в инкубационной среде так и в срезах несколько повышается, но по сравнению с фиксированным контролем общее количество ГАМК не претерпевает изменений. Некоторый прирост ГАМК может быть результатом декарбоксилирования ГК. Однако в присутствии ГК новообразование ГАМК незначительное, что согласуется с нашими [3] и с литературными данными об относительно слабой глутаматдекарбоксилазной активности [10, 11, 17].

Добавление АК вызывает заметное уменьшение содержания ГАМК. Подобное действие АК на ГАМК наблюдал Г. Шамкулашвили [6]. Следует отметить, что в исследованиях В. Оганесяна (неопубликованные

Таблица 1

Содержание ГАМК в инкубационной среде и срезах коры головного мозга крыс
в мкмольх при добавлении глюкозы, ГК и АК

Содержание ГАМК	Ткань, фиксированный контроль	Ткань, инкубированный контроль	Глюкоза	ГК	АК	Глюкоза+ГК	Глюкоза+АК	ГК+АК	Глюкоза+ГК+АК
Среда	$0 \pm 0,02$ (6)	$0,2 \pm 0,02$ (10) $P < 0,001$	$0,1 \pm 0,02$ (6) $P < 0,005$ $> 0,001$	$0,3 \pm 0,03$ (6) $P < 0,025$ $> 0,01$	$0,1 \pm 0,02$ (6) $P < 0,005$ $> 0,001$	$0,1 \pm 0,02$ (6) $P < 0,005$ $> 0,001$	$0,2 \pm 0,01$ (6) —	$0,2 \pm 0,03$ (5) —	$0,1 \pm 0,03$ (6) $P < 0,025$ $> 0,01$
Ткань 200 мг	$0,7 \pm 0,04$ (6)	$0,3 \pm 0,05$ (10) $P < 0,001$	$0,6 \pm 0,01$ (6) $P < 0,001$	$0,4 \pm 0,02$ (6) $P < 0,05$	$0,3 \pm 0,02$ (6) —	$0,9 \pm 0,01$ (6) $P < 0,001$	$1,1 \pm 0,04$ (6) $P < 0,001$	$0,5 \pm 0,02$ (5) $P < 0,001$	$0,7 \pm 0,03$ (6) $P < 0,001$
Общее количество в мкмоль/г	3,5 (6)	2,5 (10)	3,5 (6)	3,5 (6)	2,0 (6)	5,0 (6)	6,5 (6)	3,5 (5)	4,0 (6)

данные), проведенных в нашей лаборатории, АК сильно подавляла глутаматдекарбоксилазную активность.

Интересные данные были получены при совместном добавлении глюкозы и ГК. При этой комбинации значительно возрастает содержание ГАМК, и она в основном аккумулируется в срезах, причем в большей степени, чем при добавлении одной глюкозы. Подобное явление отмечается, когда глюкоза сочетается с АК. Таким образом, АК сама по себе способствует утилизации ГАМК, а в присутствии добавленной глюкозы она усиливает образование ГАМК, что наблюдали и другие авторы [4, 6].

Ряд исследований показал, что глюкоза стимулирует превращения ГК и особенно АК [7, 8, 17]. Как Априкян в нашей лаборатории [1], так и другие исследователи показали [8, 17], что глюкоза сильно усиливает утилизацию АК. Не исключена возможность, что помимо эффекта глюкозы на связывание ГАМК срезами аминокот АК и ГК в присутствии добавленной глюкозы используется для образования ГАМК.

Как видно из табл. 1, по сравнению с фиксированным контролем общее содержание ГАМК в присутствии добавленных ГК и АК не изменяется, по сравнению же с инкубированным контролем уровень ГАМК повышается и основная часть ее аккумулируется в срезах.

При комбинации глюкоза, ГК и АК наблюдается повышение уровня ГАМК, особенно в срезах, однако в менее выраженной степени, чем в присутствии добавленных глюкоза+ГК и глюкоза+АК. При наличии глюкозы+ГК или АК механизм образования ГАМК требует дальнейших исследований.

В следующей серии опытов мы изучали утилизацию добавленной ГАМК. ГАМК, добавленная в количестве 5,9 мкмоль на 100 мг ткани, утилизируется незначительно (табл. 2). В присутствии добавленной глю-

Таблица 2

Содержание ГАМК в инкубационной среде и срезах коры головного мозга крыс при добавлении ГАМК, ГК и глюкозы

Содержание ГАМК	ГАМК, фиксированный контроль	ГАМК, инкубированный контроль	ГАМК+ глюкоза	ГАМК+ ГК	ГАМК+ глюкоза+ ГК
Среда	10,4±0,26 (6)	9,4±0,1 (6) P < 0,005 > 0,001	9,2±0,11 (6) P < 0,1 > 0,05	8,9±0,16 (6) P < 0,005 > 0,001	8,3±0,1 (6) P < 0,001
Ткань 200 мг	2,0±0,06 (6)	2,2±0,06 (6) P = 0,05	2,6±0,05 (6) P < 0,005 > 0,001	1,1±0,04 (6) P < 0,061	3,0±0,07 (6) P < 0,001
Общее количество в мкмоль г	62,0 (6)	58,0 (6)	59,0 (6)	50,0 (6)	56,5 (6)

козы происходит некоторое накопление ГАМК в срезах. Как видно из данных табл. 2, в присутствии добавленной ГАМК, ГК способствует ути-

лизации ГАМК, причем особенно снижается содержание ГАМК в срезах. Не исключена возможность, что при большом содержании ГАМК подавляется ее образование из ГК, т. е. количество утилизированной ГАМК не восполняется ее новообразованием.

В опытах с добавлением ГАМК, глюкозы и ГК отмечается тот же эффект, как и при добавлении глюкозы+ГК (табл. 1), т. е. происходит более высокое накопление ГАМК в срезах. Однако суммарное количество ГАМК несколько меньше, чем в опытах с глюкозой+ГК, без добавления ГАМК (табл. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что как при наличии, так и в отсутствии глюкозы, количественные взаимоотношения между содержанием ГАМК и ГК играют значительную роль в превращениях ГАМК. Кроме того, полученные данные позволяют заключить, что в утилизации ГАМК важную роль играет его аккумуляция или связывание в ткани.

Чем больше связывается ГАМК, тем меньше она утилизируется. В аккумуляции ГАМК в срезах большую роль играет глюкоза и ее этот эффект усиливается при добавлении ГК и АК. В этом случае происходит как новообразование ГАМК, так и ее заметное аккумуляция в срезы.

Важное значение имеет и то, что глюкоза является источником энергии в мозговой ткани. Количество свободной глюкозы в мозговой ткани незначительно, а при инкубировании мозговых срезов без добавления глюкозы в первую очередь используются свободные аминокислоты, в частности ГК и ГАМК [3]. Поэтому представляло интерес изучить сдвиги в содержании ГАМК при ее добавлении после предварительной инкубации мозговых срезов. Одновременно мы ставили опыты с гомогенатами коры головного мозга.

Т а б л и ц а 3
Изменение содержания ГАМК в срезах и гомогенатах коры головного мозга крыс в мкмольях на г ткани с прединкубацией и без нее

Условия опыта	Срезы коры головного мозга	Гомогенаты коры головного мозга
15 мин. прединкубация + ГАМК	52,5±0,5 (12)	50,0±0,7 (4)
+ГАМК сразу	58,0±0,85 (14) P<0,001	53,5±0,42 (4) P=0,005

Приведенные в табл. 3 результаты показывают, что при добавлении ГАМК после 15-минутной инкубации срезов коры головного мозга она утилизируется в большей степени, чем в опытах без прединкубации.

В опытах на гомогенатах разница в утилизации ГАМК с прединкубацией и без нее выражена менее заметно. По-видимому, в течение 15-

минутной прединкубации происходит некоторое истощение тканей субстратами окисления, в первую очередь глюкозой, необходимой для синтеза макроэргических соединений, вследствие чего добавленная на этом фоне ГАМК лучше утилизируется. Для подтверждения этого предположения была проведена следующая серия опытов с добавлением глюкозы и АТФ после 15-минутной прединкубации. Данные, приведенные в табл. 4, свидетельствуют о том, что после 15-минутной прединкубации при добавлении глюкозы и АТФ вместе с ГАМК, последняя утилизируется в значительно меньшей степени. Утилизация ГАМК подавляется также, когда АТФ и глюкоза добавляются до прединкубации.

Таблица 4

Изменение содержания ГАМК в срезах коры головного мозга крыс при добавлении ГАМК, глюкозы и АТФ в мкмольях на г ткани

15'-прединкубация +ГАМК	15'-прединкубация +ГАМК+АТФ	15'-прединкубация + глюкоза+ГАМК	ГАМК	ГАМК +АТФ	ГАМК +глюкоза
52,5±0,5 (12)	59,0±0,8 (6) P<0,001	60,5±0,18 (5) P<0,001	58,2±0,8 (14)	60,0±0,9 (6) P=0,1	60,0±0,7 (6) P=0,1

В ы в о д ы

1. При инкубации срезов коры головного мозга крыс в аэробных условиях при рН=7,4 в фосфатном буфере ГАМК частично утилизируется.

2. Глюкоза способствует аккумулярованию ГАМК в мозговых срезах.

3. ГК не оказывает особого влияния на содержание ГАМК, а АК, наоборот, снижает ее содержание. Эти аминокислоты, добавленные вместе с глюкозой, способствуют значительному нарастанию количества ГАМК, большая часть которой аккумуляруется в мозговых срезах. Полученные данные позволяют заключить, что повышение содержания ГАМК в основном связано с аккумулярованием ее в срезах, где она переходит в связанную форму.

После предварительной инкубации мозговых срезов утилизация добавленной ГАМК повышается. Наоборот, этот процесс подавляется при добавлении глюкозы и АТФ.

Հ. Խ. ԲՈՒՆՅԱՆ, Է. Ն. ՕՍԻՊՈՎԱ

**ՈՒՂԵՂԱՅԻՆ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔԻ ԿՈՂՄԻՑ ԳԱՄՄԱ-ԱՄԻՆՈԿԱՐԱԳԱԹՔԻ
(ԳԱԿԹ) ՅՈՒՐԱՑՄԱՆ ՄԱՍԻՆ**

Ա մ փ ո փ ու մ

Հետազոտվել են ԳԱԿԹ-ի քանակական տեղաշարժերը ուղեղի կտրվածքներում և ինկուբացիոն միջավայրում գլյուկոզայի, գլուտամինաթթվի և ապարագինաթթվի ավելացման դեպքում:

Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ ԳԱԿԹ-ն փոքր չափով է յուրացվում ուղեղի կտրվածքների կողմից անրոք պայմաններում (ֆոսֆատային բուֆեր рН 7,4):

Գլյուկոզան թեթևակի բարձրացնում է ԳԱԿԹ-ի մակարդակը և խթանում է նրա կուտակումն ուղեղի կեղևի կտրվածքներում: Ստացված տվյալները վկայում են այն մասին, որ ԳԱԿԹ-ի յուրացումը ուղեղային հյուսվածքի կողմից կախված է նրա կուտակման հետ ուղեղային հյուսվածքի կտրվածքներում, որտեղ հիմնականում նա գտնվում է կապված վիճակում:

ԳԱԿԹ-ի կուտակումը ուղեղային կտրվածքներում զուգորդվում է նրա ընդհանուր քանակի ավելացման հետ:

Երբ ուղեղային հյուսվածքը ենթարկվում է նախնական ինկուբացիայի (15 րոպե), ապա վերջինիս քայքայումը ուղեղային հյուսվածքի կողմից համեմատաբար արագ է ընթանում: Ինկուբացիայից հետո ավելացրած գլյուկոզան և ԱՏՑ-ն ընկճում են ԳԱԿԹ-ի յուրացման պրոցեսը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Априкян Г. В. ДАН АрмССР, 35, 213, 1962.
2. Бунятян Г. Х. Третья Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы, Ереван, 1963.
3. Демин Ю. М., Мусаелян С. С., Карапетян В. С., Осипова Э. Н. и Акопян Дж. А. Вopr. биохим. мозга, 1, Ереван, 1963.
4. Кометнани П. А. Укр. биох. журнал, 37, 5, 1965.
5. Снедекор Дж. У. Статистические методы в применении к исследованиям в сельском хозяйстве и биологии, 1961.
6. Шамкулашвили Г. Г. Сообщ. АН ГрузССР, 42, 1, 105—110, 1966.
7. Chain E. B., Cohen M. M. and Rocchiari F. Proc. Roy. Ser. B., 156, 163, 1962.
8. Chain E. B., Rocchiari E. and Reeding H. W. Proc. Roy. Soc. Ser. B. 156, 144, 1962.
9. Elliott K. A. C., van Gelder N. M. J. Neurochem., 3, 28, 1958.
10. Haslam B. J. and Krebs H. A. Biochem. J., 88, 566, 1963.
11. Krebs H. A. and Bellamy D. Biochem. J., 75, 523, 1960.
12. McIlwain H. and Tresize M. A. Biochem. J., 63, 250, 1956.
13. McKhann G. M. and Tower D. B. Am. J. Physiol., 196, 36, 1959.
14. McKhann G. M. and Tower D. B. In: Inhibition in the nervous system and γ -aminobutyric acid, Oxford, 163, 1860.
15. Roberts E. and Erankel S. J. Biol. Chem., 187, 55—63, 1950.
16. Roberts E., Rothstein M. and Baxter C. F. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 97, 746, 1958.

17. Sellinger O. Z., Catanzaro R., Chain E. B. and Pocchiari F. Proc. Roy. Soc. Ser. B., 156, 148, 1962.
18. Tsukada V., Hirano S., Nagata V., Matsutani T. In: Inhibition in the nervous system and γ -aminobutyric acid., Oxford, 163, 1960.
19. Tsukada V., Nagata V., Hirano S. and Matsutani T. J. Neurochem., 10, 241, 1963.