

17. Тигранян Р. А., Вахулина О. П., Панченко Л. Д. Космич. биология и авиакосмич. медицина, т. 18, № 4, с. 63—66, 1984.
18. Fratta W., Yung H.—Y. T., Hong J., Costa E. Nature, v. 268, p. 452—453, 1977.
19. Rossier J., Guillemin R., Bloom F. Eur. J. Pharmacol., v. 48, p. 465—466, 1978.
20. Akil H., Shioda H., Walner J. M., Watson S. G. — In: Adv. in Biochem. Pharmacol., v. 3, p. 61—67, 1982.
21. Chretien M., Seidah N. Mol. and Cell. Biochem., v. 34, p. 101—127, 1981.
22. Verdhoven P. V., Carton H. FEBS Lett., v. 138, p. 76—78, 1982.
23. McGivern R. F., Mousa S., Couri D., Berntson G. G. Life Sci., v. 33, p. 47—54, 1983.
24. Swann A. C., Elsworth J. D., Charney D. S. Eur. J. Pharmacol., v. 86, p. 167—175, 1983.
25. Kohno Y., Tanaka M., Hoaki Y., Ida Y., Nagasaki M. Eur. J. Pharmacol., v. 92, p. 265—268, 1983.

Поступила 10. IX 1986

УДК 547.965

РОЛЬ N-АЦЕТИЛ-L-АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ АМИНОКИСЛОТ

АГРИКЯН Г. В., КНАРЯН В. А., ШАГИНЯН В. А., АХВЕРДЯН Э. С.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Исследовано влияние N-ацетил-L-аспарагиновой кислоты (НААК) на высокоаффинный захват нейромедиаторных аминокислот (аспарагиновой, глутаминовой и ГАМК) обогащенными фракциями нейронов, глии и синапсом головного мозга крысы. Показано, что НААК заметно подавляла захват дикарбоновых аминокислот указанными фракциями, но не влияла на захват ГАМК. Ингибирование захвата аспарагиновой кислоты синаптической фракцией под действием НААК носило конкурентный характер. Полученные результаты свидетельствуют о том, что НААК является природным ингибитором захвата возбуждающих нейромедиаторных аминокислот.

N-ацетил-L-аспарагиновая кислота (НААК) была обнаружена в головном мозгу животных Tallan и соавт. в 1956 г. [1]. Количество этого нейроспецифического соединения в мозгу птиц и млекопитающих составляет 80—110 мг%, у рыб и черепах—11—16 мг%, в мозгу лягушек и в нервной ткани беспозвоночных содержание НААК незначительно [2]. Самое высокое содержание НААК было установлено в сером веществе головного мозга—124 мг%, а самое низкое—в корешках спинного мозга—48 мг% [2]. Количество НААК в сером веществе мозга в 2 раза больше, чем в белом; в спинномозговой жидкости не обнаружена.

При фракционировании мозговой ткани 59% глутаминовой кислоты (ГК), 47% аспарагиновой кислоты (АК) и 52% НААК обнаруживалось

в растворимой фракции и соответственно 23, 39 и 39%—в грубой митохондриальной фракции. Субфракционирование последней показало аналогичное с возбуждающими нейромедиаторами распределение NAAK с преимущественной локализацией в синаптосомах. Распределение ГК, АК и NAAK в процентах в очищенных митохондриях соответственно составляло 27, 7 и 23%, а в синаптосомах—50, 85 и 61% [3]. Преимущественное распределение NAAK в синаптосомах по сравнению с митохондриями указывает на ее непосредственное отношение к передаче нервного импульса.

Goldstein [4] выделил из головного мозга и частично очистил фермент аспартикоацетилазу, ацетилирующую исключительно АК. Примечательно, что задолго до открытия NAAK Birnbaum и соавт. [5] установили, что в почках ацилазой I подвергаются гидролизу ацетилапроизводные всех аминокислот, кроме NAAK, а ацилазой II из всех ацетилапроизводных аминокислот подвергается гидролизу только NAAK.

Роль NAAK в организме животных остается окончательно невыясненной. По мнению Tallan [2], она принимает определенное участие в сохранении ионного равновесия в НС как источник анионов. Хотя меченые предшественники (глюкоза, ацетат) слабо включаются в NAAK, тем не менее, в определенных экспериментальных условиях было показано значительное включение метки в молекулу NAAK [6]. Период полужизни NAAK составляет 12 ч [7]. По данным Оганесяна [8], NAAK является эффективным источником ацетата для синтеза ацетилхолина. Следует также отметить, что NAAK активирует глутаминазу I головного мозга [9].

При возбуждении, вызванном кофенином (2,5—7,5 мг/100 г живой массы), количество NAAK в мозгу белых мышей заметно понижалось [10]. Введение ганглиоблокатора—ганглерона (4 мг/100 г живой массы) вызывало аналогичный эффект. Отмечено также заметное снижение количества NAAK в мозгу белых мышей после возбужденного плавания [10] и у агрессивных мышей [11]. Возможно, при возбуждении ЦНС NAAK подвергается усиленному гидролизу, а образовавшиеся АК и ацетат, окисляясь, могут служить дополнительным источником энергии для деятельности мозга. В пользу этого заключения свидетельствуют данные о том, что при инкубации срезов коры больших полушарий головного мозга добавление NAAK приводило к заметному усилению поглощения O_2 этими срезами [12].

Имеются сведения о том, что гистамин, норадреналин, серотонин и дофамин уменьшают количество NAAK в срезах головного мозга. Учитывая, что гистамин, норадреналин и серотонин (но не дофамин) увеличивали содержание 3',5'-сАМР в срезах коры больших полушарий морских свинок [13, 14], Reichelt и соавт. [15] исследовали вероятную роль сАМР в снижении содержания NAAK. Ингибирование фосфодиэстеразы сАМР кофенином приводило к некоторому уменьшению количества NAAK. Активирующий аденилатциклазу NaF в препаратах мозга крыс с разрушенными клетками [16] не изменял концентрацию NAAK [15]. Хотя аденозин является наиболее эффективным стимулятором образования сАМР [17, 18], Reichelt и соавт. наблюдали лишь слабое увеличение со-

держания НААК под его действием. Эти авторы пришли к выводу, что действие нуклеотидов на НААК не прямое [15].

Недавно было показано, что наряду с АК и ГК НААК в условиях *in vitro* значительно повышала количество сАМР в коре больших полушарий [19]. Имеются сведения также о том, что НААК является антагонистом возбуждающих нейромедиаторов—АК и ГК [20]. Ингибирующий эффект НААК на связывание АК с постсинаптическими рецепторами [21] является дополнительным свидетельством синаптической активности НААК.

Материалы и методы

Объектом исследований служил головной мозг половозрелых белых крыс, содержащихся на обычном пищевом рационе вивария. Обогащенные фракции нейронов и глии получали по ранее описанному методу [22]. Синапсомы выделяли по Hajos [23]. Конечный осадок обогащенных фракций нейронов и глии и синапсомы суспендировали в 0,32 М сахарозе. Состав среды поглощения (конечные концентрации в ммоль): трис-НСl буфер, рН 7,4—25; NaCl—127,2; KCl—5; CaCl₂—2,7; MgSO₄—1,3; глюкоза—11,1.

Захват аминокислот изучали инкубированием проб в атмосфере воздуха при постоянном встряхивании и температуре 37° в течение 20 мин. Пробы содержали 0,9 мл среды поглощения, 0,1 мл соответствующей фракции, содержащей 100 мкг белка, меченые аминокислоты в конечной концентрации 10⁻⁵М, аминоксиуксусную кислоту (АОУК) в той же концентрации для подавления трансаминирования и 0,05 мКи/мл соответствующих меченых ¹⁴С-аминокислот; НААК добавляли в конечной концентрации 10⁻³М. Реакцию останавливали добавлением 1 мл холодной среды поглощения. Фракции осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 мин при 4°, надосадочную жидкость декантировали, осадок растворяли протозолом или диметилсульфоксидом. Радиоактивность измеряли, используя сцинтилляционную жидкость Брэя, на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Intertechnique SL-4221» (Франция). Степень захвата аминокислот выражали величиной распад/мин/мг осадка, деленной на величину распад/мин/мкл среды. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [24] в модификации Hess и Lewin [25].

В опытах использовали НААК, АК, ГК, ГАМК и АОУК „Sigma“, США (чистота НААК составляла 99,32%), радиоактивные ¹⁴С-АК (140 мКи ммоль) (ЧССР), ¹⁴С-ГК (200 мКи ммоль) (ЧССР), ¹⁴С-ГАМК (11,8 мКи ммоль) (Венгрия).

Результаты и обсуждение

В течение ряда лет в нашей лаборатории изучается роль НААК в передаче первого импульса в ЦНС животных. Первые работы были выполнены на обогащенных фракциях нейронов и глии головного мозга белых крыс. Полученные результаты показали, что НААК в концентрации 1 мМ ингибировала высокоаффинный захват ¹⁴С-АК фракцией нейронов (рис. 1, а) и фракцией глии (рис. 1, б) на 25,8 и 37% соответственно. Вызывает интерес то, что неприродное соединение N-ацетил-L-аспарагин в той же концентрации оказалось неэффективным, в то время как аспарагин проявил ингибирующее действие в обеих фракциях (на 27%). Изучение действия НААК на захват ¹⁴С-АК синапсомной фракцией (рис. 1, в) показало, что НААК в той же концентрации ингибировала

процесс захвата еще сильнее (на 46,8%). В указанных экспериментальных условиях NAAK ингибировала захват синапсоматами ^{14}C -ГК несколько интенсивнее, чем ^{14}C -АК (на 54%), но не оказывала заметного влияния на захват тормозного медиатора ГАМК. Таким образом, нами установлено, что NAAK является природным ингибитором захвата возбуждающих нейромедиаторных аминокислот—АК и ГК. Используемая величина концентрации NAAK является физиологической, так как расчеты по данным Reichell и соавт. [3] показали, что содержание NAAK в синапсомной фракции составляет 1,3 мМ.

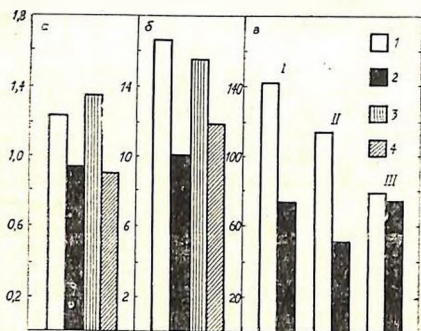


Рис. 1. Высокоаффинный захват ^{14}C -АК обогащенными фракциями нейронов (а) и глии (б) головного мозга белых крыс: контроль (1), под действием 1 мМ NAAK (2), N-ацетил-L-аспарагина (3) и аспарагина (4); захват ^{14}C -АК (I), ^{14}C -ГК (II) и ^{14}C -ГАМК (III) синапсомной фракцией (в) под действием 1 мМ NAAK. По оси ординат—отношение захвата в распад/мин/мг осадка к величине распад/мин/мкл среды

В следующей серии экспериментов было установлено (рис. 2), что по мере увеличения концентрации NAAK в среде инкубации синапсом ингибирующий эффект возрастал. При концентрации NAAK 5 мМ захват ^{14}C -АК оказался почти полностью ингибированным. Величины IC_{50} , полученные для захвата ^{14}C -АК и ^{14}C -ГК синапсомной фракцией головного мозга белых крыс, имели близкие значения, равняясь соответственно 3,0 и 2,4 мМ. Кинетический анализ захвата ^{14}C -АК синапсомной фракцией показал (рис. 3), что ингибирование захвата под действием NAAK носило конкурентный характер. Так, K_m захвата ^{14}C -АК в контроле составляла 10 мМ, а в присутствии NAAK—20 мМ. Максимальная скорость захвата при этом не менялась и была равной 11,1 нмоль/мг белка/5 мин. Таким образом, сродство ^{14}C -АК в присутствии NAAK снижалось вдвое.

Было проверено также влияние фторпроизводного NAAK—фторацетиласпарагиновой кислоты—FNAAK* на захват ^{14}C -АК и ^{14}C -ГК. FNAAK оказывала аналогичное с NAAK действие, но несколько превос-

ходившее эффект последней; FNAAK также не оказывала влияния на захват ^{14}C -ГАМК.

Таким образом, в настоящее время можно считать доказанным, что NAAK является регулятором содержания сАМР, ингибитором связы-

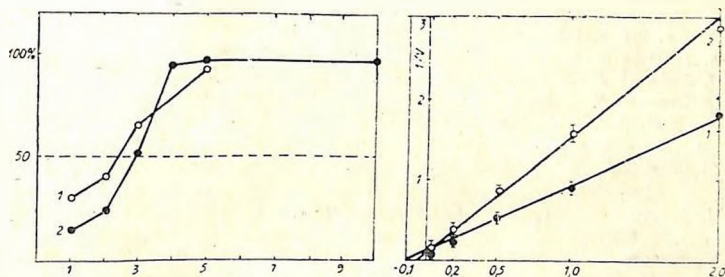


Рис. 2. Величины IC_{50} захвата ^{14}C -ГК (1) и ^{14}C -АК (2) синапсомной фракцией головного мозга белых крыс под действием NAAK в возрастающей концентрации; IC_{50} (1) = 2,4 мМ; IC_{50} (2) = 3 мМ. По оси абсцисс—концентрация NAAK, в мМ; по оси ординат—ингибирование захвата, в %.

Рис. 3. Кинетика захвата ^{14}C -АК синапсомной фракцией головного мозга белых крыс по Лайнуиверу-Берку в отсутствие (1) и в присутствии (2) NAAK (3 мМ). По оси абсцисс—величины $1/[\text{АК}]$, $(\text{мМ})^{-1}$; по оси ординат—количество ^{14}C -АК (нмоль/мг белка/5 мин) $^{-1}$. K_m (1) = 10 мМ; K_m (2) = 20 мМ; $V = 11,1$ нмоль/мг белка/5 мин

вания ^{14}C -АК с соответствующими постсинаптическими рецепторами [19, 21], а также природным ингибитором захвата возбуждающих нейромедиаторных аминокислот—АК и ГК.

ROLE OF N-ACETYL-L-ASPARTIC ACID IN THE MECHANISM OF ACTION OF NEUROTRANSMITTER AMINO ACIDS

APRIKIAN G. V., KNARIAN V. A., SHAHINIAN V. A., AKHVERDIAN E. S.

Institute of Biochemistry Arm. SSR Academy of Sciences, Yerevan

A new effect of N-acetyl-L-aspartic acid (NAA) is established: it depresses the high affinity uptake of Asp and Glu in enriched neuronal and glial fractions, and especially in synaptosomes. NAA does not affect the uptake of GABA. It was found that NAA inhibited competitively the uptake of Asp by synaptosomes. N-acetyl-L-asparagine does not affect the uptake of neurotransmitter amino acids.

* FNAAK синтезировал сотрудник нашего института Я. В. Возный

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Tallan H. H., Moore S., Stein W. H. J. Biol. Chem., v. 219, p. 257—264, 1956.
2. Tallan H. H. J. Biol. Chem., v. 224, p. 41—45, 1957.
3. Reichelt K. L., Fonnum F. J. Neurochem., v. 16, p. 1409—1416, 1969.
4. Goldstein F. B. J. Biol. Chem., v. 234, p. 2702—2706, 1959.
5. Birnbaum S. M., Levintov L., Kingsley F. B., Greenstein G. P. J. Biol. Chem., v. 194, p. 455—470, 1952.
6. Jacobson K. B. J. Gen. Physiol., v. 43, p. 323—333, 1959.
7. McIntosh J. C., Cooper J. R. J. Neurochem., v. 12, p. 825—835, 1965.
8. Оганесян В. С. Докл. АН АрмССР, т. 32, с. 37—41, 1961.
9. Оганесян В. С., Бунятыян Г. Х., Бадалян А. А., Микуртумова К. С. Вопр. биохимии мозга, т. 5, с. 5—16, Изд-во АН АрмССР, 1969.
10. Бунятыян Г. Х., Априкян Г. В. Вспр. биохимии мозга, т. 2, с. 5—15, Изд-во АН АрмССР, 1961.
11. Marcucci F., Mussini E., Valzelli L., Gerattini S. J. Neurochem., v. 15, p. 53—54, 1968.
12. Бунятыян Г. Х., Априкян Г. В., Паронян й. А. Вспр. биохимии мозга, т. 1, с. 139—144, Изд-во АН АрмССР, 1964.
13. Kakiuchi S., Rall T. W. Mol. Pharmacol., v. 4, p. 367—373, 1963.
14. Forn J., Krishna G. Fed. proc. Amer. Soc. Exp. Biol., v. 29, p. 480—482, 1970.
15. Reichelt K. L., Wedege E., Kvamme E. J. Neurochem., v. 18, p. 2129—2136, 1971.
16. Perkins J. P., Moore M. M. J. Biol. Chem., v. 245, p. 62—68, 1971.
17. Kakiuchi S., Rall T. W. Mol. Pharmacol., v. 4, p. 379—384, 1968.
18. Sattin A., Rall T. W. Mol. Pharmacol., v. 6, p. 13—17, 1970.
19. Burgal M., Jorda A., Grisolia S. J. Neurochem., v. 38, p. 1498—1500, 1982.
20. Curatolo A., Marchetti M., Brancati A., Solleo A. Arch. Sci. Biol., v. 51, p. 98—103, 1967.
21. Burgal M., Lizondo J., Jorda A., Grisolia S. Neurochem., Res., v. 9, p. 219—224, 1984.
22. Априкян Г. В., Хамбергер А. Вопр. биохимии мозга, т. 12, с. 168—176, Изд-во АН АрмССР, 1977.
23. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
24. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, с. 265—275, 1951.
25. Hess H. H., Lewin E. J. Neurochem., v. 12, p. 205—211, 1965.

Поступила 9. IX 1986