

А. А. СИМОНЯН

ДЕЙСТВИЕ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ НА ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА КУРИНОГО ЭМБРИОНА

Существуют разноречивые данные в отношении окисления гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в мозговой ткани. Ряд авторов [1, 12, 13, 15, 16] показал, что ГАМК не является эффективным субстратом для дыхания мозговой ткани. Однако это не исключает высокую метаболическую активность ГАМК и ее окисление в мозгу. Так, например, по данным Цукада и сотр. [27] ГАМК в количестве 10 мкмоль несколько уступает глюкозе в отношении поглощения кислорода головным мозгом морской свинки.

В опытах Мак Канна и сотр. [20, 21] ГАМК в количестве 30 мкмоль повышает дыхательную активность срезов мозга в такой же степени, как глюкоза (15 мкмоль) и глутамат (30 мкмоль). В их исследованиях ГАМК была так же эффективна, как и пируват, являясь субстратом для окислительного фосфорилирования. Одновременно в этих опытах было показано, что ГАМК окисляется и участвует в процессе фосфорилирования также в митохондриях мозга кошек [22]. Аналогичные данные были получены Сактором и Пакером [26] в отношении мозга белых крыс.

Целью данной работы было изучение влияния гамма-аминомасляной кислоты на окислительное фосфорилирование митохондрий мозга куриного эмбриона в эмбриогенезе.

Методика исследования. Опыты ставили на эмбрионах кур белой русской породы. Исследование проводили с 13 дня развития, т. е. с начала плодной стадии онтогенетического развития кур [6, 11] и продолжали до вылупления. Для сравнения опыты ставили также на зрелых курах. Гомогенизацию ткани проводили гомогенизатором типа Поттера с вращающимся тефлоновым пестиком [25]. Субклеточные фракции мозговой ткани выделяли дифференциальным центрифугированием, методом Манделя и сотр. [19] с некоторыми видоизменениями, в среде 0,25 М раствора сахарозы, рН 7,4. Степень чистоты выделенных фракций определяли морфологическим и энзиматическим способами. Морфологическую целостность митохондрий определяли фазово-контрастным микроскопом. Энзиматический контроль производили определением сукциндегидрогеназной активности [28]. Изолированные митохондрии инкубировали в течение 1 часа при 26°. Реакционная смесь для инкубации содержала (в мкмольях): ГАМК—50, калий фосфат—40, КСl—100, MgCl₂—10, глюкозу—150, АТФ—3 (Reanal) и 0,75 мг кристаллической гексокиназы (Sigma). Митохондрии добавляли из расчета 2—3 мг белка. рН

смеси 7,4 конечный объем—2,2 мл. Окисление в митохондриях измеряли манометрическим [10] и параллельно—полярографическим способами [3]. Газовая фаза—воздух. Реакцию приостанавливали добавлением 3,3% трихлоруксусной кислоты. Неорганический фосфат определяли методом Лоури и Лопез [17], в видоизменении В. П. Скулачева [9]. Все данные вычисляли из расчета на 1 мг белка, который определяли по Лоури и сотр. [18]. Реакционная смесь для изучения АТФ-фосфогидролазной активности содержала 1,6 мл 0,25 М раствора сахарозы, 0,2 мл АТФ (4 мг АТФ в каждой пробе) и 0,2 мл суспензии митохондрий, соответствующей 2—3 мг белка. Время инкубации 30 мин. Критерием активности фермента служило увеличение неорганического фосфата в среде. Полученные данные статистически обработаны [4].

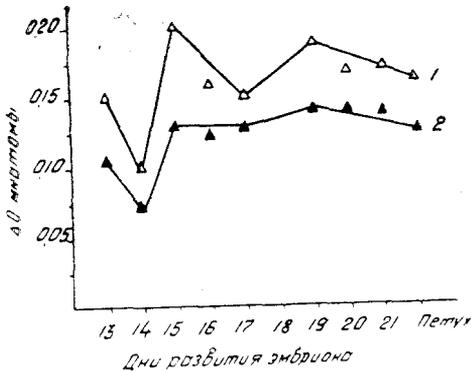


Рис. 1. Полярографическое определение дыхания в митохондриальной фракции мозга куриного эмбриона в онтогенезе и у зрелых кур при окислении ГАМК. 1 — ГАМК, 2 — эндогенное дыхание. Изолированные митохондрии инкубировали в течение 3 мин. при 26°. В полярографической чашке находились: ГАМК—25, калий фосфат—20, KCl—50, глюкоза — 75, MgCl₂ — 5, АТФ — 1,5, 0,25—0,35 мг кристаллической гексокиназы. Конечный объем смеси 1,0—1,1 мл, рН 7,4, газовая фаза — воздух. Митохондрии добавляли из расчета 1,0—2,0 мг белка на каждую пробу.

Результаты исследования и их обсуждение. В наших исследованиях ГАМК, добавленная к митохондриям мозга куриного эмбриона, в некоторой степени стимулирует дыхание и способствует образованию макроэргов (табл. 1). По сравнению с эндогенным дыханием при наличии ГАМК интенсивность дыхания митохондрий в разные дни эмбриогенеза кур возрастает в 2—3 раза. Повышение уровня поглощения кислорода с участием ГАМК наблюдается также в митохондриях мозга цыплят в постэмбриональном периоде, а также у зрелых особей.

При эндогенном дыхании фосфат в митохондриях не эстерифицируется, наоборот, под действием митохондриальной АТФ-фосфогидролазы за счет расщепления АТФ увеличивается количество свободного фосфата в среде. Однако при добавле-

нии ГАМК происходит эстерификация фосфата и образование макроэргических связей.

Интересно отметить, что закономерности в динамике дыхания и эстерификации неорганического фосфата в митохондриях мозга куриного эмбриона в эмбриогенезе, которые наблюдались в наших прежних исследованиях [2], при окислении таких субстратов, как сукцинат, глутамат и α-кетоглутарат, повторяются и с добавлением ГАМК. Дыхание митохондрий в ходе онтогенетического развития с начала плодной стадии в митохондриях мозга постепенно повышается и на 21 день составляет $2,62 \pm 0,071$ мкатома на 1 мг белка, тогда как на 13 день оно составляло

Таблица 1

Соотношение окисления и фосфорилирования в митохондриях мозга куриного эмбриона в ходе эмбриогенеза при добавлении ГАМК (ΔO и ΔP в мкатамах, $M \pm m$)

Дни развития эмбриона	Эндогенное дыхание		ГАМК		
	O	P*	ΔO	ΔP	P/O
13	0,63±0,046 (6)	0,75±0,080 (6)	1,87±0,092 (8) P<0,001	1,77±0,093 (8)	0,97±0,085 (8)
14	0,75±0,115 (6)	0,83±0,143 (6)	1,99±0,209 (8) P<0,001	1,56±0,046 (8)	0,71±0,101 (8)
15	0,65±0,197 (5)	0,99±0,121 (5)	1,53±0,141 (9) P>0,001	0,93±0,109 (9)	0,61±0,042 (9)
16	0,97±0,214 (6)	0,87±0,105 (6)	2,21±0,102 (9) P<0,001	1,27±0,061 (9)	0,57±0,023 (9)
17	0,76±0,167 (5)	0,77±0,165 (5)	2,17±0,114 (9) P<0,001	1,07±0,060 (9)	0,48±0,013 (9)
18	0,88±0,200 (5)	0,97±0,158 (5)	2,32±0,067 (8) P<0,001	1,09±0,067 (8)	0,47±0,028 (8)
19	0,71±0,110 (5)	1,07±0,149 (5)	2,46±0,102 (7) P<0,001	1,15±0,054 (7)	0,43±0,068 (7)
20	0,96±0,176 (6)	1,10±0,030 (6)	2,41±0,184 (6) P<0,001	1,05±0,158 (6)	0,47±0,030 (6)
21	0,60±0,133 (6)	1,00±0,088 (6)	2,62±0,071 (8) P<0,001	1,51±0,194 (8)	0,57±0,071 (8)
1-дневный цыпленок	1,31±0,228 (5)	1,35±0,129 (5)	3,12±0,128 (9) P<0,001	0,81±0,096 (9)	0,26±0,034 (9)
Петух	0,56±0,145 (5)	1,25±0,165 (5)	1,67±0,356 (11) P<0,001	1,76±0,231 (11)	1,29±0,135 (11)

* В этой, а также в следующих таблицах звездочкой обозначается количество свободного фосфата.

1,87±0,092. Эти данные подтверждаются также определением дыхания полярографическим методом (рис. 1).

Количество эстерифицированного фосфата, наоборот, понижается. Коэффициент соотношения окисления и фосфорилирования в онтогенезе постепенно понижается, составляя 0,43±0,068—0,97±0,085 в разные периоды развития зародыша.

Исследования показывают, что ГАМК в некоторой степени окисляется также в митохондриях мозга кроликов и белых крыс (зрелые животные). Из данных, приведенных в табл. 2, видно, что при наличии ГАМК дыхание митохондрий мозга кроликов усиливается, количество

Таблица 2

Соотношение окисления и фосфорилирования в митохондриях мозга кроликов при добавлении ГАМК (ΔO и ΔP в мкатамах, $M \pm m$)

Эндогенное дыхание		Г А М К		
O	P*	ΔO	ΔP	P/O
$1,13 \pm 0,093$ (7)	$0,85 \pm 0,094$ (7)	$1,84 \pm 0,248$ (12) $P > 0,005$	$2,51 \pm 0,081$ (12)	$1,39 \pm 0,060$ (12)

эстерифицированного фосфата составляет $2,51 \pm 0,081$ мкатама, а коэффициент P/O— $1,39 \pm 0,060$. Такая же картина окислительного фосфорилирования при наличии ГАМК наблюдается также в митохондриях мозга белых крыс (табл. 3).

Таблица 3

Соотношение окисления и фосфорилирования в митохондриях мозга белых крыс при добавлении ГАМК (ΔO и ΔP в мкатамах, $M \pm m$)

Эндогенное дыхание		Г А М К		
O	P*	ΔO	ΔP	P/O
$0,40 \pm 0,089$ (6)	$1,12 \pm 0,149$ (6)	$1,15 \pm 0,102$ (21) $P < 0,001$	$0,47 \pm 0,033$ (21)	$0,47 \pm 0,041$ (21)

Таким образом, как показывают наши исследования, ГАМК в некоторой степени окисляется в митохондриях головного мозга куриного эмбриона, зрелых кур, а также кроликов и белых крыс. Однако ГАМК по своему эффекту намного уступает таким субстратам окислительного фосфорилирования, как сукцинат, глутамат и α -кетоглутарат [2].

При окислении гамма-аминоасляной кислоты дыхательный контроль в разные дни эмбриогенеза кур варьирует от 1,31 до 3,03 (табл. 4). Для полного убеждения, что окисление в митохондриях мозга связано с ГАМК, мы испытывали влияние акцепторов, а также других компонентов реакционной смеси на окислительное фосфорилирование. Для решения этого вопроса исследовали окисление и фосфорилирование в следующих пробах:

- 1) эндогенное дыхание — контроль без добавок;
- 2) полная инкубационная смесь;
- 3) полная инкубационная смесь без глюкозы;
- 4) полная инкубационная смесь без гексокиназы и глюкозы;
- 5) полная смесь без гексокиназы;
- 6) полная смесь без АТФ, неорганического фосфата и гексокиназы.

Опыты показывают, что по сравнению с эндогенным дыханием при наличии ГАМК поглощение кислорода митохондриями усиливается более чем в два раза (табл. 5) и имеет место эстерификация неорганиче-

Таблица 4
 Дыхательный контроль митохондрий мозга куриного эмбриона в онтогенезе при окислении ГАМК ($M \pm m$, ΔO в мкатомах)

Дни развития эмбриона	ΔO (без АТФ, Р и гексокиназы)	Дыхательный контроль
13	$0,67 \pm 0,061$ (8) $P < 0,001$	$3,03 \pm 0,540$ (8)
14	$1,25 \pm 0,150$ (8) $P > 0,005$	$1,64 \pm 0,173$ (8)
15	$0,94 \pm 0,169$ (8) $P > 0,010$	$1,70 \pm 0,152$ (8)
16	$1,38 \pm 0,113$ (8) $P < 0,001$	$1,62 \pm 0,148$ (8)
17	$1,48 \pm 0,114$ (8) $P < 0,001$	$1,53 \pm 0,121$ (8)
18	$1,17 \pm 0,105$ (8) $P < 0,001$	$2,16 \pm 0,163$ (8)
19	$1,61 \pm 0,058$ (8) $P < 0,001$	$1,51 \pm 0,058$ (8)
20	$1,34 \pm 0,107$ (8) $P < 0,001$	$1,82 \pm 0,075$ (8)
21	$2,16 \pm 0,135$ (8) $P > 0,010$	$1,31 \pm 0,114$ (8)
1-дневный цыпленок	$1,67 \pm 0,044$ (10)	$1,81 \pm 0,087$ (10)
Петух	$2,13 \pm 0,036$ (6) $P < 0,001$	$1,31 \pm 0,056$ (6)

ского фосфата. Эти закономерности наблюдаются также в случае отсутствия глюкозы в среде. На процесс окисления и фосфорилирования это не влияет. Полученные данные можно объяснить наличием следов сахарозы в гексокиназе (Sigma), использованной в наших исследованиях [5]. Глюкоза, образующаяся вследствие расщепления сахарозы, оказывается достаточной для образования акцепторной системы «глюкоза + гексокиназа».

В тех пробах, где гексокиназа отсутствует, поглощение кислорода митохондриями по сравнению с эндогенным дыханием также стимулируется, однако фосфат не эстерифицируется, а, наоборот, высвобождается и в среде увеличивается количество свободного фосфата. Та же картина наблюдается и в пробах без гексокиназы и глюкозы.

Таким образом, данные, приведенные в табл. 5, показывают, что процесс окисления в митохондриях связан с наличием ГАМК. Результаты этих опытов подтверждаются и полярографическими наблюдениями.

По нашим предварительным данным расхождение результатов, полученных в исследованиях разных авторов при использовании ГАМК в качестве субстрата окисления в нервной ткани, является результатом применения разных методов исследования.

1. В наших опытах ГАМК брали в 2 раза больше, чем в исследованиях Ловтрупа [15, 16] и других авторов, которые не наблюдали ее стимулирующего действия на дыхание. В опытах Ловтрупа в реакцион-

Таблица 5

Влияние гексокиназы, АТФ, неорганического фосфата и глюкозы на соотношение окисления и фосфорилирования митохондрий мозга куриного эмбриона при добавлении ГАМК (ΔO и ΔP в мкатамах $M \pm m$)

Опыты	ΔO	ΔP	P/O
Эндогенное дыхание	$1,05 \pm 0,122$ (14)	$0,55 \pm 0,056^*$ (14)	—
Полная инкубационная смесь	$2,37 \pm 0,104$ (18)	$1,37 \pm 0,117$ (18)	$0,60 \pm 0,153$ (18)
Без глюкозы	$2,16 \pm 0,249$ (9)	$1,44 \pm 0,223$ (9)	$0,56 \pm 0,091$ (9)
Без глюкозы и гексокиназы	$2,13 \pm 0,157$ (9)	$1,36 \pm 0,125^*$ (9)	—
Без гексокиназы	$2,07 \pm 0,256$ (9)	$0,84 \pm 0,169^*$ (9)	—
Без АТФ, P и гексокиназы	$1,80 \pm 0,117$ (8)	0 (8)	—

ной смеси отсутствует КС1, который по литературным данным [23, 24] является стимулятором процессов эстерификации неорганического фосфата и это действие осуществляется через реакции трансфосфорилирования.

2. В опытах Ловтрупа митохондрии выделялись методом Броди и Бейн [14]. Разница заключается в том, что для выделения митохондриальной фракции центрифугирование мы производили в течение 25—27 мин., в то время как по вышеотмеченной методике оно длится от 40 до 60 мин.

3. Гомогенизацию ткани мы производили тefлоновым гомогенизатором, что, как указывают многочисленные данные, имеет определенное преимущество над гомогенизаторами другого типа.

4. Особого внимания заслуживает вопрос температуры инкубации реакционной смеси. В наших опытах она равнялась 26°C . В исследованиях, где ГАМК не подвергается окислению, инкубацию проводили при 37°C . Мы показали, что по сравнению с 26° инкубация при 37° сопровождается повышением активности митохондриальной АТФ-фосфогидролазы мозга более, чем на 30% (табл. 6). Эти, а также наши прежние данные

Таблица 6
Влияние разных температур на АТФ-фосфогидролазную активность митохондрий мозга кроликов (ΔP в мкатамах, $M \pm m$, инкубация 30 минут)

Инкубация при 26°	Инкубация при 37°
$1,99 \pm 0,09$ (6) $P < 0,001$	$3,04 \pm 0,09$ (6)

[7, 8] показывают, что оптимальной температурой максимального действия АТФ-фосфогидролазы является 37—45°. Одновременно в литературе имеются указания о том, что при 37° ГАМК в количестве 13 мкмоль/мл повышает активность митохондриальной АТФ-азы мозга более 66,8% [1]. При 26° ГАМК почти не повышает активность фермента (табл. 7). Как видно, не лишено основания предположение, что инкуба-

Таблица 7
Влияние ГАМК на АТФ-фосфогидролазную активность в митохондриях мозга куриного эмбриона при 26° ($M \pm m$, ΔP в мкатамах)

	Контроль (без ГАМК)	С добавлением ГАМК
Эмбрион	$2,38 \pm 0,129$ (5)	$2,39 \pm 0,117$ (5)
Петух	$1,88 \pm 0,129$ (5)	$1,89 \pm 0,119$ (5)

ция при 37° с добавлением ГАМК сопровождается и окислением, и фосфорилированием; однако образующиеся макроэрги быстро расщепляются активизированным ферментом и вследствие этого в среде прибавляется свободный фосфат, что и мешает выявлению образующихся макроэргов. Об этом свидетельствуют наши прежние опыты, которые были проведены на митохондриях мозга кроликов при 26 и 37° (табл. 8). Приве-

Таблица 8
Влияние разных температур на процесс эстерификации неорганического фосфата при окислении ГАМК (ΔP в мкатамах, $M \pm m$)

Инкубация при 26°	Инкубация при 37°
$2,75 \pm 0,06$ (8) $P < 0,001$	$2,18 \pm 0,05$ (8)

денные в таблице данные показывают, что интенсивная эстерификация неорганического фосфата происходит в условиях инкубации реакционной смеси при 26°.

В ы в о д ы

1. Гамма-аминомасляная кислота в некоторой степени окисляется в митохондриальной фракции мозговой ткани куриного эмбриона и зрелых особей, а также кроликов и белых крыс и в определенной степени способствует образованию макроэргических связей.

2. С начала плодной стадии (с 13 дня) эмбрионального развития в митохондриях мозга куриного эмбриона при окислении ГАМК преобладают процессы сопряженного фосфорилирования. Затем они постепенно замедляются и повышается уровень свободного окисления. Энергия, вы-

деленная при интенсивном расщеплении макроэргов, обеспечивает температуру тела эмбриона.

3. Дыхательная активность мозговой ткани в течение развития эмбриона при наличии ГАМК повышается, однако при этом количество макроэргов не увеличивается. Постепенное понижение соотношения окисления и фосфорилирования в митохондриях мозга в течение онтогенетического развития тесно связано с повышением АТФ-фосфогидролазной активности.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 15.XI 1967 г.

Ա. Ա. ՍԻՄՈՅԱՆ

ԳԱՄԱ-ԱՄԻՆԱԿԱՐԱԳԱԹՔՎԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԱՎԻ ՍԱՂՄԻ ՈՒՂԵՂԻ ՄԻՏՈՔՈՆՈՐԻԱՆԵՐԻ ՕՔՍԻԴԱՅԻՈՆ ՖՈՍՖՈՐԻԼԱՅՄԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Հետազոտվել է գամմա-ամինոկարապթթվի (ԳԱԿԹ) ազդեցությունը հավի սաղմի ուղեղից անջատված միտոքոնդրիանների օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վրա: Փորձերից ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ ԳԱԿԹ-ը որոշ չափով օքսիդանում է սաղմի, ինչպես նաև հասուն հավերի ուղեղի միտոքոնդրիաներում և նպաստում մակրոէրգային կապերի առաջացմանը: Զարգացման պտղային շրջանի սկզբից (ինկուբացման 13-րդ օրից) սկսած հավի սաղմի ուղեղում գերակշռում են կապված օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման պրոցեսները: Էմբրիոոգենեզի վերջում բարձրանում է ազատ օքսիդացման մակարդակը և օքսիդացիոն ֆոսֆորիլացման գործակիցը աստիճանաբար փոքրանում է: Առաջացած մակրոէրգերի ինտենսիվ ճեղքման հետևանքով առաջացած ազատ էներգիան նպաստում է ձուր նորմալ շերմաստիճանի պահպանմանը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бунятыан Г. Х., Мовсесян С. Г., Урганджян М. Г. Вопросы биохимии мозга. Изд. АН АрмССР, 1, 15, 1964.
2. Бунятыан Г. Х., Симомян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 41, 2, 97, 1965.
3. Гейровский Я. Полярнографический метод. Теория и практическое применение. ОКТИ, М., 99, 1937.
4. Закутинский Д. И., Селиванова Л. Н. Биологическая оценка препаратов для профилактики и лечения лучевой болезни. Медгиз, 1960.
5. Мовсесян С. Г., Урганджян М. Г. Вопросы биохимии мозга. Изд. АН Арм. ССР, 1, 87, 1964.
6. Рагозина М. Н. Известия АН СССР, сер. биол., 4, 95, 1955.
7. Симомян А. А. Известия Министерства с.-х. АрмССР, 3—4, 203, 1964.
8. Симомян А. А. Известия АН АрмССР (сер. биол.), 17, 4, 22, 1964.
9. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М., 1962.
10. Умбрейт В. В., Буррис Р. Х., Штауффер Дж. Ф. Мапометрические методы изучения тканевого обмена. ИЛ, М., 1951.

11. Шмидт Г. А. Эмбриология животных. Ч. II, М., 1953.
12. Vacila M., Campello A., Vianne C., Vos's D. J. Neurochem., 11, 231, 1964.
13. Balazs R., Biesold D., Magyaor K. J. Neurochem., 10, 685, 1963.
14. Brody T. M., Bain J. A. J. Biol. Chem., 195, 685, 1952.
15. Lovtrup S. J. Neurochem., 8, 243, 245, 1961.
16. Lovtrup S. Brain mitochondria. „Growth and maturation of the brain“. Amsterdam (London), N. Y., 237, 1964.
17. Lowry O. H., Lopez J. A. J. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.
19. Mandel P., Borkowski T., Harth S., Mardell R. J. Neurochem., 8, 126, 1961.
20. Mc Khann G. M., Tower D. B. Am. J. Physiol., 196, 36, 1959.
21. Mc Khann G. M., Albers R. W., Sokoloff L., Micklesen D., Tower D. B. In: Inhibition in the nervous system and γ -Aminobutyric acid, ed. Roberts E., Pergamon Press, N. Y., 169, 1960.
22. Mc Khann G. M., Tower D. B. J. Neurochem., 7, 26, 1961.
23. Pressman B. C., Lardy H. A. J. Biol. Chem., 197, 547, 1952.
24. Pressman B. C., Lardy H. A. Biochim. et Biophys. acta, 18, 482, 1955.
25. Potter V. R., Elvehjem C. A. J. Biol. Chem, 114, 2, 495, 1936.
26. Sacktor B., Packer L. J. Neurochem., 9, 371, 1962.
27. Tsukada Y., Hurano S., Nagata Y., Matsutani T. In: Inhibition, in the nervous system and γ -Aminobutyric acid, ed Roberts E., Pergamoun Press, N. Y., 163, 1960.
28. Wattenberg W., Leong J. Histochem. Cytochem., 8, 296, 1960.