

Г. Х. БУНЯТЯН, Г. Т. АДУИЦ, Р. Р. НЕРСЕСЯН

ТРАНСАМИНИРОВАНИЕ γ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ БЕЛЫХ КРЫС В ОНТОГЕНЕЗЕ

Полученные данные свидетельствуют о наличии ГАМК- α -кетоглутарат, ГАМК-оксалоацетат и ГАМК-пируват трансминаз в головном мозгу крыс. У новорожденных крыс наиболее активна ГАМК-оксалоацетат трансминаза, и ее активность сохраняется на высоком уровне до 60-дневного возраста. Активность ГАМК- α -кетоглутарат трансминазы невысокая и значительно повышается с возрастом. ГАМК-пируват трансминаза проявляет сравнительно низкую активность у новорожденных крыс, она значительно возрастает у 30-дневных. Содержание глутамата и аспартата в мозгу повышается с возрастом, а аланина—не претерпевает изменений. Начиная с 15-дневного возраста в присутствии добавленного ГАМК+пируват+пиридоксальфосфата наблюдается более значительное образование глутамата по сравнению с аланином.

В метаболизме γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) как в мозговой, так и в других тканях существенную роль играет ее трансаминирование с α -кетоглутаровой кислотой (КГК) под действием 4-аминобутират-2-оксиглутарат-аминотрансферазы, которая локализована в митохондриях и растворимой фракции [13, 25]. Исследованиями ряда авторов показано, что ГАМК может входить в реакцию трансаминирования и с щавелевоуксусной кислотой (ЩУК) [6, 12, 20, 21]. Диксон и Фауден [11], Кретович [6, 7] показали возможность трансаминирования ГАМК с пировиноградной кислотой (ПВК) и глиоксиловой кислотой в растениях. Об активности ГАМК и ПВК-трансминазы в мозговой ткани свидетельствуют также исследования Деминга и других [3], показавших значительное повышение содержания аланина в присутствии глюкозы и ГАМК.

Метаболизм ГАМК в постнатальном периоде развития в мозговой ткани изучен недостаточно, в связи с этим представляло интерес изучить динамику трансаминирования ее с КГК, а также с ПВК и ЩУК при онтогенетическом развитии организма.

Материал и методика. Исследования проводили на гомогенатах мозговой ткани 1-, 15-, 30-, 60-дневных белых крыс. Инкубационная смесь состояла из 0,5 мл гомогената (100—150 мг свежей ткани), 1 мл боратного буфера (рН 8,2), 0,1 мл (150 мкг) пиридоксальфосфата (ПФ). В качестве субстрата были использованы КГК, ЩУК, пируват в количестве 40 мкмоль, и ГАМК—20 мкмоль (0,1 мл). Инкубацию проводили в аппарате Варбурга при 38° в течение 1 часа. Об активности фермента судили по количеству образовавшейся глутаминовой, аспарагиновой кислот (ГК и АК) и аланина, которые определяли хроматографическим методом Боде в модификации Зайцевой и Тюленевой [4]. Калибровочные кривые строили для каждой изучаемой аминокислоты.

Результаты и обсуждение. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в мозгу новорожденных крыс имеет место довольно интенсивное трансаминирование ГАМК с некоторыми кетокислотами. Интересно отметить, что у новорожденных крыс активность трансаминазы ГАМК-КГК невысокая (табл. 1). С развитием животного, вплоть до двухмесячного возраста, она резко повышается. Так, например, в мозгу двухнедельных крыс, по сравнению с однодневными, она выше примерно в 4 раза, у 30-дневных крыс в 7, а у 60-дневных в 10 раз. Следует отметить, что в опытах с ГАМК + КГК образуется значительное количество АК. Очевидно, в этих условиях часть ГК переходит в АК, что должно быть также учтено при определении активности ГАМК-КГК трансаминазы.

Обращает на себя внимание тот факт, что с развитием животного содержание ГК в мозгу значительно повышается и с 4,8 мкмоль/г у новорожденных доходит до 10,4 мкмоль/г у 60-дневных крыс (табл. 1). При инкубировании гомогенатов мозга в боратном буфере (рН 8,2) у новорожденных крыс содержание эндогенной ГК несколько повышается, у 15-, 30- и 60-дневных крыс, наоборот, заметно понижается, причем утилизация ее с возрастом усиливается. Однако, как видно из приведенных данных (табл. 2), у новорожденных и 15-дневных крыс при инкубировании гомогенатов мозга уровень АК почти не изменяется. Подобное явление отмечается и у 30- и 60-дневных крыс. По-видимому, в условиях нашего эксперимента не происходит новообразования АК из эндогенной ГК. Содержание АК в мозгу также повышается с возрастом, но в меньшей степени, чем уровень ГК.

Таблица 1

Активность ГАМК-г-КГК трансаминазы в мозгу крыс в ходе постнатального развития, мкмоль глутамата/г влажной ткани

Условия опыта	Возраст, дни			
	1	15	30	60
Фиксированный контроль	4,8	7,2	8,8	10,4
Инкубированный контроль	5,4 \pm 0,45	6,0 \pm 0,45	6,6 \pm 0,84	6,5 \pm 0,36
ГАМК-КГГ-ПФ	6,2 \pm 0,49	9,1 \pm 0,7	11,7 \pm 1,2	14,4 \pm 1,22
Активность трансаминазы	0,8	3,1	5,1	7,9

Трансаминирование ГАМК с ЩУК в мозгу новорожденных крыс протекает более интенсивно (табл. 2), составляя 6,4 мкмоль/г АК. К 15-дневному возрасту активность фермента несколько снижается, а затем вновь медленно возрастает и у 2-месячных животных приближается к уровню, характерному для мозга новорожденных. Следует отметить, что в мозгу животных наиболее активна реакция трансаминирования между ГК и ЩУК [9], которая играет важную роль в превращении ГК в АК. Образовавшийся при этом КГК окисляется в ЩУК, которая, трансаминируясь с ГК, вновь переходит в АК.

Таблица 2

Активность ГАМК-ЩУК трансаминазы в мозгу крыс в ходе постнатального развития, мкмоль аспартата/г влажной ткани

Условия опыта	Возраст, дни			
	1	15	30	60
Фиксированный контроль	3,6	4,18	5,0	5,2
Инкубированный контроль	$3,4 \pm 0,51$	$3,8 \pm 0,44$	$4,6 \pm 0,27$	$5,0 \pm 0,31$
ГАМК-ЩУК-ПФ	$9,8 \pm 1,0$	$8,9 \pm 1,66$	$10,2 \pm 1,3$	$11,2 \pm 0,45$
Активность трансаминазы	$\bar{6,4}$	5,1	5,6	$\bar{6,2}$

В головном мозгу белых крыс ГАМК входит в реакцию трансаминирования и с ПВК (табл. 3). ГАМК—ПВК трансаминаза в мозговой ткани новорожденных крыс, если судить по приросту аланина, почти в 3 раза активнее, чем ГАМК- α -КГК трансаминаза, и в 3 раза менее активна, чем ГАМК-ЩУК трансаминаза. Активность ГАМК-ПВК трансаминазы в мозгу постепенно возрастает, достигая максимума у 30-дневных крыс, затем к 2-месячному возрасту она снижается. Интересно отметить, что уровень аланина в мозговой ткани не претерпевает изменений с возрастом. Относительную стабильность его в мозгу крыс отмечали и другие авторы [15, 22].

Таблица 3

Активность ГАМК-ПВК трансаминазы в мозгу крыс в ходе постнатального развития, мкмоль аланина/г влажной ткани

Условия опыта	Возраст, дни			
	1	15	30	60
Фиксированный контроль	1,1	1,5	1,43	1,4
Инкубированный контроль	$2,2 \pm 0,68$	$1,7 \pm 0,85$	$1,9 \pm 0,27$	$0,7 \pm 0,26$
ГАМК-ПВК-ПФ	$4,5 \pm 0,55$	$6,3 \pm 1,43$	$9,0 \pm 0,41$	$6,1 \pm 0,69$
Активность трансаминазы	2,3	4,6	7,4	4,4

Следует отметить, что в течение первых двух месяцев постнатальной жизни из исследованных трансаминаз линейно повышается только активность ГАМК-КГК трансаминазы. По литературным данным, в мозгу мышечной в процессе развития активность трансаминазы АК-КГК, аланина-КГК трансаминаз также возрастает [19]. Авенирова и др. [1] наблюдали резкое возрастание активности ГАМК-КГК трансаминазы к 30-му дню постнатальной жизни, что соответствует периоду завершения развития нейронной и возникновению дендритной сети.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о существовании различных ГАМК трансаминаз в мозгу, об их различной активности в процессе постнатального развития животного. Образование АК в присутствии ГАМК и ЩУК, аланина при добавлении ГАМК и ПВК, по-видимому, происходит и путем прямого переаминирования между ГАМК и

указанными кетокислотами. О формировании АК и аланина не из предварительно образованной ГК свидетельствует тот факт, что в раннем онтогенезе переаминирование между ГАМК и ЩУК, ГАМК и ПВК в мозговой ткани протекает более интенсивно, чем между ГАМК и КГК, даже с учетом образования АК и аланина в опытах с ГАМК+КГК. По данным Коэна и сотр. [9], переаминирование между АК и ПВК в мозгу протекает более интенсивно, чем между ГК и ПВК. Не исключена возможность, что некоторая часть образовавшейся ГК переходит в глутамин, однако, как указывалось выше, при инкубировании без добавок гомогенатов мозга новорожденных крыс содержание ГК даже несколько повышается (табл. 1), а у 15-дневных снижается в незначительной степени.

В связи с трансаминированием между ГАМК и указанными кетокислотами представляло интерес изучить сдвиги ГК, АК и аланина в ходе онтогенеза в присутствии ГАМК и соответствующих кетокислот. В инкубированном контроле мозга (табл. 4) новорожденных крыс ГК составляет 5,4 мкмоль/г ткани. В присутствии добавленной ГАМК уровень ГК, АК и аланина особым изменениям не подвергается. В опытах с ГАМК+КГК+ПФ отмечается лишь незначительный прирост ГК, но при этом возрастает содержание АК (2,9 мкмоль/г). По всей вероятности, значительная часть образовавшейся ГК переходит в АК. Учитывая прирост АК, можно заключить, что активность ГАМК-КГК трансаминазы составляет не 0,8 мкмоль ГК/г, а 2,9, т. е. 3,7 мкмоль ГК/г. Как отмечалось выше, при инкубировании гомогенатов мозга новорожденных крыс образование АК из эндотениой ГК не происходило, очевидно, причиной этого явился недостаток ПФ. По литературным данным, концентрация витамина B₆ в мозгу с развитием возрастает [18]. В исследованиях Де Марко [10] показано, что даже в мозгу взрослых животных уровень его значительно меньше того количества, которое необходимо для проявления максимальной активности фермента.

При добавлении ГАМК+ЩУК+ПФ содержание ГК заметно снижается, аланина—не изменяется, а АК—сильно возрастает. В присутствии добавленных ГАМК+ПВК+ПФ уровень ГК и АК особым изменениям не подвергается, значительно возрастает содержание аланина.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у новорожденных наиболее активна ГАМК-ЩУК трансаминаза, ГАМК-ПВК и ГАМК-КГК трансаминазы менее активны.

Данные, приведенные в табл. 4, показывают, что и у 15-дневных крыс ГАМК сама по себе также не оказывает существенного влияния на уровень ГК, АК и аланина. При комбинации ГАМК+КГК+ПФ уровень ГК нарастает в большей степени, чем у новорожденных, наряду с этим, кроме АК, значительно возрастает и содержание аланина. Очевидно, значительная часть образовавшейся ГК утилизируется для формирования не только АК, но и аланина. Полученные данные свидетельствуют о значительном активировании ферментных систем синтеза аланина у 15-дневных крыс. В этом возрасте в присутствии добавленных ГАМК+

Таблица 4

Содержание свободных аминокислот в гомогенатах мозга крыс разного возраста при различных условиях инкубации, мкмоль/г влажной ткани

Условия опыта	ГК	Аланин	АК
Новорожденные			
Контроль	5,4 \pm 0,25	2,2 \pm 0,68	3,4 \pm 0,51
ГАМК	5,82 \pm 1,3	2,6 \pm 0,41	3,7 \pm 0,4
ГАМК-КГК-ПФ	6,2 \pm 0,49	1,9 \pm 0,26	6,3 \pm 1,24
ГАМК-ЩУК-ПФ	4,3 \pm 0,45	2,1 \pm 0,34	9,8 \pm 1,0
ГАМК-ПВК-ПФ	5,5 \pm 0,44	4,5 \pm 0,55	3,8 \pm 0,69
15-дневные			
Контроль	6,0 \pm 0,48	1,7 \pm 0,85	3,8 \pm 0,44
ГАМК	6,8 \pm 0,37	1,7 \pm 0,26	4,4 \pm 0,20
ГАМК-КГК-ПФ	9,1 \pm 0,7	6,4 \pm 0,31	5,7 \pm 0,32
ГАМК-ЩУК-ПФ	4,1 \pm 0,21	1,6 \pm 0,20	8,9 \pm 1,66
ГАМК-ПВК-ПФ	12,2 \pm 0,2	6,3 \pm 1,43	2,0 \pm 0,26
30-дневные			
Контроль	6,6 \pm 0,84	1,9 \pm 0,27	4,6 \pm 0,27
ГАМК	7,5 \pm 0,8	0,8 \pm 0,45	4,8 \pm 0,86
ГАМК-КГК-ПФ	11,7 \pm 1,2	0,7 \pm 0,68	5,8 \pm 0,68
ГАМК-ЩУК-ПФ	7,5 \pm 0,56	2,4 \pm 0,88	10,2 \pm 0,88
ГАМК-ПВК-ПФ	21,9 \pm 0,69	9,0 \pm 0,41	3,0 \pm 0,87
60-дневные			
Контроль	6,5 \pm 0,36	0,7 \pm 0,26	5,0 \pm 0,31
ГАМК	7,2 \pm 0,51	0,86 \pm 0,37	6,9 \pm 0,41
ГАМК-КГК-ПФ	14,4 \pm 1,22	1,54 \pm 0,18	4,66 \pm 0,28
ГАМК-ЩУК-ПФ	6,12 \pm 0,68	4,0 \pm 0,24	11,2 \pm 0,45
ГАМК-ПВК-ПФ	17,4 \pm 0,44	6,1 \pm 0,69	7,6 \pm 0,13

ЩУК+ПФ содержание ГК, аланина и АК претерпевает те же сдвиги, что и у однодневных крыс.

Иная картина наблюдается при комбинации ГАМК+ПВК+ПФ (табл. 4): уровень ГК повышается в большей степени, чем при наличии ГАМК-КГК, а количество аланина нарастает, как и в опытах с ГАМК+КГК+ПФ, на 4,6 мкмоль/г. С этого возраста отмечается активирование процессов, обуславливающих образование ГК.

Первый месяц постнатальной жизни является важным этапом в развитии головного мозга, в этот период происходят важные морфо-физиологические изменения [16, 17, 24] и биохимические сдвиги, в частности в азотистом обмене: увеличивается содержание ряда аминокислот (АК, ГК, ГАМК), а также активируются ферментативные системы, участвующие в их превращениях [2, 8, 14, 23]. Содержание ГК в мозгу в этом возрасте составляет 8,8 мкмоль/г (табл. 1). При инкубации гомогенатов мозга (инкубированный контроль) при рН 8,2 у одномесячных животных количество ГК понижается до 6,6 мкмоль/г ткани (табл. 4), понижается и уровень аланина, а АК почти не изменяется.

В присутствии добавленной ГАМК содержание ГК несколько повышается, значительно снижается уровень аланина, а АК не претерпевает изменений. Полученные результаты свидетельствуют об активировании процессов утилизации аланина в этом возрасте. При комбинации ГАМК + КГК + ПФ уровень ГК повышается в большей степени, чем у однодневных и 15-дневных крыс. Отмечается примерно такой же прирост АК, однако содержание аланина, в отличие от 15-дневных крыс, значительно снижается.

Полученные данные позволяют заключить, что в этом возрасте, наряду с повышением активности ГАМК-КГК трансминазы, с КГК вступает в трансминирование также аланин. У 30-дневных крыс в присутствии добавленных ГАМК + ЩУК + ПФ, как и следовало ожидать, происходит значительное образование АК, содержание аланина, как и у других возрастных групп, заметным изменениям не подвергается. Обращают на себя внимание результаты исследований при комбинации ГАМК + ПВК + ПФ. В этом случае (табл. 4) отмечается весьма значительное образование ГК, уровень которой повышается в большей степени, чем в опытах с ГАМК + КГК. Подобное явление, хотя и в менее выраженной степени, наблюдалось у 15-дневных крыс. Очевидно, в этом возрасте особенно активируется аланин-КГК трансминаза, и аланин, образующийся в результате трансминирования ПВК, служит источником для формирования ГК. Необходимый для этой реакции КГК может образоваться за счет добавленного пирувата. В этих опытах значительное повышение уровня аланина может быть обусловлено не только активностью ГАМК-ПВК, но и ГК-ПВК трансминазы.

У 60-дневных крыс (табл. 4) при инкубировании гомогенатов мозговой ткани содержание ГК и аланина заметно понижается, по сравнению с фиксированным контролем (табл. 1), уровень АК не изменяется. Более заметная утилизация ГК и аланина в мозговой ткани с возрастом отмечалась и другими авторами. В присутствии добавленной ГАМК уровень ГК и аланина не изменяется, АК несколько возрастает. В этой серии опытов с ГАМК + КГК + ПФ отмечался наиболее высокий уровень ГК, но содержание аланина, и особенно АК, существенным изменениям не подвергалось. Полученные данные свидетельствуют о том, что в этом возрасте интенсивность перехода ГК в АК подавляется.

При комбинации ГАМК + КГК + ПФ отмечается та же закономерность, что и в гомогенатах мозга 30-дневных крыс (табл. 4), только у 60-дневных аланин образуется в большом количестве. В этом возрасте в присутствии добавленных ГАМК + ПВК + ПФ также отмечается более высокий уровень ГК, по сравнению с аланином и АК; образование последней происходит в незначительной степени, по сравнению с одной ГАМК.

Հ. Խ. ԲՈՒՆՅԱԹՅԱՆ, Գ. Թ. ԱԳՈՒՆՑ, Ռ. Ռ. ՆԵՐՍԻՍՅԱՆ

γ -ԱՄԻՆԱԿԱՐԱԳԱԹԹՎԻ ՏՐԱՆՍԱՄԻՆԱՑՈՒՄԸ ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՈՒՂԵՂՈՒՄ ՕՆՏՈՓԵՆՆԵՋԻ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրությունները ցույց են տալիս, որ սպիտակ առնետների ուղեղում գոյություն ունեն γ -ԱԿԿԹ- α -կետոգլուտարատ, γ -ԱԿԿԹ-օքսալաացետատ, և γ -ԱԿԿԹ-պիրուվատ տրանսամինազներ:

Նորածին առնետների ուղեղում բարձր ակտիվություն ունի γ -ԱԿԿԹ-օքսալաացետատ տրանսամինազան, որը այդ մակարդակի վրա պահպանվում է մինչև 60 օրական հասակը:

γ -ԱԿԿԹ- α -կետոգլուտարաթթու տրանսամինազան նորածին առնետների ուղեղում ցուցարերում է ցածր ակտիվություն, որը հասակին զուգահեռ աստիճանաբար բարձրանում է:

Համեմատաբար ցածր ակտիվություն է նկատվում γ -ԱԿԿԹ-պիրուվատ տրանսամինազայի նկատմամբ, որը զգալիորեն բարձրանում է 30 օրական առնետների ուղեղում:

Ուղեղում հասակին զուգահեռ ավելանում է գլուտամատի և ասպարտատի քանակը, իսկ ալանինի քանակը փոփոխություն չի կրում:

Ուղեղում, սկսած 15 օրական հասակից, γ -ԱԿԿԹ-ի և պիրուվատի ներկայությամբ ավելի շատ գլուտամատ է առաջանում, քան ալանին:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Авенирова Е. Л., Богданова Е. В., Сытинский И. А. и Томякчева М. Г. Биохимия. 2, 493, 1966.
2. Бунятян Г. Х., Симонян А. А. Вопросы биохимии мозга. Ереван, 1, 17, 1961.
3. Демин Ю. М., Мусаелян С. С., Карапетян В. С., Осипова Э. Н. и Акопян Д. А. Вопросы биохимии мозга. Ереван, 1, 45, 1964.
4. Зайцева Г. И. и Тюленева Н. П. Лабораторное дело, 3, 24, 1958.
5. Кометиани П. А., Тез. докл. конф. по обмену аминокислот, Тбилиси, 1965.
6. Кретович В. Л., Каспарек М. Физиология растений, 8, 663, 1961.
7. Кретович В. Л., Моргунов Е. А., Карякина К. И., Любимова Н. В. ДАН СССР, 161, 2, 1965.
8. Berl S. Biochemistry, 5, 1966.
9. Cohen P. P., Nekhuls G. L. J. Biol. Chem. 140, 711, 1941.
10. De Marco C. Biochim. Biophys. Acta 25, 634, 1957.
11. Dixon R., Fowden L. Ann. Bot. N. S. 25, 513, 1961.
12. Kamrin R. P. and Kamrin A. A. J. Neurochem, 6, 219, 1961.
13. Kempen M. J. Vanden Berg C. J., Van der Veldesra H. J. Neurochem., 12, 581, 1965.
14. McMurray W. C., Bayer S. M. Internat. Neurochem. Conf. Preliminary, abstracts, Oxford. 72, 1965.
15. Oja S. S. Ann. Acad. Sci. Fenn. Ser. A. V. Medica, 125, 1, 1966.
16. Purpura D. P., Shofer R. J., Houseplan E. M., Noback C. R. In Progress In. Brain Research, Growth and Maturation of the Brain 2Ed by Purpura D. P. and Schade. J. P. V. 4 Elsevier Amsterdam, p. 187, 1964.
17. Rudnick D., Waelsch H. J. Exp. Zool. 129, 1955.
18. Sedlak J., Tursky T. Biologia, 1253, 210, 1957.

19. *Steward F. C., Thompson J. F., Dent C. E.* Science 110, 439, 1949.
20. *Tsukada I., Nagata I., Takagaki G.* Metabolism of γ -aminobutyric acid in brain slices. Proc. Japan Acad. 39, 510, 1957.
21. *Tursky T.* Biologia, 12, 118, 1957.
22. *Vernadakis A. A., Woodbury D. M.* Amer. J. Physiol., 203, 448, 1962.
23. *Voeller K., Pappas G. D., Purpura D. P.* Exp. Neurolog., 7, 107, 1963.
24. *Walsh H., Sperry W. M., Stoyanoff V. A.* J. Biol. Chem., 140, 888, 1941.
25. *Waksman A., Rubinstein M. K., Kurlyama K., Roberts E. J.* Neurochem. 15, 4, 350, 1968.