

в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. На пробу брали по 0.5 мл гомогената, содержащего 6-8 мг белка. Митохондриальную фракцию коры мозга получали методом дифференциального центрифугирования в Tris-сахарозе [10].

Аминокислоты мозговых ТХУ-экстрактов разделяли с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге и определяли нингидриновым методом [11]. Аммиак и глутамин определяли микродиффузионным методом [12], α -кетоглутарат – спектрофотометрическим методом [13].

Из табл. 1 видно, что инкубация гомогенатов коры мозга с аспарагином в фосфатном буфере в присутствии Mg^{2+} приводит к более значительному образованию глутамина (1.6 мкмоль/проба), чем глутамата (0.1 мкмоль/проба). Содержание аммиака при этом почти не меняется (1.5 мкмоль против 1.7 в контроле – ГК без инкубации), однако имеется незначительное повышение уровня аспартата. Такая направленность предполагает возможный синтез глутамина из аспарагина, однако однозначно об этом не свидетельствует. Более выраженное образование глутамина и глутамата из аспарагина регистрируется в присутствии в инкубационной среде α -кетоглутарата (2.6 и 0.3 мкмоль/проба соответственно). При этом имеет место полная утилизация эндогенного аммиака. Некоторое уменьшение содержания аммиака наблюдается и в отсутствие в пробе α -кетоглутарата, но при наличии глутамата, хотя при этом содержание добавленного глутамата не меняется. Аспарагин подавляет утилизацию глутамата также в присутствии АТФ и кетоглутарата.

Таблица 1

Содержание аминокислот и аммиака при инкубации аспарагина с гомогенатами мозга

АН+добавки	ГК	ГН	АК	NH ₃
ГК без инкубации	7.2±0.5	-	-	1.7±0.2
-	0.1±0.02	1.6±0.01 *	1.8±0.02 *	1.5±0.2
ГК	7.7±0.6	-	-	0.9±0.1 *
ГК+КГ	7.7±0.5	-	-	3.2±0.4 *
ГК+АТФ	7.7±0.7	-	-	1.0±0.1
КГ	0.3±0.03	2.6±0.03 *	2.7±0.03*	0±0 *
КГ+АТФ	0.7±0.05*	-	-	1.4±0.1
ГК+КГ+АТФ	7.2±0.4	-	-	0.7±0.1

Примечание. Во все пробы добавлен аспарагин в конечной концентрации 8 мМ. Инкубационная смесь содержала: 0.1 М К-фосфатный буфер, рН 7.4, 0.05 М Tris-HCl буфер, рН 7.4, 0.12 М MgSO₄. В отдельные пробы добавлены глутамат (ГК) – 8мМ, α -кетоглутарат (КГ) – 5 мМ, АТФ – 5 мМ. Инкубация 40 мин при 37⁰С. Реакцию останавливали добавлением ТХУ в конечной концентрации 3.3%. АН – аспарагин, ГН – глутамин, АК – аспартат. n=7. * – p < 0.05.

В опытах с митохондриальной фракцией коры мозга были получены несколько иные результаты (табл. 2). При инкубации митохондрий с аспарагином имеет место образование глутамата без прироста аммиака. Нали-

чие в среде глутамата повышает выход аммиака в четыре раза при недостоверной утилизации аминокислоты. Кетоглутарат и в особенности кетоглутарат с АТФ способствуют образованию аммиака, уменьшая выход глутамата. Интересно, что при наличии в инкубационной среде всех ингредиентов имеет место повышение уровня глутамата, хоть и статистически незначимое.

Таблица 2

Количественные сдвиги содержания глутамата и аммиака в митохондриальной фракции коры мозга

АН+добавки	ГК	NH ₃
ГК без инкубации	8.5±0.6	0.17±0.02
-	2.0±0.03	0.17±0.03
ГК	7.2±0.5*	0.68±0.04*
ГК+ АТФ	6.0±0.4*	1.15±0.22
КГ	0.2±0.04	0.44±0.05*
КГ+АТФ	0.5±0.04*	0.85±0.09*
ГК+ КГ	8.6±0.9	0.34±0.05
ГК+КГ+АТФ	9.7±1.1	0.34±0.04

Примечание. Инкубационная среда и сокращения те же, что в табл.1. n=5.

Таблица 3

Влияние α-кетоглутарата на уровень эндогенных аминокислот в митохондриях мозга

Добавки	ГК	ГН	АК	ГАМК	NH ₄
Фикс. контроль	0.56±0.05	0.32±0.04	0.25±0.01	0.18±0.02	0.12±0.02
Инк. контроль	0.32±0.03 *	0.25±0.03	0.45±0.04 *	0.20±0.02	0.28±0.04*
КГ	0.88±0.06 *	0.20±0.01	0.05±0.008*	0.12±0.01*	0.28±0.04
АТФ	0.16±0.02 *	0.37±0.02 *	0.56±0.06	0.22±0.02	1.85±0.15*
КГ+АТФ	0.85±0.07	0.35±0.04 *	0.05±0.009*	0.10±0.01*	1.54±0.18*
НАД	0.20±0.03 *	0.23±0.04	0.25±0.01*	0.22±0.04	1.65±0.20*
КГ+ НАД	0.90±0.07	0.34±0.02 *	0.06±0.010*	0.12±0.01*	1.33±0.09*

Примечание. Инкубационная среда (но без аспарагина) и сокращения те же, что в табл.1. Концентрация α-кетоглутарата в пробах 5 мМ. n=5.

Поскольку кетоглутарат является универсальным акцептором аминокислот, нами было изучено его влияние на содержание эндогенных аминокислот и аммиака в митохондриях мозга (табл. 3), где он участвует в анаплеротических реакциях цикла Кребса. Инкубация митохондрий приводит к достоверной утилизации глутамата, сопровождающейся повышением уровня

аспартата и аммиака, что соответствует основной направленности обмена глутамата в митохондриях мозга [14-16]. АТФ и НАД способствуют утилизации эндогенного глутамата с повышением уровня аммиака, однако если первый приводит к повышению выхода аспартата и глутамина, второй подобного действия не оказывает. Кетоглутарат вызывает достоверное уменьшение концентрации аспартата и ГАМК и сдвигает обмен аминокислот в сторону синтеза глутамата. При этом концентрация аммиака и глутамина в сравнении с инкубированным контролем не меняется. Вместе с тем кетоглутарат несколько подавляет выход аммиака из АТФ и НАД, по-видимому, направляя его на синтез глутамата и глутамина.

Таблица 4

Утилизация кетоглутарата в присутствии аспартата в митохондриях коры мозга

Условия опыта	Контроль фиксации	Инкубация	АТФ	КГ фиксация	КГ инкубация	АТФ	ПФ	АТФ + ПФ
Без КГ	20.0±2.0	40.5±5.2*	сл.*	-	-	-	-	-
КГ	-	-	-	10.2±0.7	5.8±0.3*	3.4±0.2*	4.1±0.2*	2.5±0.1*

Примечание. ПФ – пиридоксальфосфат. Эндогенный КГ представлен в нМ. В пробы с КГ добавлено по 10 мкМ аспартата. КГ добавлен по 10 мкМ/проба. n=5.

Утилизация самого кетоглутарата в митохондриях резко усиливается в присутствии аспартата и АТФ (табл. 4). Так, добавление АТФ и аспартата к митохондриям приводит к полному окислению эндогенного кетоглутарата и резкому уменьшению концентрации экзогенного. Аналогичное, но менее выраженное действие на утилизацию кетоглутарата в присутствии аспартата оказывает пиридоксальфосфат. Эффекты обоих кофакторов кумулируются, приводя к значительной утилизации кетоглутарата митохондриями.

Полученные данные свидетельствуют о существенных различиях в обмене аминокислот семейства глутамина в гомогенатах и митохондриях мозга, что связано не только с нейроно-глиальной, но и внутриклеточной компартментализацией обмена дикарбоновых аминокислот и ГАМК в мозге. Вместе с тем они указывают на центральную роль кетоглутарата в превращениях аминокислот семейства глутамина. Результаты опытов не подтверждают версию о предпочтительном трансаминировании амидов в сравнении с аминокислотами. Напротив, они говорят о несравненно более высокой скорости трансаминирования последних. Вопрос о возможности синтеза глутамина из аспарагина аналогично обратному процессу, несмотря на некоторые указания на его наличие, остается открытым и требует дальнейших исследований с использованием радиоактивных изотопов.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятына НАН РА

**Ռ. Գ. Քամայան, Ա. Գ. Վարդանյան, Ն. Խ. Խաչատրյան,
Հ. Ս. Գրիգորյան**

**Երկկարբոն ամինաթթուների նյութափոխանակության որոշ
յուրահատկությունները առնետի ուղեղում**

Ուսումնասիրվել է ասպարագինից գլյուտամինի սինթեզի հնարավորությունը առնետի ուղեղում: Ուղեղի հոմոգենատների հետ ասպարագինի ինկուբացիան բերում է ասպարտատի, գլյուտամատի և գլյուտամինի առաջացմանը: Կետոգլյուտատը նպաստում է նշված ամինաթթուների առաջացմանը և ճնշում է ավելացված գլյուտամատի յուրացումը ԱԵՖ-ի առկայության և բացակայության պայմաններում: Նման արգելակումը նշվում է նաև ուղեղի միտոքոնդրիումներում: Ասպարագինը նպաստում է գլյուտամատի յուրացմանը և ամոնիակի առաջացմանը նրանից: ԱԵՖ-ը և ՆԱԴ-ը նպաստում են գլյուտամատի յուրացմանը միտոքոնդրիումների կողմից: ԱԵՖ-ը բարձրացնում է ասպարտատի, գլյուտամինի ու ամոնիակի էլքը էնդոգեն գլյուտամատից, իսկ ՆԱԴ-ը միայն ամոնիակի առաջացումը: Կետոգլյուտատ-րատը շեղում է ամինաթթուների նյութափոխանակությունը դեպի գլյուտամատի սինթեզը: Էնդոգեն և էկզոգեն կետոգլյուտատը արդյունավետ յուրացվում է ուղեղի միտոքոնդրիումների կողմից: վերջինս հատկապես ԱԵՖ-ի և պիրիդոքսալֆոսֆատի առկայությամբ:

**R. G. Kamalyan, A. G. Vardanyan, N. Kh. Khachatryan,
H. S. Grygoryan**

Some Features of Dicarboxylic Amino Acids Exchange in Rat Brain

The possibility of glutamine synthesis from asparagine was study. Incubation of asparagine with brain homogenates leads to aspartate, glutamate and glutamine formation. Ketoglutarate promote formation of these amino acids, particularly aspartate and glutamine and inhibits utilization of added glutamate in presence and absence of ATP. The same inhibition takes place also in the brain mitochondria. Asparagine promotes glutamate utilization and ammonia formation from the last mentioned. ATP and NAD promote glutamate using by mitochondria. The first increases aspartate, glutamine and ammonia output from endogenous glutamate, while the second increases only ammonia level. Ketoglutarate moves amino acids metabolism to side of glutamate synthesis. The endogenous and the added ketoglutarate are used intensively in mitochondria, particularly the last one is used in presence of ATP and pyridoxal phosphate.

Р. Г. Камалян, А. Г. Варданян, Н. Х. Хачатрян, А. Г. Григорян

**Некоторые особенности обмена дикарбоновых аминокислот
в мозге крысы**

Исследована возможность синтеза глутамина из аспарагина. Инкубация аспарагина с гомогенатами мозга приводит к образованию аспартата, глутамата и глутамина. Кетоглутарат способствует образованию указанных аминокислот и подавляет утилизацию добавленного глутамата в присутствии и в отсутствие АТФ. Подобное ингибирование наблюдается и в митохондриях мозга. Аспарагин способствует утилизации глутамата и выходу аммиака из последнего. АТФ и

НАД усиливают использование глутамата митохондриями. Первый усиливает выход аспартата, глутамина и аммиака из эндогенного глутамата, тогда как второй повышает лишь уровень аммиака. Кетоглутарат сдвигает обмен аминокислот в сторону синтеза глутамата. Эндогенный и добавленный кетоглутарат интенсивно используются митохондриями мозга, последний в особенности в присутствии АТФ и пиридоксальфосфата.

Литература

1. *Лестровая Н. Н.* – Биохимия. 1954. Вып.4. С. 478-484.
2. *Мардашев С. Р., Лестровая Н. Н.* - ДАН СССР. 1951 . Т.78. С. 547-563.
3. *Сюй Тун-Сень*- Биохимия. 1959. Т. 24. Вып. 3. С. 528-534.
4. *Meister A., Sober H. A., Tice S. V., Fraser P. E.* - J. Biol. Chem. 1952. V. 197. N 1. P. 319-330.
5. *Novogrodsky A., Nishimura T. S., Meister A.* - J. Biol. Chem. 1963. V. 238. P. 5-10.
6. *Porter T. G., Spink D. C., Martin S. B., Martin D. L.* - J. Biol. Chem. 1985. V. 231. P. 705-712.
7. *Камалян Р. Г., Микаелян Е., Варданыан А. Г., Камалян М. Г.* – Нейрохимия. 1999. 16. N 3. С. 248-250
8. *Hambarzumyan D. Kh., Vardanyan A. G., Mikaelyan E. R., G. Kamalyan R. G.* – In: Biochemical and molecular-biological aspects of the brain immune system (ed. A. Galoyan), Yerevan-Tsakhkadzor. 2001. P. 203-210.
9. *Kamalyan R. G., Manucharyan M.* - Neurochem. Research. 2008. V. 33. N 6. P. 1164-1165.
10. *Brody F. N., Vain J. A.* - J. Biol. Chem. 1952. V. 195. P. 685-692.
11. *Камалян Р. Г., Матевосян С. Г.* – Вопр. биохимии мозга. Изд. АН АрмССР. 1966. Вып. 2. С. 40-48.
12. *Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А.* - Вопр. мед. химии. 1962. N 5. С. 538-542.
13. *Тарве У. С.* В кн.: Матер. III всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы. Ереван. 1963. С. 271.
14. *Камалян Р. Г., Бунятян Г. Х., Мовсесян С. Г.*- Вопр. биохимии мозга. Изд. АН АрмССР. 1968. Вып. 4. С. 16-26.
15. *Balazs R., Haslam R. G.* - Biochem J. 1960. V. 94. P. 131-137.
16. *Krebs H. A., Bellamy D.* - Biochem J. 1960. V.75. P. 523-530.