

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГАМК-ШУНТА
В ГОЛОВНОМ МОЗГУ

РОЗАНОВ В. А.

Медицинский институт им. Н. И. Пирогова, Одесса

В обзоре рассмотрены основные экспериментальные данные, касающиеся возможных механизмов регуляции потока через ГАМК-шунт в нервной ткани на уровне метаболического контроля, проанализированы результаты исследований, оценивающих количественный вклад ГАМК-шунта в энергетический метаболизм в головном мозгу. Предложена схема регуляции ГАМК-шунта, основанная на представлении о ключевой роли функциональной активности ГАМК-ергических нейронов и изменениях концентрации K^+ и Ca^{2+} в межклеточном пространстве.

ГАМК-шунт рассматривается как совокупность нейроспецифических реакций, являющихся обходным метаболическим путем по отношению к стадии окисления α -кетоглутарата и обеспечивающих повышенные компенсаторные возможности нервной ткани при экстремальных состояниях [1] и защиту мозга от стрессовых повреждений [2]. В связи с этим представляет большой интерес вопрос о закономерностях регуляции этого пути метаболизма в ЦНС.

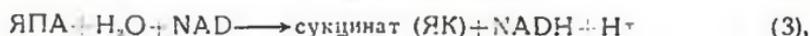
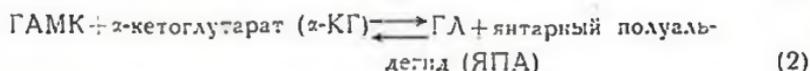
В настоящем обзоре рассматривается круг вопросов, связанных с быстрыми механизмами регуляции ГАМК-шунта на уровне метаболического контроля, и не затрагиваются более высокие уровни регуляции, а также другие метаболические превращения ГАМК и глутамата, подробно рассмотренные в ряде монографий и обзоров [5—9].

Идентификация регуляторных ферментов, изучение их свойств *in vitro* и доказательства наличия «структуры» у ГАМК-шунта как пути метаболизма

Теоретические исследования Newsholme показали, что метаболические пути обладают термодинамической и кинетической структурой, которая отражает устойчивость метаболического потока и возможности его регуляции [3, 4]. Последовательность реакций лишь тогда является метаболическим путем, когда доказана его общая термодинамическая вы-

годность и наличие потокообразующей, околоравновесной(ых) и неравновесной(ых) стадий [4].

ГАМК-шунт представляет собой последовательность реакций:



что можно представить в виде следующего суммарного уравнения:



Таким образом, общим итогом работы ГАМК-шунта является окислительное декарбоксилирование α -КГ, но без участия CoASH и фосфорилирования ГТФ [5, 7].

Исходя из значений стандартной свободной энергии окисления в присутствии NAD^+ ($\Delta G'_{ox}$) с учетом энергии, выделяющейся при окислении NADH в дыхательной цепи, значение стандартной свободной энергии (ΔG°) для суммарного процесса составляет -151.4 кДж моль $^{-1}$, что указывает на экзергонический характер ГАМК-шунта*. Таким образом, ГАМК-шунт как метаболический путь представляет собой неравновесный процесс, причем наиболее далека от равновесия его первая стадия—глутаматдекарбоксилазная (ГДК) реакция, которая является необратимой и протекает с выделением CO_2 . Это обстоятельство, а также сравнительно низкая величина V ГДК-реакции по сравнению с ГАМК-траксаминазой в ткани мозга [9, 10] однозначно указывают на то, что ГДК является регуляторным ферментом ГАМК-шунта, его потокообразующей стадией. Более того, максимальная активность каждого последующего фермента ГАМК-шунта больше, чем активность предыдущего: ГАМК-Т-активность превышает ГДК-активность в 4—5 раз [9, 10], а активность дегидрогеназы ЯПА в 2 раза выше максимальной ГАМК-Т-активности [11].

Некоторые молекулярные и кинетические характеристики ГДК из головного мозга животных представлены в табл. 1. Очищенная ГДК инактивируется при добавлении макроэргических трифосфатов, особенно АТФ (в концентрациях, ниже физиологических), этот эффект ослабляется при повышении концентрации в среде P_i и пиридоксаль-5-фосфата (PLP): механизм ингибирующего влияния АТФ заключается в снижении степени насыщения апофермента кофактором [16]. Специальные эксперименты указывают на то, что АТФ и PLP не конкурируют за один и тот же участок поверхности фермента, участок связывания АТФ не входит в состав активного центра ГДК [17]. Таким образом, АТФ выступает как аллостерический регулятор ГДК, снижающий сродство апофермента к коферменту.

* Исходные данные для расчета взяты из руководства: Мецлер Д., Биохимия, т. 1, табл. 3.3 и 3.7, М., Мир, 1980.

Таблица 1

Некоторые молекулярные и кинетические характеристики ГДК из головного
мозга млекопитающих

Источник	Величина M_r	Субъединичная структура	Кинетические характеристики	Число оборотов или величина У. А.	Ссылка
Мышь	85 ± 2 кД	Две идентичные субъединицы с M_r 44 ± 2 кД	K_m для ГА=0,7 мМ K_m для PLP=0,05 мкМ	3,3 моль ГАМК · ·мг ⁻¹ ·мин ⁻¹ 1,1 - 1,6с ⁻¹ *	[14] [9, 15]
Свинья (обнаружены 3 формы ГДК ГДК-I, II и III)	120 кД	Две идентичные субъединицы с M_r 60 кД	ГДК-I K_m для ГА=0,17 мМ K_i для ГАМК=11,1 мМ K_D для PLP=0,18 мкМ ГДК-II K_m для ГА=0,45 мМ K_i для ГАМК=19,8 мМ K_D для PLP=0,35 мкМ ГДК-III K_m для ГА=1,24 мМ K_i для ГАМК=23,9 мМ K_D для PLP=0,76 мкМ	—	[12]
Человек	140 кД	Две идентичные субъединицы с M_r 67 кД	K_m для ГА=1,3 мМ K_m для PLP=0,13 мкМ	—	[13]

*Расчет произведен нами на основании данных работ Shank, Cambell и Rando [9, 15].

В дальнейших экспериментах выяснилось, что АТР лишь усиливает ингибирующее влияние субстрата (ГЛ) на активность очищенной ГДК. Добавление 10 мМ ГЛ вызывает диссоциацию холофермента, сопровождающуюся двухфазным снижением активности (с быстрым и медленным компонентом), этот эффект усиливается в присутствии микромолярных концентраций АТР и P_i , но ослабляется при добавлении 10 мкМ PLP. При изучении восстановления холоэнзима из PLP (20 мкМ) и апоэнзима (полученного инкубацией холоэнзима с ГЛ), выяснилось, что полного восстановления холоэнзима даже при насыщающих концентрациях PLP достигнуть не удастся [18, 19]. Однако, если в процессе предварительного получения апоГДК инкубация с ГЛ осуществляется в присутствии < 100 мкМ АТР, последующая реактивация в присутствии PLP протекает быстрее. Добавление АТР в концентрациях больших, чем 100 мкМ, ингибирует этот процесс: добавление P_i (1—10 мМ) стимулирует реактивацию [18].

Согласно последним данным, ГДК головного мозга помимо декарбоксилирования ГЛ, способна осуществлять зависимую от декарбоксилирования реакцию переаминирования L-глутамата, в результате которой получается CO_2 , пиридоксаминфосфат и ЯПА [20]. Кроме того, ГДК может осуществлять переаминирование ГАМК с PLP с образованием ЯПА и пиридоксамин-5-фосфата. В обоих случаях при этом ГДК теряет кофермент и превращается в апоформу. Интенсивность этих процессов составляет доли процента от интенсивности декарбоксилирования ГЛ, они активируются при сдвиге рН в щелочную сторону, в то время как оптимум рН ГДК-реакции лежит в пределах 6,2—6,5 [20].

В последние годы описаны изоферменты ГДК (α , β и γ -формы), отличающиеся по кинетическим характеристикам [12, 20], но, по-видимому, имеющие близкую величину M_r [20]. Изоформы ГДК отличаются различной чувствительностью к ингибирующему действию АТР [21]. В мозгу различают также PLP-зависимую и PLP-независимую (то есть прочно связанную с PLP) ГДК [7, 12]. Активность PLP-независимой ГДК составляет 25% от суммарной, остальная принадлежит PLP-зависимой ГДК [7]. Неясно, являются ли они самостоятельными типами ГДК, или же обусловлены наличием двух каталитических центров или двух субъединиц одной и той же молекулы фермента [7]. Кроме того, различают цитоплазматическую ГДК-I и митохондриальную ГДК-II [8].

В целом представленные данные дают основание утверждать, что доступность кофактора (PLP) является важным моментом в регуляции ГДК-активности *in vitro*. Сравнительно низкие значения K_m для ГЛ при том, что содержание ГЛ в мозгу доходит до 10 ммоль/кг, а концентрация ее внутри клеток может быть значительно больше, свидетельствуют о том, что ГДК-реакция близка к насыщению субстратом. При этом повышение концентрации ГЛ, в силу приведенного выше механизма, приводит к снижению ГДК-активности и уменьшению потока через ГАМК-шунт, что полностью удовлетворяет требованиям [4], предъявляемым к потокообразующей стадии метаболического пути.

Имеются данные о том, что очищенная ГДК ингибируется не только

ГЛ, но и конкурентно подавляется продуктом реакции—ГАМК ($K_1=16$ мМ); этот процесс также зависит от АТР, в его основе лежит диссоциация—ассоциация холофермента [22]. ЯПА, глиоксилат, пируват, оксалоацетат и α -КГ в микромолярных концентрациях активируют ГДК, а глутарат и α -КГ в миллимолярных концентрациях ингибируют фермент [23]. Отмечено также, что очищенная ГДК подавляется норадреналином и серотином в миллимолярных концентрациях [23]. Имеются данные, что Cl^- (200 мМ) и Zn^{2+} (10 мкМ) обладают угнетающим действием на ГДК-активность *in vitro* [15, 23], причем влияние Cl^- в одинаковой степени сказывается на всех изоформах ГДК [21].

Вторая стадия ГАМК-шунта (ГАМК-трансаминазная реакция), учитывая ее обратимый характер [24], по всей видимости, является равновесной и зависит от концентрации субстратов и продуктов реакции. Эту стадию катализирует ГАМК-Т, представляющая собой димер из двух, по-видимому, идентичных субъединиц по 50—58 кД в зависимости от источника выделения (табл. 2). Довольно большие значения K_m для α -КГ и ГАМК и данные о сравнительно высокой максимальной ГАМК-Т-активности в ткани мозга свидетельствуют о том, что доступность субстратов является основным фактором, определяющим интенсивность переамирирования в ГАМК-Т-реакции.

Третью стадию ГАМК-шунта (окисление ЯПА в ЯК) катализирует ЯПАДГ, присутствующая в мозгу человека в двух изоформах, заметно отличающихся по аминокислотному составу, но имеющих близкую величину M_r (145 кД) и являющихся димерами ($M_r \approx 69$ кД) [32]. K_m для NAD (в зависимости от изоформы и источника выделения) колеблется в пределах 16,0—30,0 мкМ, для ЯПА—2,0—3,7 мкМ [32, 33]. Высокие концентрации ЯПА (> 100 мкМ) ингибируют ЯПАДГ из мозга крысы по неконкурентному типу по отношению к NAD, в механизме катализа имеет место упорядоченный тип связывания субстратов: NAD присоединяется первым и NADH отщепляется последним [33]. Сведения о возможности обратной ЯПАДГ реакции в литературе нами не обнаружены. Можно полагать, что интенсивность этой реакции ГАМК-шунта зависит от восстановленности пиридиннуклеотидов. Равновесие в ЯПАДГ-реакции сдвинуто вправо вследствие быстрой утилизации ЯК, в связи с чем данную реакцию можно считать практически необратимой [34]. Согласно расчетам [34], содержание ЯПА в головном мозгу по меньшей мере на 3 порядка ниже, чем ГАМК и ГЛ; за ЯПА помимо ЯПАДГ конкурируют активные ЯПА-редуктазные системы [35]. Эти данные дают основание заключить, что ЯПАДГ-реакция представляет собой неравновесную стадию ГАМК-шунта, которая не насыщается субстратом.

Таким образом, ГАМК-шунт удовлетворяет требованиям, предъявляемым к метаболическим путям [4], поскольку включает неравновесную потокообразующую стадию, близкую к насыщению субстратом (ГДК-реакция); неравновесную стадию, не насыщаемую субстратом (ЯПАДГ-реакция) и околоравновесную обратимую стадию (ГАМК-Т-реакция) и в целом является неравновесным энергетически выгодным процессом.

Таблица 2

Некоторые молекулярные и кинетические характеристики очищенной до гомогенного состояния ГАМК-Г из головного мозга млекопитающих

Источник	Величина M_r	Субъединичная структура	Кинетические характеристики	Число оборотов или величина U . А.	Ссылка
Кролик	116 кД	Две идентичные субъединицы с M_r 58 кД	—	$9,5 \text{ сек}^{-1}$	[25]
Мышь	109 кД	Две неидентичные субъединицы с M_r 53 и 58 кД	K_m для ГАМК=1,1 мМ K_m для α -КГ=0,25 мМ	50 мкмоль ГЛ $\text{мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	[14]
Крыс	104 ± 6 кД	Две идентичные субъединицы с M_r 57 ± 5 кД	K_m для α -КГ=5,5 мМ	$3,5 - 30,6 \text{ с}^{-1}$	[26] [27]
Свинья	100 кД	Две идентичные субъединицы с M_r 50 кД	—	$9,6 \text{ с}^{-1}$	[28]
Свинья (обнаружены 2 формы ГАМК-Т а и в)	110 кД		Форма а. K_m для α -КГ=1,3 мМ Форма в. K_m для α -КГ=0,4 мМ	8,3 мкмоль ГЛ $\text{мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ 2,9 мкмоль ГЛ $\text{мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	[31]
Человек	—	Две идентичные субъединицы с M_r 50 кД	—	—	[29]
Человек	—	—	K_m для ГАМК=0,4 мМ K_m для α -КГ=1 мМ	—	[30]

Анализ регуляторных эффектов в системе метаболизма ГАМК в головном мозгу

Необходимо отметить, что вопрос о соотношениях и механизмах регуляции *in vivo* альтернативных путей обмена глутамата, куда входит и глутаматдекарбоксилазный путь, неоднократно обсуждался [5, 7, 9, 36]. Известно, что основным путем превращения глутамата является аминотрансферазный, в то время как декарбоксилазный представлен значительно слабее. Это вытекает из сопоставления максимальных активностей соответствующих ферментов. Однако интенсивность декарбоксилирования глутамата может возрасти при подкислении внутренней среды клеток, поскольку оптимум рН ГДК лежит в пределах 6,2—6,5 [5, 7, 37]. В настоящем разделе мы рассмотрим только экспериментальные данные, имеющие отношение к построению теории метаболического контроля ГАМК-шунта как единого метаболического пути в нервной ткани.

Возможность переноса результатов, полученных на очищенных препаратах ферментов, на механизмы регуляции *in vivo* представляет большую проблему. Однако в случае с ГДК ряд регуляторных эффектов находит свое подтверждение при исследовании ферментативной активности в гомогенатах ткани мозга.

При изучении препаратов нервной ткани подтверждается, что ГДК работает в условиях неполного насыщения PLP: степень насыщения фермента коферментом колеблется от 10 до 60% в различных отделах мозга [38]. Максимальная активность апофермента ГДК наблюдалась в черной субстанции, там же отмечалась минимальная доля холофермента и наиболее выражено проявлялось ингибирующее действие метоксипиридоксина [38]. Таким образом, *in vivo* доступность кофактора является основным компонентом метаболического контроля ГДК-активности. Выявлена прямая зависимость в распределении ГДК-активности и активности пиридоксалькиназы между отделами мозга, причем активность пиридоксалькиназы отчетливо подавляется 1 мМ ГАМК [39], вследствие чего замыкается регуляторный механизм по принципу обратной связи, то есть реализуется торможение продуктом реакции, но через дополнительный механизм, включающий доступность кофактора. В грубых гомогенатах и в культуре клеток сетчатки подтверждается ингибирующая роль ГАМК как продукта реакции [40]. Исключением из выявленной закономерности является мозжечок: здесь высокая активность пиридоксалькиназы сочетается с относительно небольшой ГДК-активностью [39].

При изучении регуляции уровня ГАМК в структурах лимбической системы мозга крыс показано тормозящее влияние 0,3—2,0 мМ АТР на ГДК-активность, причем одновременно выявлена способность ГАМК (10^{-2} М) тормозить олигомицинзависимую АТРазу [41]. На основании собственных данных и анализа литературы предложена схема регуляции обмена ГАМК в синаптическом окончании (рис. 1), которая предусматривает наличие периодических колебаний величины соотношения

ГЛ/ГАМК, что может иметь значение для переключения процессов возбуждения и торможения в ЦНС [41].

В наших экспериментах активность PLP-независимой ГДК была наибольшей в мозжечке (вдвое выше, чем в коре больших полушарий и стволовой части мозга) [42]. PLP-зависимая ГДК также была наиболее активна в мозжечке, а максимальная ГДК-активность (содержание фермента) в мозжечке и стволе была примерно одинакова и превышала таковую в коре мозга. В то же время, отношение ГЛ/ГАМК в мозжечке и

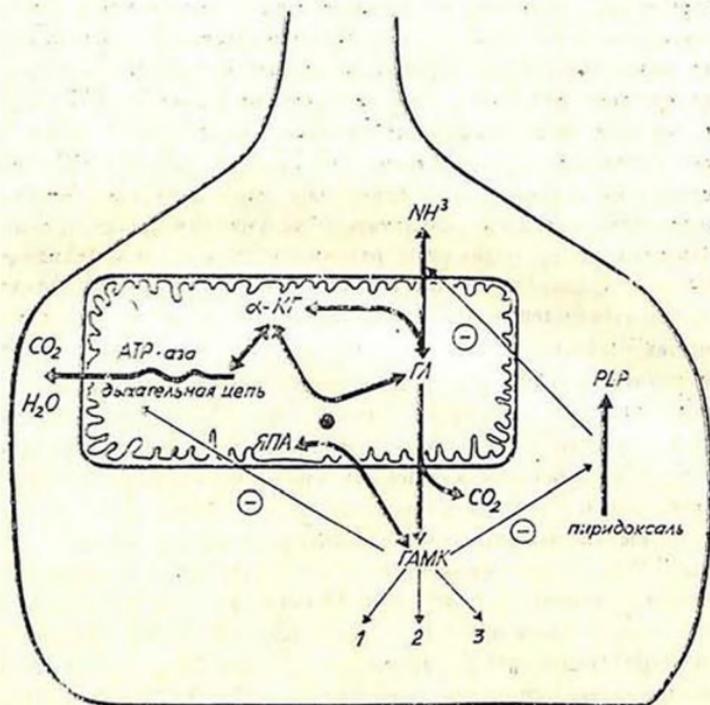


Рис. 1 Схема регуляции обмена ГАМК в синаптическом окончании [41].

Предполагается, что общий фонд ГАМК подразделяется на медиаторную (1), немедиаторную (2) и регуляторную (3) ГАМК. Повышение уровня регуляторной ГАМК приводит к снижению концентрации PLP за счет торможения пиридоксалькиназы и прямого выключения PLP из катализа путем образования шиффова основания с ГАМК. Одновременно происходит повышение глутаматдегидрогеназной активности (вследствие снятия тормозящего влияния PLP) и торможение АТФазной активности. В итоге накапливается α-КГ, что создает условия для восстановления уровня ГЛ и увеличения соотношения ГЛ/ГАМК

коре было практически одинаковым, следовательно, выявляемые различия в ГДК-активности в этих двух отделах мозга не связаны и не зависят от соотношения ГЛ/ГАМК. Таким образом, различия в ГДК-активности разных отделов мозга скорее всего обусловлены различиями в содержании ГДК (или в доле ГАМК-ергических нейронов), чем особенно

стями регуляции ГДК в этих отделах [42]. Аналогичный вывод можно также сделать на основании того, что в разных отделах мозга показаны отличия в 2—2.5 раза в содержании апо-ГДК [43].

Представляют интерес данные об активирующем влиянии деполяризующих концентраций K^+ на активность ГДК, эффект отмечен на препаратах синапсом и на срезах мозга, он зависит от наличия в среде Ca^{2+} [44]. Эти данные указывают на то, что активирующее влияние K^+ связано с выбросом ГАМК из нервных структур в ответ на деполяризацию, что приводит к снятию ретронгибирования ГДК и активации продукции ГАМК. Вероятно, этот эффект имеет большое регуляторное значение *in vivo*.

Относительно возможных механизмов регуляции потока через ГАМК-Т-реакцию можно отметить следующее. Равновесие в этой реакции при исследовании гомогенатов мозга смещено влево, в сторону образования ГАМК [24]. По нашим данным, внутри митохондрий, где сконцентрировано 80% ГАМК-Т-активности, отношение ГЛ/ГАМК приближается к 1, в то время как вне митохондрий оно равно 3 [45]. Вероятнее всего, в митохондриях, где образующийся ЯПА быстро утилизируется под действием ЯПАДГ, а ГЛ также быстро включается в ЦТК на стадии α -КГ, равновесие в ГАМК-Т-реакции сдвинуто вправо, а в цитоплазме—влево.

Относительно ЯПАДГ-реакции теоретически предсказывается ее практически необратимый характер в связи с быстрой утилизацией образующегося сукцината [34].

Динамическая компартиментализация обмена ГАМК.

Транспорт через биомембраны как фактор регуляции обмена ГАМК

Проблеме компартиментализации энергетического и аминокислотного обмена, в том числе обмена ГАМК в ЦНС, посвящены монографии и обзоры [5, 7, 9]. С понятием компартиментализации тесно связано представление о так называемых связанных и свободных формах ГАМК и глутамата, отражающих их статическое распределение в нервной ткани [46—48] и о множественности метаболических пулов этих аминокислот, отличающихся различной скоростью их метаболизма [9, 36]. Согласно современным представлениям, в нервной ткани различают два основных метаболических компартамента: большой (нейрональный, или энергетический) и малый (глиальный, или синтетический) [5]. Синаптические окончания выделяют в самостоятельный компартамент [49]. Известно, что ГДК локализована преимущественно в ГАМК-ергических нервных окончаниях, однако она содержится и в телах нейронов, и в глиальных клетках [5, 8, 50]. Сведения о нейроглиальном распределении ГАМК-Т-активности противоречивы. Согласно данным ряда авторов, ГАМК-Т в клетках глии более активна, чем в нейронах [51], по другим данным, вклад глиальных клеток в деградацию ГАМК незначителен [52]. В то же время очевидно, что основная масса ГАМК-Т (80%) локализована в постсинаптической зоне [52] и в несинапсомных митохондриях, отли-

чающихся также и более высокой активностью синаптически-восстановительных ферментов [36]. Имеются данные в пользу того, что транспорт ГАМК внутрь митохондрий осуществляется специфическим переносчиком в обмен на ГА [53].

Основная концепция, характеризующая взаимосвязь различных компартментов обмена ГАМК, сводится к следующему. В малом (глиальном) компартменте поглощаемая глйей ГАМК трансформируется в глутамин который мигрирует в нейроны (нервные окончания), где является предшественником ГА и ГАМК [7, 36]. В процессе метаболического обмена между нейронами и глйей происходит суммарное расщепление интермедиатов ЦТК от нейронов к глиальным клеткам. Глутамин и оксалоацетат глиального происхождения, образующийся в пируваткарбоксилазной реакции частично восполняют эти потери [54]. Эти положения подкрепляются сведениями о наличии систем активного транспорта нейромедиаторных аминокислот внутрь нейронов и глиоцитов [7, 8], а также данными о существовании систем активного транспорта α -КГ и малата в мембранах нервных клеток [55]. Как и для аминокислот, этот процесс зависит от наличия Na^+ в среде, скорость поглощения α -КГ тормозится глутаматом, аспартатом и пируватом; глутамин, ГАМК и β -аланин стимулируют поглощение α -КГ синаптоссмами [55].

На основании этих положений и приведенных в предыдущих разделах данных можно попытаться представить себе интегральную схему регулируемых событий, определяющих интенсивность обмена ГАМК (рис. 2). Исходя из того, что осуществление пре- и постсинаптического торможения является основной физиологической функцией ГАМК-ергических нейронов, логично предположить, что именно приход нервного импульса или повышение концентрации K^+ во внеклеточной среде (при деполяризации близлежащих нервных клеток) является пусковым механизмом не только нейрофизиологических, но и метаболических сдвигов в системе ГАМК.

Представленная на рис. 2 схема подкрепляется данными о том, что синаптический компартмент содержит не более 10—20% от общего содержания ГАМК в нервной ткани [56], вследствие чего выход ГАМК из синаптических окончаний существенно сказывается на содержании ГАМК в нервных окончаниях, что может иметь регуляторное значение. Доставка ГАМК к культуре астроцитов дозозависимо стимулирует активность глиальной ГАМК-Т [51]. ГАМК активно поглощается астроцитами против градиента концентрации, причем увеличение дозы ГАМК стимулирует ее поглощение по механизму положительной обратной связи: спонтанный выход ГАМК из астроцитов, в противоположность поглощению, не изменяется при повышении концентрации ГАМК в среде [57]. Основная масса выделяемого нейронами ГА поглощается астроцитами, где он претерпевает метаболические превращения до α -КГ и глутамина, последние транспортируются обратно в нейроны и синаптические окончания; подчеркивается, что в ГАМК-ергических нейронах основная масса ГА используется для образования ГАМК [58].

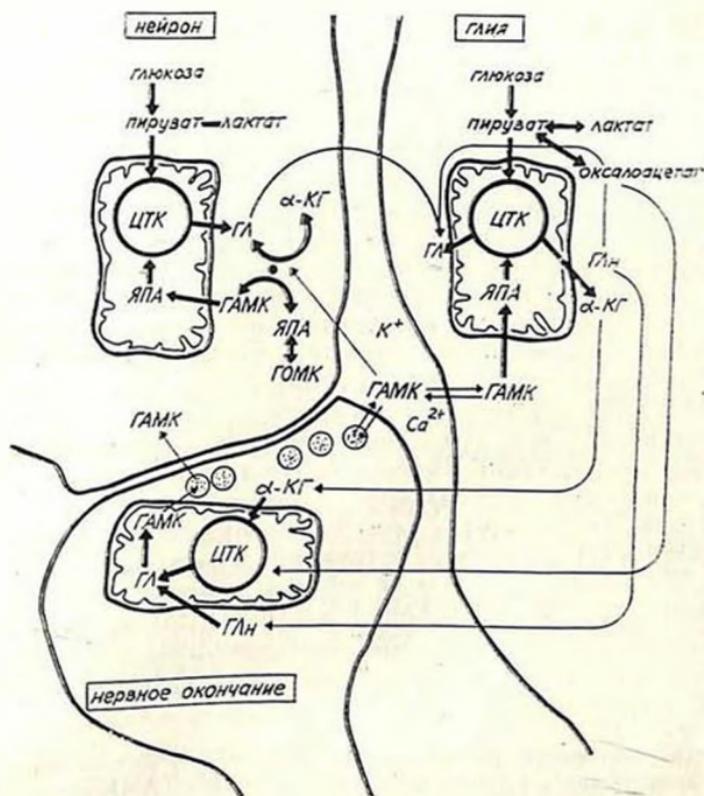


Рис. 2 Схема регулируемых процессов при работе ГАМК-шунта с учетом компартиментализации его компонентов (для ГАМК-ергических нейронов).

Приход нервного импульса или увеличение внеклеточной концентрации K^+ (в присутствии Ca^{2+}) вызывает выброс ГАМК из нервных окончаний и клеток глии. Снижены: концентрации ГАМК в пресинаптическом компартменте влечет за собой снятие ретроингибирования ГДК и тормозящего влияния ГАМК на глидоксалькиназу. За это следует активация ГДК и уменьшение пресинаптического фонда ГЛ. В постсинаптических структурах поглощение ГАМК приводит к уменьшению отношения ГЛ/ГАМК, вследствие чего в цитоплазме тормозится обратная ГАМК-Т-реакция. Благодаря сопряженному переносу ГАМК внутрь митохондрий, а ГЛ — наружу, ГАМК включается в ЦТК на стадии сукцината, восстанавливается митохондриальное соотношение ГЛ/ГАМК и избыток ГЛ мигрирует в клетки глии, где он служит сырьем для синтеза новых порций ГАМК и глутамина (ГЛН), ГАМК в клетках глии включается в ЦТК на стадии сукцината, вследствие чего создаются условия для оттока α -КГ, оксалоацетата и глутаминна в нервные окончания. Там эти субстраты служат для восполнения потерь субстратов ЦТК, отвлекаемых для образования ГЛ и ГАМК.

Предложенная схема предусматривает пространственную разобщенность ГАМК-шунта (по крайней мере его потокообразующей стадии — ГДК-реакции) от двух последующих и указывает на наличие дополнительных транспортных стадий: стадии выхода ГАМК из нервных окончаний или глиальных клеток, транспорта внутрь нейронов, нервных окончаний и глии, транспорта внутрь митохондрий. На каждой из этих стадий может осуществляться регуляция потока через ГАМК-шунт. Учитывая квантовость выброса ГАМК из нервных окончаний и сравнительно низкий уровень спонтанного выхода ГАМК из глии и нейронов, резко стимулируемый K^+ и зависящий от Ca^{2+} [7, 58], эта стадия может играть роль дополнительной потокообразующей ступени, близкой к насыщению субстратом. Учитывая то, что поглощение ГАМК срезами мозга с последовательным включением систем высокого и низкого сродства характеризуется отсутствием насыщения (в пределах физиологических концентраций ГАМК) [59, 60], можно полагать, что поступление ГАМК внутрь клеток является стадией, далекой от насыщения и зависящей от концентрации внеклеточной ГАМК. Наконец, учитывая то, что транспорт ГАМК внутрь митохондрий осуществляется, вероятно, в обмен на ГЛ, можно предполагать, что этот процесс также прежде всего зависит от концентрации ГАМК и ГЛ вне и внутри митохондрий. В то же время, следует отметить, что существуют популяции нейронов, содержащих все компоненты ГАМК-шунта (ГДК, ГАМК-Т и ЯПАДГ [61] и, следовательно, не зависящие от транспорта ГАМК через биомембраны. Это подчеркивает разнообразие регуляторных механизмов ГАМК-шунта в ЦНС в силу ее клеточной гетерогенности.

Количественная характеристика потоков и ферментативных активностей в ГАМК-шунте. Оценка вклада ГАМК-шунта в биоэнергетику. Взаиморегуляции между α -КГДК-реакцией и ГАМК-шунтом.

Поскольку, как уже указывалось, основным итогом реакций ГАМК-шунта является утилизация α -КГ, представляет большой интерес вопрос о доле α -КГ, проходящей через ГАМК-шунт, то есть о количественном вкладе ГАМК-шунта в цикл Кребса. Использование различных методических подходов дает разные результаты. По данным математического моделирования, ГАМК-шунт составляет от 20 до 34% потока через цикл Кребса [34]. Сравнение максимальных ферментативных активностей, ответственных за работу ЦТК и ГАМК-шунта, по данным разных авторов, дает значения от 10 до 40% [62—64]. Используя методику оценки вклада ГАМК-шунта в поток субстратов ЦТК по измерению включения метки в ГАМК из меченого пирувата McKhann и соавт. [64] получили значение в пределах 40%. С учетом возможной компартментализации пула глутамата, применяя метод радионуклидной индикации в сочетании с математическим моделированием, Balazs и соавт. показали, что ГАМК-шунт в мозгу может составлять не более 8—10% от общего потока через цикл Кребса [45]. Учитывая то, что ГАМК-ергические нейроны составляют

лишь часть от общей массы нейронов [9], в них эти величины могут быть значительно выше.

Представляет интерес сопоставление максимальных ферментативных активностей ГАМК-шунта и интенсивности потока его субстратов, особенно ГАМК, на различных этапах межклеточного транспорта в ЦНС. Значения ГАМК-Т-активности (табл. 3) колеблются примерно в тех же пределах, что и величины, характеризующие интенсивность поглощения ГАМК клеточными структурами. Следовательно, транспорт внутрь клеток не является лимитирующей стадией дальнейших метаболических превращений ГАМК. В то же время скорость ее спонтанного выхода из клеточных структур значительно ниже, чем скорость поглощения и ГАМК-Т-активность. Однако скорость выхода существенно увеличивается при повышении концентрации K^+ (в присутствии Ca^{2+}). Это еще раз подтверждает вероятность нашего предположения о том, что функциональная активность ГАМК-ергических нейронов является основным фактором регуляции ГАМК-шунта, а выход ГАМК—дополнительной потокообразующей стадией.

В связи с тем, что ГАМК-Т и α -КГДК непосредственно конкурируют за утилизацию α -КГ в митохондриях, напрашивается предположение о возможности взаиморегуляции между этими ферментными системами. К сожалению, сведения о механизмах регуляции α -КГДК головного мозга крайне ограничены. Регуляция по механизму фосфорилирования-дефосфорилирования для α -КГДК не доказана [72]. Очищенные препараты α -КГДК из мозга быка весьма нестабильны [74]. Ca^{2+} и Mg^{2+} и тиаминпирофосфат стабилизируют фермент. По всей видимости, Ca^{2+} имеет значение в регуляции α -КГДК-активности, так как он не только защищает фермент от инактивации, но и повышает его активность [74]. Эффект Ca^{2+} реализуется не через активацию киназы, как это характерно для ПДК, а посредством снижения K_m для α -КГ [71]. По некоторым данным, эффект Ca^{2+} может стать противоположным, ингибирующим, если его концентрация доходит до 100 мкМ [75]. Активность α -КГДК тормозится $NADH_2$, сукцинил-СоА и АТР, стимулируется АDP, причем, по всей видимости, отношение $NADH_2/NAD^+$ и сукцинил-СоА/СоА имеет большее значение в регуляции, чем АТР/АDP [71]. Таким образом, механизмы метаболического контроля, определяющие перераспределение потоков между ЦТК и ГАМК-шунтом, остаются неясными.

В то же время, хорошо известна взаимосвязь между функциональным состоянием ЦНС и интенсивностью реакций энергетического обмена. В связи с этим, функциональная активация ГАМК-системы, сопровождающаяся торможением в ЦНС и усилением утилизации ГАМК по пути ГАМК-шунта, хорошо согласуется с возможностью ослабления напряженности энергетического обмена в клетках, находящихся в состоянии торможения.

Таким образом, с учетом сопоставления интенсивности потоков и возможности взаиморегуляции между альтернативными путями обмена α -КГ теория метаболического контроля ГАМК-шунта в ЦНС может

Сравнение интенсивностей потоков субстратов и ферментативных активностей ГАМК-шунта и некоторых сопряженных процессов (головной мозг мелких грызунов)

Характеризуемый процесс	Параметр процесса	Численное значение* (мкмоль г ⁻¹ ткани мин ⁻¹)	Ссылка
Интенсивность утилизации глюкозы мозгом	V	1,22—4,0 (K _m =11,1 мкМ)	[65, 66]
Интенсивность утилизации пирувата мозгом	V	0,68—2,28 (K _m =1,0—6,3 мМ)	[67]
Поток активного ацетата через цикл Кребса	V _{Ср}	0,40	[49]
Поток субстратов через ГАМК-шунт	V _{Ср}	0,03—0,20	[49, 9]
Спонтанный выход ГАМК (область полосатого тела)	V _{Ср}	0,00003—0,0001	[73]
Спонтанный выход ГАМК из нейронов в культуре	V _{Ср}	0,01	[58]
Спонтанный выход ГАМК из глии в культуре	V _{Ср}	0,002—0,001	[58]
Спонтанный выход ГАМК из синантосом	V	0,02—0,01	[7]
В присутствии 60 мкМ/л К ⁺ , из срезов коры	V*	0,13	[68]
Поглощение ГАМК (срезы с низким средством)	V*	0,115—0,300 (K _m =22,0 мкМ)	[7]
Поглощение ГАМК низкоаффинное глией в культуре	V	0,124 (K _m =9,2—120,0 мкМ)	[59]
Поглощение ГАМК высокоаффинное нейронами в культуре	V	0,584 (K _m ≈ 9,0 мкМ)	[59]
Поглощение ГАМК высокоаффинное глией в культуре	V	0,013 (K _m ≈ 0,1—31,0 мкМ)	[59, 9]
Обмен ГАМК между теоретическими компартментами	V _{Ср}	0,010—0,013	[34]
Поток глутамат→глутамин (культура астроцитов)	V _{Ср}	0,24	[70]
Поток глутамат→α-кетоглутарат (культура астроцитов)	V _{Ср}	0,41	[70]
Поглощение α-КГ синантосомами (возжечки)	V	0,05—0,1 (K _m =10 мкМ)	[55]
ГАМК-активность (гомогенаты мозга и его отделов)	макс. актив.	0,09—0,12—0,28—0,45—0,7 ¹ —0,60	[38, 42, 10, 63, 65]
ГАМК-Т-активность (прямая: ГАМК→ЯПА)	макс. актив.	0,186—0,28—0,49—0,51—1,35	[45, 63, 72, 10, 71]
ГАМК-Т-активность (обратная: ЯПА→ГАМК)	макс. актив.	0,63—1,05	[23, 72]
α-КГ/ГАМК-активность (гомогенаты или митохондрии)	макс. актив.	1,24—3,40	[45, 71]

* Все данные приведены к величинам в указанной размерности с учетом содержания в 1 г сырой ткани мозга 100 мг белка или 20 мг белка митохондрий, как рекомендовано в работе Hawking, Mans [71].

быть дополнена следующими соображениями. ГАМК выделяется медленно и спонтанно из всех типов клеток, однако ее выход из ГАМК-ергических нейронов носит дискретный характер и регулируется K^+ и Ca^{2+} . Захватывается и метаболизируется ГАМК, вероятно, всеми типами клеток, так как ГАМК-Т имеется как в ГАМК-ергических, так и в не содержащих ГАМК нейронах [76]. В последних повышение концентрации ГАМК стимулирует дополнительные возможности утилизации α -КГ по пути ГАМК-шунта. В литературе нет данных об изменении КГДК-активности при изменении концентрации K^+ , однако хорошо известно, что ПДК-активность в митохондриях нервной ткани под влиянием экзогенного K^+ резко увеличивается [77]. Можно думать, что это есть не что иное, как усиление потока на лимитирующей стадии ввода субстратов в ЦТК в связи с увеличением его пропускной способности вследствие активации ГАМК-шунта.

Множественность механизмов регуляции ГАМК-шунта

В последнее время все больше внимания уделяется надмолекулярной организации ферментов. Развито представление, согласно которому метаболический путь (фрагмент метаболизма) соответствует реально существующему мультиэнзимному комплексу [78]. В структуре гипотетических надмолекулярных комплексов, отражающих организацию ЦТК, находят свое место и ферментные системы альтернативных взаимосвязанных реакций, в частности аминотрансферазы: причем роль матрицы в формировании структуры играет α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс [79].

Для ферментов ГАМК-шунта фиксация на матрице и белок-белковые взаимодействия также играют большую роль в регуляции. Так, фиксация ГДК на синапсомембранных искусственных фосфолипидных мембранах имеет значение для регуляции ее активности. Связанная ГДК более восприимчива к регуляции кофактором и характеризуется более высокими значениями K_m по отношению к ГА, а также большей величиной V [80]. Два других фермента ГАМК-шунта (ГАМК-Т и ЯПАДГ), которые пространственно разобщены с ГДК, способны образовывать надмолекулярные комплексы [81, 82]. Величина M_r образующегося комплекса близка к 300 кД, отношение ГАМК-Т и ЯПАДГ в составе комплекса—1:1 с равновесной константой 0,1 мкМ [82].

Подводя итоги, можно отметить следующее. ГАМК-шунт в ЦНС представляет собой метаболический путь, обладающий термодинамической и кинетической структурой как единое целое, но пространственно разобщенный в силу компартиментализации метаболизма ГАМК. Это не исключает возможности существования всех компонентов ГАМК-шунта в одном и том же нейроне, однако основной вклад в биоэнергетику ГАМК вносит, по-видимому, не там, где она синтезируется, а в постсинаптических образованиях. Анализ данных литературы указывает на весьма вероятную роль функциональной активности ГАМК-ергических нейронов и уровня K^+ (и Ca^{2+}) в межклеточной жидкости как основных регуляторов

интенсивности ГАМК-шунта. Биокатализаторы ГАМК-шунта представляют из себя олигомерные белки относительно небольшой величины M_r . Вероятнее всего они стерически связаны и пространственно сближены с более крупными и сложно организованными ферментами ЦТК, в частности с КГДК. Пока неизвестно, подвержены ли эти ферментные белки посттранскрипционной модификации (например, фосфорилированию-дефосфорилированию) и изменяется ли при этом их каталитическая активность, однако многочисленные данные свидетельствуют о регулирующем влиянии АТР на ГДК-активность. Наиболее вероятными лимитирующими стадиями ГАМК-шунта являются продукция ГАМК в ГДК-реакции и ее выход из пресинаптических образований, хотя не исключена регуляция доступностью субстрата и на последующих этапах ГАМК-шунта (ГАМК-трансаминазном и ЯПА-дегидрогеназном). Помимо срочных механизмов метаболического контроля, существуют, по-видимому, и долгосрочные: по механизму репрессии синтеза ГДК под действием ГАМК и по механизму индукции синтеза ГАМК-Т. Этот более высокий и эффективный уровень регуляции, связанный с изменением количества ферментов и индуцирующим влиянием гормональных факторов применительно к системе ГАМК представляет большой интерес, однако накопленный в этой области большой фактический материал может стать предметом самостоятельного аналитического обзора.

MECHANISMS OF REGULATION OF THE GABA SHUNT IN BRAIN

V. A. ROZANOV

Pirogov Medical Institute, Odessa

This review considers major experimental evidence related to possible mechanisms regulating the flow through the GABA shunt in nerve tissue at the level of metabolic control. Results of studies evaluating the quantitative contribution of the GABA shunt to energy metabolism of brain have been analysed. We propose a scheme for the regulation of GABA shunt which is based on the concept about the key role of the functional activity of GABA-ergic neurons and changes of K^+ and Ca^{2+} concentration in the intercellular space.

ЛИТЕРАТУРА

1. Розанов А. Я., Трещинский А. И., Хмелевский Ю. В.—Ферментативные процессы и их коррекция при экстремальных состояниях, Киев, Здоровья, 1985.
2. Меерсон Ф. Э. Адаптация, стресс и профилактика, М., Наука, 1981.
3. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма, М., Мир, 1977.
4. Newsholme E. A. FEBS Lett., v. 117, p. 121—134, 1980.
5. Сытинский И. А. Гамма-аминомасляная кислота в деятельности центральной нервной системы, Л., Наука, 1972.
6. Розанов В. А. Нейрохимия, т. 1, с. 406—419, 1982.
7. Tapia R.—In: Handbook of Neurochemistry (ed. A. Lajtha), v. 3, p. 423—466, N. Y., London, Plenum Press, 1983.

8. Раевский К. С., Георгиев В. П. Медлительные аминокислоты. М., Медицина. 1986.
9. Shank R. P., Campbell G. Le M.—In: Handbook of Neurochem. (ed. A. Lajtha), v. 3. p. 381—404. N. Y., London, Plenum Press, 1983.
10. Сусарь Н. А., Орехов В. С. Укр. биохим. журн., т. 54, с. 565—568, 1982.
11. Boer De Th., Bruinvels J. J., Neurochem., v. 23, p. 471—478, 1977.
12. Spink D., Porter T. G., Wu S. J., Martin D. L. Biochem. J., v. 231, p. 695—703, 1985.
13. Blindermann J. M., Maitre M., Ossola L., Mandel P. Eur. J. Biochem., v. 86, p. 143—152, 1987.
14. Wu J.—Y., Su Y. Y. T., Lam D. M. K., Schousboe A., Chude O. In: Research methods in Neurochemistry, v. 5. p. 129—174, 1981.
15. Rando R. J. Biol. Chem., v. 256, p. 1111—1114, 1981.
16. Seligmann B., Miller L. P., Brockmann D. E., Martin D. L. J. Neurochem., v. 30, p. 371—376, 1978.
17. Wu S. Y., Martin D. L. J. Neurochem., v. 42, p. 1607—1612, 1984.
18. Meeley M. P., Martin D. L. Cell. and Mol. Neurobiol., v. 3. p. 39—54, 1983.
19. Meeley M. P., Martin D. L. Cell. and Mol. Neurobiol., v. 3. p. 55—68, 1983.
20. Porter T. G., Spink D., Martin S., Martin D. L. Biochem. J., v. 231, p. 705—712, 1985.
21. Tursky T., Lussanova M. J. Neurochem., v. 30. p. 903—905, 1978.
22. Porter T. G., Martin D. L. J. Neurochem., v. 43, p. 1464—1476, 1984.
23. Porter T. G., Martin S. B., Martin D. L. J. Neurochem., v. 47, p. 468—471, 1986.
24. Bemmelen Van F. J., Schouten M. J., Fekkes D., Bruinvels J. J. Neurochem., v. 45, p. 1471—1474, 1985.
25. John R. A., Fowler I. J. Biochem. J., v. 155, p. 645—651, 1976.
26. Maitre M., Cieselski L., Cash C., Mandel P. Eur. J. Biochem., v. 52, p. 157—169, 1975.
27. Ossola L., Maitre M., Blindermann J.—M., Mandel P. J. Neurochem., v. 34, p. 293—296, 1980.
28. Churchich J. E., Moses U. J. Biol. Chem., v. 256, p. 1101—1104, 1981.
29. Beeler T., Churchich J. E. Eur. J. Biochem., v. 85, p. 365—371, 1978.
30. Cash C., Maitre M., Cieselski L., Mandel P. FEBS Lett., v. 47, № 2, p. 199—203, 1974.
31. Bloch-Tardy M., Buzenet A., Fages C., Rolland B., Gonnard P. Neurochem. Res., v. 5, p. 1147—1154, 1980.
32. Cash C. D., Maitre M., Ossola L., Mandel P. Biochim. et biophys. acta, v. 524, p. 26—36, 1978.
33. Rivett A. J., Tipton K. F. Eur. J. Biochem., v. 117, p. 187—193, 1981.
34. Garfinkel D. J. Biol. Chem., v. 241, p. 3918—3929, 1966.
35. Конунникова Н. П. Нейрохимия, т. 5, с. 370—376, 1986.
36. Clark J. B., Niclas W. J.—In: Handbook of Neurochemistry (ed. A. Lajtha), 2nd ed., N. Y., London, Plenum Press, v. 7, p. 135—158, 1984.
37. Северин С. Е. Вестн. АМН СССР, т. 7, с. 53—67, 1968.
38. Nitsch C. J. Neurochem., v. 34, p. 822—830, 1980.
39. Tursky T., Brechtlova M., Lussanova M. Biologia (CSSR), v. 31, p. 923—929, 1976.
40. Mello de F. G. Dev. Brain Res., v. 14, p. 7—13, 1984.
41. Щипакина Т. Г. Нейрохимия и физиология синаптических процессов, Пушкино, с. 6—25, 1976.
42. Розанов В. А. Укр. биохим. журн., т. 59, с. 41—45, 1987.
43. Blindermann J.—M., Maitre M., Mandel P. J. Neurochem., v. 32, p. 245—246, 1979.
44. Gold B. I., Roth R. H. J. Neurochem., v. 32, p. 883—888, 1979.
45. Розанов В. А., Безамауга С. Нейрохимия, т. 5, с. 377—383, 1986.

46. Elliott K. A. C., Khou R. T., Bilodeau E. Can. J. Biochem., т. 43, p. 407—416, 1965.
47. Дозгалевиц И. Н., Пикунца А. Т. Докл. АН БССР, т. 12, с. 556—559, 1968.
48. Розанов В. А., Рейтгарова Т. Е. Укр. биохим. журн., т. 55, с. 671—763, 1983.
49. Balazs R., Machiata Y., Hammond B. J., Julian T., Richter A. Biochem. J., v. 116, p. 445—467, 1970.
50. Weissmann-Nanopoulos D., Belin M. P., Didier M., Aguera M., Partisani M., Maitre M., Popof J. F. Neurochem. Int., № 6, p. 785—791, 1983.
51. Bardakdjian J., Tardy M., Pimoule C., Gonnard P. Neurochem. Res., v. 4, p. 517—527, 1979.
52. Gale K., Sarvey C., Stork J., Childs J. A., Yalisove, Dayhoff R. E. Brain Res., v. 307, p. 255—262, 1984.
53. Pussurella S., Atlante A., Barile M., Quagliaricello D. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 121, p. 770—778, 1984.
54. Schousboe A., Drejer J., Larssen O. M., Yu A. C. H., Hertz L. Acta Neurol., Scand., v. 69, № 5, p. 332—334, 1984.
55. Shank P., Campbell G. M. J. Neurochem., v. 42, p. 1153—1161, 1984.
56. Zisapel N., Zurgil N. Life Sci., v. 23, № 3, p. 231—236, 1978.
57. Hertz L., Wu P. H., Schousboe A. Neurochem. Res., v. 3, № 3, p. 313—323, 1970.
58. Schousboe A., Hertz L. Dale's Princ. and Commn. between Neurons. Colloq. Neurochem. Group Biochem. Soc., Oxford, July, 1982, p. 113—141. Oxford e. a., 1983.
59. Balcar V. J., Mark J., Borg J., Mandel P. Neurochem. Res., v. 4, № 3, p. 339—354, 1979.
60. Рейтгарова Т. Е., Розанов В. А., Тоцкий В. Н. Укр. биохим. журн., т. 59, № 2, с. 87—90, 1987.
61. Weissmann-Nanopoulos D., Belin N. F., Mandel P., Maitre M. Neurochem. Int.: v. 6, p. 333—338, 1984.
62. Haslum P. J., Krebs H. A. Biochem. J., v. 88, p. 566—578, 1963.
63. Balazs R., Haslum R. J. Biochem. J., v. 94, p. 131—141, 1965.
64. McKhann G. M., Albers R. W., Sokoloff L., Mitchelson O., Tower D. B.—In Inhibition in the Nervous System and γ -Aminobutyric acid, p. 169. Oxford, Pergamon Press., 1960.
65. Cremer J., Cunningham V. J. Biochem. J., v. 180, p. 677—679, 1979.
66. Gjedde A., Crono Ch. Science, v. 214, № 4519, p. 456—457, 1981.
67. Cunningham V. J., Sarna G. S. J. Neurochem., v. 33, p. 433—437, 1979.
68. Muchiyama Y., Balazs R., Hammond B. J., Julian T., Richter D. Biochem. J., v. 116, p. 469—481, 1970.
69. Van der Heyden J. A. M., Venema K., Korf J. J. Neurochem., № 34, p. 1648—1653, 1980.
70. Yu A. C., Schousboe A., Hertz L. J. Neurochem., v. 49, p. 954—960, 1982.
71. Hawking R. A., Mans A. M.—In: Handbook of Neurochemistry (ed. by A. Lajtha), 2nd ed., N. Y., London, Plenum Press, v. 3, p. 259—294, 1983.
72. Laan J. W., Buer Th., Bruinvels J. J. Neurochem., v. 32, p. 1763—1780, 1979.
73. Van der Heyden J. A. M., Venema K., Korf J. J. Neurochem., № 34, p. 1648—1653, 1980.
74. Снежкуте М. А., Глемжа А. А. Биохимия, т. 41, с. 491—495, 1976.
75. Lui J. C. K., Cooper A. J. L. J. Neurochem., v. 47, p. 1376—1386, 1986.
76. Chan-Palay V., Wu J.—Y., Palay S. L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., № 76, p. 2067—2071, 1979.
77. Kovachich G. B., Hangaard N. J. Neurochem., v. 28, p. 923—927, 1977.
78. Курганов Б. И. Молекуляр. биол., т. 20, 12, с. 369—377, 1986.
79. Любарев А. Е., Курганов Б. И.—В кн.: Молекулярные механизмы и регуляция энергетич. обмена. Тезисы докладов Всесоюзн. симпозиума, Пушкино, с. 13, 1986.
80. Covarrubias M., Tapia R. J. Neurochem., v. 34, p. 1682—1688, 1980.
81. Manzocci A. J. Neurochem., v. 46, p. 1894—1898, 1985.
82. Heart W. G., Churchich J. E. J. Biol. Chem., v. 259, p. 11459—11463, 1986.

Получена 29. VIII 1988