



## АКТИВНОСТЬ КИСЛЫХ И НЕЙТРАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС; РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В ГЛИИ И НЕЙРОНАХ

МУРТИ В., ПРАКАШ Г. С., СУБРАМАНИЯМ К., ШРИВАСТУ К. Р.,  
ПРАСАД М. С. К., САДАСИВУДУ Б.

Центр современных исследований в области нейрохимии, Отдел биохимии  
Османского медицинского колледжа, Хайдарабад, Индия

Помимо роли, которую играют протеиназы головного мозга в кругообороте белков, они принимают участие в аксоплазматическом токе [1] и образовании таких биологически активных пептидов, как вещество Р [2], эндорфины и энкефалины [3]. В различных тканях описаны два типа протеиназ—лизосомные и нелизосомные. Наибольшая роль в протеолизе отводится цистеиновым протеиназам—катепсинам В, Н и L [4]. Лизосомная аспарагиновая протеиназа катепсина D, активная при кислых значениях рН, обладает более узкой специфичностью по сравнению с цистеиновыми протеиназами. Все вышеуказанные протеиназы были выделены из ткани головного мозга разных животных [5—9]. Из головного мозга была выделена также нелизосомная протеиназа, активная при нейтральных значениях рН [5]. В настоящем сообщении представлены результаты исследований по региональному распределению протеиназ, активных при кислых и нейтральных значениях рН, в головном мозгу крыс и сопоставлено их содержание в изолированных препаратах нейронов и глии.

Эксперименты были проведены на белых крысах массой 150—200 г. Животных декапитировали и выделяли мозжечок, кору больших полушарий, ствол мозга согласно методике, предложенной Sadasivudu и Lajtha [10].

В опытах использовали 10%-ный гомогенат ткани в 0,32 М ледяной сахарозе, который получали с помощью гомогенизатора типа Поттер-Эльвегейм, используя тефлоновый пестик. Гомогенизацию проводили через 3 мин после декапитации.

Фракции, обогащенные нейронами и глией, получали по методу Iqbal и Tellez Nagel [11] в модификации Shrivastaw и соавт. [12]. Кору больших полушарий инкубировали с 0,1%-ным трипсином 1 ч при

37° в 10 мМ К-фосфатном буфере, рН 6,0 содержащем 10%-ный фиколл и 10%-ные растворы глюкозы и фукозы. Затем в пробы добавляли 0,1%-ный раствор ингибитора трипсина, все последующие операции проводили при 0—4°. Ткань размельчали, пропуская ее последовательно через сита разного диаметра (105, 75 и 53 мкм). Полученную суспензию разводили равным объемом 50%-ной сахарозы и насланвали на прерывистый градиент сахарозы, содержащий 5 мл 50%-ной сахарозы, 10 мл 40%-ной сахарозы и 5 мл 35%-ной сахарозы. После 10-минутного центрифугирования при 4500g отбирали нейрональную фракцию, осевшую между 40 и 50%-ной сахарозой, для дальнейшей очистки. Глиальная фракция была получена на границе 35 и 40%-ной сахарозы. Морфологическая картина полученных фракций в фазово-контрастном микроскопе полностью соответствовала описанию Iqbal и Tellez Nagel [11] и Norton и Poduslo [13].

Активность протениаз определяли по методу Serra и соавт. [14] по высвобождению тирозина из денатурированного мочевиной гемоглобина. В случае протениаз, активных при нейтральных значениях рН, инкубационная смесь содержала 0,1 мл гемоглобина (2,5 мг), 32 мкмоль трис-НСI буфера, рН 7,6 и 0,2 мл гомогената. После 1 ч инкубации в термостатированной водяной бане при 37° с помешиванием реакцию останавливали добавлением 2 мл 5%-ной ТХУ. Затем пробы центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин и к 1 мл супернатанта добавляли 2 мл 0,5 М карбонат-бикарбонатного буфера в 0,05 М NaOH (рН 10,5), а через 10 мин при комнатной температуре—0,5 мл реагента Фолина (1:2,5) и через 1 ч измеряли поглощение при 750 нм, используя L-тирозин в качестве стандарта. В случае протениаз, активных при кислых значениях рН, в качестве субстрата использовали раствор гемоглобина (5 мл) в цитратном буфере, рН 3,2 (40 мкмоль цитрата). Белок определяли по методу Lowry и соавт. [15], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Проведенные исследования показали, что активность нейтральных протениаз почти одинакова в коре полушарий и стволе мозга и несколько ниже в мозжечке (таблица). Во всех 3-х регионах активность

*Таблица*

Активность кислых и нейтральных протениаз в различных отделах головного мозга крыс (мкмоль тирозина/г сырой ткани)

	Кора больших полушарий	Мозжечок	Ствол мозга
Нейтральные протениазы	12,63± 1,38 (6)	10,63± 2,86 (6)	14,63± 2,59 (6)
Кислые протениазы	156,8±	153,5±	118,75±
Белок (мг/г сырой ткани)	11,4 (6)	12,32 (6)	13,57 (6)
	97,76±	92,4±	84,83±
	4,55 (6)	6,91 (6)	16,6 (6)

кислых протенназ в 10 раз выше, чем нейтральных. Минимальная активность кислой протенназы обнаружена в стволе мозга, в двух других областях она практически одинакова. Как видно из данных, представленных на рисунке, У. А. нейтральных протенназ выше в глиальных клетках по сравнению с нейронами. Однако У. А. кислых протенназ в 4 раза выше в нейронах, чем в глии. С другой стороны, в нейронах У. А. кислых протенназ в 5 раз выше, чем нейтральных. В глиальных же клетках У. А. нейтральных протенназ вдвое выше, чем кислых. Минимальное содержание белка обнаружено в стволе мозга.

В последнее время описаны два основных пути внутриклеточной деградации белков. Установлено, что внутриклеточная деградация белков, в основном, осуществляется лизосомными протенназами [16]. По-видимому, за нелизосомный протеолиз ответственны протенназы, активные при нейтральных значениях рН.

Обычно более высокая активность кислых протенназ по сравнению с нейтральными в любом отделе головного мозга свидетельствует о большем вкладе кислых протенназ в деградацию белков, что может играть определенную роль при патологии.

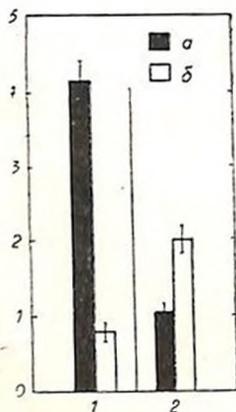


Рис. Активность кислых и нейтральных протенназ во фракциях, обогащенных нейронами (1) и глиальными клетками (2). а—кислые протенназы; б—нейтральные протенназы. По оси ординат—активность в мкмоль тирозина/мг белка/ч

Поскольку установлено, что активность кислых протенназ выше в нейрональном препарате, большая часть протенназ, активных при кислых значениях рН, должна быть локализована в нейронах. Точно так же высокая активность нейтральных протенназ в любом отделе головного мозга может быть обусловлена повышенным содержанием глиальных клеток. Значительная активность нейтральных протенназ обнаружена в синапсоммах [17]. Существует гипотеза, что деградация белков с длинным периодом полужизни осуществляется лизосомными ферментами, тогда как расщепление белков с коротким периодом полужизни может быть частично обусловлено нелизосомными нейтральными протенназами. Известно, что 3,5% белков мозга имеют короткое время полужизни (в среднем 10 ч), тогда как остальные—более длительное (в среднем 10 дней) [18]. В этой связи можно предположить, что нейроны обладают более высокой протеолитической активностью, что важно для осуществления ряда процессов, перечисленных во введении.

# ACID AND NEUTRAL PROTEINASES IN DIFFERENT REGIONS OF RAT BRAIN ALONG WITH THEIR DISTRIBUTION IN NEURONS AND GLIA

MOORTHY B., SURYA PRAKASH G., SUBRAHMANYAM K., SHRIVASTAW K. P.,  
PRASAD M. S. K., SADASIVUDU B.

Centre for Advanced Research in Neurobiochemistry, Department of Biochemistry,  
Osmania Medical College, India

Acid (pH 3,2) and neutral (pH 7,6) proteinase activities were studied in different regions of rat brain along with their specific activities in the enriched neuronal and glial cell preparations. It was found that the specific activity of neutral proteinase was relatively higher in glial cells when compared to neurons, while the specific activity of acid proteinase was higher in neurons. These data are discussed in relation to the breakdown of proteins in brain.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Black M. M., Lasek R. J. *Brain Res.*, v. 171, p. 401—413, 1979.
2. Marks N., Lajtha A.—In: *Handbook of Neurochemistry*, v. 5, pt. A., (ed. Lajtha A.), N. Y., Plenum Press, 1971.
3. Herbert E., D. *Trends Biochem. Sci.*, v. 6, p. 184—188, 1981.
4. Barrett A. J., Kirschke H.—In: *Methods in Enzymology*, v. 80, pt. C. p. 535—561, Lorand, L., N. Y., Acad. Press Inc., 1981.
5. Marks N., Lajtha A. *Biochem. J.*, v. 97, p. 74—83, 1965.
6. Hackenthal E., Hackenthal R., Hilgenfeldt U. *Biochim. et biophys. acta*, v. 522, p. 561—573, 1978.
7. Benuck M., Grynbaum A., Marks N. *Brain Res.*, v. 143, p. 181—185, 1978.
8. Barkhudaryan N. A., Akopyan T. N., Galoyan A. A. *Biokhimiya (Moscow)*, v. 45, p. 1293—1297, 1980.
9. Azaryan A. V., Akopyan T. N., Buntatyan H. Ch. *Biomed. Biochem. Acta*, v. 42, p. 1237—1246, 1983.
10. Sadasivudu B., Lajtha A. J. *Neurochem.*, v. 17, p. 1299—1311, 1970.
11. Iqbal K., Tellez Nagel. *Brain Res.*, v. 45, 296—301, 1972.
12. Shrivastaw K. P., Phillip M., Chevallier P. J. *Neurosci. Res.*, v. 9, p. 1—14, 1983.
13. Norton W. T., Podusto S. E. *Science*, v. 167, p. 1144—1146, 1970.
14. Serra S. A., Grynbaum A., Lajtha A., Marks N. *Brain Res.*, v. 44, p. 579—592, 1972.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
16. Poole B., Wibo M. J. *Biol. Chem.*, v. 248, p. 6221—6226, 1973.
17. Lajtha A.—In: *Regional Neurochemistry*, p. 25—36, (Kety S. S., Elkes J., Eds.) London, Pergamon Press, 1961.
18. Lajtha A., Dunlop D. *Life Sci.*, v. 29, p. 755—767, 1981.

Поступила 9. II, 1984