

с контролем сократить убойный возраст молодняка птиц, что повысит экономическую эффективность их выращивания.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Даниелян Л.Т. Чайный гриб. Ереван, 135, 1993.
2. Ветеринарное законодательство. М., 4, 414, 1988.
3. Ойвин И.А. Патолог. физиол. и эксперим. терапия. 4, 76-85, 1960.
4. Airsh D.C., Burton G.C., Blenden D.C. Antimic. Ag. Chemo. 4, 69, 1073.
5. Anderson E.S. Ann. Rev. Microbiol. 22, 131, 1968.
6. Franklin T.J. J. Biochem. 105, 371, 1967.
7. Mercer A.D., Pocurull D., Gaines W., Wilson, Bonnett J.V. Appl. Microbiol. 22, 700, 1971.

Поступила 27.II.1998.

Биол. журн. Армении, 3 (51), 1998

УДК 636.393.577.1

## ГИДРОЛИЗ ГЛУТАМИНА В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА СВИНЬИ И КРЫСЫ

Р.Г. КАМАЛЯН, Е.Р. МИКАЕЛЯН, Ж.Дж. СААКЯН,  
А.Г. ВАРДАНИЯН, Л.Л. БАДАЛЯН

Институт биохимии НАН Армении, 375044, Ереван

Гидролиз глутамина в митохондриальной фракции мозга свиньи, активируемый фосфатом и АДФ, подавляется сукцинатом, который снимает также избыточную активацию процесса  $\alpha$ -кетоглутаратом на фоне 5 ммоль фосфата. Некоторую активацию гидролиза глутамина в присутствии фосфата вызывает агонист ГАМК-срнической активности О-сульфозтаноламин (СЭА). Вместе с тем в опытах *in vivo* и *in vitro* на крысах СЭА не оказывал влияния на активность фермента. В опытах *in vitro* все испытанные соединения (янтарная кислота, ГАМК, АДФ) не влияли на гидролиз глутамина в присутствии 10 ммоль фосфата. Последний в различной степени активировал гидролиз глутамина в свежих и стареющих митохондриях. Преинкубация митохондрий с глутамином сопровождается проникновением его в митохондрии, которые после промывания продуцируют аммиак в ответ на добавление фосфата. Гидролиз глутамина, удерживаемого промывными митохондриями, подавляется SH-реагентами.

Գլուտամինի հիդրոլիզը խոզի ուղեղի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում, խթանվելով ֆոսֆատի և ԱՄԶ-ի կողմից, արգելակվում է սաթաթթվով, որը նաև հանում է պրոցեսի  $\alpha$ -կետոգլուտարատի ազդեցությամբ հավելյալ ակտիվացումը 5 մմոլ ֆոսֆատի առկայության դեպքում: Գլուտամինի հիդրոլիզի որոշ ակտիվացում դրսևորում է ՉԱԿԹ-ի ազդեցությամբ Օ-սուլֆոէթանոլամինը (ՍԷԱ) ֆոսֆատի ներկայությամբ: Միևնույն ժամանակ առնետների մոտ *in vivo* և *in vitro* փորձերի պայմաններում ՍԷԱ-ը չի ազդում գլուտամինի հիդրոլիզի վրա: *In vitro* փորձերում բոլոր ուսումնասիրված միացությունները (սաթաթթու, ՉԱԿԹ, ԱՄԶ) չեն ազդում գլուտամինի հիդրոլիզի վրա 10մմոլ ֆոսֆատի առկայության դեպքում: Վերջինս տարբեր աստիճանով խթանում է գլուտամինի հիդրոլիզը թարմ և հնացած միտոքոնդրիումներում: Գլուտամինի հետ նախաինկուբացումն ուղեկցվում է դրա ներթափանցմամբ միտոքոնդրիումների մեջ, որոնք լվացումից հետո արտադրում են ամոնիակ, ի պատասխան ֆոսֆատի ավելացմանը: Լվացված միտոքոնդրիումներում գլուտամինի հիդրոլիզը արգելակվում է SH-ռեագենտների կողմից:

The glutamine hydrolysis in fraction of pig brain mitochondria activated by the phosphate and ADP is inhibited by succinate which also eliminates the additional activation of this process induced by  $\alpha$ -ketoglutarate in presence of 5 mM phosphate. The O-sulfoethanolamine (SEA) - GABA-agonist causes a certain activation of glutamine hydrolysis in presence of phosphate. However, the SEA doesn't affect *in vivo* and *in vitro* on this process in brain mitochondria of rat. *In vitro* the all tested compounds (succinate, GABA, ADP) don't affect on the glutamine hydrolysis in presence of 10 mM phosphate. The last activates the glutamine hydrolysis in fresh and old mitochondria in different extents. The preincubation of mitochondria with glutamine is accompanied with its penetration into mitochondria, which produce ammonia after washing in addition to phosphate. Glutamine hydrolysis is inhibited by SH-reagents in washed mitochondria.

### *Митохондрии мозга - глутамин - глутаминаза*

Гидролиз глутамина, осуществляемый фосфат активируемой глутаминой (ФАГ), обеспечивает генерацию нейромедиаторных аминокислот - глутамата и ГАМК, тесно связанных метаболически. Известно, что ГАМК интенсивнее продуцируется из глутамина [7-9], чем из непосредственного предшественника глутамата, что объясняется большей доступностью глутамина для ГАМК-генерирующих компартментов, обусловленной лучшим его прохождением через мембраны. Однако мнение о том, что глутаминаза в основном обеспечивает медиаторную потребность мозга, скорее всего, половинчато, так как фермент локализован в митохондриях, имеющих отношение к энергетике. Кроме того, количество глутамата, образующееся в митохондриях из других фондов, достаточно для потребности в аминокислотных медиаторах, и эта задача, возможно, выполняется изоформой фермента, локализованной в синаптосомальных митохондриях.

Фермент активируется помимо фосфата также АТФ и АДФ, ди- и трикарбоновыми кислотами и другими анионами, генерируемыми в митохондриях. Следует отметить, что факторы, приводящие к набуханию митохондрий и увеличению митохондриального матрикса, одновременно с усилением процессов окисления и фосфорилирования вызывают активацию гидролиза глутамина, синтеза нитрулина и карбоксилирования пирувата [4]. Очевидно, что глутаминаза тесно связана с кардинальными процессами жизнедеятельности митохондрий и является немаловажным регуляторным звеном их синхронизации.

Учитывая роль ФАГ в генерации ГАМК, нами изучалось влияние ГАМК-ергических агонистов и метаболитов ГАМК шунта на активность митохондриальной формы фермента.

**Материал и методика.** Эксперименты проводили на митохондриальных препаратах глутаминазы, выделенных из мозга свиньи и крысы. Мозг свиньи хранили в морозилке в течение двух недель. Существенных изменений глутаминазной активности за этот срок не наблюдалось. В опытах на крысах использовали митохондрии, полученные из свежееудавленного мозга и из мозга, хранившегося в морозилке в течение месяца. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [1]. О глутаминазной активности судили по продукции аммиака, определяемого микродиффузионным методом [8]. Белок определяли по Лоури и др. [6].

**Результаты и обсуждение.** В табл. I представлены результаты определения аммиака после инкубации митохондрий с глутамином и

известными и возможными активаторами ФАГ. Из данных таблицы видно, что глутамин в отсутствие фосфата или АДФ не продуцирует аммиак. В условиях наших опытов не наблюдается также продукция аммиака из АДФ. Последний вместе с фосфатом дает несколько больший прирост аммиака из глутаминна, чем каждый из них в отдельности. Интересно, что янтарная кислота, рассматриваемая как активатор ФАГ, в наших опытах предотвращает продукцию аммиака из глутаминна в присутствии как фосфата, так и АДФ. Совместное добавление последних несколько ослабляет ингибирующий эффект янтарной кислоты.  $\alpha$ -Кетоглутаровая кислота в отличие от янтарной несколько усиливает гидролиз глутаминна как в отдельности, так и, в особенности, в присутствии фосфата и АДФ. Янтарная кислота подавляет активирующий эффект  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты в присутствии фосфата и АДФ на гидролиз глутаминна.

Таблица 1. Гидролиз глутаминна митохондриями мозга свиньи

| Добавки<br>мкмоль/мг белка                 | Продукция $\text{NH}_3$ |        |
|--------------------------------------------|-------------------------|--------|
| Глутамин (ГН)                              | -                       | -      |
| АДФ                                        | -                       | -      |
| ГН+фосфат (ф)                              | 4.1                     | 0.35*  |
| ГН+янтарная к-та (ЯК)                      | -                       | -      |
| ГН+АДФ                                     | 3.0                     | 0.27*  |
| АДФ+ЯК                                     | -                       | -      |
| АДФ+ф+ЯК                                   | -                       | -      |
| ГН+ф+ЯК                                    | -                       | -      |
| ГН+АДФ+ЯК+ф                                | 2.9                     | 0.26** |
| Сульфозетаноламин (СЭА)                    | -                       | -      |
| ГН+ $\alpha$ -кетоглутарат ( $\alpha$ -КГ) | 1.3                     | 0.10*  |
| ГН+СЭА                                     | -                       | -      |
| ГН+этанолламин (ЭА)                        | -                       | -      |
| ГН+АДФ+ф                                   | 15.9                    | 1.20** |
| ГН+АДФ+ЯК                                  | 0.7                     | 0.04** |
| ГН+АДФ+ $\alpha$ -КГ                       | 6.1                     | 0.45** |
| ГН+ $\alpha$ -КГ+ф                         | 7.0                     | 0.80** |
| ГН+АДФ+ $\alpha$ -КГ+ф                     | 9.0                     | 0.85   |
| ГН+ф+СЭА                                   | 7.8                     | 0.70   |
| ГН+ф+ЭА                                    | 3.9                     | 0.27   |
| ЭА                                         | -                       | -      |
| ГН+АДФ+ф+ $\alpha$ -КГ+ЯК                  | 1.7                     | 0.03   |

Примечание: \* - достоверность ( $p < 0,05$ ) в сравнении с пробой, содержащей ГН;

\*\* - достоверность в сравнении с пробами, содержащими ГН + ф или ГН + АДФ.

Учитывая данные об ингибировании О-сульфозетаноламином ГАМК-трансаминазы и накоплении в его присутствии ГАМК [3,5], одного из продуктов обмена глутаминна, мы изучали также влияние этого соединения и этаноламина на гидролиз глутаминна митохондриями мозга: этаноламин не оказывает действия на этот процесс, а сульфозетаноламин активирует гидролиз только в присутствии фосфата.

Вместе с тем, в опытах на крысах с внутрибрюшинным введением за сутки до забоя сульфозетаноламина (1 г/кг массы) существенных изменений в продукции аммиака из глутаминна свежеприготовленными препаратами

митохондрий не отмечалось (табл.2). Срок забоя животных в этих опытах был обусловлен максимальным накоплением ГАМК в мозге при введении сульфозетаноламина [2].

Таблица 2. Влияние внутрибрюшинного введения О-сульфозетаноламина (СЭА) на гидролиз глутамина в свежeweделенных митохондриях мозга крыс\*

| Добавки             | Продукция $\text{NH}_3$ , мкмоль/мг белка |      |       |      |
|---------------------|-------------------------------------------|------|-------|------|
|                     | Контроль                                  |      | Опыт  |      |
| —                   | 2.73                                      | 0.25 | 3.25  | 0.28 |
| фосфат (ф)          | 9.79                                      | 0.88 | 10.44 | 0.75 |
| ЯК                  | 4.66                                      | 0.25 | 3.76  | 0.25 |
| $\alpha$ -КГ        | 4.06                                      | 0.30 | 3.76  | 0.25 |
| АДФ                 | 7.29                                      | 0.56 | 7.06  | 0.60 |
| ф+ЯК                | 11.02                                     | 0.90 | 9.69  | 0.85 |
| ф+ $\alpha$ -КГ     | 11.90                                     | 1.05 | 10.98 | 1.00 |
| АДФ+ф               | 13.28                                     | 1.45 | 12.51 | 1.30 |
| АДФ+ф+ЯК            | 14.03                                     | 0.85 | 12.99 | 1.00 |
| АДФ+ $\alpha$ -КГ+ф | 13.34                                     | 0.95 | 11.14 | 0.90 |

Примечание: \*Контрольной группе животных введено 1.0 мл физраствора, опытной - в том же объеме 1г/кг массы СЭА за 24ч до забоя.

Полученные предварительные данные не исключают, однако, участия ГАМК-антагонистов, в том числе сульфозетаноламина, в регуляции активности глутаминазы мозга, в частности синапсомальной ее изоформы, имеющей непосредственное отношение к ГАМК-ергической активности. В опытах на митохондриальных препаратах, выделенных из мозга анестезированных под легким эфирным наркозом крыс, хранившегося в морозилке в течение месяца, не было выявлено эффекта ни янтарной кислоты, ни АДФ, ни ГАМК, ни сульфозетаноламина на фоне 10 мМ фосфата, который в 3,5 раза активировал гидролиз глутамина.

Аналогичное отмечалось и в опытах со свежеприготовленными митохондриями мозга крыс (табл.3). Различие заключалось лишь в меньшей степени гидролиза глутамина в отсутствие активаторов, АДФ и фосфата, в митохондриях, выделенных сразу после декапитации, и в большей степени в активации фосфатом (приблизительно в 10 раз). Янтарная кислота в этих опытах, в отличие от опытов на мозге свиньи, не оказывает ингибирующего действия на продукцию аммиака из глутамина.

Таблица 3. Гидролиз глутамина в свежеприготовленных митохондриях мозга крысы

| Добавки        | Гидролиз ГН, мкмоль $\text{NH}_3$ /мг белка |      |
|----------------|---------------------------------------------|------|
| —              | 0.79                                        | 0.05 |
| АДФ            | 3.80                                        | 0.20 |
| ф              | 12.34                                       | 0.75 |
| АДФ+ф          | 16.54                                       | 1.25 |
| АДФ+ф+ЯК       | 16.28                                       | 1.38 |
| АДФ+ф+СЭА      | 15.51                                       | 1.40 |
| АДФ+ф+ГАМК     | 14.14                                       | 1.10 |
| АДФ+ф+СЭА+ГАМК | 16.05                                       | 1.38 |
| АДФ+ф+ЯК+СЭА   | 14.14                                       | 1.05 |
| АДФ+ф+ЯК+ГАМК  | 15.20                                       | 1.25 |

Препинкубация свежеприготовленных митохондрий с глутамином в течение 10 мин и последующая их промывка показали, что часть глутамин проникает в митохондрии, так как добавка фосфата вызывает активацию продукции аммиака, подавляемую добавлением SH-реагента. Последний подавляет гидролиз как проникшего в митохондрии глутамин, так и добавленного, что свидетельствует о доступности фермента как для субстрата, так и для SH-реагента (табл.4).

Таблица 4. Гидролиз глутамин митохондриями мозга крысы

| Добавки     | Продукция NH <sub>3</sub> ,<br>мкмоль/мг белка |      | Препинкубация с ГН (10 мин)<br>инкубация промытого осадка                      |                                                |
|-------------|------------------------------------------------|------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| --          | ----                                           |      | Добавки                                                                        | Продукция NH <sub>3</sub> ,<br>мкмоль/мг белка |
| АДФ         | 4.51                                           | 0.22 | -                                                                              | --                                             |
| Ф           | 5.14                                           | 0.47 | Ф                                                                              | 0.93      0.05*                                |
| ЯК          | 1.37                                           | 0.09 | SH-реагент                                                                     | 0.14      0.01**                               |
| α-КГ        | 2.74                                           | 0.15 | ГН+Ф                                                                           | 4.49      0.37*                                |
| ЭА          | 1.06                                           | 0.04 | ГН+Ф+SH-реагент                                                                | 0.81      0.05**                               |
| Ф+АДФ       | 7.40                                           | 0.65 | SH-реагент - N-метилмаленимил<br>* - эффект фосфата<br>** - эффект SH-реагента |                                                |
| АДФ+ЯК      | 4.11                                           | 0.53 |                                                                                |                                                |
| Ф+ЯК        | 6.17                                           | 0.50 |                                                                                |                                                |
| АДФ+Ф+ЯК    | 6.17                                           | 0.55 |                                                                                |                                                |
| АДФ+ α-КГ   | 7.20                                           | 0.73 |                                                                                |                                                |
| Ф+ α-КГ     | 9.05                                           | 0.77 |                                                                                |                                                |
| АДФ+Ф+ α-КГ | 9.05                                           | 0.85 |                                                                                |                                                |
| Ф+СЭА       | 6.63                                           | 0.55 |                                                                                |                                                |
| Ф+ЯК+ α-КГ  | 9.66                                           | 0.75 |                                                                                |                                                |

Примечание: \* - достоверно в сравнении с контрольной пробой (20 ммоль ГН)  
\*\* - достоверно в сравнении с пробой, содержащей Ф.

Разница в продукции NH<sub>3</sub> из проникшего в промытые митохондрии и добавленного к ним глутамин связана, скорее всего, с различиями в концентрации субстрата, чем с наличием двух форм фермента по обе стороны мембраны.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Палладин А.В., Кирсенко О.В. Биохимия, 26, 385-390, 1961.
2. Fletcher A., Fowler L.J. Biochem. Pharmacol., 29, 11, 1451-1454, 1980.
3. Fowler L.J. J. Neurochem., 21, 2, 437-440, 1973.
4. Halestrap A.P. BBA, 3, 973, 355-382, 1989.
5. Loscher W. J. Neurochem., 36, 4, 1521-1527, 1981.
6. Lowrey O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. J. Biol. Chem., 193, 263-275, 1951.
7. Reubi J.C., van den Berg C., Cuenod M. Neurosci. transmitter pools. Lett, 10, 171-174, 1978.
8. Seligson D., Seligson H. Lab. Med., 38, 324-330, 1951.
9. Yu A.C.H., Hertz E., Hertz L. J. Neurochem., 42, 951-960, 1984.

Поступила 1.V.1998