

- [5] Чуркин А.А., Мартынов А.И. Краткое руководство по использованию МКБ-10 в психиатрии и наркологии. М: Трида-Х, 2000, 232 с.
- [6] Arakelyan A., Boyajyan A., Poghosyan A., Mayilyan K., Aivazyan V., Avetisyan G., Hovsepian M., Mkrtchyan G. The application package under MATLAB 5.0 environment for molecular weight analysis of the main protein components of circulating immune complexes, isolated from the blood of patients with stroke. - Proc. 9th annual conf. "Electron microscopy-2000", Yerevan, p. 20-21.
- [7] Arinami T., Otsuka Y., Hamahuchi H., Itokawa M., Aoki J., Shimizu H., Okubo Y., Iwawaki A., Ota K., Enguchi H., Tagaya H., Yano S., Shimizu H., Toru M. Evidence supporting an association between DRB1 gene and schizophrenia in Japanese. - Schizophr. Res. 1998, v.32, N.2, p.81-86.
- [8] Bakunts H.O., Boyajyan A.S., Poghosyan A.G., Asatryan N.T., Arakelyan A.A., Eryan L.K. Investigation of circulating immune complexes in patients with cerebrovascular disorders. Bulletin of the International Academy of Sciences "Ecology and Safety of Vital Functions". 1999, N.7 (19) 2, p. 141-144.
- [9] Digeon M., Laver M., Riza J., Bach J.F. Detection of circulating immune complexes in human aorta by simplified assays with polyethylene glycol. - J. Immunol. Methods, 1977, v. 16, N. 2, p. 165-183.
- [10] Hawi Z., Gibson S., Straub R.E., Walsh D., Kendler K.S., Gill M. Schizophrenia and HLA: No association with PCR-SSOP typed classical loci in a large Irish familial sample. - Am. J. Med. Genet., 1999, v. 88, N. 4, p. 422-429.
- [11] Jacobsen L.K., Mittleman B.B., Kumra S., Lenane M.C., Barracchini K.C., Adams S., Simonis T., Lee P.R., Long R.T., Sharp W., Sidransky E., Ginn E.I., Rapoport J.L. HLA antigens in childhood onset schizophrenia. - Psychiatry Res., 1998, v. 78, N. 3, p. 123-132.
- [12] Jonsson E.G., Zhang F., Ningaonkar V.L., Rudert W.A., Sedvall G.C. Lack of association between schizophrenia and HLA DQB1 alleles in a Swedish sample. - Schizophr. Res., 1998, v. 29, N. 3, p. 293-296.
- [13] Madan T., Banerjee B., Bhatnagar P.K., Shah A., Sarma P.U. Identification of 45 kD antigen in immune complexes of patients of allergic bronchopulmonary aspergillosis. - Mol. Cell. Biochem., 1997, v. 166, N. 1-2, p. 111-116.
- [14] Mkrtchyan G., Hovsepian M., Arakelyan A., Boyajyan A., Karageuzyan K., Harutyunyan V., Hakobyan G. The studies of the indices of neuro-immune status in patients with FMF. - Abstract of "Familial Mediterranean Fever" II. International Conference, Antalya - Turkey, 3-7 May, 2000, p. 94.
- [15] Muller N., Riedel M., Ackenheil M., Schwarz M.J. The role of immune function in schizophrenia: an overview. - Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci., 1999, v. 249, N. 4 (Suppl.), p. 62-68.
- [16] Ningaonkar V.L., Rudert W.A., Zhang X.R., Trucco M., Ganguli R. Negative association of schizophrenia with HLA DQB1*0602: evidence from a second African-American cohort. - Schizophr. Res., 1997, v. 23, N. 1, p. 81-86.
- [17] Procaccia S., Lanzanova D., Caputo D., Ferrante P., Papini E., Gasparini A., Colucci A., Bianchi M., Villa P., Blasio R., et al. Circulating immune complexes in serum and in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. Characterization and correlation with the clinical course. - Acta Neurol. Scand., 1988, v. 77, N. 5, p. 373-381.
- [18] Sasaki T., Matsushita M., Nanko S., Fukuda R., Kennedy J.L., Tokunaga K. Schizophrenia and the HLA-DRB1 gene in the Japanese population. - Am. J. Psychiatry, 1999, v. 156, N. 6, p. 771-773.
- [19] Weber K. and Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. - J. Biol. Chem., 1969, v. 244, N. 6, p. 4406-4412.
- [20] Wiesmann M., Wandinger K.P., Missler U., Eckhoff D., Rothermundt M., Arolt V., Kirchner H. Elevated plasma levels of S-100b protein in schizophrenic patients. - Biol. Psychiatry, 1999, v. 45, N. 11, p. 1508-1511.

РЕГУЛЯЦИЯ ФОСФАТИВИРУЕМОЙ ГЛУТАМИНАЗЫ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА КРЫСЫ

Амбарцумян Д.

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА

Изучен гидролиз глутамин в митохондриальной фракции коры мозга белых крыс. Показано, что утилизация глутамин в основном обусловлена действием фосфатактивированной глутаминазы (ФАГ). Активность ФАГ по выходу аммиака превышает таковую по выходу глутамата, что объясняется утилизацией последнего в митохондриях. Пиридоксальфосфат (ПФ) активизирует ФАГ в несколько раз большей степени, чем фосфат. Аддитивности в действии активаторов не наблюдается. Лейцин не оказывает достоверно значимого влияния на активность ФАГ, тогда как таурин вызывает усиление выхода по аммиаку, подавляя таковую по глутамату.

Համարժեքային Դ., Ամենտի ուղեղի ֆոսֆատով ակտիվացվող գլյուտամինազայի կարգավորումը: Ամենտախիլիզ է գլյուտամինի հիդրոլիզը սպիտակ առնետի ուղեղի կեղևի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում: Ցույց է տրվել, որ գլյուտամինի յուրացումը հիմնականում պայմանավորված է ֆոսֆատով ակտիվացվող գլյուտամինազայով (ՖԱԳ): Ֆերմենտի ակտիվությունը ըստ առնետիայի ելքի գերազանցում է ալոսիսին ըստ գլյուտամինազայի ելքի, ինչը րազատվում է փոքրիկ յուրացմամբ միտոքոնդրիումների կողմից: Պիրիդոքսալֆոսֆատը ակտիվացնում է ՖԱԳ-ն ֆոսֆատից մի փոքր ավելի արտախալոված աստիճանով, սակայն նրանց ազդեցությունը չի գտնարվում: Լեյցինը ընդգծված ազդեցություն չի գործում ՖԱԳ-ի ակտիվության վրա, այն դեպքում, երբ տաուրինը ուժեղացնում է առնետիայի արտախալումը և խեղցնում գլյուտամինազայի ելքը:

Hambardzumyan D. Regulation of phosphate-activated glutaminase in rat brain mitochondria. The hydrolysis of glutamine in mitochondrial fraction of brain crust was made in the white rats. It is shown that utilization of glutamine is mainly caused by action of phosphate-activated glutaminase (PAG). Activity of PAG in terms of ammonium output exceeds that in terms of glutamate output what ensues from the latter's utilization in mitochondria. Pyridoxalphosphate (PP) activates PAG in a stronger matter than phosphate does. There is no additive effect in activators. Leucin does not affect significantly the activity of PAG, whereas taurin accelerates the ammonium output and depresses the glutamate output.

ВВЕДЕНИЕ. Обмен глутамин в мозговой ткани изучен достаточно хорошо [1-7], но ряд вопросов, касающихся его роли как источника нейромедиаторных аминокислот [7], субстрата окисления в нейрональных [8, 9] и иммунокомпетентных клетках [10], продолжает оставаться в центре внимания исследователей. Гидролиз глутамин в мозге с образованием глутамата и аммиака осуществляется фосфатактивированной глутаминазой (ФАГ), локализованной в наружной стенке внутренней митохондриальной мембраны [7, 11]. Такая локализация позволяет ферменту выполнять роль посредника между медиаторным и метаболическим пулами глутамата. Показано, что добавление ¹⁴C-глутамин к инкубируемому в фосфатном буфере митохондриям сопровождается накоплением меченого глутамата в инкубационной среде и лишь незначительное количество метки проникает в митохондриальный матрикс [5, 7]. Авторы полагают, что роль ФАГ заключается в поставке глутамата в нейромедиаторный пул. Вместе с тем данные, полученные в нашей лаборатории, свидетельствуют о возможности использования глутамин в качестве энергетического субстрата [8]. Следовательно, глутамин или образующийся из него глутамат могут проникать в

митохондрии, обеспечивая определенный уровень дыхания и, возможно, поставляя аммиак для генерации внутримитохондриального глутамата, запасаемого в качестве альтернативного субстрата дыхания. Подобная поставка аммиака глутамином гепатоцитам обеспечивает работу цикла мочевины [12]. Известно, что в митохондриях гепатоцитов имеется параллелизм между процессами синтеза мочевины, окисления ацил-СoА, синтезом цитрулина, активностью ФАГ и окислительным фосфорилированием [13]. Поскольку в мозге отсутствуют митохондриальные этапы синтеза мочевины, то поставка аммиака в них сопряжена с регуляцией интенсивности оборотов трикарбонового цикла и запасанием глутамата в них. Таким образом, изучение регуляции активности ФАГ как механизма, контролирующего соответствие между нейрональным и метаболическим путями глутамата, представляет несомненный интерес, чему и посвящено настоящее исследование.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Опыты проведены на белых крысах-самцах весом 150-180г, содержащихся в условиях вивария Института биохимии НАН РА. Животных забивали под легким эфирным наркозом, быстро извлекали мозг, промывали охлажденным 0,3М раствором Трис-сахарозы, pH=7,0, быстро удаляли мозговые оболочки с кровеносными сосудами, отделяли кору больших полушарий, взвешивали и гомогенизировали в 9-кратном объеме Трис-сахарозы. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования в 0,3М Трис-сахарозе [14]. Инкубацию митохондриальных препаратов проводили в 0,05 М Трис-HCl буфере, pH=8,6, содержащем 0,05М KH_2PO_4 , 1,2М MgSO_4 , 2,6М CaCl_2 , в течение 40 мин при 37°C. В отдельные пробы добавляли Na_2HPO_4 - 10мМ, пиридоксальфосфат (ПФ) - 5мМ, лейцин - 10мМ, таурин - 10мМ. Инкубационную смесь доводили до 1мл 0,05М Трис-HCl буфером. Реакцию останавливали добавлением 2,5% ТХУ в конечной концентрации. Приводится конечная концентрация всех реагентов. После удаления ТХУ из проб экстракцией этиловым эфиром в пробах определяли аммиак (15) и глутамат [16]. Белок митохондрий определяли методом Лоури [17]. Данные подвергнуты статистической обработке с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В табл. 1 приведены результаты определения аммиака и глутамата при инкубации митохондриальной фракции коры мозга крыс с известными и возможными эффекторами ФАГ в присутствии глутамин.

Таблица 1. Гидролиз глутамин в митохондриальной фракции коры мозга крысы (нМ/мин/мг белка)

Добавки	Выход аммиака	Выход глутамата
Глутамин (ГН)	33,00 ± 5,25	19,50 ± 1,50
ГН + Фосфат (Ф)	98,00 ± 9,50 *	71,50 ± 2,00 *
ГН + ПФ	115,00 ± 11,00 *	78,00 ± 2,25 *
ГН + Ф + ПФ	96,25 ± 6,50	75,50 ± 1,50
ГН + Ф + лейцин	114,00 ± 16,75	74,25 ± 4,00
ГН + Ф + таурин	122,50 ± 9,25 **	54,00 ± 6,50 **
ГН + Ф + ДОН	71,25 ± 6,00	38,00 ± 2,50

Состав инкубационной среды: все реактивы приготовлены на 0,05 М Трис-HCl буфере pH 8,6, содержащем 0,05 мМ Na_2HPO_4 . Все пробы содержали 10мМ глутамин в конечной концентрации. В отдельные пробы добавляли по 10мМ Na_2HPO_4 , таурин и лейцин, по 5мМ ПФ и ДОН. Достоверные сдвиги отмечены звездочкой: * - в сравнении с ГН, ** - в сравнении с ГН + Ф.

Из данных таблицы видно, что не отмечается соответствия в продукции аммиака и глутамата из глутамин, что объясняется, скорее всего, утилизацией образующегося глутамата в реакциях трансаминирования и декарбоксилирования, протекающих в грубых митохондриальных препаратах мозга. Не исключена также генерация аммиака, минуя глутаминазную реакцию, путем прямого декарбоксилирования глутамин и спонтанного дезамидирования образующегося амида ГАМК [18, 19]. Представляет интерес факт активации ФАГ ПФ-ом, которая несколько превышает вызываемую фосфатом. Обусловлено ли это ассоциацией Трис-формы фермента, как в случае фосфата, или другим механизмом, остается неясным. Скорее всего механизм действия аналогичен, поскольку совместное добавление не усиливает эффект активации. Исходя из интенсивности активации при раздельном и совместном применении ПФ и фосфата, можно полагать большее сродство последнего к ФАГ. Поскольку в литературе имеются данные об активации ФАГ лейцином и О-сульфоэтанолламином [8], представляло интерес изучить влияние лейцина, с дефицитом которого связывают падение активности ФАГ, и таурин, аналогом которого является О-сульфоэтанолламин, ингибитор ГАМК-трансаминазы [20-22].

Полученные результаты свидетельствуют о недостоверной тенденции активации ФАГ по выходу аммиака, но не глутамата. Напротив, выход последнего в пробе с добавлением таурин заметно ниже по сравнению с пробой, содержащей только фосфат (2,16 и 2,86 мМ/мг белка). Это говорит либо о стимуляции таурином утилизации образующегося из глутамин глутамата, либо способствовании им вышеуказанного нами альтернативного пути прямого декарбоксилирования глутамин [18, 19]. Использование в экспериментах одного из известных ингибиторов ФАГ и глутамилтрансфераз 6-диазо-5-оксонорлейцина (ДОН) показало, что ингибирующее его действие на ФАГ мозга проявляется при концентрации 3мМ и выше. В этой концентрации выход аммиака и

глутамата из глутамина под действием активированного фосфатом фермента подавлялся на 28 и 47% соответственно. Поскольку возможности утилизации глутамата в митохондриях несомненно выше таковых аммиака, то более вероятной является первая цифра. Следует отметить, что степень ингибирования зависит от использованной концентрации и препаратов мозга. Так, в срезах мозга морских свинок ДОН в концентрации 0,5-1,0 мМ не действовал на обмен глутамата [23], тогда как в очищенных центрифугированием в градиенте плотности сахарозы митохондриях и синапсоматомах он подавлял активность фермента более чем на 50% [18, 19].

Резюмируя полученные результаты, можно отметить, что митохондриальная ФАГ является поливалентно регулируемым ферментом, активность которого настраивается метаболическими событиями, координирующими работу нейромедиаторного и метаболического пулов глутамата.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Hertz L. Functional interaction between neurons and astrocytes. I. Turnover and metabolism of putative amino acids and neurotransmitters. - *Prog. Neurobiol.*, v. 13, p. 277-323, 1979.
- [2] Thanki C.M., Sugdon D., Thomas A.J., Bradford H.F. In vivo release from cerebral cortex of [14 C] glutamate synthesized from [14 C] glutamine. - *J. Neurochem.*, v. 41, p. 611-617, 1983.
- [3] Battaglini G. and Martin D.L. Stimulation of synaptosomal γ -aminobutyric acid synthesis by glutamate and glutamine. - *J. Neurochem.*, v. 54, p. 1179-1187, 1990.
- [4] Battaglini G. and Martin D.L. GABA synthesis in brain slices is dependent on glutamine produced in astrocytes. - *J. Neurochem. Res.*, v. 162, p. 151-156, 1991.
- [5] Roberg B., Torgner I.A., Kvamme E. The orientation of phosphate activated glutaminase in the inner mitochondrial membrane of synaptic and non-synaptic mitochondria. - *Neurochem. Int.*, v. 27, N $^{\circ}$ 4/5, p. 367-376, 1995.
- [6] Erecinska M., Nelson D., Daikhin Y., Yudkoff M. Regulation of GABA levels in rat brain synaptosomes: Fluxes through enzymes of the GABA-shunt and effects of glutamate, calcium and ketone bodies. - *J. Neurochem.*, v. 67, N $^{\circ}$ 6, p. 2025-2034, 1996.
- [7] Kvamme E. Synthesis of glutamate and its regulation. - *Prog. Brain Res.*, v. 1160, p. 73-85, 1998.
- [8] Kamalyan R.G., Gyulkhandanyan A.V., Karapetyan T.D., Mikaelyan E.R., Vardanyan A.G. Regulation of activity of brain phosphate activated glutaminase isoforms. - *Neurochem. Cellular, Molecular and Clinical Aspects* (Eds. By Teelken and Korf), Plenum Press. - N-Y, 1997, Sec. 38: Amino Acid Neurotrans., p. 1077-1081.
- [9] Zielke H.R., Collins R.M., Baab P.J., Huang Y., Zielke C.L., Tildon J.T. Compartmentation of [14 C] glutamate and [14 C] glutamine oxidative metabolism in the rat hippocampus as determined by microdialysis. - *J. Neurochem.*, v. 71, p. 1315-1320, 1998.
- [10] Newsholme E.A. Nutrition of immune cells: The implications for whole body metabolism. - *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 30, N $^{\circ}$ 6, p. 345-361, 1997.
- [11] Torgner I.A., Laake J.H., Roberg B., Kvamme E., Takami Y., Ottersen O.P. PAG-like immunoreactivity diverges strongly among glutamate-ergic pathways in rat cerebellum. - *J. Neurochem.*, v. 71 (suppl.) S88C, 1998.
- [12] Haussinger D. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. - *Biochem. J.*, v. 267, p. 281-290, 1990.
- [13] Hallestrap A.P. The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. - *BBA*, v. 3, N $^{\circ}$ 973, p. 355-382, 1989.
- [14] Brody F.N. and Bain J.A. A mitochondrial preparation from mammalian brain. - *J. Biol. Chem.*, v. 195, p. 685-692, 1952.
- [15] Seligson D. and Seligson H. Microdiffusion method for determination of nitrogen liberated as ammonia. - *J. Lab. Clin. Med.*, v. 38, p. 324-328, 1951.
- [16] Камалян Р.Г., Мовсесян С.Г. Некоторые стороны регуляции обмена глутамата, аспартата и ГАМК в митохондриальной фракции мозговой ткани. - *Вопр. биохим. мозга*, т. 2. Ереван: Изд-во АН Арм.ССР, с.40-48, 1966.
- [17] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. - *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- [18] Kamalyan R.G., Mikaelyan E.R., Vardanyan A.G. To glutamine family amino acids exchange in brain. - *J. Neurochem.*, v. 71, suppl. 1, 1998, S85A.
- [19] Kamalyan R.G., Hambarzumyan D., Mikaelyan E.R., Vardanyan A.G. Glutamine exchanges in the different brain preparations. - *Am. J. Med. Gen.*, v. 96, N $^{\circ}$ 4, p. 560, 2000.
- [20] Fowler L.J. Analysis of the major amino acids of rat brain after in vivo inhibition of GABA-transaminase by ethanolamine-O-sulphate. - *J. Neurochem.*, v. 21, N $^{\circ}$ 2, p. 437-440, 1973.
- [21] Fletcher A., Fowler L.J. GABA metabolism in rat brains following chronic oral administration of ethanolamine-O-sulphate. - *Biochem. Pharmacol.*, v. 29, p. 1451-1454, 1980.
- [22] Metcalfe B. Inhibitors of GABA metabolism. - *Biochem. Pharmacol.*, v. 28, p. 1705-1712, 1979.
- [23] Камалян Р., Джонс П., Амбарцумян Д., Бачелард Г. Обмен аминокислот в срезах мозга морской свинки в условиях активации и подавления глутаминазы и ГАМК-шунта. - *Нейрохимия*, т. 17, N $^{\circ}$ 2, с. 99-103, 2000.

УФ-ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ *Escherichia coli*

Киракосян Л., Мирзоян Н., Саакян М., Аракелян М., Пепоян А.

Институт молекулярной биологии НАН РА

Изучены УФ- и антибиотикочувствительность некоторых штаммов *E. coli*. Показана сравнительно высокая УФ-резистентность штамма *E. coli* G35 N61 из нормальной микрофлоры кишечника человека по отношению к штамму *E. coli* G35 N49, преобладающему в кишечной микрофлоре больных раком. Установлены также различия в антибиотикорезистентности изученных штаммов по ряду антибиотиков.

Կիրակոսյան Լ., Միրզոյան Ն., Տահակյան Մ., Արակելյան Մ., Փեփոյան Ա., *Escherichia coli* որոշ շտամների ՌԻՄ-զգայունությունը և անտիբիոտիկզգայունությունը: Ուսումնասիրվել է *E. coli* որոշ շտամների ՌԻՄ- և անտիբիոտիկզգայունությունը: Ցույց է տրվել նորմալ մարդկանց աղիքային միկրոֆլորայից անջատված *E. coli* G35N61 շտամների համեմատաբար բարձր ՌԻՄ-կայունությունը քաղցկեղով տառապող մարդկանց աղիքային միկրոֆլորայում գերակշռող *E. coli* G35 N49 շտամների նկատմամբ: Պարզվել են նաև ուսումնասիրված շտամների տարբերությունները ըստ մի շարք անտիբիոտիկների նկատմամբ ցուցաբերած զգայունության:

Kirakosian L., Mirzoyan N., Sahakian M., Arakelyan M., Pepoyan A. UV-sensitivity and antibiotic resistance of several *Escherichia coli* strains. The UV- and antibiotic-sensitivity of several *E. coli* strains (*E. coli* K12 AB 1157, *E. coli* K12 AB 1885, *E. coli* G35 N49, *E. coli* G35 N61) was studied. It has been shown a comparatively high UV-resistance of *E. coli* G35 N61 from human normal intestinal microflora, compared to *E. coli* G35 N49 dominating in intestinal microflora of cancer patients. It was found the different resistance of these strains to several antibiotics.