

ВЗАИМОСВЯЗЬ АКТИВНОСТИ γ -ГЛУТАМИЛТРАНСФЕРАЗЫ И ТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ ВОЗБУЖДАЮЩИХ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ АМИНОКИСЛОТ

ТУРШЯН Г. А., АКОПЯН Г. Е., САФРАЗЯН С. С., АПРИКЯН Г. В.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятына АН Армении, Ереван

Серин в присутствии бората ингибирует активность γ -глутамилтрансферазы и захват возбуждающих нейромедиаторных аминокислот—глутаминовой и аспарагиновой. С другой стороны, конкурентный ингибитор захвата глутаминовой и аспарагиновой кислот—N-ацетил-L-аспарагиновая кислота является сильным природным ингибитором активности γ -глутамилтрансферазы. Полученные результаты указывают на возможную роль γ -глутамилтрансферазы в транспорте возбуждающих нейромедиаторных аминокислот через синаптическую мембрану.

γ -Глутамилтрансферазе КФ 2.3.2.2. (5-глутамил) пептид: аминокислота 5-глутамилтрансфераза (ГГТФ) придается определенная роль в транспорте аминокислот, пептидов и аминов через клеточные мембраны, хотя отсутствуют прямые доказательства [1]. Имеются только сведения о том, что в культуре клеток глиии и нейронов мозга куриных эмбрионов существует взаимосвязь между захватом глутаминовой кислоты и активностью этого фермента [2]. Из литературных данных видно, что наибольшая активность ГГТФ сосредоточена в почечной ткани и поджелудочной железе [3]. Примечательно, что выраженная активность фермента обнаружена в лактирующей молочной железе [4]. Наши исследования показали, что ГГТФ активность головного мозга сосредоточена главным образом в синаптической фракции, что может указывать на ее отношение к синаптической передаче [6].

Настоящая работа посвящена выяснению возможной роли ГГТФ в захвате нейромедиаторных аминокислот синаптическими головными мозга белых крыс. По имеющимся литературным данным серин в присутствии бората оказывает сильное ингибирующее действие на активность ГГТФ [3, 7]. Представляло интерес изучить сдвиги в степени захвата медиаторных аминокислот в аналогичных условиях. В связи с ранее установленным в нашей лаборатории фактом ингибирования захвата нейромедиаторных аминокислот клеточными популяциями и синаптическими головными мозга N-ацетил-L-аспарагиновой кислотой (НАА) [8] было изучено её действие на активность ГГТФ.

В качестве экспериментальных животных использовали белых крыс линии *Wistar*, содержащихся на обычном пищевом рационе инвентаризации. Синапсомы из головного мозга выделяли по методу Hajos [9]. Конечный осадок синапсомы суспендировали в следующей среде поглощения: 0,32 М сахара на 0,1 М трис-НСl буфере, pH 7,4, NaCl—127, KCl—5, CaCl₂—2,7, MgSO₄—1,3, глюкоза—11,1 мМ. Активность ГГТФ определяли по методу Meister и соавт. [7].

Захват нейромедиаторных аминокислот—глутаминовой (ГК) и аспарагиновой кислот (АК) изучали в атмосфере воздуха при 37° в течение 20 мин. Пробы содержали 0,9 мл среды поглощения, 0,1 мл синапсомной суспензии, содержащей 100 мкг белка, 0,05 мКи/мл соответствующих меченных [¹⁴C] аминокислот и 10⁻⁶ М аминокислоту (АУК) для подавления трансаминирования. Серин и борат добавляли в конечной концентрации 5 мМ, а N-ацетиласпартат (НАА)—10⁻³ и 3·10⁻³ М. Реакцию останавливали добавлением 1 мл холодной среды поглощения. Синапсомы осаждали центрифугированием при 1300g в течение 15 мин при 4°. Осадок промывали дважды 3 мл инкубационной смеси, осаждали как указано выше и растворяли в 0,7 мл 98%-ного диметилсульфоксида. Радиоактивность измеряли, используя сцинтилляционную жидкость Бреля, на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Intertechnique-4221» (Франция). Степень захвата аминокислот выражали в распад/мин/мг белка. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [10]. В опытах использовали [¹⁴C] АК (140 мКи/ммоль), [¹⁴C] ГК (200 мКи/ммоль) «Chemipro» СССР, НАА (93,82%) АУК («Sigma», США).

Результаты и обсуждение

Данные табл. 1 показывают, что активность ГГТФ в синапсомах головного мозга белых крыс составляет $2,12 \pm 0,077$ нМ п-нитроанилина/мин·мг белка. Добавление серина в концентрации 5 мМ не

Таблица 1

Действие серина и бората на γ -глутамилтрансферазную активность (нмоль п-нитроанилина/мин/мг белка) в синапсомной фракции белых крыс

Контроль	2,12±0,08 (5)
Серин 5 мМ	2,23±0,114 (6) p>0,5
Борат 5 мМ	3,35±0,141 (6) p<0,001
Серин+борат	0 (6)

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 в скобках указано количество опытов.

оказывает заметного влияния на активность фермента. При добавлении бората в той же концентрации не только не ингибируется ферментативная активность, но и заметно активируется. Указанное повышение активности ГТТФ можно объяснить увеличением ионов Na при добавлении бората [7]. Совместное добавление серина и бората в тех же концентрациях приводит к 100%-ному ингибированию активности фермента. Полученные нами данные в отношении действия ука-

Таблица 2

Действие серина и бората на поглощение $[^{14}\text{C}]$ ТК и $[^{14}\text{C}]$ АК
(распад/мин/мг белка) синапсомы мозга белых крыс

Условия эксперимента	ГК	% ингибирования	АК	% ингибирования
Контроль	$179354,0 \pm 6777,33$ (12)		$102059,8 \pm 6792,58$ (7)	
Серин 5 мМ	$89802,91 \pm 3487,91$ (6) $p < 0,001$	49,93	$4247,42 \pm 597,6$ (7) $p < 0,001$	58,5
Борат 5 мМ	$15030,6 \pm 5869,42$ (9) $p \leq 0,01$	16,8	$91533,63 \pm 12963,63$ (7) $p < 0,2$	10,4
Серин + борат 5 мМ	$9125,54 \pm 5053,07$ (9) $p < 0,001$	49,7	$4545,03 \pm 685,01$ (7) $p < 0,001$	55,5

занных соединений в синапсомы головного мозга согласуются с данными литературы, указывающими, что серин сам по себе не оказывает заметного влияния на активность фермента из почек крыс, тогда как в присутствии бората ингибирует ее активность в весьма высокой степени. Авторы считают, что для действия серина, ингибитора ГТТФ, обязательно присутствие бората. Так, в среде трис-HCl и вероната серин не действует на активность ГТТФ [3]. В дальнейшем в наших экспериментах мы исходили из того, что если фермент имеет отношение к транспорту аминокислот, то ингибиторы фермента окажут аналогичное действие на высокоаффинный захват нейромедиаторных аминокислот.

Таблица 3

γ -Глутамилтрансферазная активность в (нмоль *p*-нитроанилина/мин/мг белка) синапсомы фракции мозга белых крыс в присутствии *N*-ацетиласпартата

Условия эксперимента	Активность фермента	% ингибирования
Контроль	$1,755 \pm 0,161$ (6)	
<i>N</i> -ацетиласпартат 10^{-3} М	$0,47 \pm 0,015$ (6) $p < 0,001$	72,95
<i>N</i> -ацетиласпартат $3 \cdot 10^{-4}$ М	$0,244 \pm 0,073$ (6) $p < 0,001$	86,45

Результаты исследований, приведенные в табл. 2, показывают, что добавление серина в конечной концентрации 5 мМ в весьма высокой степени ингибирует захват ГК (на 49,93%) и АК (на 58,5%).

Хотя борат также оказывает ингибирующее действие на захват ГК (на 16,8%) и АК (на 10,4%), это действие по сравнению с серином незначительно. При одновременном добавлении к инкубационной среде серина и бората в тех же концентрациях захват ГК и АК ингибируется в той же степени, как в присутствии серина. Таким образом, серин оказывает сильное ингибирующее действие на захват ГК и АК как в отсутствие, так и в присутствии бората, а на активность ГТТФ — только в присутствии бората. Для выяснения этого вопроса необходимы дополнительные исследования.

Как было отмечено выше, нейроспецифическое соединение головного мозга NAA, количество которой составляет 100—200 мг% является ингибитором захвата ГК и АК синаптическими головными [8]. В связи с полученными нами результатами о возможной взаимосвязи активности ГТТФ и высокоаффинного захвата возбуждающих нейромедиаторных аминокислот представляло интерес изучение влияния NAA на активность указанного фермента в синаптических головных мозга.

Как видно из данных табл. 3, NAA в концентрации 10^{-3} и $3 \cdot 10^{-3}$ М ингибирует активность ГТТФ соответственно на 72,95 и 83,05%.

Исследования, проведенные нами по изучению ГТТФ в субклеточных фракциях мозга, показали наличие значительной активности фермента в синаптической фракции. Последующие исследования в отношении изучения активности фермента в онтогенезе показали, что в мозгу она достаточно повышается со дня рождения животного и достигает максимума в зрелом возрасте [5]. Наличие значительной активности ГТТФ в синаптической фракции головного мозга подтверждает гипотезу Meister и соавт. о транспортной функции γ -глутаминового цикла [7].

Таким образом, нами обнаружен новый ингибитор ГТТФ в головном мозгу — NAA, который является нейроспецифическим соединением. Полученные данные указывают, что ГТТФ имеет непосредственное отношение к транспорту возбуждающих нейромедиаторных аминокислот в синаптических головных мозга.

RELATIONSHIP BETWEEN γ -GLUTAMYLTRANSFERASE ACTIVITY AND THE TRANSPORTATION SYSTEM OF THE EXCITATORY AMINO ACID NEUROTRANSMITTERS

TURSHIAN G. A., HAKOPIAN G. E., SAFRAZIAN S. S., APRIKIAN G. V.

Institute of Biochemistry of the Armenian Acad. Sci., Yerevan

γ -Glutamyltransferase (GGTF)-inhibitor serine borate proved to be an effective inhibitor of excitatory amino acids i. e., glutamic (GA) and aspartic (AA) acids, uptake. On the other hand, N-acetyl-L-aspartic acid

that is a competitive inhibitor of GA and AA uptake, has been found to be the effective natural inhibitor of GGTF activity. The data obtained points out the important role of GGTF in the transfer of the excitatory amino acid neurotransmitters through synaptic membrane.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Orlowski M., Meister A.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 67, p. 1248—1252, 1970.
2. *Hajkova B., Lisy V., Pearce B., Murphy S., Stasting F.* Proc. of the Fifth Meeting of European Society for Neurochemistry, Abstracts (ed. E. S. Vizi, K. Magyar), p. 119, 1984.
3. *Revel J. P., Ball E. G. J.* Biol. Chem., v. 234, p. 577—582, 1959.
4. *Hanes C. S., Hird F. Y. R., Tisherwood F. A.* Biochem. J., v. 51, p. 25—5, 1952.
5. *Туриян Г. А., Акопян Г. Е., Сафразян С. С., Априкян Г. В.* Биол. журн. Армения, т. 42, № 2, с. 153—156, 1988.
6. *Туриян Г. А., Акопян Г. Е., Сафразян С. С.* Нейрохимия, т. 3, № 1, с. 47—50, 1984.
7. *Meister A., Tate S. S., Ross L. L.*—In: Enzymes of Biological Membranes (ed. A. Martonosi), p. 315—347, Plenum Press, New York, 1976.
8. *Априкян Г. В., Княрян В. А., Шагинян В. А., Ахвердян Э. С.* Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 71—76, 1987.
9. *Hajos F.* Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
10. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. S.* J. Biol. Chem. v. 193, p. 265—275, 1951.

Поступила 17. XI. 1990