

ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССА УТИЛИЗАЦИИ α-КЕТОГЛУТАРАТА И СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ СВЯЗАННЫХ С НИМИ СУБСТРАТОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

РОЗАНОВ В. А., БЕЗАМАУТА С.

Одесский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Исследовали α-кетоглутаратдегидрогеназную и ГАМК-α-кетоглутаратаминотрансферазную активность в гомогенатах и митохондриально-синапсомной фракции мозжечка, коры и стволовой части головного мозга крыс. Судя по соотношению максимальных энзиматических активностей в митохондриях мозжечка ГАМК-шунт может обеспечивать превращение 1/4, а в коре—1/8—1/10 части потока α-кетоглутарата. Митохондриальная ГАМК-Т составляет 80% от всей определяемой активности при пересчете на мг белка. Отношение глутамат/ГАМК в митохондриально-синапсомной фракции приближается к 1, а в постмитохондриальном супернатанте составляет 3,5—4,0. Полученные данные важны с точки зрения уточнения механизмов метаболического контроля ГАМК-шунта в ЦНС и разработки подходов его направленной регуляции.

Метаболическому пути глутамат→ГАМК→янтарный полуальдегид (ЯПА)→сукцинат принадлежит роль шунта регулируемой α-кетоглутаратдегидрогеназной реакции, лимитирующей стадии цикла трикарбоновых кислот [1, 2], что является специфической особенностью нервной ткани и отражает ее повышенные компенсаторные возможности. Благодаря исследованиям Balazs [3, 4], сформировалось представление о том, что 8—10% потока субстратов цикла трикарбоновых кислот на стадии α-кетоглутарата (α-КГ) в ткани мозга может подвергаться превращениям в цепи альтернативных реакций ГАМК-шунта.

В то же время, особенности функционирования ГАМК-шунта и количественная оценка его вклада в биоэнергетику в различных морфо-функциональных образованиях мозга остаются во многом неясными. Одним из целесообразных методических этапов в решении этих вопросов является сопоставление максимальных активностей ферментных систем, катализирующих альтернативные метаболические превращения, в частности α-кетоглутаратдегидрогеназного комплекса (α-КГДК) и ГАМК-α-кетоглутаратаминотрансферазы (ГАМК-Т). Такое исследование представляет также интерес с точки зрения последующего анализа возможных механизмов контроля ГАМК-шунта как самостоятельного метаболического пути.

Исходя из этих соображений нами предпринято исследование, в ходе которого определялась активность α-КГДК и ГАМК-Т, а также содержание ГАМК и глутамата в гомогенатах, грубой митохондриальной фракции и постмитохондриальном супернатанте мозжечка, коры и стволовой части головного мозга крыс.

Материалы и методы

Исследования проводили на половозрелых крысах линии *Wistar* (самки и самцы) массой 180—200 г. Животных декапитировали, головной мозг быстро извлекали, освобождали от мозговых оболочек и сосудистых сплетений. На холоду отделяли мозжечок, изогнутыми ножницами снимали кору, остальную (стволовую) часть брали в опыт целиком. В гомогенатах отделов мозга определяли активность α -КГДК ферментативным методом [5]. ГАМК-активность — по приросту глутамата [6], содержание ГАМК и глутамата — методом хроматографии на бумаге.

С целью получения митохондриальной фракции из ткани отделов головного мозга и последующего определения α -КГДК-активности, материал, полученный от 3-х животных, объединяли и гомогенизировали (1:10) на холоду в среде выделения, содержащей 0,225 М маннитола, 0,075 М сахарозы и 0,1 мМ ЭДТА, а также 2% (по объему) свежей сыворотки крови кролика.

Этапы выделения включали 10-минутное центрифугирование гомогенатов при 4000g, последующее центрифугирование полученной наосадочной жидкости в течение 15 мин при 11000g и промывку осадка при тех же условиях. Осадок митохондрий и синантосом ресуспендировали в среде разрушения, содержащей 0,02 М раствор калий-фосфатного буфера, pH 7,4; 0,33% (по весу) дезоксиколата и $1 \cdot 10^{-4}$ М фенил-метилсульфонилфторида и подвергали троекратному замораживанию-оттаиванию в жидком азоте в течение 30—40 мин. В последующем активность фермента определяли в лизате митохондрий и синантосом.

При определении активности α -КГДК инкубационная среда содержала: (в мМ) K^+ -фосфатный буфер—100; NAD—1,0; CoA-SH—0,4; дитиотрейтол—0,5; тиаминпирофосфат—0,1; $MgCl_2$ —1,0; α -кетоглутарат—2,0. Реакцию начинали добавлением лизата митохондрий и синантосом, содержащего 80—200 мг белка. В контрольную пробу не вносили субстрат окисления. Активность фермента выражали в имоль окисленного субстрата в мин на мг белка или на 1 г ткани.

При определении ГАМК-Т активности в субфракциях ткани мозга среда выделения содержала те же компоненты, что и в первом случае, а также 0,1 М трис-ацетатного буфера, pH 8,2. Условия фракционирования были аналогичными. Осадок митохондрий и синантосом ресуспендировали в среде разрушения, содержащей 0,1 М трис-ацетатного буфера, 0,1% тритона X-100 и выдерживали 30 мин при 0—4°. Далее определяли ГАМК-Т-активность по ранее описанному методу [6] и содержание ГАМК и глутамата в лизированной митохондриально-синантосомной фракции и постмитохондриальном супернатанте методом хроматографии на бумаге.

При определении содержания ГАМК и глутамата в митохондриально-синантосомной фракции и постмитохондриальном супернатанте средой выделения служил 0,15 М K^+ , Na^+ -фосфатный буфер pH 7,0. Условия выделения были аналогичными. Результаты исследований обработаны статистически по методу Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, величины максимальной активности двух ферментных систем, катализирующих альтернативные реакции утилизации α -КГ, существенно различаются. Во всех трех исследованных отделах головного мозга скорость окисления α -КГ под действием дегидрогеназного комплекса превышает скорость его трансаминирования с ГАМК. В то же время, при сравнении отделов мозга наблюдается значительное и достоверное преобладание ГАМК-Т-активности в мозжечке над аналогичным показателем в коре, в то время как наиболее высокая α -КГДК-активность отмечается в коре. Вследствие такой неравномерности в распределении активности обоих ферментов (ствол

в обоих случаях занимает промежуточное положение) превышение дегидрогеназной активности над трансаминазой в мозжечке достигает 2,6 раза, в стволе—4,3 раза, а в коре—6,9 раз. Таким образом, при сравнении различных отделов мозга видно, что в гомогенатах мозжечка вклад ГАМК-шунта в превращения α -КГ более значителен, чем в гомогенатах коры.

Таблица 1

Максимальная α -КГДК- и ГАМК-Т-активность и содержание ГАМК и глутамата в гомогенатах 3-х отделов головного мозга крыс ($n=8-10$)*

Показатель и единицы измерения	Морфо-функциональные отделы мозга		
	мозжечок	кора	ствол
α -КГДК-активность (нмоль α -КГ $\cdot$ г $^{-1}$ ткани $\cdot$ мин $^{-1}$)	950,0 $\pm$ 45,0	1242,0 $\pm$ 55,0	1085,0 $\pm$ 39,0**
ГАМК-Т-активность (нмоль глутамата $\cdot$ г $^{-1}$ ткани $\cdot$ мин $^{-1}$)	364,0 $\pm$ 26,0*	186,0 $\pm$ 13,0	252,0 $\pm$ 11,0*
Содержание глутамата (мкмоль/г ткани)	8,66 $\pm$ 0,41	9,76 $\pm$ 0,40	8,22 $\pm$ 1,02
Содержание ГАМК (мкмоль/г ткани)	2,06 $\pm$ 0,23	2,30 $\pm$ 0,17	3,08 $\pm$ 0,21**

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 при расчете достоверности различий в качестве объекта сравнения взят минимальный показатель; * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

Следует отметить, что мозжечок, где наблюдается максимальная интенсивность утилизации ГАМК, характеризуется наиболее низким ее содержанием (табл. 1). Наиболее высокое содержание ГАМК отмечается в стволовой части мозга, включающей богатые ГАМК подкорковые образования [7]. Различия в содержании глутамата в отделах мозга менее выражены (отмечается тенденция к более высокой его концентрации в коре мозга), однако при расчете соотношения глутамат/ГАМК обнаруживается, что в мозжечке и коре оно составляет 4,3—4,2, а в стволе—2,7.

Несколько иные закономерности и соотношения выявлены в митохондриально-синапсомной фракции исследуемых отделов головного мозга. Как видно из табл. 2, наиболее высокая активность α -КГДК определялась в митохондриях стволовой части мозга, а минимальная активность—в мозжечке (как и при определении активности в гомогенатах). ГАМК-активность в митохондриях различных отделов головного мозга крыс (в полном соответствии с результатами ее определения в гомогенатах) распределяется следующим образом: мозжечок > ствол > кора. При этом в митохондриях коры и мозжечка сохраняется примерно такое же соотношение между максимальной определяемой α -КГДК- и ГАМК-Т-активностью, как и в гомогенатах этих отделов мозга (близкое к 3 в мозжечке и к 7 в коре). В то же время в митохондриях, выделенных из стволовой части мозга, превышение α -КГДК-активности над ГАМК-Т-активностью достигает 8, что при-

мерно вдвое превышает результат, полученный при изучении этих показателей в гомогенатах.

Таким образом, если судить по максимальной активности двух альтернативных ферментных систем, в митохондриях мозжечка ГАМК-шунт способен обеспечивать превращение примерно 1/4 потока α -КГ, а в коре и структурах ствола—лишь 1/8—1/10, что приближается к данным Balazs [3, 4].

Таблица 2

α -КГДК- и ГАМК-Т-активность и содержание ГАМК и глутамата в ли-
зирванной митохондриально-синаптической фракции из различных от-
делов головного мозга крыс (n=6—10)

Показатель и единицы измерения	Морфо-функциональные отделы мозга		
	мозжечок	кора	ствол
α -КГДК-активность (нмоль $\text{NADH}_2 \cdot \text{мг}^{-1}$ белка $\cdot \text{мин}^{-1}$)	51,78 $\pm$ 8,06	70,08 $\pm$ 3,76	92,24 $\pm$ 13,60
p		<0,05	<0,05
ГАМК-Т-активность (нмоль глутамата $\cdot \text{мг}^{-1}$ белка $\cdot \text{мин}^{-1}$)	16,14 $\pm$ 0,59	10,80 $\pm$ 0,55	11,48 $\pm$ 1,31
p	<0,001		>0,05
Содержание глутамата (нмоль $\cdot \text{мг}^{-1}$ белка)	20,83 $\pm$ 7,92	20,17 $\pm$ 6,91	18,57 $\pm$ 4,56
p	>0,05	>0,05	
Содержание ГАМК (нмоль $\cdot \text{мг}^{-1}$ белка)	23,00 $\pm$ 4,27	22,00 $\pm$ 3,72	13,00 $\pm$ 2,27
p	<0,05	<0,05	

Таблица 3

ГАМК-Т-активность и содержание ГАМК и глутамата в постмитохон-
дриальном супернатанте различных отделов головного мозга крыс
(n=8—10)

Показатель и единицы измерения	Морфо-функциональные отделы мозга		
	мозжечок	кора	ствол
ГАМК-Т-активность (нмоль глутамата $\cdot \text{мг}^{-1}$ белка $\cdot \text{мин}^{-1}$)	2,20 $\pm$ 0,30	1,40 $\pm$ 0,14	2,05 $\pm$ 0,36
p	<0,05		>0,05
Содержание глутамата (нмоль $\cdot \text{мг}^{-1}$ белка)	159,83 $\pm$ 13,63	177,88 $\pm$ 14,82	156,75 $\pm$ 16,80
p	>0,05	<0,05	
Содержание ГАМК (нмоль $\cdot \text{мг}^{-1}$ белка)	56,43 $\pm$ 7,65	52,00 $\pm$ 6,17	61,00 $\pm$ 6,12
p	>0,05		>0,05

В связи с этим представляет интерес оценка интенсивности ГАМК-трансаминазной реакции вне митохондрий, где α -кетоглутарат-дегидрогеназная активность, целиком связанная с митохондриями, отсутствует, но имеется значительная аминотрансферазная активность [8].

Как видно из табл. 3, постмитохондриальный супернатант по сравнению с митохондриальной фракцией мозга характеризуется на порядок более низкой активностью ГАМК-Т и соответственно в 2—3 и 8—9 раз более высоким содержанием ГАМК и глутамата (в пересчете на 1 мг белка). Полученные данные указывают на преимущественно митохондриальную локализацию ГАМК-Т и относительно низкое содержание взаимосвязанных с ней аминокислот в митохондриях. Следует обратить внимание на своеобразное распределение ГАМК и глутамата в митохондриальной фракции мозга и в супернатанте. Как видно из табл. 2, в митохондриальной фракции уровни ГАМК и глутамата примерно равны, в то же время во внемитохондриальном компартменте уровень глутамата в 3—4 раза превышает уровень ГАМК, что соответствует их соотношению в гомогенатах.

Подводя итоги сказанному, следует подчеркнуть, что наблюдаемые в гомогенатах соотношения между глутаматом и ГАМК обусловлены их содержанием во внемитохондриальном компартменте, в то время как соотношения между ферментативными активностями (α -КГДК и ГАМК-Т) обусловлены митохондриальными показателями. Это особенно хорошо заметно, если произвести расчет активности ферментов и содержания аминокислот на супернатант и митохондрии из расчета на 1 г исходной ткани (рисунок). Оказалось, что постмитохондриальный супернатант содержит на порядок больше ГАМК и глутамата, чем митохондрии из того же количества исходной ткани. В то же время, учитывая малый объем митохондриальной и, особенно, синаптической фракции, концентрации субстратов могут быть совершенно иными. Однако независимо от этого отношение глутамат/ГАМК в митохондриально-синаптической фракции приближается к 1, а в постмитохондриальном супернатанте составляет 3,5—4. Поскольку глутамат является продуктом ГАМК-трансаминазной реакции, можно предположить, что его высокий уровень в постмитохондриальном супернатанте лимитирует активность фермента. С другой стороны, учитывая значения K_m для ГАМК и α -КГ (соответственно 1,5 и 0,25 мМ) [9], что приближается к физиологическим концентрациям ГАМК [7] и значительно превышает концентрации α -КГ [10], можно высказать предположение, что фактором, лимитирующим ГАМК-Т-активность, является концентрация α -КГ. В связи с этим, вполне логичным представляется обнаруженный нами относительно большой вклад ГАМК-шунта в утилизацию α -КГ именно в мозжечке, где активность α -КГДК минимальная и наиболее вероятно участие α -КГ в ГАМК-Т-реакции (рисунок).

При анализе данных, приведенных на рисунке, обращает на себя внимание почти полное совпадение обнаруженных уровней содержания аминокислот в митохондриально-синаптической фракции и супернатанте с их содержанием в гомогенатах и значительное расхождение суммарных показателей ферментативной активности в соответствующих субфракциях и гомогенатах, особенно в мозжечке. Вероят-

нее всего, это связано с потерями ферментативной активности вследствие удаления части фермента с ядерной фракцией и обрывкам клеток, а также возможным изменением соотношения эндогенных регуляторов активности в ходе препаративной обработки ткани, что имеет особое значение для регулируемого фермента α -КГДК. Для выяснения истинных причин наблюдаемого несоответствия нужны

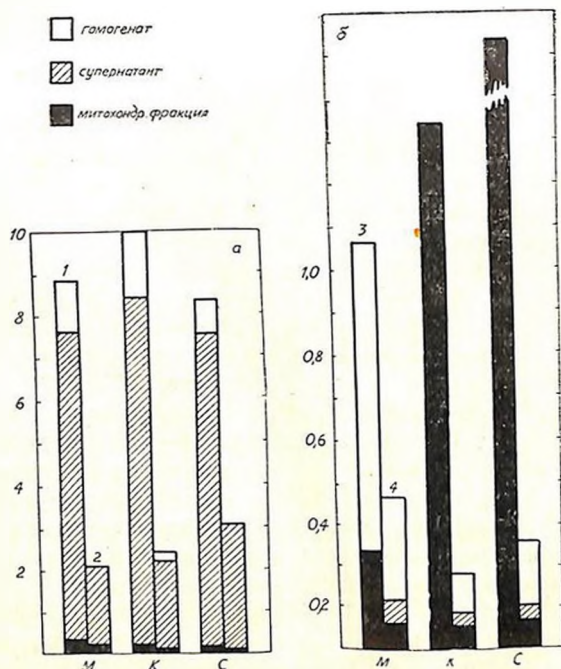


Рис. Распределение ГАМК-Т- и α -КГДК-активности и содержания ГАМК и глутамата в митохондриально-синаптической фракции, постмитохондриальном супернатанте и гомогенатах различных отделов головного мозга крысы при расчете на 1 г исходной ткани. а — распределение глутамата (1) и ГАМК (2), б — распределение α -КГДК-(3) и ГАМК-Т-активности (4); М — мозжечок К — кора, С — ствол мозга. По оси ординат: а — мкмоль г⁻¹ ткани мозга, б — мкмоль г⁻¹ ткани мозга · мин⁻¹

дополнительные исследования. С другой стороны, обнаруженные соотношения между содержанием ГАМК в синаптической-митохондриальной фракции и супернатанте, совпадающие с данными литературы [11] и подкрепляемые сведениями о крайне незначительной скорости спонтанного выхода ГАМК из субклеточных структур [12] убеждают в адекватности методических подходов.

В целом, полученные данные представляют интерес для дальнейшего уточнения механизмов метаболического контроля ГАМК-шунта в ЦНС и разработки подходов его направленной регуляции.

THE RATE OF 2-OXOGLUTARATE UTILIZATION AND SOME RELATED COMPOUNDS CONTENT IN DIFFERENT REGIONS OF RAT BRAIN

ROZANOV V. A., BEZAMAHOUTA C.

N. I. Pirogov Medical School, Odessa

The oxidation of 2-oxoglutarate and its transamination with GABA have been studied in homogenates and mitochondria of cerebellum, brain cortex and brain stem. Judged by maximal activities of the two enzymes, which catalyze these two reactions, GABA-bypass is able to utilize about 1/4 of 2-oxoglutarate in cerebellar mitochondria, and 1/8—1/10 in cortex and brain stem subcellular particles. The mitochondrial GABA—2-oxoglutarate transaminase (which comprises GABA—T activity) functions under the conditions of low GABA concentration, while outside mitochondria GABA content is much higher.

It is assumed that permeability of brain mitochondria membranes to GABA may represent a regulatory mechanism of GABA transamination rate in mitochondria.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Сытинский Н. А. Гамма-аминомасляная кислота в деятельности центральной нервной системы, Л., Наука, 1972.
2. Newsholme E. FEBS Lett., v. 117, p. 121—134, 1980.
3. Balazs R., Machiyama Y., Hammond B. J., Julian T., Richter D. Biochem. J., v. 116, p. 461—467, 1970.
4. Hammond B. J., Julian T., Machiyama Y., Balazs R. Biochem. J., v. 116, p. 461—467, 1970.
5. Gubler C. J. J. Biol. Chem., v. 236, № 12, p. 3112—3120, 1961.
6. Розанов В. А. Вопр. мед. химии, т. 26, № 1, с. 42—46, 1980.
7. Сытинский Н. А. Гамма-аминомасляная кислота—медиатор торможения. Л., Наука, 1979.
8. Ещенко Н. Д. Нейрохимия, т. 1, № 2, с. 200—213, 1982.
9. Laan J. W., Boer Th., Bruinvels J. J. Neurochem., v. 32, № 6, p. 1769—1780, 1979.
10. Вольский Г. Г.—В кн.: Нервная система, т. 13, с. 63—65, Л., ЛГУ, 1973.
11. Löscher W. J. Neurochem., v. 36, № 4, p. 1521—1527, 1981.
12. Van der Heyden J. A. M., Venema K., Korf J. J. Neurochem., v. 34, № 6, p. 1648—1653, 1980.

Поступила 14. I 1986