

О ТОРМОЖЕНИИ АКТИВНОСТИ  
ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ ИЗ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ  
ЧЕЛОВЕКА И МОЗГА КРЫС ГАММА-  
АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТОЙ

А.Х. ТОВМАСЯН, Б.А. КАЗАРЯН, А.А. БАРСЕГЯН,  
М.Р. ВАРТАНЯН

*Институт молекулярной биологии НАН Армении, 375014, Ереван*

Показано, что гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) тормозит активность тирозингидроксилазы, выделенной из лейкоцитов крови человека, синапсом гипоталамуса и полосатого тела мозга крыс и обработанной тритоном X-100.

Յույց է տրված, որ գամա-ամինակարագարրոն (ԳԱԿ) արգելակում է ծարղու արյան լեյկոցիտներից և սոնետների ուղեղի հիպոթալամուսից ու շերտավոր ծարճնից անջատված և տրիտոն X-100-ով մշակված, քիրոզին հիպոթալազի ակտիվությունը:

The gamma-aminobutyric acid (GABA) inhibits the activity of tyrosine hydroxylase, isolated from the human blood leucocytes and the synaptosomes of hypothalamus and striate body of rats brain and treated by triton X-100.

*Тирозингидроксилаза - лейкоциты - мозг - ГАМК.*

Изучение взаимодействия различных нейромедиаторных систем мозга приобретает все более актуальный характер. В этом аспекте обнаружение фермента тирозин-3-монооксигеназы (ТТ, КФ 1.14.3.2) в лейкоцитах крови человека, являющегося ключевым при биосинтезе катехоламинов, имеет большое значение. Минесовой показано [2], что ТТ из лейкоцитов крови имеет кинетические свойства, сходные с таковыми мозгового фермента, что делает возможным прижизненное изучение кинетических параметров и изменений активности последнего под влиянием различных факторов и биологически активных соединений.

Процесс взаимодействия ГАМК-ергической и дофаминергической систем мозга изучался многими исследователями [7, 12, 13]. ГАМК обнаруживается в ЦНС, где она выполняет медиаторную и регуляторную функции, в периферической нервной системе, а также в других органах (поджелудочной железе, кишечнике, печени, сосудах) и в крови. Проведенные в последние годы исследования вынуждают по-новому

оценить роль ГАМК в периферических органах. Так, например, на поверхности мембран изолированных телятоцитов существуют специфические ГАМК-рецепторы [6]. ГАМК и ГАМК-рецепторы представлены в вегетативной нервной системе, в частности, на постганглионарных симпатических волокнах, иннервирующих сердечно-сосудистую систему и кишечник [14,10]. Установлено наличие ГАМК-рецепторов на мембране лимфоцитов и тромбоцитов, кроме того, тромбоциты содержат фермент деградации ГАМК - ГАМК-трансаминазу [9]. Содержание ГАМК в крови составляет  $10^{-6}$ М, что близко к физиологической концентрации ее в мозге. С другой стороны, на внешних мембранах нейтрофилов локализованы  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторы, а также дофаминовые рецепторы [5]. Таким образом, приведенные литературные данные позволяют предположить, что лейкоциты крови имеют составные части как холинергической и ГАМК-ергической систем.

В связи с вышесказанным нас заинтересовали степень идентичности свойств ТГ из крови человека, гипоталамуса и полосатого тела мыши крысы, а также изменения их в присутствии ГАМК.

*Материал и методика.* Гедаринизированную плазму крови человека отстаивали в течение 30 мин в пермосеке. Кровь центрифугировали в течение 10 мин при 3000g. Затем отбирали фракцию, обогащенную лейкоцитами, которую подвергали обработке последовательно гипертоническим раствором хлористого натрия и дистиллированной водой при 4 °С для более полной очистки фракции лейкоцитов.

Полученный препарат лейкоцитов обрабатывали 0,2%-ным раствором тритона X-100 для разрушения мембран клеток и центрифугировали при 15000g в течение 30 мин. Полосаточную жидкость использовали в качестве источника фермента.

Выделение ситалпосом проводили по методу Хайоня [9].

Для определения ТГ-ативной активности использовали спектрофотометрический метод [1], который позволяет непосредственно следить за ходом реакции по приросту окисленного кофермента реакции ДМШ. Инкубационная смесь содержала: 3,0 мл 0,1М трис-малеатного буфера (рН 6,15), различные концентрации тирозина, 500 мкМ ДМШ, 100 мкМ ГАМК. Измерения проводили на спектрофотометре Spcord M-40 UVVIS. При определении концентрации белка использовали метод Бредфорда [4].

*Результаты и обсуждение.* В первой серии экспериментов было изучено действие ГАМК на активность солиобилизированной 0,2%-ным тритоном X-100 ТГ, выделенной из лейкоцитов крови человека в условиях *in vitro* при различных концентрациях субстрата реакции - тирозина. ГАМК проявляла ингибирующий эффект на активность фермента. При этом с увеличением концентрации субстрата возрастала

и степень ингибирования. Так, например, при концентрации тирозина 60 мкМ величина ингибирования составила 17%, 120 мкМ - 22%, 180 мкМ - 29%, 240 мкМ - 42% и 360 мкМ - 63% (рис. 1). Для субстрата реакции - тирозина - были определены величины  $K_m$ . До добавления ГАМК она составила 20 мкМ, что близко к имеющимся литературным данным [2], и 13 мкМ - после добавления ГАМК. Добавление ГАМК приводит к снижению максимальной скорости реакции с 310 до 215 имоль/мин/мг белка.

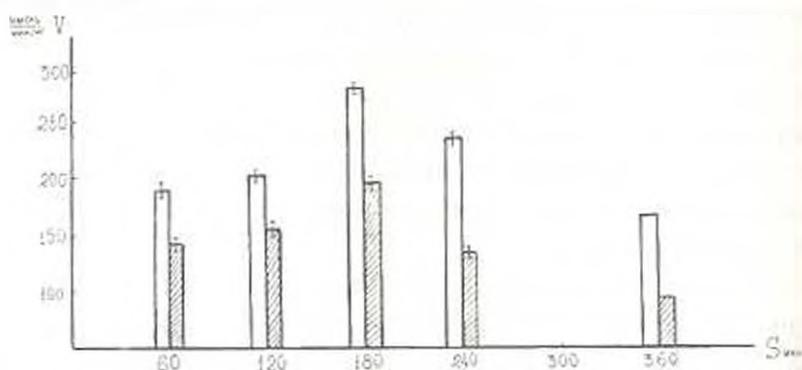


Рис. 1. Влияние ГАМК на активность солибилизированной гританом X-100 ТГ из лейкоцитов крови человека при различных концентрациях тирозина.

□ - контроль, ▨ - ГАМК 10<sup>-6</sup> M.

Для определения специфичности эффекта ГАМК изучалось ее влияние на активность солибилизированной 0,2%-ным гританом X-100 ТГ из гипоталамуса и полосатого тела мозга крыс. Выявлено ингибирующее влияние ее при всех исследуемых концентрациях тирозина. Однако, если в экспериментах с ТГ из лейкоцитов крови величина ингибирования возрастала при повышении концентрации тирозина, то в данном случае, несколько увеличиваясь, она затем снижалась. Так, активность ТГ из гипоталамуса подавлялась при концентрации тирозина 60 мкМ на 64,5%, при концентрации 180 мкМ - 59%, а при концентрации 360 мкМ величина ингибирования составила 15% (рис. 2). Активность ТГ из полосатого тела ингибировалась относительно меньше, но с той же закономерностью: 60 мкМ - 34,4%, 120 мкМ - 38,1%, 180 мкМ - 27,1%, 240 мкМ - 10,5% (рис. 3). Величина  $K_m$  для тирозина составила: для фермента из гипоталамуса 45 мкМ до и 12 мкМ после добавления ГАМК, для фермента из полосатого тела - 33 и 30 мкМ соответственно. Следует отметить также снижение максимальной скорости реакции с 207 до 60 имоль/мин/мг белка для фермента из гипоталамуса и с 315 до 218 имоль/мин/мг белка для ТГ из



активности ТТ.

Нами было исследовано также влияние ГАМК на активность ТТ, выделенной из лейкоцитов и обработанной 0,1%-ным раствором тритона X-100 и методом быстрого замораживания-размораживания. Оказалось, что ГАМК ингибирует активность фермента в меньшей степени и даже увеличивает скорость гидроксилирования тирозина, однако данные оказались статистически недостоверными, поэтому мы сочли целесообразным не приводить их в данной публикации.

Таким образом, ГАМК оказывает тормозящее влияние на активность соллобидизированных тритоном X-100 препаратов ТТ как из лейкоцитов крови человека, так и из гипоталамуса и полосатого тела мозга крыс, что, по-видимому, может свидетельствовать об определенном сходстве этих форм фермента.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Минеева Вялых М.Ф. *Вопр. мед. химии*, 22, 2, 274-279, 1976.
2. Минеева М.Ф. *Бюлл. эксп. биол. и мед.*, 65, 99-101, 1987.
3. Товмасын А.Х., Минеева М.Ф., Казарян Б.А. *Нейрохимия*, 5, 257-264, 1986.
4. Bradford M.M. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
5. Faraj B.A., Olkowski Z.L., Jackson R. *Pharmacol.*, 42, 135-141, 1991.
6. Ferenoi P., Ebner J., Zimmerman Ch., Kikuta Ch., Roth E., Haussinger D. *Hepatol.*, 8, 69-72, 1988.
7. Gale K., Casu M. *Mol. and Cell. Biochem.*, 39, 364-365, 1981.
8. Garry D.J., Sorenson R.L., Elde R.P., Muley B.E., Madson A.A. *Diabetes.*, 35, 1090-1095, 1986.
9. Gentilini G., Faill P., Gietty A., Nardi Dei V., Ziletti L. *Eur. J. Pharmacol.*, 183, 335-336, 1990.
10. Hajos F. *Brain Res.*, 93, 485-489, 1975.
11. Krantis A., Harding R.K. *Eur. J. Pharmacol.*, 141, 291-298, 1987.
12. Minik G.Y., Bear C.A., Sarjeant E.J. *Amer. J. Physiol.*, 252, 642-647, 1987.
13. Van den Pol A.N. *J. Neurosci.*, 6, 877-891, 1986.
14. Scheel-Kruger J. *Acta Neurol. Scand.*, 73, 107, 1986.
15. Schneider D. *Naunyn-Sch. Arch. Pharm.*, 343, 94, 1991.

Получила 25 VII 1998