

УДК 577.112.612

К. А. Гевондян<sup>1</sup>, Д. Х. Амбарцумян<sup>1</sup>, С. Г. Минасян<sup>2</sup>, Р. Г. Камалян<sup>1</sup>

# **Дыхание иммунных клеток и митохондрий мозга на аминокислотных субстратах**

(Представлено академиком А. А. Галояном 22/IV 2004)

Известно, что аминокислоты семейства глутамина синтезируются из глюкозы и могут в условиях ее дефицита служить в качестве субстратов дыхания в митохондриях мозга. В то же время имеются данные о плохой проницаемости митохондрий мозга в отношении основного аминокислотного субстрата глутамата [1, 2], который, по-видимому, в основном захватывается цитоплазматическими везикулами, запасаящими и транспортирующими его в нервные окончания. Основным источником трансмиссерного глутамата в мозге служит глутамин, превращение которого в глутамат и аммиак обеспечивается локализованной на наружной стенке внутренней митохондриальной мембраны нейронов фосфатактивируемой глутаминазой (ФАГ). Концепция компартментализации обмена нейротрансмиссерных аминокислот, глутамата и ГАМК в мозге объясняет ряд особенностей их метаболизма, связанных с множественностью путей обмена и функций [3-6]. Согласно концепции глутамин-глутаматного цикла медиаторный глутамат, захваченный глиальными клетками, превращается в глутамин, транспортируется в нейроны, где и подвергается действию ФАГ. Если большая часть глутамата захватывается цитоплазматическими везикулами, то аммиак, скорее всего, проникает в митохондрии [7], где используется в синтезе глутамата, регулируя одновременно через глутаматдегидрогеназную реакцию интенсивность функционирования цикла Кребса. Вместе с тем ряд данных свидетельствует о возможности использования глутамина в качестве топлива энтероцитами, спленоцитами, лимфоцитами и нейтрофилами [8-10]. Однако такая возможность связывается с интенсивным глутаминолизом, без учета окисления образующегося глутамата. Дыхание указанных клеток на аминокислотных субстратах мало исследовано, что побудило нас провести сравнительное изучение возможности их окисления митохондриями мозга, тимоцитами и спленоцитами.

Опыты проведены на белых крысах обоего пола, содержащихся в условиях вивария Института биохимии НАН РА. Крыс обезглавливали под легким эфирным наркозом, быстро удаляли мозг, тимус и селезенку, промывали холодным раствором Трис-сахарозы, удаляли оболочки и гомогенизировали в соответствующих средах. Митохондрии мозга выделяли по Палладину и Кирсенко [11]. Белок определяли по Лоури [12]. Для получения тимоцитов и спленоцитов использовали охлажденную до 4°C модифицированную среду Хенкса, содержащую до  $5.12 \times 10^{-2}$  г/л  $\text{Ca}^{2+}$  [13]. Дыхание митохондрий регистрировали с помощью аппарата "BAS-100" (USA) с использованием электрода Кларка. Инкубационная среда для выделенных митохондрий мозга содержала: 100 мМ сахарозы, 60 мМ KCl, 1.5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5

мМ Трис-буфера, рН 7.4; для тимоцитов и спленоцитов - 120 мМ KCl, 1 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ Нерес, рН 7.4,  $t = 37^\circ\text{C}$ . Субстраты окисления с концентрациями указаны в подписях к рисункам. Везде АДФ добавляли по 200 мкМ.

Результаты изучения дыхания митохондрий мозга на аминокислотных субстратах представлены на рис. 1.

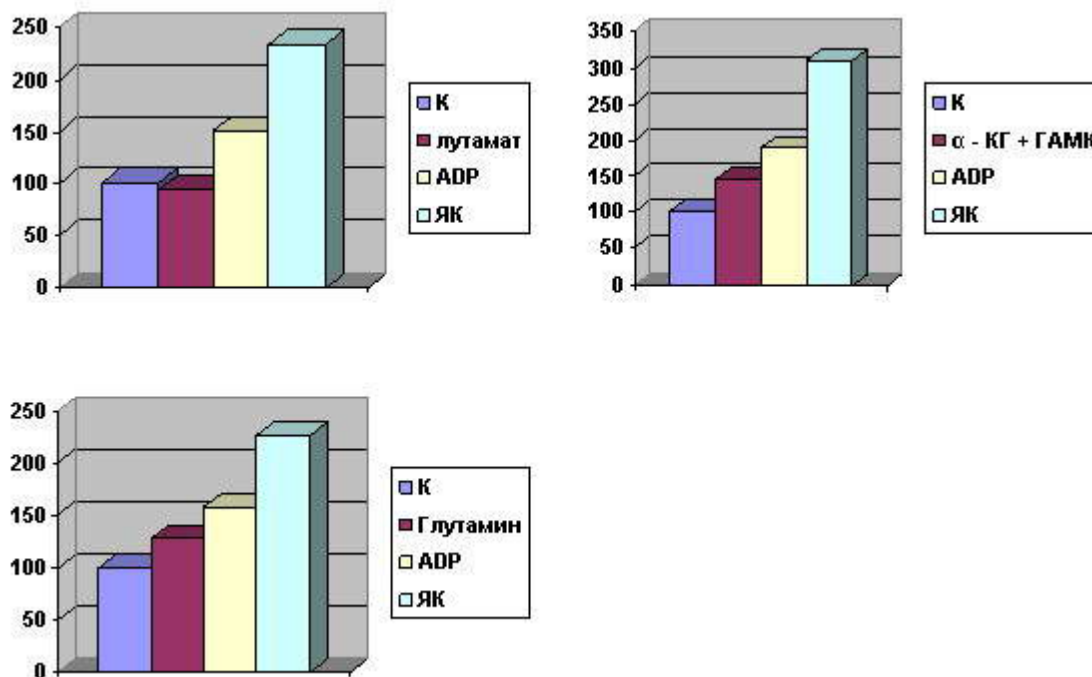


Рис.1. Дыхание митохондрий мозга на аминокислотных субстратах. Концентрация субстратов 5мМ.  
Скорость эндогенного дыхания  $2.6 \times 10^{-8} \text{ М мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ белка}$

Как видно из рисунка, добавление глутамата к митохондриям почти не влияет на уровень эндогенного дыхания. Дыхание на глутамате при добавлении универсального активатора окисления - акцептора фосфата АДФ усиливается на 65% по сравнению с пробой, содержащей глутамат в фосфатном буфере. Добавление янтарной кислоты в состоянии 3 дыхательной цепи приводит к усилению уровня поглощения кислорода до 90%, что свидетельствует о нормальном функционировании митохондрий и о том, что янтарная кислота является лучшим энергетическим субстратом митохондрий.

Интересно, что глутамин в отличие от глутамата повышает уровень эндогенного дыхания, что, скорее всего, связано с большей проницаемостью митохондрий для амида. Вместе с тем при активации дыхания АДФ суммарное поглощение кислорода на глутамате и его амиде одинаково, т.е. АДФ усиливает дыхание на глутамате в большей степени, чем на глутамине.

Более высокий уровень поглощения кислорода отмечается при совместном добавлении к митохондриям  $\alpha$ -кетоглутарата и ГАМК (+ 45% от эндогенного дыхания), который возрастает примерно на столько же при добавлении в среду АДФ.

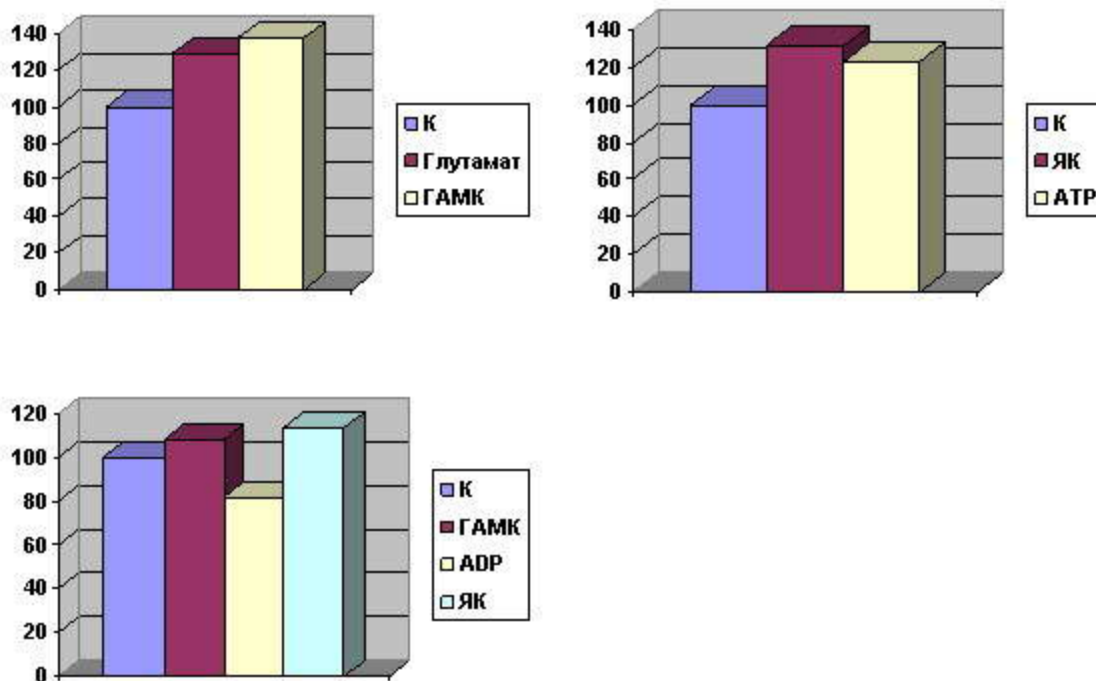


Рис. 2. Дыхание тимоцитов на аминокислотных субстратах. Концентрация субстратов: глутамин - 15 мМ, глутамат, ГАМК и кетоглутарат - 10 мМ, сукцинат - 6 мМ. Скорость эндогенного дыхания -  $6.8 \text{ нМ} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ белка}$

На рис. 2 и 3 представлены результаты изучения дыхания на аминокислотных субстратах тимоцитов и спленоцитов. Спленоциты дышат на глутамине заметно лучше тимоцитов. Дыхание же на глутамате в тимоцитах выше, чем в спленоцитах. Добавление АДФ к инкубированным в фосфатном буфере спленоцитам, дышащим последовательно на глутамате и янтарной кислоте, приводит к резкому подавлению поглощения кислорода, что объясняется, скорее всего, изменением соотношения АТФ/АДФ в цитоплазме клетки. По-видимому, увеличение АТФ в цитоплазме на фоне энергизации митохондрий приводит по принципу отрицательной обратной связи к приостановке дыхания. В наших опытах дыхание тимоцитов на глутамине ниже, чем на глутамате, что говорит о большей доступности для митохондрий тимоцитов экзогенного глутамата, чем глутамата, образующегося из глутамина через ФАГ.

Примечательно, что ГАМК, который имеет свои рецепторы типа А на поверхности иммунных клеток [14], подавляющие через CD3 их иммунную активность, понижает эндогенное дыхание спленоцитов, не влияя существенно на таковое тимоцитов.

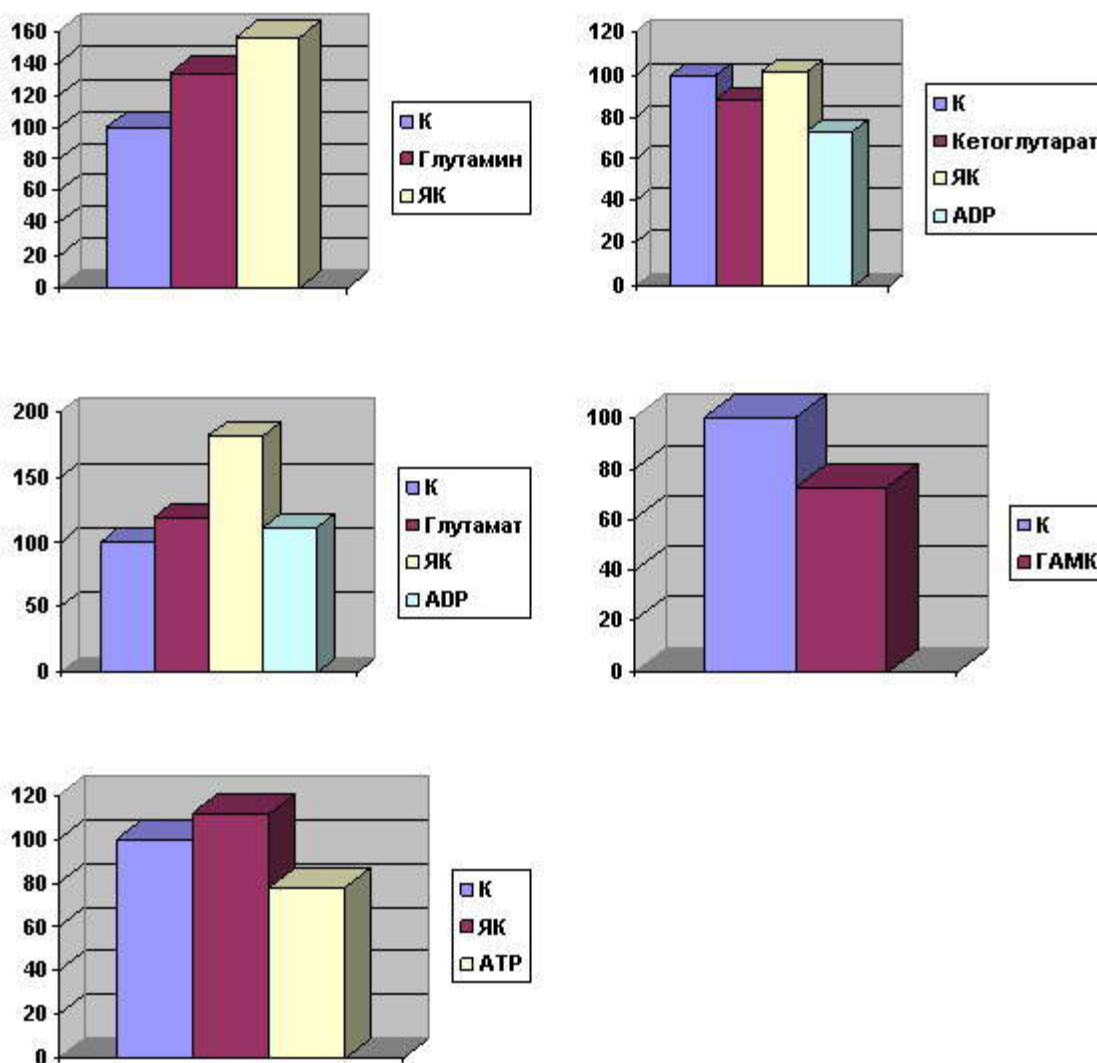


Рис.3. Дыхание спленоцитов на аминокислотных субстратах. Концентрация субстратов: глутамин - 15 мМ, глутамат, ГАМК и кетоглутарат - 10 мМ, сукцинат - 6 мМ. Скорость эндогенного дыхания -  $4.6 \text{ нМ} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ белка}$

Чанг и др. [15] считают, что стимуляция пролиферации лимфоцитов глутамином связана с поддержанием соответствующего внутриклеточного редокс-статуса. Кюри, Ньюшолм и др. отмечают высокую глутаминазную активность лимфоцитов и нейтрофилов [8,10], однако, по их данным, как и в наших опытах на тимоцитах и спленоцитах, дыхание на глутамине не коррелирует с его превращением в глутамат. О низкой дыхательной активности лейкоцитов на аминокислотных субстратах говорят также данные по выходу  $^{14}\text{CO}_2$  из меченого глутамина и достаточно высокий выход аминокислот, которые, по-видимому, используются в синтезе белка. Но каким образом обеспечивается энергетическая компонента этого синтеза, остается неясным. Полученные нами данные не свидетельствуют в пользу использования иммунными клетками глутамина в качестве эффективного дыхательного субстрата.

Электрохимические исследования проведены в рамках гранта NFSAT EISI 0101.

<sup>1</sup>Институт биохимии НАН РА

<sup>2</sup>Институт химической физики НАН РА

### Литература

1. *Kvamme E.* - Prog. Brain Res. 1998. V. 1160. P. 73-85.
2. *Roberg B., Torgner I. A., Kvamme E.* - Neurochem. Int. 1995. V. 27. P. 367-376.
3. *Rae C., Hare N., Bubbs W. A.* - J. Neurochem. 2003. V.85. N 2. P. 503-510.
4. *Reubi J. C., Van den Berg C. J., Cuenod M.* - Neurosci. Lett. 1978. V. 10. P. 171-174.
5. *Roberg B., Torgner I. A., Kvamme E.* - Neurochem. Res. 1999. V. 24. N7. P. 809-814.
6. *Yu A. C. H., Fisher T. E., Hertz E., Schousboe A.* - J. Neurosci. Res. 1984. V. 11. P. 351-357.
7. *Marcaggi P., Coles J. A.* - Progress Neurobiol. 2001. V. 64. P. 157-183.
8. *Curi T. C., De Melo M. P., De Azevedo R. B., Homem-de-Bittencourt P. I.* - Am. J. Physiol. 1997. V. 273. P. 1124-1129.
9. *Daikhin Y., Yudkoff M.* - J. Nutr. 2000. V. 130 (4S Suppl). P. 1026S-1031S.
10. *Newsholme E. A.* - Braz. J. Med. Biol. Res. 1997. V. 30. N6. P. 345-361.
11. *Палладин А. В., Кирсенко О. Б.* - Биохимия. 1961. Т. 26. С. 385-390.
12. *Lowry O. H., Rosebrough N. T., Farr A. L. Randall R. J.* - J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265-270.
13. *Панавене Д. Г., Банджюлене С. Ю.* - Лабораторное дело. 1983. N4. С. 10-11.
14. *Tian Chau C., Hales T. G., Kaufman D. L.* - J. Neuroimmunology. 1999. V. 96. P. 21-28.
15. *Chang W. K., Yang K. D., Shaio M. F.* - Clin Exp Immunol. 1999. V. 117. P. 482-488.

Կ. Ա. Ղևոնդյան, Դ. Խ. Համբարձումյան, Ս. Հ. Մինասյան, Ռ. Գ. Քամալյան

**Իմունային բջիջների և ուղեղի միտոքոնդրիումների շնչառությունը ամինաթթվային  
սուբստրատների վրա**

Ուսումնասիրվել է ուղեղի միտոքոնդրիումների և իմունային բջիջների՝ գլյուտամինի ընտանիքի ամինաթթվային սուբստրատները օքսիդացնելու ունակությունը: Ցույց է տրվել, որ ուղեղի միտոքոնդրիումները շնչառական շղթայի էներգիզացված 3-րդ վիճակում օքսիդացնում են գլյուտամինը, գլյուտամինաթթուն և ԳԱԿԹ+կետո-գլյուտարաթթուն՝ համարյա հավասար արդյունավետությամբ, որը, սակայն, զիջում է սաթաթթվի օքսիդացմանը: Թիմոցիտները զգալիորեն պակաս ինտենսիվությամբ են օքսիդացնում ամինաթթվային սուբստրատները: Սպլենոցիտներում անգամ ամենաարդյունավետ շնչառական սուբստրատը՝ սաթաթթուն, նկատելիորեն չի խթանում թթվածնի կլանումը, իսկ ԱԿԳ-ի և ԱԵՖ-ի ավելացումը ընդհակառակը՝ հանգեցնում է շնչառության արգելակմանը թիմոցիտներում և հատկապես՝ սպլենոցիտներում: Գլյուտամինի օքսիդացման ցածր արագությունը իմունային բջիջներում չի հարաբերակցվում նրանցում հայտնի բարձր գլյուտամինազային ակտիվության հետ:

**K. A. Ghevondyan, D. Kh. Hambardzumyan, S. H. Minasyan, R. G. Kamalyan**

**The Respiration of the Immune Cells and Brain Mitochondria on the Amino Acids  
Substrates**

The ability of mitochondria and immune cells to oxidize the substates of the glutamine family amino acids has been studied. It was shown that brain mitochondria in the state 3 of respiratory chain oxidizes glutamine, glutamate and GABA+ $\alpha$ -ketoglutarate with same rate, which however is much less than that of succinate. The thymocytes oxidizes amino acids substrates with much less intensity. In splenocytes even succinate the better respiratory substrate doesn't stimulate the oxygen consumption in appreciably extent and ATP or ADP addition to incubation media inhibits respiration of the thymocytes and particularly in splenocytes. The low rate of glutamine oxidation in immune cells doesn't agree with the high rate of glutamine hydrolysis in these cells.