

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского»

Институт биологии и биомедицины

**ОСОБЕННОСТИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ГОЛОВНОГО
МОЗГА. БИОХИМИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ.**

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано методической комиссией Института биологии и биомедицины для студентов ННГУ, обучающихся по направлению 06.03.01 «Биология», 31.05.03 «Стоматология», 31.05.01 «Лечебное дело», 30.05.01 «Медицинская биохимия», 30.05.02 «Медицинская биофизика», 30.05.03 «Медицинская кибернетика»

Нижегород

2019

УДК 577.2(075.8)

ББК 28.707.2

ОСОБЕННОСТИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА. ОСНОВНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ. Автор: Щелчкова Н.А.: Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2019. – 25 с.

Рецензент: д.б.н. А.В. Дерюгина

В пособии представлены базовые понятия, касающиеся особенностей энергетических процессов в головном мозге. Высокая интенсивность энергетического обмена является основным фактором деятельности мозга. Изменение энергетического баланса определяет реакции нервной ткани в возрастном аспекте, а также на гипоксические и/или ишемические типы повреждения нервной системы. Предназначено для студентов ННГУ, обучающихся по направлениям подготовки 06.03.01 «Биология», 31.05.03 «Стоматология», 31.05.01 «Лечебное дело», 30.05.01 «Медицинская биохимия», 30.05.02 «Медицинская биофизика», 30.05.03 «Медицинская кибернетика».

Ответственный за выпуск

председатель методической комиссии Института биологии и биомедицины
ННГУ, к.б.н. Е.Л. Воденеева

УДК 577.2(075.8)

ББК 28.707.2

© Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского, 2019

Содержание

| | |
|--|----|
| Введение..... | 4 |
| Тема №1. Глюкоза, как основной энергетический субстрат для мозга..... | 5 |
| Лабораторная работа №1. Приготовление ткани головного мозга для определения субстратов | 10 |
| Лабораторная работа №2. Количественное определение глюкозы в ткани мозга и цельной крови экспериментальных животных | 11 |
| Тема № 2. Отличительные особенности метаболизма глюкозы в нейронах и глиальных клетках | 13 |
| Лабораторная работа №3. Определение активности фермента гексокиназы, лимитирующего фактора гликолиза в клетках головного мозга. | 16 |
| Лабораторная работа №4. Определение концентрации белка в гомогенате головного мозга методом М.М. Bradford (1976)..... | 17 |
| Тема № 3. Мембранный транспорт глюкозы | 18 |
| Заключение | 22 |
| Список литературы | 23 |

Введение

Характерная особенность нервной ткани — высокая интенсивность энергетического метаболизма. По потреблению кислорода и глюкозы мозг занимает первое место среди крупных органов животного или человека. Преимущественным субстратом окисления в нервной ткани является глюкоза. Собственные углеводные резервы мозга весьма незначительны и этим объясняется чрезвычайная чувствительность нервной ткани, прежде всего, коры больших полушарий, к гипогликемии и гипоксии.

Изучение энергетического обмена в головном мозге привлекает особое внимание нейрохимиков и нейрофизиологов. Многочисленные биохимические и биофизические процессы, связанные с поддержанием своеобразной пространственно-функциональной архитектоники мозга, с непрерывным образованием функциональных ансамблей нейронов, с обновлением и образованием синаптических структур и других, протекают с очень значительными энергетическими затратами.

Учебно-методическое пособие содержит краткие теоретические сведения об особенностях энергетических процессов разнообразных нейроцитов, и биохимическим тестам, применяемым в современной аналитической практике прикладных и фундаментальных отраслях биомедицины.

Основной целью авторов при составлении настоящего учебно-методического пособия было помочь студентам получить теоретические представления о специфических энергетических процессах в нервной системе у животных, освоить методические тесты для определения энергетических субстратов и ферментов в норме и ишемии мозга, а также научить трактовать результаты биохимических показателей.

Тема №1. Глюкоза, как основной энергетический субстрат для мозга.

Основной путь получения энергии нервных клеток – аэробное окисление глюкозы. Глюкоза является практически единственным энергетическим субстратом, поступающим в нервную ткань и не зависит от действия инсулина. Собственные запасы глюкозы в мозге невелики (2,5–4,0 мкмоль/г). Поэтому мозг нуждается в постоянном поступлении глюкозы из крови. Интенсивное поступление глюкозы из капилляров в клетки мозга обеспечивается работой специальных переносчиков глюкозы.

Метаболизм глюкозы обеспечивает 85-90% энергетических потребностей ткани для физиологической функции мозга посредством генерации АТФ, основы для поддержания нейрональных и ненеуронных клеток. Однако, глюкоза является не только основным энергетическим источником нервной ткани, но и важнейшим предшественником для биосинтеза аминокислот, особенно глутамата, аспартата, аланина, глицина и других метаболитов. Следовательно, жесткая регуляция метаболизма глюкозы имеет решающее значение для физиологии мозга, а нарушение метаболизма глюкозы в мозге лежит в основе ряда заболеваний, влияющих как на сам мозг, так и на весь организм.

Специализированные центры в мозге, включая проопиомеланокортины (POMC) и агутин-связанные пептидные (AgRP) нейроны в гипоталамусе, определяют уровни центральной и периферической глюкозы и регулируют метаболизм глюкозы через блуждающий нерв, а также нейроэндокринные сигналы (рис. 1). Подача глюкозы в мозг регулируется нервно-сосудистой связью и может модулироваться метаболически-зависимыми и -независимыми механизмами. Глюкоза поступает в мозг из крови, пересекая ГЭБ через транспортер глюкозы 1 (GLUT1), и глюкоза и другие метаболиты (например, лактат, Lac) быстро распределяются через метаболическую сеть клеток мозга.

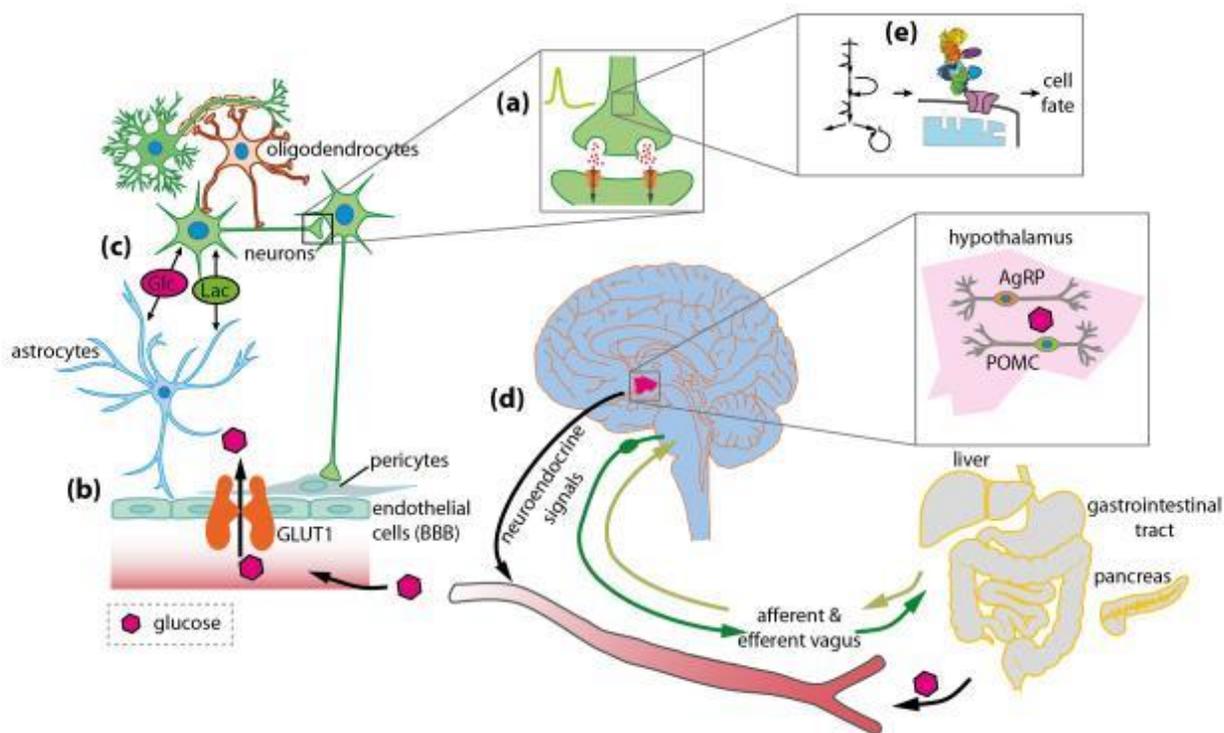


Рис. 1 Роль глюкозы в метаболизме мозга (Grayson BE, et al. 2013).

Наибольшая доля энергии в мозге расходуется на нейронные вычисления и обработку информации, например, генерирование потенциалов действия и постсинаптических потенциалов, генерируемых после синаптических событий, и поддержание ионных градиентов и потенциала покоя нейронов. Кроме того, метаболизм глюкозы обеспечивает энергию и предшественников для биосинтеза нейротрансмиттеров. Важно отметить, что астроцитарный гликоген, по-видимому, имеет непосредственное отношение к обучению.

Потребность мозга в кислороде и глюкозе заметно изменяется в ходе онтогенеза, значительно повышаясь с его ростом и дифференцировкой, а также формированием отдельных структурно-функциональных ансамблей нейронов. По мере развития головного мозга скорость окисления глюкозы в нем возрастает и одновременно увеличивается зависимость функциональной активности нейронов от интенсивности окислительных процессов как источника энергии.

Головным мозгом потребляется до 70% глюкозы, образующейся в печени и выделяющейся из нее в кровь. Потребление глюкозы мозгом взрослого человека, рассчитанное по артериовенозной разнице, составляет в среднем 0,25-0,30 мкмоль/мин. У мелких лабораторных животных (крыс, мышей) этот показатель выше и в среднем равен 0,60-0,80 мкмоль/мин.

Собственные углеводные запасы в нервной ткани относительно невелики. Это обстоятельство наряду с отмеченной ограниченной способностью мозга использовать другие субстраты окисления лежит в основе характерной для нервной ткани зависимости от постоянного поступления глюкозы из крови. Только при продолжительном голодании клетки начинают использовать дополнительный источник энергии — кетоновые тела.

При уменьшении уровня глюкозы в крови головной мозг продолжает потреблять по-прежнему высокие количества глюкозы и кислорода. И лишь при снижении концентрации глюкозы крови ниже критических величин (тяжелая гипогликемия) значительно падает потребление мозговой тканью как глюкозы, так и кислорода и развивается коматозное состояние с потерей сознания.

Попытки компенсировать развитие комы и поддерживать энергетический баланс головного мозга путем введения животным различных метаболитов глюкозы (гексозофосфатов, лактата, пирувата, фруктозы, галактозы и др.) в значительных количествах были неудачными. При гипогликемической коме лишь внутривенные инъекции глюкозы, могут нормализовать энергетический метаболизм мозга и вывести животное из коматозного состояния. Эти наблюдения указывают на весьма ограниченную способность головного мозга компенсировать уменьшенное поступление глюкозы за счет окисления других энергетических субстратов. Основной причиной этого является низкая проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) в мозге взрослых животных для других субстратов окисления.

Транспорт глюкозы в мозг осуществляется преимущественно с помощью специальной системы переносчиков, активно функционирующей в широких пределах концентраций глюкозы в крови — от 2,75 до 16,50 ммоль/мл. На долю пассивной диффузии приходится не более 5% от общего потока глюкозы.

Исследования активного переноса глюкозы через ГЭБ, выполненные *in vitro* на препаратах капилляров мозга, которые рассматривают как анатомический локус ГЭБ, работы на культуре клеток мозга, а также эксперименты *in vivo* с ¹⁴C-глюкозой или ее дериватами, позволили установить основные характеристики этого процесса.

Гексокиназная реакция является доминирующим путем пополнения пула метаболитов гликолиза в мозге, поскольку, как уже упоминалось, глюкоза представляет собой основной энергетический субстрат в этой ткани. Окисление иных энергетических субстратов и ввод компонентов в гликолитическую цепь через другие реакции (фосфотриозы и др.) в нервной ткани не имеет существенного значения. Все это позволяет рассматривать гексокиназную реакцию как первый пункт контроля над скоростью энергетического обмена в головном мозге. Лишь в экстремальных ситуациях — при резкой гипогликемии или в условиях чрезвычайно интенсивного гликолиза при кислородной недостаточности — лимитирующим этапом может стать транспорт глюкозы через ГЭБ.

В клетках центральной нервной системы наиболее энергоёмким процессом, потребляющим до 40 % производимого АТФ, является функционирование транспортной Na⁺/K⁺-АТФ-азы (Na⁺/K⁺-«насоса») клеточных мембран (рис. 2). Активный транспорт ионов Na⁺ и K⁺ компенсирует постоянный поток ионов через ионные каналы.

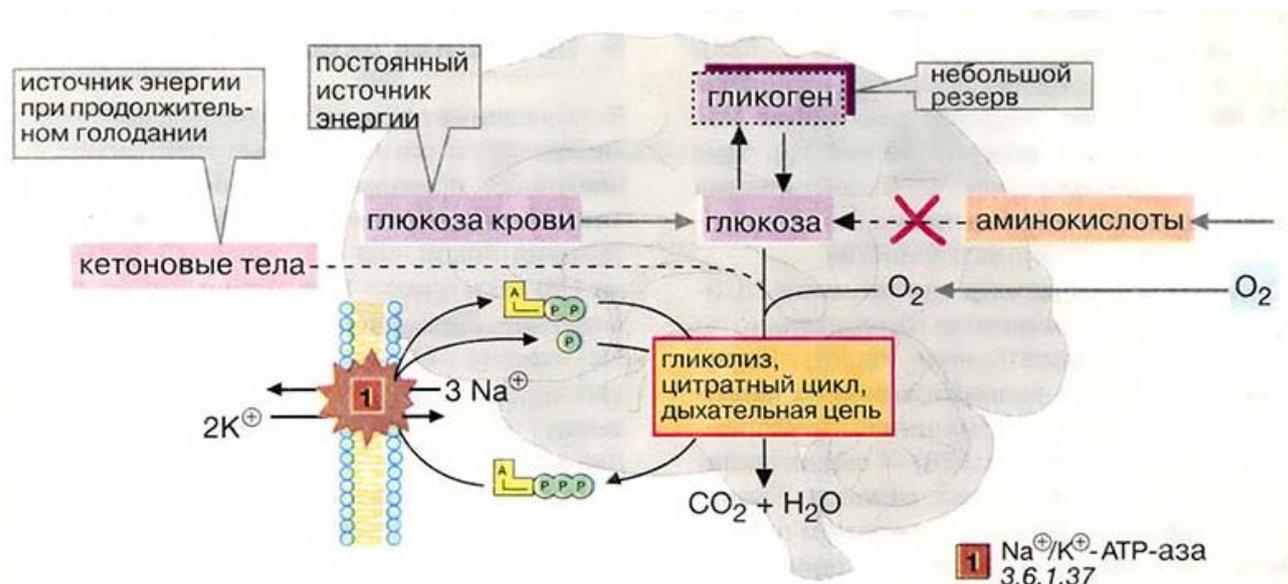


Рис. 2 Распределение энергии в клетках центральной нервной системы (Нейрохимия под ред. Болдырев А.А, 2010)

Наркотические вещества угнетают в мозге главным образом окисление глюкозы, молочной кислоты и пировиноградной кислоты, совершенно не действуя, например, на окисление янтарной кислоты. Это угнетение приводит к понижению функциональной активности нервной ткани. Вот почему понижение нервной деятельности во время наркоза или сна сопровождается уменьшением потребления глюкозы мозгом. Наоборот, при возбуждении центральной нервной системы глюкоза, доставляемая кровью, задерживается и окисляется мозгом в повышенном количестве.

Кроме энергии, глюкоза обеспечивает субстратами процессы биосинтеза медиаторов, аминокислот, липидов, нуклеиновых кислот. Такими субстратами являются промежуточные продукты гликолиза, ацетил-КоА, α -кетокислот цикла Кребса, метаболиты пентозофосфатного цикла (рибоза-5-фосфат и НАДФН).

В нервной ткани происходит интенсивный синтез жирных кислот, сложных липидов (глицерофосфолипидов, сфингомиелина, гликолипидов), холестерина. Синтез цереброзидов и сульфатидов активнее в период миелинизации, а синтез ганглиозидов - при дифференциации нейронов.

Расчеты, проведенные на основании многочисленных экспериментов с глюкозой, содержащей ^{14}C в различных положениях углеродной цепи, показывают, что около 85-90% глюкозы, потребляемой мозгом взрослого животного, полностью окисляется до CO_2 и H_2O ; около 5% расходуется в реакциях гликолиза с образованием молочной кислоты и лишь 5-7% используется в других реакциях (синтез гликогена, синтез керамидной части гликолипидов и гликопротеидов, нейротрансмиттеров и др.). В некоторых случаях, например в экспериментах на мелких лабораторных животных (белые крысы, мыши) с использованием введенной интрацестернально глюкозы ^{14}C , показана возможность полного 100% окисления этого субстрата до CO_2 и H_2O .

Вопросы для самоконтроля:

1. Опишите основные источники энергии в головном мозге.
2. Укажите физиологическую норму концентрации глюкозы в ткани головного мозга.
3. Опишите транспортные системы глюкозы в ЦНС.
4. Участником, каких неэнергетических процессов является в головном мозге глюкоза.

Лабораторная работа №1. Приготовление ткани головного мозга для определения субстратов

С целью максимально быстрой фиксации ткани для прекращения метаболических реакций и сохранения уровня субстратов применялся метод замораживания мозга с помощью жидкого азота.

Замороженные полушария головного мозга гомогенизировались в фарфоровой ступке, охлажденной жидким азотом. Далее гомогенат депротеинизировали 5% раствором хлорной кислоты (HClO_4).

Тканевой экстракт для определения глюкозы, пирувата и лактата готовили из расчета: 2 г ткани на 6,5 мл HClO_4 . Выдерживали на холоде в течение 15 минут и производили центрифугирование при 3000 g 15 минут.

Получившийся супернатант переносили во взвешенную заранее охлажденную центрифужную пробирку (m_1). Определяли массу пробирки с супернатантом (m_2). Производили нейтрализацию хлорной кислоты 69% раствором углекислого калия (K_2CO_3), доводя рН до 7,0 (рН определяли при помощи универсальной индикаторной бумаги). Определяли массу пробирок с измененной рН (m_3).

Для осаждения перхлоратов калия пробирку оставляли на холоде на 10 минут, затем центрифугировали при 3000 g 5 минут. Надосадочную жидкость сливали в чистую пробирку. Количественное содержание субстратов в ткани мозга выражалось в мкмоль исследуемого вещества на 1 г влажной ткани (мкмоль/г).

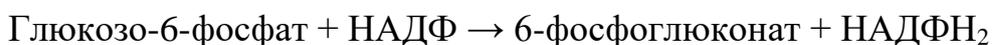
Лабораторная работа №2. Количественное определение глюкозы в ткани мозга и цельной крови экспериментальных животных

Цель работы- сравнить уровень глюкозы в ткани мозга и цельной крови экспериментальных животных.

Работа №1. Определение глюкозы в головном мозге проводили энзиматическим методом по Кочетову Г.А. (1980).

Принцип метода:

Глюкоза в присутствии АТФ и гексокиназы фосфорилируется в глюкозо-6-фосфат. Добавление глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы вызывает окисление глюкозо-6-фосфата с образованием эквивалентных количеств восстановленной формы НАДФ. Количество глюкозы в исследуемой пробе эквивалентно количеству восстановившегося НАДФ.



Изменение оптической плотности раствора в кювете определяется спектрофотометрически при 340 нм.

Ход определения:

В спектрофотометрическую кювету вносили 2 мл 0,2М Трис-буфера (рН 7,0), 0,75 мл 0,017М $MgCl_2$, 0,1 мл 5 мМ НАДФ, 0,05 мл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (0,4МЕ/мин), 0,09 мл 0,08 М АТФ (рН 7,0). Добавляли 0,1 мл исследуемого образца (тканевого экстракта), перемешивали и измеряли оптическую плотность (E_1) при длине волны 340 нм. Затем

добавляли 0,1 мл гексокиназы (0,4МЕ/мин), перемешивали и оставляли на 10 минут при комнатной температуре, затем снова измеряли оптическую плотность (E_2).

Расчет концентрации:

$$M_{\text{глю}} = \Delta E * V * K / 6,22; K = (m_0 + 3,3) * (m_3 - m_1) / m_0 - (m_2 - m_1); \text{ где}$$

M - концентрация субстрата в мкмоль/г влажной ткани;

ΔE - разница экстинкции от начала и до полного окончания реакции;

V - объём пробы, мл;

6,22 – коэффициент микромолярной экстинкции восстановленной формы пиридиннуклеотидов;

K – коэффициент разведения по отношению к 1 г ткани;

m_0 - объём ткани для анализа,

m_1 - масса стеклянной пробирки,

m_2 - масса пробирки с фильтратом,

m_3 - масса пробирки после нейтрализации.

Работа №2. Определение глюкозы в цельной крови проводили энзиматическим колориметрическим методом с депротеинизацией с использованием диагностических наборов фирмы «Vital» (страна производитель - Россия).

Принцип метода:

При окислении β -D-глюкозы кислородом воздуха под действием глюкозооксидазы образуется эквимольное количество перекиси водорода. Под действием пероксидазы перекись водорода окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного продукта, который регистрируется при длине волны 510 нм. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации глюкозы в пробе.

Сделать вывод о разнице концентраций глюкозы в ткани мозга и цельной крови животного.

Тема № 2. Отличительные особенности метаболизма глюкозы в нейронах и глиальных клетках

Масса головного мозга взрослого человека составляет около 2 % массы тела, доля потребления поступающего в организм кислорода достигает 20–25 %. Установлены существенные различия в потреблении кислорода разными типами клеток мозга.

В среднем потребление кислорода нейронами протекает в 4–5 раз активнее, чем глиальными клетками. Установлены также различия в интенсивности протекания окислительных процессов в отдельных компартментах одного и того же нейрона: больше кислорода потребляют структуры, локализованные в области перикариона и в синаптических окончаниях.

В эндотелиальных клетках сосудов, астроцитах работает в широких пределах концентрации глюкозы в крови (2,75–16,50 мкмоль/мл) активный транспортер **ГЛЮТ1**. Количество этого белка-переносчика увеличивается с возрастом параллельно усилению функциональной активности мозга. Мутации гена, кодирующего глюкозный транспортер **ГЛЮТ1**, приводят к развитию тяжелой форм инфантильной эпилепсии.

Астроциты и нейроны сообщаются друг с другом, объединяясь в комплекс, «перерабатывающий» глюкозу. Астроциты первыми захватывают глюкозу, которую им поставляет **GLUT1**. Транспорт астроцитами нейротрансмиттеров и глюкозы определяет состав экстрацеллюлярной жидкости, омывающей нейроны. Они прямым образом влияют на электрическую активность нейронов и на их чувствительность к глюкозе.

Особенностью гликолиза нейронов является подавленная активность фермента фосфоглюкокиназа. Этот фермент катализирует необратимую (с гидролизом АТФ) реакцию фосфорилирования фруктозы-6-фосфата до фруктозы-1,6-бифосфата. Образование фруктозы-1,6-бифосфата – это committed step на метаболической развилке между пируватом и пентозо-фосфатным путём.

Получаем, что нейроны функционально блокируют образование пирувата из глюкозы, а вместо этого пускают глюкозу через пентозофосфатный путь на пуриновый метаболизм и нахождение в восстановленном состоянии.

Напротив, астроциты окисляют глюкозу и удовлетворяют энергетический дефицит нейронов в форме молочной кислоты, которая может «перемещаться» в нейроны cell-to-cell. Восстановление пирувата до лактата осуществляет изомер лактат дегидрогеназы (LDH-5), который доминирует в астроцитах, а в нейронах доминирует изомер фермента (LDH-1), который связан в большей степени с утилизацией лактата и образованием пирувата и окислением его в дальнейшем в цикле Кребса.

Поступление глюкозы в мозг и ее потребление клетками глии напрямую зависит от активности нейронов. Глюкоза необходима не только для того, чтобы обеспечить энергетические потребности, но и для синтеза нейромедиаторов, например глицина, глутаминовой кислоты и гаммааминомасляной кислоты (ГАМК).

Астроциты группируются около синаптических контактов, где располагаются рецепторы. Глутамат стимулирует захват глюкозы астроцитами, в котором участвуют транспортные белки, специфические к глутамату. Глутамат-опосредованное возбуждение снижает аффинитивность глюкозе GLUT3 (нейроны) и повышает аффинитивность глюкозе GLUT1 (астроциты). Глиоциты быстро забирают глутамат после его высвобождения из синапсов и работают благодаря электрохимическому градиенту Na^+ . Натрий-зависимый захват глутамата астроцитами запускает каскад молекулярных событий, в котором участвует Na^+/K^+ -АТФаза (энергозависимый процесс). Внутри клеток глюкоза гликолитически расщепляется и образуется лактат, который высвобождается из астроцитов. На перенос одной молекулы глутамата требуется три атома натрия, при этом входит одна молекула глюкозы, две молекулы АТФ синтезируются в результате анаэробного гликолиза и высвобождаются две молекулы лактата.

В астроците одна молекула АТФ расходуется на один оборот мембранной протонной помпы, а вторая потребляется при превращении глутамата в глутамин ферментом глутаминсинтетазой. Показано, что даже в аэробных условиях лактат – предпочтительный энергетический субстрат, который используют нейроны. В присутствии кислорода лактат превращается в пируват, который поступает в митохондрию и в цикл трикарбоновых кислот (ацетат). При сгорании одной молекулы лактата генерируется 17 молекул АТФ. Это означает, что при активации мозг временно прогоняет глюкозу через астроциты, где проходит гликолиз, а затем окисляет лактат в нейронах с использованием кислорода. Захват глюкозы стимулируется увеличением активности нейронов.

Астроциты забирают глутамат из синаптической щели, он метаболизирует в глутамин (глутаминсинтетаза). Затем они отдают глутамин нейронам, которые вновь делают из него глутамат или ГАМК (фермент глутаматдекарбоксилаза). Переносчик глутамата GLT1 экспрессируется преимущественно в астроцитах, а глиальный высокоаффинный переносчик глутамата (GLAST) – как в астроцитах, так и в других клетках глии. Накопление глутамата в экстрацеллюлярном пространстве делает его токсичным. Контроль за экстрацеллюлярными концентрациями глутамата и ГАМК – одна из фундаментальных функций клеток глии. Баланс концентраций этих двух нейротрансмиттеров – решающий, он характеризует активность метаболических процессов.

Вопросы для самоконтроля:

1. Гликолитическое расщепление глюкозы в нейронах и клетках глии. Показать особенности с помощью уравнений реакций.
2. Лактатный шаттл астроцитов.
3. Гексокиназная реакция. Ее значение в окислении глюкозы головным мозгом. Ингибиторы и активаторы данной реакции.
4. Нарисовать схему взаимопревращения глутамат-глутамин и обосновать участие в этом процессе молекулы глюкозы.

Лабораторная работа №3. Определение активности фермента гексокиназы, лимитирующего фактора гликолиза в клетках головного мозга.

Активность гексокиназы (ГК, КФ 2.7.1.1) определяли спектрофотометрически по увеличению светопоглощения при 340 нм и 37°C при восстановлении НАДФ.

Реакции имели вид:



Приготовление гомогената из тканей лабораторного животного:

Ткани для приготовления гомогената извлекают тотчас после декапитации животного. Все операции следует проводить при температуре не выше +4о С. Навески тканей: головной мозг (500 мг), печень (250 мг), сердце (500 мг), скелетные мышцы (500 мг), тщательно измельчают ножницами и переносят в стакан гомогенизатора. Навеску ткани гомогенизируют 1–2 мин в 7 объёмах охлаждённого фосфатного буфера. Гомогенат центрифугируют (с охлаждением до +4о С) 10 мин при 600 g для осаждения неразрушенных клеток и ядерной фракции. Супернатант используют в качестве источника гликолитических ферментов. Для получения безмитохондриальной фракции первоначальный гомогенат центрифугируют 10 мин (с охлаждением до +4о С) при 10000 g.

Ход определения: Реакционная среда состояла из 50 мМ Трис-НСl буфера, рН 8,0, содержащего 10 мМ MgCl₂, 1 мМ НАДФ, 2 мМ АТФ, 20 мМ глюкозу и супернатант исследуемой ткани 500 мкл. Реакцию запускали добавлением Г6ФДГ (12,5 мкг/мл). За единицу активности фермента принимали количество белка, катализирующее перенос 1 мкмолья фосфата с АТФ на глюкозу.

Количество белка определяли по методу Бредфорда.

Лабораторная работа №4. Определение концентрации белка в гомогенате головного мозга методом М.М. Bradford (1976).

Принцип метода: Метод основан на сдвиге спектра поглощения кумасси (COOMASSIE BLUE) в сторону значений 595 нм прямо пропорционально концентрации содержащегося в растворе белка. Кумасси образует комплекс с белком; этот комплекс измеряют при длине волны 595 нм. Абсорбционная фотометрия комплекса кумасси/белок имеет очень высокую чувствительность и эффективна даже в случае следовых концентраций белков.

Реагент (Брэдфорд): 100 мг Кумасси G-250 растворить в 50 мл спирта и добавить 100 мл ортофосфорной кислоты, довести до 1 л водой и профильтровать через бумажный фильтр.

Внимание! реагент очень чувствителен к белку (1-2 μ g/ml). Все должно быть абсолютно чистым и посуда и бумажный фильтр и кюветы и руки, иначе раствор посинеет и его можно будет вылить. Чистый раствор Брэдфорда имеет коричневый цвет и синее при наличии белка.

Ход определения:

Смешать 0,5 мл полученного гомогената с 0,5 мл реагента Брэдфорда. Через 10 минут измерить оптическую плотность раствора (D) на ФЭКе при 595 нм против контрольного раствора (0,5 мл фосфатного буфера и 0,5 мл красителя). Концентрация белка определялась путем сравнения полученного значения D с калибровочной кривой. Калибровочный график строится по значениям оптических плотностей, полученных для известных концентраций альбумина.

Тема № 3. Мембранный транспорт глюкозы

Глюкоза не растворяется в липидах, поэтому не может преодолеть ГЭБ путем простой диффузии. Глюкоза в клетки попадает в основном пассивно через специальные транспортеры (GLUT). Пассивный транспорт означает, что глюкоза может попадать из области с большей концентрации в меньшую. Гексокиназа очень быстро фосфорилирует глюкозу при попадании в клетку. Вследствие этого снаружи глюкозы всегда больше, чем внутри клетки, что необходимо для пассивного транспорта глюкозы в цитозоль.

Для ее переноса необходимы специальные транспортные белки. В мозге находят 4 типа переносчиков глюкозы: GLUT1, GLUT2, GLUT3 и GLUT4 (рис. 3).

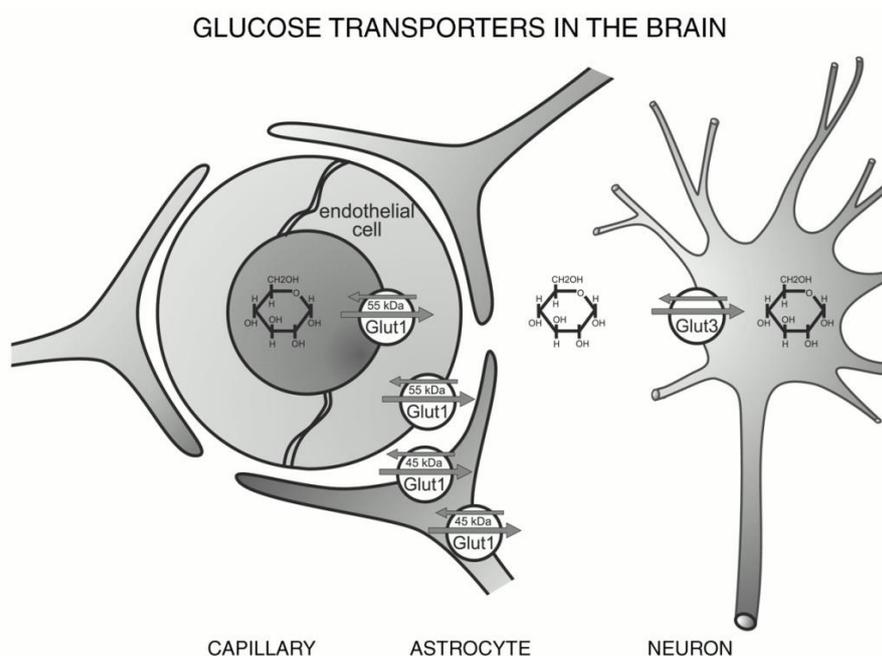


Рис. 3 Переносчики глюкозы

(<http://usmle.biochemistryformedics.com/glucose-transporter-1glut-1,3>).

GLUT1 – основной переносчик, который забирает глюкозу с люминального слоя ГЭБ. В этом процессе инсулин не участвует. Инсулиннечувствительный GLUT1 характеризуется высокой структурной

консервативностью. Так, GLUT1 человека на 97-98% гомологичен GLUT1 крысы, мыши, кролика и свиньи.

GLUT1 и его мРНК обнаруживаются во всех отделах как взрослого, так и развивающегося мозга. Его 45 кДа изоформа обнаружена в кортикальных мембранах, нечувствительных к гипо- и гипергликемии. Изоформа 55 кДа, уровень которой повышается при гипогликемии и не изменяется при гипергликемии, локализуется в ГЭБ. Концентрация глюкозы, при которой транспорт достигает 50% от максимума (Км), составляет 20 мМ.

Много GLUT1 в эритроцитах, куда глюкоза поступает также без участия инсулина. Возможно, в эритроцитах, поджелудочной железе и в мозге существует один механизм транспорта глюкозы, который не стимулируется инсулином. В ГЭБ в переносе глюкозы от люминальной мембраны к аблюминальной участвуют несколько типов GLUT. Когда глюкозы в крови мало, количество GLUT1 в эпителиальных клетках ГЭБ увеличивается. Это компенсаторная реакция для поддержания работы мозга в условиях дефицита его основного энергетического субстрата. Когда глюкозы в крови много, число GLUT1 остается прежним, и это – причина катастроф, связанных с острой гипергликемией, и нейродегенеративных процессов, обусловленных хронической гипергликемией. Хроническая гипергликемия может быть одной из причин развития болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных процессов.

GLUT2 — белок-переносчик глюкозы, осуществляющий перенос глюкозы через клеточную мембрану посредством облегченной диффузии. Это основной переносчик глюкозы между печенью и кровью, также он принимает участие в почечной реабсорбции глюкозы. Также способен переносить фруктозу. GLUT2, в отличие от GLUT4, не регулируется инсулином. GLUT2 присутствует в клеточных мембранах следующих тканей: печень, поджелудочная железа (бета-клетки), гипоталамус (незначительно), базолатеральная и апикальная мембраны тонкой кишки, клетки почечных канальцев. GLUT2 имеет высокую глюкозную ёмкость, но низкую

аффинность (сродство) к ней, и поэтому функционирует как часть «глюкозного сенсора» в β -клетках поджелудочной железы. Является очень эффективным переносчиком глюкозы. GLUT2 также является переносчиком глюкозамина.

GLUT3 работает в нейронах по всему мозгу. Он присутствует в клетках, которым необходимо быстро поглотить большое количество глюкозы. В мозге такие клетки – активно работающие нейроны. Инсулиннечувствительный GLUT3 — основной глюкозный транспортер нейронов взрослого мозга, обнаружен также в глиальных и эндотелиальных клетках мозга. GLUT3 обладает более высоким сродством к глюкозе ($K_m \sim 10$ мМ), что существенно, поскольку уровень глюкозы в межклеточном мозговом пространстве (интерстиции) ниже, чем в плазме крови.

GLUT3, по-видимому, специфичен для нейронов, так как он был обнаружен в других клетках (сердце, печень) лишь в следовых количествах и совсем не обнаружен в скелетной мышце. Правда, сердце предпочитает использовать в качестве субстрата энергии жирные кислоты, а печень и мышца потребляют глюкозу при стимуляции инсулином. Нейронам такая стимуляция не требуется.

Тем не менее, в мозге есть отделы, которые контролируют потребление энергии в этом органе. В клетках мозга обнаружен чувствительный к инсулину переносчик **GLUT4**. Инсулинчувствительный GLUT4 имеет преимущественно внутриклеточную локализацию и высокую чувствительность к глюкозе ($K_m \sim 3$ мМ). В ответ на инсулин везикулы, содержащие GLUT4, подвергаются немедленному экзоцитозу. Высокий уровень этого транспортера отмечен в мозжечке, обонятельных луковицах, гиппокампе, наименьший — в латеральном гипоталамусе, аркуатных ядрах и больших полушариях. Однако остается неясным, задействован GLUT4 в нейрональной инсулиновой сигнальной системе или в чувствительных к глюкозе механизмах, лежащих в основе регуляции потребления пищи и веса тела.

Задания для самоконтроля:

1. Подготовить сообщения – презентации по теме «Транспортеры глюкозы в головном мозге».

2. Заполнить таблицу:

| свойство | GLUT1 | GLUT2 | GLUT3 | GLUT4 |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|
| орган | | | | |
| потребность в глюкозе | | | | |
| Аффинитивность глюкозе | | | | |
| Дополнительные комментарии | | | | |

3. Инсулин как нейромодулятор.

Заключение

Метаболизм глюкозы тесно связан с физиологией и функционированием мозга. Опубликованные исследования указывают на сложную регуляцию биохимических, клеточных и системных путей, многие особенности точной регуляции остаются спорными или неуловимыми.

Появление новых и усовершенствованных биохимических или генетических инструментов, методов скрининга, технологий визуализации и системного анализа позволит изучать клеточные, субклеточные и даже биохимические механизмы в клетке или *in vivo* с беспрецедентным временным и пространственным разрешением.

Помимо изучения отдельных биохимических или клеточных путей и их контроля над внутриклеточными сигнальными каскадами (например, запрограммированной гибелью клеток), периферическим гомеостазом или активностью мозга, будущие задачи исследований заключаются в интеграции полученных знаний для формирования более глубокого понимания взаимосвязи между различными системами и типами клеток. В конечном счете, глубокое понимание этих механизмов приведет к лучшему пониманию патофизиологии множества различных заболеваний головного мозга и позволит разработать новые стратегии лечения.

Список литературы

1. Нейрохимия учеб.пособие для вузов//А.А.Болдырев, Н.Д.Ещенко, В.А. Илюха, Е.И.Кяйвярайнен;науч.ред Ю.А. Владимиров.-М:Дрофа,2010.- 398 с.
2. Нейрохимия:Учебник для биологических и медицинских вузов/ под ред. акад. РАМН И.П. Ашмарина и проф. Стукалова.- М:Изд.Института биомедицинской химии РАМН, 1996, 470 с.
3. Нейрохимия. Основы и принцип./Ф.Хухо .-М:Мир, 1990.
4. Кольман Я., Рем К. Наглядная биохимия. - М.: Мир, 2000. - 469 с.
5. Камкин А.Г. Физиология и молекулярная биология мембран клеток: учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений. - М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 592 с.
6. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. - М.: Медицина, 2001. - 328с.
7. Ковалева А.В. НЕЙРОФИЗИОЛОГИЯ: учебник для академического бакалавриата / А. В. Ковалева. — Москва : Издательство Юрайт, 2018. — 186 с.
8. Арефьева, А. В. Нейрофизиология : учебное пособие для вузов / А. В. Арефьева, Н. Н. Гребнева. — Москва : Издательство Юрайт, 2019. — 189 с.
9. Николлс Д.Г., Мартин А.Р., Валлас Б. Дж., Фукс П.А. От нейрона к мозгу. – М., Изд-во «Едиториал УРСС», 2012. – 672с.
- 10.Sokoloff L. Energetics of functional activation in neural tissues. *Neurochem Res.* 1999;24:321–329.
- 11.Simpson IA, et al. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27:1766–1791.
- 12.Gandhi GK, et al. Astrocytes are poised for lactate trafficking and release from activated brain and for supply of glucose to neurons. *Journal of neurochemistry.* 2009;111:522–536.

13. Dienel GA. Brain lactate metabolism: the discoveries and the controversies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32:1107–1138.
14. Dienel GA. Astrocytic energetics during excitatory neurotransmission: What are contributions of glutamate oxidation and glycolysis? *Neurochem Int.* 2013 in press, DOI: 10.1016/j.neuint.2013.1006.1015.
15. Attwell D, et al. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature.* 2010;468:232–243.
16. Vafaei MS, et al. Oxygen consumption and blood flow coupling in human motor cortex during intense finger tapping: implication for a role of lactate. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32:1859–1868.
17. Gordon GR, et al. Bidirectional control of arteriole diameter by astrocytes. *Exp Physiol.* 2011;96:393–399.
18. Wolf T, et al. Excessive oxygen or glucose supply does not alter the blood flow response to somatosensory stimulation or spreading depression in rats. *Brain Res.* 1997;761:290–299.
19. Nehlig A. Cerebral energy metabolism, glucose transport and blood flow: changes with maturation and adaptation to hypoglycaemia. *Diabetes Metab.* 1997;23:18–29.
20. Grayson BE, et al. Wired on sugar: the role of the CNS in the regulation of glucose homeostasis. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14:24–37.
21. Grill HJ, Hayes MR. Hindbrain neurons as an essential hub in the neuroanatomically distributed control of energy balance. *Cell Metab.* 2012;16:296–309.
22. <http://usmle.biochemistryformedics.com/glucose-transporter-1glut-1,3>.

Наталья Александровна Щелчкова

**ОСОБЕННОСТИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ
ГОЛОВНОГО МОЗГА.
БИОХИМИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ.**

Учебно-методическое пособие

Федеральное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского»
603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

Подписано в печать . Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура Таймс.
Усл. печ. л. . Уч.-изд 500 экз.

Отпечатано в типографии Нижегородского госуниверситета
им. Н.И. Лобачевского
603600, г. Нижний Новгород, ул. Большая Покровская, 37
Лицензия ПД № 18-0099 от 14.05.01