

21. Wu J.-Y. Decarboxylases. Brain glutamate decarboxylase as a model // *Ibid.* — P. 111—131.
22. Bernasconi R., Maitre L., Martin P., Raschdorf F. The use of inhibitors of GABA-transaminase for the determination of GABA turnover in mouse brain regions: an evaluation of aminoxyacetic acid and gabaculine // *J. Biochem.* — 1982. — 38, N 1. — P. 57—66.
23. Van den Berg C., Garfinkel D. A simulation study of brain compartments // *Biochem. J.* — 1971. — 123, N 1. — P. 211—218.
24. Baxter C. Some recent advances in studies of GABA metabolism and compartmentation // *GABA in nervous system function* / Ed. by E. Roberts, T. Chase, D. Tower. — New York: Raven Press, 1976. — P. 61—88.
25. Brain P., Evans A. Acute influences of some ACTH-related peptides on fighting and adrenocortical activity in male laboratory mice // *Pharmacol. Biochem. and Behav.* — 1977. — 7, N 5. — P. 425—433.
26. Howells D. The inhibitory transmitter: GABA or its choline ester // *J. Pharm. Pharmacol.* — 1971. — 23, N 10. — P. 794—795.
27. Ефимова Е. К. О действии экзогенного гидрокортизона на синаптическую передачу в центральной нервной системе // *Физиология, биохимия и патология эндокринной системы.* — Киев: Здоров'я, 1972. — Вып. 2. — С. 17—19.
28. Сапронов Н. С. Возбудимость гипоталамуса и лимбических структур мозга кроликов под влиянием глюкокортикоидов и АКТГ // *Фармакология и токсикология.* — 1975. — 38, № 6. — С. 672—675.

Киев. НИИ эндокринологии  
и обмена веществ

Получено 12.12.89

УДК 577.152.141+597.554.3

© А. А. ЖИДЕНКО, В. В. ГРУБИНКО, А. Ф. ЯВОНЕНКО

## ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОПРЕВРАЩЕНИЯ $\alpha$ -КЕТОГЛУТАРАТ — ГЛУТАМАТ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА ЭКЗОТЕРМНЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ЗИМОВКИ

*Выявлена корреляция в динамике изменений содержания глутамата,  $\alpha$ -кетоглутарата, глутаминна, аммиака и уровня активности  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы, NAD P-глутаматдегидрогеназы, глутаминсинтетазы, а также глутаминазы в мозге молодых особей карпа в процессе зимнего голодания. Установлено, что в условиях энергетического состояния и образования значительного количества аммиака в организме зимующих рыб, его связывание наряду с известным глутаминсинтезным механизмом может протекать и в ходе NADP-глутаматдегидрогеназной реакции, равновесие которой сдвинуто в сторону синтеза глутамата. Предполагается, что эта реакция обеспечивает отток  $\alpha$ -кетоглутарата из лимонного цикла, что приводит к обострению энергетического состояния организма.*

Одним из механизмов, обеспечивающих пластичность ткани мозга при экстремальных состояниях, вызванных охлаждением организма, является лабильность процессов высвобождения и связывания аммиака [1]. Особая роль в реакциях трансаминирования и дезаминирования, а также в энергетическом обмене мозга принадлежит глутаминовой кислоте, которая является источником промежуточных продуктов цикла Кребса, в том числе  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты. В то же время возможна и обратная реакция — синтез глутамата из  $\alpha$ -кетоглутарата. У эндотермных организмов ее значение заключается в детоксикации избытка аммиака в мозге [2]. У экзотермных животных в связи с образованием значительных количеств аммиака при действии экстремальных факторов (низкие температуры, голодание и др.) роль данного механизма детоксикации в ткани мозга, по-видимому, также должна быть существенной.

Целью нашей работы явилось изучение возможности связывания аммиака в мозге карповых рыб в ходе NADP-глутаматдегидрогеназной реакции при низких температурах.

## Материалы и методы

Объектом исследования служили особи карпа (*Cyprinus carpio*) возрастом до одного года. Митохондрии из клеток мозга выделяли методом дифференциального центрифугирования [3] и дополнительно очищали центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (0,32—1,2 М) [4]. Глутаматдегидрогеназную активность определяли спектрофотометрически посредством регистрации реакции окисления NADPH при длине волны 340 нм в 0,05 М  $K^+$ -фосфатном буфере, рН 7,5, при этом использовали ранее описанную методику [5] в некоторой модификации. Инкубационная смесь (3 мл) содержала: 40 мМ  $K^+$ -фосфат; 13,6 мМ 2-оксоглутарат, 21 мМ ацетат аммония; 0,9 мМ ЭДТА; 0,12 мМ NADPH; 0,1 мМ ADP. Активность фермента выражали в наномолях окисленного NADPH в расчете на 1 мг белка за 1 мин.

Определение 2-оксоглутаратдегидрогеназной активности осуществляли по методу, описанному ранее [3]. Состав инкубационной среды: 130 мМ KCl; 20 мМ  $KH_2PO_4$ ; 20 мМ трис-HCl; 5 мМ  $MgCl_2$  рН 7,2. Инкубировали на протяжении 7 мин в режиме постоянного продувания воздуха через суспензию. После 2 мин преинкубации к митохондриям добавляли 2-оксоглутарат и малат (конечная концентрация 2 мМ). Фосфорилирование инициировали посредством добавления ADP до конечной концентрации 10 мМ. Ферментативную активность выражали в наномолях окисленного 2-оксоглутарата на 1 мг белка за 1 мин.

Содержание 2-оксоглутарата (в микромолях на 100 г сырой ткани) определяли спектрофотометрически, используя ферментативный метод [6].

Определение активности глутаминсинтетазы, глутаминазы, а также содержание аммиака и глутаминина в мозге рыб осуществляли, как описано ранее [7, 8], количество глутаминовой кислоты определяли хроматографически [9], концентрацию белка — по методу Лоури.

Результаты обрабатывали статистически по Ойвину.

## Результаты и обсуждение

Из данных, приведенных в табл. 1, следует, что в процессе зимовки в мозге исследуемых рыб увеличивается содержание аммиака. Это связано с возрастанием доли свободных аминокислот и белков, используемых в качестве источника энергии, а также с интенсификацией дезаминирования небелковых азотистых субстратов [10, 11]. В то же время в мозге молодых рыб наблюдается увеличение содержания глутаминина, что коррелирует со значительным возрастанием в этот период активности глутаминсинтетазы (табл. 2), являющейся одним из основных ферментов детоксикации аммиака в организме рыб [12]. Однако, накопление аммиака к середине зимовки может свидетельствовать о недостаточной эффективности его связывания в нетоксичный глутамин в ходе глутаминсинтетазной реакции (из-за возникновения у зимующей молодежи карпа энергодефицитного состояния [13]). В таких условиях происходит включение других механизмов детоксикации аммиака. Одним из них является восстановительное аминирование  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты с образованием глутаминовой. Известно, что равновесие глутаратдегидрогеназной реакции обычно сдвинуто в сторону синтеза глутамата [14]. Кроме того, 2-оксоглутарат неконкурентно ингибирует окисление глутамата в митохондриях эндотермных жи-

Таблица 1. Изменение содержания некоторых метаболитов обмена глутамата в ткани мозга молодежи карпа в процессе зимовки (мкмоль на 100 г сырой ткани;  $M \pm m$ ;  $n=6$ )

Субстраты	Месяцы			
	сентябрь	февраль	апрель	
			1 группа	2 группа
2-Оксоглутарат	$1,95 \pm 0,23$	$1,28 \pm 0,10$	$0,27 \pm 0,05^*$	$0,09 \pm 0,02^{**}$
Глутамат	$50,36 \pm 11,98$	$8,26 \pm 1,20^*$	$19,21 \pm 1,44^*$	$23,70 \pm 1,99^*$
Глутамин	$15,04 \pm 2,52$	$19,79 \pm 3,37$	$15,97 \pm 0,42$	$4,39 \pm 0,61^{**}$
Аммиак	$50,88 \pm 6,13$	$231,33 \pm 20,96^*$	$78,40 \pm 6,35^*$	$143,08 \pm 9,37^{**}$

\*. \*\* В табл. 1, 2 различия по отношению к показателям сентября и между исследуемыми группами соответственно статистически достоверны,  $p < 0,001 - 0,05$ .

вотных [15], это приводит к дополнительному смещению равновесия в сторону образования глутаминовой кислоты. Поэтому обнаруженный нами факт образования наибольшего количества 2-оксоглутарата в мозге рыб в сентябре (табл. 1) подтверждает потенциальную возможность участия NADP-зависимой глутаратдегидрогеназы в детоксикации аммиака в процессе зимовки. Однако при этом происходит отток важнейшего промежуточного продукта цикла Кребса —  $\alpha$ -кетоглутара-

**Таблица 2.** Изменение активности некоторых ферментов обмена глутамата в митохондриях мозга молоди карпа в процессе зимовки ( $M \pm m$ ;  $n=6$ )

Ферментативная активность	Месяцы			
	сентябрь	февраль	апрель	
			1 группа	2 группа
$\alpha$ -Кетоглутаратдегидрогеназная, нмоль $\alpha$ -кетоглутарата на 1 мг белка за 1 мин	4,20 $\pm$ 0,71	3,74 $\pm$ 0,37	6,97 $\pm$ 0,70*	5,76 $\pm$ 0,48
NADP-глутаматдегидрогеназная, нмоль NADPH на 1 мг белка за 1 мин	20,12 $\pm$ 1,15	14,98 $\pm$ 1,95*	20,98 $\pm$ 1,41	22,87 $\pm$ 2,40
Глутаминсинтетазная, мкмоль $P_1$ на 1 мг белка за 1 мин	1,16 $\pm$ 0,03	9,30 $\pm$ 0,67*	6,21 $\pm$ 0,62*	5,14 $\pm$ 1,10*
Глутаминазная, нмоль $NH_3$ на 1 мг белка в 1 мин	2,17 $\pm$ 0,07	7,73 $\pm$ 1,13*	29,41 $\pm$ 4,68*	24,05 $\pm$ 4,00*

та. В то же время ожидаемого снижения скорости функционирования цикла трикарбоновых кислот в начальный период зимовки не наблюдается. Известно, что для эндотермных животных убыль промежуточных продуктов цикла восполняется благодаря действию другого набора ферментов. При нормальных условиях реакции, выводящие промежуточные продукты из лимонного цикла, и реакции, восполняющие их убыль, находятся в состоянии динамического равновесия. Поэтому концентрация этих метаболитов в митохондриях остается практически постоянной [2].

Наши эксперименты подтверждают данный механизм для экзотермных животных: концентрация  $\alpha$ -кетоглутарата в митохондриях мозга исследованных рыб на протяжении первоначальных 4-х месяцев зимовки изменялась недостоверно ( $p < 0,1$ ). Однако к концу зимовки картина меняется. Можно провести дифференциацию молоди карпа по физиологическому состоянию и исследуемым биохимическим показателям. Нами выделены две группы рыб: к первой («сильные») отнесены активные, подвижные особи, быстро реагирующие на внешнее раздражение. Ко второй группе («слабые») — неактивные, вялые, малоподвижные особи с замедленной реакцией на раздражение. Изученные нами биохимические параметры исследованных рыб также значительно отличались (табл. 1). Так, в апреле содержание  $\alpha$ -кетоглутарата в мозге у рыб первой группы уменьшилось в 7 раз по сравнению с сентябрем, а у рыб второй группы — в 21,7 раз. Различия в содержании  $\alpha$ -кетоглутарата у рыб сравниваемых групп, по-видимому, вызывает снижение активности  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы у «слабой» молоди карпа (табл. 2). Это, вероятно, может быть причиной снижения энергообразования в цикле трикарбоновых кислот у «слабых» особей. В то же время глутаматдегидрогеназная активность у рыб второй группы по сравнению с особями первой увеличивается (табл. 2). Это приводит к возрастанию содержания глутамата в ткани мозга «слабых» рыб (табл. 1).

Содержание глутамина и уровень активности глутаминсинтетазы с февраля по апрель снижается, особенно у рыб второй группы. Из этого следует, что уровень концентрации образуемого в это время аммиака за счет утилизации аминокислот должен возрастать. Однако из данных, представленных в табл. 1, следует, что содержание аммиака в мозге рыб с февраля к апрелю снижается, что особенно заметно в случае рыб первой группы. Поэтому можно предположить возможность связывания аммиака вне глутаминсинтетазного пути, т. е. в ходе NADP-глутаматдегидрогеназной реакции (табл. 2).

Исходя из полученных данных, мы считаем, что весной (по выходе молоди карпа из зимовки) в митохондриях мозга рыб имеет место усиленный отток  $\alpha$ -кетоглутарата из цикла трикарбоновых кислот. При этом, вероятно, в отличие от первоначального периода голодания, компенсаторного восполнения промежуточных метаболитов не происходит. Причина этого — дефицит энергии и недостаток свободных аминокислот, образующихся при ферментативном гидролизе эндогенных белков мышц в этот период и служащих источником энергии у карповых рыб [16].

Таким образом, процесс взаимопревращения  $\alpha$ -кетоглутарат — глутамат в мозге зимующей молоди карпа носит адаптивный характер и в условиях энергодифицита направлен на детоксикацию конечного продукта азотного обмена — аммиака. Нарушение динамического равновесия в системе рассматриваемых превращений (вследствие невозможности компенсаторного восполнения промежуточных метаболитов из-за недостаточности питательных субстратов) может вызвать нарушение процессов выведения аммония, энергообразования. По-видимому, именно это является одной из причин гибели молоди карпа в период зимовки.

*А. О. Жиденко, В. В. Грубинко, О. Ф. Явоненко*

ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОПЕРЕТВОРЕННЯ  
 $\alpha$ -КЕТОГЛУТАРАТ — ГЛУТАМАТ В МІТОХОНДРІЯХ МОЗКУ  
ЕКЗОТЕРМНИХ ТВАРИН В УМОВАХ ЗИМІВЛІ

Резюме

Виявлено кореляцію між динамікою вмісту глутамату,  $\alpha$ -кетоглутарату, глутаміну і амонію та рівнем активності  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази, NADP-глутаматдегідрогенази, глутамінсинтетази і глутамінази в мозку моделі коропа в процесі зимового голодування. Встановлено, що за умов енергодифициту в організмі і при утворенні значної кількості аміаку в зимуючих рыб, його зв'язування поряд з відомим глутамінсинтетазним механізмом може здійснюватися і в NADP-глутаматдегідрогеназній реакції, рівновага якої зміщена в бік синтезу глутамату. В зв'язку з цим, імовірно, відбувається вилучення  $\alpha$ -кетоглутарату з лимонного циклу, поглиблюється енергодифицитний стан організму рыб, що можливо спричинює їх загибель.

Чернігівський педагогічний ін-т  
ім. Т. Г. Шевченка

*A. A. Zhidenko, V. V. Grubinko, A. F. Yavonenko*

PECULIARITIES OF INTERCONVERSION OF  
 $\alpha$ -KETOGLUTORATE — GLUTAMATE IN BRAIN MITOCHONDRIA  
OF EXOTHERMAL ANIMALS UNDER HIBERNATION

Summary

It has been found that there exists a correlation in the dynamics of changes in the amount of glutamate,  $\alpha$ -ketoglutarate, glutamine, ammonia and activity level of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase, NADP-glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutaminase in the brain of young carp in the process of winter starvation. It has been stated that under condition of energy deficiency and meaningful amount of ammonia in the organism of hibernating fish, its binding parallel with the known glutamine syn-

thetase mechanism may proceed in the course of the NADP-glutamate dehydrogenase reaction which balance is shifted towards the glutamate synthesis. This reaction is supposed to provide the outflow of  $\alpha$ -ketoglutarate from the citric cycle, which intensifies energy deficiency of the organism.

T. G. Shevchenko Pedogogical Institute, Chernigov

1. Эмирбеков Э. З., Исмаилов И. А. Влияние гипотермии на систему аммиак—глутамин—глутаминовая кислота в головном мозге сусликов после зимней спячки // Укр. биохим. журн.— 1979.— 51, № 6.— С. 684—686.
2. Ленинджер А. Л. Основы биохимии.— М.: Мир, 1985.— Т. 2.— 368 с.
3. Зинич В. Н. Метод измерения 2-оксоглутаратдегидрогеназной активности интактных митохондрий // Укр. биохим. журн.— 1986.— 58, № 2.— С. 73—77.
4. Арутюнян А. В., Гулян Э. А., Нерсисян Ц. М. и др. АМР-дезаминазная активность ядерной и митохондриальной ткани мозга // Там же.— 50, № 5.— С. 554—558.
5. Biochemica information.— W.-Germany: Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, 1975.— Bd. 2.— 167 s.
6. Bergmeyer H.-U., Bernt E.  $\alpha$ -Oxoglutarate // Methods of enzymatic analysis / Ed. H.-U. Bergmeyer.— Weinheim: Verlag Chemie, 1963.— P. 324—327.
7. Грубинко В. В., Явоненко А. Ф., Яковенко Б. В. Субклеточная локализация глутаминсинтетазной активности в мышечной ткани и печени карпа // Укр. биохим. журн.— 1987.— 50, № 3.— С. 73—76.
8. Явоненко А. Ф., Яковенко Б. В., Грубинко В. В., Жиденко А. А. Глутаминсинтетазная и глутаминазная активность в организме молоди карпа при выходе из зимовки // Рыб. хоз-во.— 1988.— Вып. 42.— С. 45—49.
9. Пасхина Т. С. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге // Современные методы в биохимии.— М.: Медицина, 1964.— Т. 1.— С. 162—180.
10. Creac'h Y. Protein thiols and free amino acids of carp tissues during prolonged starvation // Arch. Sci. Physiol.— 1966.— 20, N 1.— P. 115—121.
11. Raffin I., Leroy C. Comparative study on AMP-deaminase in gill, muscle and blood of fish // Comp. Biochem. and Physiol.— 1980.— 67, N 4.— P. 533—540.
12. Creac'h Y., Vellas F., Bauche G. Metabolisme azote chez les poissons // Bull Union of seanoogr. France.— 1974.— 6, N 4.— P. 57—59.
13. Сорвачев К. Ф. К вопросу об азотистом обмене мышц у рыб // Биохимия.— 1959.— 24, № 3.— С. 489—495.
14. Krebs H. A., Veech R. L. Pyridine nucleotide interrelations // The Energy level and metabolic control in mitochondria / Eds. S. Papa, J. M. Tager, E. Quagliariello, E. C. Slater.— Bari: Adriatica Editrice, 1969.— P. 329—382.
15. Хиллар М., Уонг Д. С. Регуляция глутаматдегидрогеназной активности в изолированных митохондриях печени крысы под влиянием пуриновых нуклеотидов, циклического АМР,  $\alpha$ -кетоглутарата и фосфата // Биохимия.— 1975.— 40, № 6.— С. 1275—1281.
16. Явоненко А. Ф., Яковенко Б. В., Грубинко В. В., Жиденко А. А. Зависимость выживаемости молоди карпа в условиях зимовки от содержания свободных аминокислот и белков в мышечной ткани рыб // Рыб. хоз-во.— 1989.— Вып. 43.— С. 24—29.

Получено 16.02.90

Чернигов. пед. ин-т им. Т. Г. Шевченко

УДК 612.8.015+591.35+577.112.3

© А. Н. ФАРАДЖЕВ

## ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ГЛУТАМИНОВОЙ, АСПАРАГИНОВОЙ И ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТ В МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ СТРУКТУР ЛИМБИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА СОБАК В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

Обнаружено, что содержание глутаминовой, аспарагиновой и гамма-аминомасляной кислот в исходной митохондриальной фракции структур лимбической системы мозга собак в период постнатального онтогенеза повышается к годовалому возрасту. Содержание глутаминовой кислоты во всех изученных периодах онтогенеза превышает содержание аспарагиновой и гамма-аминомасляной кислот в митохондриальной фракции структур лимбической системы.