

УДК 612.8.015:612.84:577.95:577.158.4

ОСОБЕННОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФОРМ ГАМК-ТРАНСАМИНАЗЫ ЗРИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗАТОРА СОБАК В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

АГАЕВ Т. М., ПИГАРЕВА З. Д.

Установлено, что во фракциях митохондрий отдельных образований зрительного анализатора мозга собак в постнатальном онтогенезе как активность ГАМК-транс-аминазы (ГАМК-Т-азы), так и интенсивность образования продуктов ее реакции—глутаминатах исследуемых тканей к 45-дневному возрасту не регистрируется такое снижение активности ГАМК-Т-азы, как во фракции митохондрий. Напротив, в ткани переднего двухолмия (ПД) и наружных колленчатых тел (НКТ) она даже возрастает. К 90-му дню активность ГАМК-Т-азы во фракции митохондрий ПД увеличивается, тогда как в ткани уменьшается, отсюда следует, что перестройки ГАМК-Т-азы во фракции митохондрий более значительны, чем на уровне всей ткани. Интенсивность образования ГК в митохондриях структур зрительного анализатора неодинакова на отдельных этапах постнатального развития в каждом из его образований, тогда как уровень АК в периоде прозревания практически одинаков.

В тканях и митохондриях структур зрительной системы при световой депривации отмечается достоверное уменьшение удельной активности ГАМК-Т-азы, которое наиболее ярко выражено в НКТ. Все три образования зрительного анализатора в этот период почти в равной мере отличаются по этому показателю от контроля. Интенсивность образования ГК и АК в ГАМК-Т-азной реакции, как правило, достоверно меньше, чем в митохондриях контрольных животных.

Ранее были опубликованы данные, свидетельствующие о том, что онтогенетическое формирование ферментной системы ГАМК-Т-азы (4-аминобутират-2-оксиглутарат аминотрансфераза, КФ 2.6.1.19) в ткани функционально сопряженных с этим анализатором двигательной и теменной областях коры мозга находится под контролем световых импульсов и существенно изменяется при развитии животного в темноте [1, 2].

Из литературы известно наличие в мозгу нескольких форм ГАМК-Т-азы. В митохондриях сосредоточены в основном катионные формы фермента; его анионные формы локализованы вне митохондрий [3]. Учитывая эти данные и исходя из результатов проведенных ранее исследований, в работе была поставлена задача изучить возрастную динамику активности ГАМК-Т-азы во фракциях митохондрий отдельных образований зрительного анализатора мозга собак, развивающихся в

обычных условиях светового режима, а также в условиях световой депривации, и сопоставить результаты с ранее полученными в отношении возрастной динамики активности ГАМК-Т-азы в ткани этих же образований зрительного анализатора. Таким образом, предполагалось выявить роль отдельных форм ГАМК-Т-азы в становлении биохимических процессов, обеспечивающих осуществление функции зрения.

Материалы и методы

Применялся онтогенетический метод исследования, позволяющий проследить закономерности изменений активности ГАМК-Т-азы на отдельных этапах созревания зрительной системы в постнатальном онтогенезе. Опыты проведены на собаках в возрасте 12—16 (прозревание), 21, 45 и 90 дней. Часть животных содержалась с момента рождения до 3-месячного возраста в специальных темновых камерах [1].

Фракции митохондрий выделялись из ткани зрительной коры (поле 17), ПД и НКТ. При этом использовали метод дифференциального центрифугирования в 0,32 М сахарозе [4].

В выделенных фракциях митохондрий определяли активность ГАМК-Т-азы по методу, описанному Ниловой [5]. Инкубационная смесь состояла из 0,5 мл 0,005 М α -кетоглутаровой кислоты, 0,5 мл 0,05 М ГАМК и митохондрий. Инкубация длилась 30 мин в атмосфере азота. Количество ГК и формирующейся при этом АК определяли, используя высоковольтный электрофорез [6].

Активность ГАМК-Т-азы выражали в мкмоль ГК, образующейся в митохондриях, выделенных из 1 г свежей ткани за 1 ч.

В процессе течения ГАМК-Т-азной реакции из образующейся ГК формируется АК, что имеет место и в условиях используемой инкубационной среды [7, 8], поэтому в каждом опыте определяли интенсивность образования ГК и АК в ГАМК-Т-азной реакции. Результаты их выражали в мкмоль соответствующей аминокислоты, образующейся в течение 30 мин в митохондриях, выделенных из 1 г свежей ткани. Содержание белка во всех случаях определяли по методу Lowry и соавт. [9].

Результаты и обсуждение

Эксперименты показали, что в норме активность ГАМК-Т-азы (табл. 1) в митохондриальных фракциях отдельных образований анализатора неодинакова и имеет своеобразную возрастную динамику.

Удельная активность ГАМК-Т-азы в митохондриях в процессе постнатального онтогенеза меняется. В период созревания уровень активности фермента наименьший в митохондриях ПД. После 21-го дня к 45-му активность резко уменьшалась в митохондриях всех исследуемых структур. К 3-месячному возрасту активность фермента в митохондриях зрительной коры (поле 17) уменьшалась и увеличивалась в митохондриях ПД, оставаясь неизменной в митохондриях НКТ.

Таким образом, в митохондриях изучавшихся образований зрительного анализатора формирование ГАМК-Т-азной активности в постнатальном онтогенезе происходит в определенном соответствии с накоплением фондов соответствующих белков.

Сопоставление приведенных данных с результатами, зарегистрированными на тканевом уровне (табл. 1), позволяет отметить определенные отличия в возрастной динамике тканевого и митохондриального фондов ГАМК-Т-азы.

Таблица 1
Удельная активность ГАМК-Т-азы во фракциях митохондрий структур зрительного анализатора мозга собаки в постнатальном онтогенезе (в мкмоль ГК /мг белка/ч, n = 5—10).

Возраст животных в днях	Зрительная кора (поле 17)		ПД		НКТ	
	митохондри	ткань	митохондри	ткань	митохондри	ткань
12—16	12,4±0,9	5,26±0,25	10,7±0,6	4,35±0,15	14,70±0,96	4,71±0,21
21	15,40±0,95	3,84±0,17	10,40±0,75	2,85±0,12	14,9±1,0	4,63±0,19
p	<0,05	<0,001	>0,5	<0,001	>0,5	>0,5
45	3,80±0,45	4,81±0,25	2,70±0,25	6,50±0,27	5,00±0,40	5,43±0,18
p	<0,001	>0,1	<0,0,01	<0,001	<0,001	<0,01
90	2,55±0,20	3,43±0,22	3,60±0,40	4,33±0,10	5,20±0,28	4,57±0,25
p	<0,001	<0,001	<0,001	>0,5	<0,001	>0,5

Примечание. p—достоверность различий по сравнению с данными для группы 12—16-дневных животных

Так, в период с 12—16 и 21-го дней на фоне некоторого увеличения удельной активности фермента в митохондриях зрительной коры и стабильности ее в митохондриях ПД и НКТ в ткани зрительной коры и ПД она резко снижалась, но не изменялась в ткани НКТ. К 45-дневному возрасту, в период значительного уменьшения удельной активности в митохондриях всех структур, в ткани этих структур она нарастала. К 90-суточному возрасту активность в ткани всех структур уменьшалась. Этому соответствовало снижение удельной активности только в митохондриях зрительной коры, в митохондриях ПД активность увеличивалась и оставалась неизменной в митохондриях НКТ.

Приведенные данные позволяют полагать, что в период 45—90 дней постнатального онтогенеза в изучавшихся структурах мозга собак формируются митохондрии, отличающиеся меньшей активностью ГАМК-Т-азы, чем на более ранних этапах развития (12—16 и 21-й дни). В то же время в ткани поддерживается относительно стабильный и высокий уровень активности ГАМК-Т-азы, видимо, в большей мере за счет немитохондриальных форм фермента.

В табл. 2 обобщены результаты определения интенсивности образования ГК и сопутствующего формирования АК в ходе ГАМК-Т-азной реакции в изучавшихся митохондриях. Эти данные сопоставлены с результатами, полученными на тканевом уровне.

Интенсивность образования ГК в митохондриях структур зритель-

ного анализатора на отдельных этапах постнатального онтогенеза неодинакова. Она наибольшая в митохондриях зрительной коры в 45-дневном возрасте, а в митохондриях ПД и НКТ—в возрасте 12—16 дней, у 3-месячных собак образование ГК во всех митохондриях происходило менее интенсивно, чем на более ранних этапах развития; причем оно было выше в митохондриях НКТ, меньше и практически одинаково в митохондриях зрительной коры и ПД.

Таблица 2

Интенсивность образования ГК и АК в ГАМК-Т-азной реакции во фракциях митохондрий структур зрительного анализатора мозга собак в постнатальном онтогенезе (в мкмоль ГК и АК на массу митохондрий, выделенных из 1 г свежей ткани за 30 мин инкубации; n = 5—10)

Возраст животных в днях	Зрительная кора (поле 17)		ПД		НКТ	
	митохондрии	ткань*	митохондрии	ткань*	митохондрии	ткань*
ГК						
12—16	1,21±0,01	1,27±0,02	1,15±0,02	1,29±0,05	1,45±0,03	1,84±0,06
21	1,47±0,04	1,86±0,04	0,92±0,01	0,97±0,04	1,24±0,08	2,44±0,07
p	<0,02	<0,01	<0,001	<0,01	<0,05	<0,001
45	1,65±0,05	2,27±0,08	0,96±0,03	2,00±0,09	0,81±0,01	2,40±0,12
p	-0,01	<0,001	<0,01	<0,01	<0,01	<0,001
90	0,73±0,04	2,20±0,14	0,77±0,04	2,30±0,13	0,90±0,05	2,32±0,08
p	<0,01	<0,01	<0,001	<0,01	<0,01	<0,05
АК						
12—16	0,28±0,02	0,37±0,02	0,30±0,01	0,37±0,02	0,32±0,01	0,28±0,01
21	0,23±0,01	0,62±0,05	0,25±0,01	0,41±0,05	0,290±0,004	0,60±0,05
p	<0,05	<0,01	>0,5	>0,5	<0,05	<0,01
45	0,45±0,01	0,65±0,07	0,43±0,03	0,77±0,39	0,37±0,01	0,86±0,03
p	<0,01	<0,01	>0,5	<0,01	<0,05	<0,01
90	0,33±0,08	0,98±0,09	0,23±0,04	0,92±0,06	0,31±0,01	0,88±0,05
p	>0,1	<0,01	>0,1	<0,001	>0,5	<0,001

Примечание. p—достоверность различий по сравнению с данными для группы 12—16-дневных щенков; * расчет произведен в мкмоль ГК и АК /г ткани/ мин инкубации

Образование АК в 12—21-дневном возрасте практически было одинаково во всех митохондриях. Оно нарастало к 45-дневному возрасту и несколько снижалось к 3-м месяцам, особенно в митохондриях ПД.

Характер ГАМК-Т-азной реакции (по показателю интенсивности образования ГК) в митохондриях изучавшихся структур анализатора несколько отличался от такового в ткани. В ткани зрительной коры при сходстве возрастной динамики этого процесса не наблюдалось столь резкого падения его активности к 90-му дню, как в митохондриях. В ткани ПД в период 45—90 дней и в ткани НКТ с 21-го дня регистрировалось резкое повышение образования ГК с сохранением довольно стабильного уровня.

Формирование АК из ГК в процессе ГАМК-Т-азной реакции в ткани зрительной коры увеличивалось с 21-го дня, поддерживалось ста-

бильным в возрасте 45 дней и вновь парастало к 90-му дню. В ПД резкое нарастание образования АК отмечалось с 45 до 90 дней. В НКТ «выход» АК увеличился с 21- до 45-го дня.

Расчеты показывают (табл. 3), что соотношения между величинами интенсивности образования ГК и АК в ГАМК-Т-азной реакции в процессе развития меняются с характерными для каждого типа митохондрий особенностями.

В период от 12—16 до 21 дня величины этих соотношений в митохондриях зрительной коры и ПД численно выше, чем в ткани этих же образований анализатора.

Таблица 3
Соотношение между интенсивностью образования ГК и АК в ГАМК-Т-азной реакции в тканях и митохондриальных фракциях структур зрительного анализатора мозга собак в постнатальном онтогенезе

Возраст животных в днях	Структуры анализатора					
	Зрительная кора (поле 17)		ПД		НКТ	
	митохондри	ткань	митохондри	ткань	митохондри	ткань
12—16	4,32	3,43	3,83	3,49	4,53	6,57
21	6,39	3,00	3,68	2,35	4,28	4,66
45	3,67	3,50	2,23	2,60	2,19	2,80
90	2,21	2,29	3,34	2,37	2,90	2,63

В то же время в митохондриях НКТ, напротив, соответствующие параметры несколько значительнее в ткани. В период 45 и 90 дней эти величины сравнимы в митохондриях ткани зрительной коры и НКТ, но остаются более высокими в митохондриях ПД.

В условиях световой депривации (возраст 90 дней) активность ГАМК-Т-азы во фракциях митохондрий изучавшихся структур мозга была ниже, чем в норме (табл. 4), и составляла в зрительной коре (поле 17), ПД и НКТ соответственно 63, 81 и 30% от контроля, в большей мере изменяясь в НКТ. Снижение активности ГАМК-Т-азы в этих условиях в митохондриях в зрительной коре и особенно ПД было выражено слабее, чем в ткани. Однако в митохондриях НКТ оно было значительнее (соответственно в митохондриях—70%, в ткани—56%).

При световой депривации отмечается снижение интенсивности образования ГК и АК в ГАМК-Т-азной реакции во фракциях митохондрий всех изучавшихся образований зрительного анализатора (табл. 4). В митохондриях зрительной коры (поле 17), ПД и НКТ оно составляло по ГК 27, 30 и 24% от контроля. Снижение интенсивности образования ГК в митохондриях зрительной коры (поле 17) и НКТ выражено в большей мере, чем в ткани этих структур. В ПД отмечается практически одинаковая картина как на ткани, так и в митохондриях.

В отношении образования АК в ГАМК-Т-азной реакции имеются особенности. Интенсивность его в митохондриях зрительной коры (по-

ле 17) и НКТ уменьшалась менее значительно, чем в ткани (на 37% и 45% по сравнению с контролем), а в ткани соответственно на 59 и 64%. В ПД на фоне стабильности в митохондриях в ткани «выход» АК резко тормозился (71% по сравнению с контролем). В условиях световой депривации меняются соотношения между величинами интенсивности образования ГК и АК. Эти изменения в основном касаются митондрий.

Таблица 4

Активность ГАМК-Т-азы и образование ГК и АК в ГАМК-Т-азной реакции в тканях и фракциях митохондрий структур зрительного анализатора мозга собак в возрасте 90 дней в норме и в условиях световой депривации (n=6-10)

Условия опыта	Зрительная кора (поле 17)		ПД		НКТ	
	митохондри	ткань	митохондри	ткань	митохондри	ткань
Активность ГАМК-Т-азы						
Норма	106,0±6,2	346,0±11,6	148,0±10,5	421,0±9,6	209,0±22,4	434,0±13,5
Депривация	67,00±0,75	169,0±8,5	120,0±3,6	170,0±9,6	64,0±2,5	190,0±2,5
p	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001
Образование ГК в ГАМК-Т-азной реакции						
Норма	0,73±0,01	2,20±0,14	0,77±0,04	2,30±0,13	0,90±0,05	2,32±0,08
Депривация	0,20±0,01	1,18±0,12	0,23±0,01	0,60±0,07	0,22±0,04	0,80±0,09
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001
Образование АК в ходе ГАМК-Т-азной реакции						
Норма	0,33±0,08	0,98±0,09	0,23±0,04	0,92±0,06	0,31±0,01	0,88±0,05
Депривация	0,21±0,05	0,45±0,04	0,25±0,02	0,27±0,02	0,17±0,05	0,32±0,02
p	<0,01	<0,001	>0,5	<0,01	<0,001	<0,001
Соотношение между интенсивностью образования ГК и АК (ГК/АК)						
Норма	2,21	2,24	3,24	2,50	2,90	2,80
Депривация	1,00	2,62	0,92	2,20	1,30	2,50

Примечание. p—достоверность различий между данными контроля и опыта

Таким образом, исключение потока световой импульсации в период прозревания вызывает существенные сдвиги уровня активности ГАМК-Т-азы и образования ГК и АК в ГАМК-Т-азной реакции. Эти изменения проявляются с некоторыми отличиями на тканевом и митохондриальном уровне в каждом образовании анализатора. При этом уменьшение активности ГАМК-Т-азы в зрительной коре и ПД в большей мере выражены в ткани, а в НКТ—в митохондриях. Снижение скорости образования ГК в митохондриях зрительной коры и НКТ значительнее,

чем в ткани, а в ПД практически одинаково на обоих уровнях. Уменьшение «выхода» АК во всех структурах заметнее в ткани, чем в митохондриях.

Данные проведенного исследования позволяют заключить о различиях в свойствах и реактивности ГАМК-Т-азы, локализованной в митохондриях и других структурах клеток мозговой ткани. Каждая из форм ГАМК-Т-азы, видимо, отличается по возрастным закономерностям их формирования. В частности, можно отметить значительные отличия в уровне активности митохондриальной ГАМК-Т-азы в первые 45 дней постнатального онтогенеза по сравнению с более поздними этапами развития. Поскольку, по данным нейроморфологов [10, 11], в период 1—45 дней постнатального онтогенеза образуются в основном пирамидные нейроны, можно полагать, что нейроны ассоциативного и других типов, развитие которых начинается и завершается позднее, чем пирамидных, обладают меньшей активностью ГАМК-Т-азы в митохондриях.

При развитии животных в условиях световой депривации отмечают значительные морфологические и биохимические перестройки в зрительном и других анализаторах мозга [12, 13]. В этих условиях снижается интенсивность дыхательной и фосфорилирующей активности с ГК в качестве субстрата в митохондриях различных образований мозга [14], а также уменьшается активность глутаматдегидрогеназы [15].

Содержание ГАМК в структурах зрительного анализатора повышается [16]. Эти данные свидетельствуют о том, что нарушение условий деятельности зрительного анализатора вызывает существенные перестройки в системе ГАМК.

Приведенные результаты показывают, что при депривации обнаруживаются отличия в характере и выраженности изменений отдельных форм ГАМК-Т-азы в различных образованиях зрительного анализатора. Видимо, эти изменения связаны и отражают состояние обмена ГАМК в митохондриях нервных окончаний по сравнению с митохондриями других клеточных структур [17]. ГК и АК рассматриваются как нейромедиаторы в центральных структурах мозга [18, 19], показаны особенности возрастных сдвигов в фонде этих аминокислот в отдельных образованиях зрительного анализатора мозга контрольных и зрительно-депривированных собак [16]. Полученные нами данные позволяют считать, что в условиях световой депривации образование ГК в ГАМК-Т-азной реакции снижается в митохондриях в большей мере, чем в ткани. Изменение соотношений интенсивности образования ГК/АК в митохондриях за счет более выраженного уменьшения «выхода» ГК, по-видимому, является указанием на особое значение ГК как нейромедиатора для зрительной функции intactных животных.

Результаты настоящего исследования позволяют заключить, что сдвиги активности ГАМК-Т-азы при световой депривации касаются митохондриальной и других ее форм. Это указывает на важную роль ГАМК-Т-азы шунта не только в нервных окончаниях, но и в клетке в целом. О функциональной обусловленности онтогенетических измене-

ний отдельных форм ГАМК-Т-азы свидетельствуют отличия соответствующих сдвигов в норме и при световой депривации в каждом из изучавшихся образований анализатора, с их большей выраженностью в НТК—структуре, тесно связанной с восприятием и проведением световых импульсов.

MITOCHONDRIAL GABA-TRANSAMINASE OF DOG VISUAL ANALYZER IN POSTNATAL ONTOGENESIS

AGAEV T. M., PIGAREVA Z. D.

Institute of Physiology, Azerbaijan SSR Academy of Sciences, Baku
Institute of Brain, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The mitochondrial GABA-transaminase (GABA—T) activity and the rates of glutamic and aspartic acids formation have been studied in some regions of dog visual analyzer in postnatal ontogenesis. In 45-days old animals activity of mitochondrial GABA—T in these tissues diminishes, at the same time increasing in corpora quadrigemina anterior and corpora geniculata lateralis (CGL). In 90-days old animals activity of GABA—T in CGL increases in mitochondria but decreases in the whole tissue. The rate of glutamic acid formation in mitochondria varies in different regions of visual analyzer in the course of postnatal ontogenesis, that of aspartic acid doesn't change essentially.

In light deprived animals GABA—T loses activity both in the whole tissue and in mitochondria (being the lowest in CGL); the rates of glutamic and aspartic acids formation is lower than in control animals.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаев Т. М. Укр. биохим. ж., 51, 31—34, 1979.
2. Агаев Т. М., Пигарева З. Д., Ифраимова З. Н. Вопросы мед. химии, 26, 611—615, 1981.
3. Waksman A., Bloch M. J. Neurochem., 34, 609—613, 1968.
4. De Robertis E., Sellinger O. Z., Rodriguez H. et al. J. Neurochem., 14, 81—89, 1967.
5. Нилюва Н. С. ДАН СССР, 2, 483—486, 1966.
6. Козлов Э. А., Алиев Т. В. Укр. биохим. ж., 44, 263—267, 1972.
7. Бунятыян Г. Х., Нерсисян Р. Р.—В кн.: Вопросы биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1, с. 5—13, 1964.
8. Krebs H. A., Bellamy D. Biochem. J., 75, 523—529, 1960.
9. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
10. Поляков Г. Н.—В кн.: Проблемы динамической локализации функций мозга, М., Медицина, с. 86—94, 1968.
11. Боголепов Н. Н. Ультраструктуры синапсов в норме и патологии, М., Медицина, с. 96, 1975.
12. Пигарева З. Д. Успехи совр. биол., 79, 1, 48—63, 1975.
13. Пигарева З. Д. и др.—В кн.: Развивающийся мозг и среда (под ред. А. А. Волохова), М., Наука, с. 142—192, 1980.
14. Камышева А. С.—В кн.: Функционально-структурные основы системной деятельности и пластичности мозга, М., Ин-т мозга АМН СССР, 4, с. 403—407, 1974.

15. Буснюк М. М. Ж. высш. нерв. деят., 8, 2, 402—407, 1978.
16. Агаев Т. М., Пигарева З. Д.— В сб.: Структурно-функциональные основы организации мозга, М., Ин-т мозга АМН СССР, 7, с. 106—109, 1978.
17. Кунерт Э., Доведова Е. Л. Вопросы мед. химии, 24, 460—466, 1979.
18. Bondy S. C., Purdy J. L. Brain Res. 119, 403—416, 1977.
19. Curtiss D. R. Proc. Austral Physiol and Pharmacol. Soc., 9, 2, 99—105, 1978.

Институт физиологии АН АзербССР, Баку
Институт мозга АМН СССР, Москва

Поступила 8. IV 1982