



Биолог. журн. Армении, 3 (64), 2012

## АКТИВНОСТЬ ГАММА-ГЛУТАМИЛ ТРАНСПЕПТИДАЗЫ ПЕЧЕНИ ПРИ ГИПЕРАММОНЕМИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ И ЛЕЧЕНИИ АММИАКСНИЖАЮЩИМИ СРЕДСТВАМИ

Г.А. ТУРШЯН, Ж.А. ПАРОНЯН, Н.В. КОЧАРЯН, Г.В. АПРИКЯН

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА  
veraapri@yahoo.com

При гипераммонемическом синдроме в печени резко повышается активность гамма-глутамил транспептидазы (ГТТ). Установлено, что под действием предложенной нами аминокислотной смеси, наряду со значительным снижением аммиака в печени, при гипераммонемическом синдроме чётко снижается и активность ГТТ. Показано также, что под действием ингибитора NO синтазы L-NAME, параллельно со снижением содержания аммиака, значительно снижается активность ГТТ, что объясняется следствием подавления образования токсических продуктов NO и стимулированием синтеза глутамина.

### *γ-глутамил транспептидаза – гипераммонемия – L-NAME*

Գերամոնիակային համախտանիշի ժամանակ խիստ բարձրանում է գամմա-գլուտամիլ տրանսպեպտիդազի (ԳԳՏ) ակտիվությունը յարդդում: Պարզվել է, որ լաբորատորիայում մշակված ամինաթթվային խառնուրդի ազդեցությամբ ամոնիակի քանակի իջեցմանը զուգընթաց իջնում է նաև ԳԳՏ-ի ակտիվությունը: Ցույց է տրվել նաև, որ NO սինթազի արգելակիչ L-NAME-ի ազդեցությամբ իջնում է ԳԳՏ-ի ակտիվությունը, որը հետևանք է NO-ի թունավոր արգասիքների առաջացման ճնշման և գլուտամինի սինթեզի խթանման:

### *γ-glutamyl transpeptidase – hyperammonemia – L-NAME*

The activity of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) highly increases during hyperammonemic syndrome. After treatment of rats with amino acid mixture offered in our laboratory the activity of GGT decreased significantly. It was also shown that under the action of NO synthase inhibitor L-NAME, in parallel with the reduction of ammonia amount, the activity of GGT was strongly decreased, which is the result of the formation of toxic products of NO and stimulation of syntheses of glutamine.

### *γ-glutamyl transpeptidase – hyperammonemia – L-NAME*

Интерес к гамма-глутамил транспептидазе (ГТТ) возник в связи с обнаружением в организме множества низкомолекулярных ди- и трипептидов необычного строения и, в частности, γ-глутамилпептидов. Предполагалось, что этот фермент отвечает за синтез пептидов [28]. ГТТ катализирует перенос γ- глутамильного остатка с пептид донора (в природе, как правило, с глутатиона) на подходящий аминокислотный или пептидный акцептор [13, 14]. Донорами гамма-глутамильного остатка, кроме глутатиона, могут служить и другие γ-глутамилпептиды и глутамин. Акцепторами γ-глутамильного остатка, кроме широкого спектра аминокислот

и их производных, являются также дипептиды [30]. ГТТ также катализирует гидролиз глутатиона с образованием глутаминовой кислоты и цистеинил-глицина [31].

Наивысшая активность ГТТ сосредоточена в почках. Если в почках считать активность за 100, то в поджелудочной железе будет 8,3%, печени – 3,0%, селезёнке – 1,5%, мозге – 0,5%, лёгких – 0,3%, скелетных мышцах – 0,067% и сердечной мышце – 0,045%. ГТТ участвует в активном транспорте аминокислот и пептидов через клеточную мембрану в составе  $\gamma$ -глутамильного цикла [21, 22]. Глутатион (L-  $\gamma$ -глутамил-L-цистеинил-глицин) является преимущественно внутриклеточным веществом в сравнительно высоких концентрациях (0,5-10 мМ). ГТТ – мембраносвязанный фермент [20]. Регулируя уровень глутатиона, ГТТ может опосредованно влиять на поздние стадии белкового синтеза. Об этом свидетельствуют данные о том, что изменение белкового синтеза в злокачественных клетках сопровождается отсутствием активности ГТТ [11]. Из вышеизложенного становится понятным, что определение активности ГТТ стало одним из чувствительных тестов для выявления заболеваний почек, печени, поджелудочной железы и ряда других органов [9]. Действительно, при заболеваниях печени и некоторых других органов у людей и при экспериментальных гепатитах у животных, наряду с АСТ, АЛТ и щелочной фосфатазой, активность ГТТ значительно повышается, а при лечении чётко снижается [7, 8, 26, 29].

При изучении активности ГТТ в различных субклеточных фракциях головного мозга самая высокая активность была обнаружена в ядерной фракции, что свидетельствует об её отношении к синтезу белка. Второе место занимает синапсомная фракция, что указывает на определённую роль этого фермента в синаптической передаче [5]. Подтверждая литературные данные о 100%-ном ингибировании активности ГТТ в присутствии серина с боратом [27], в нашей лаборатории было показано, что в тех же условиях серин с боратом на 49,7% ингибирует захват глутаминовой кислоты (ГК) и 55,5% аспарагиновой кислоты (АК) [6]. Интересно отметить, что ингибитор захвата ГК и АК синапсомными N-ацетил-L-аспарагиновая кислота (НАА) [1] также ингибирует активность ГТТ на 86% [6].

В настоящей работе мы задались целью изучить активность ГТТ при экспериментальном гипераммонемическом синдроме и под действием предложенной нами аминокислотной смеси, которая эффективно снижает содержание аммиака при этом виде гипераммонемии [3]. Нами было изучено также действие ингибитора NO синтетазы L-NAME на активность ГТТ.

**Материал и методика.** В качестве экспериментальных животных были использованы белые крысы популяции Вистар массой 150-200 г. Гипераммонемический синдром вызывали двукратным внутрибрюшинным введением 3 мМ/кг  $\text{NH}_4\text{Cl}$  с интервалом 7 мин. Спустя 7 мин в/б вводили аминокислотную смесь (ГК – 4,76 мМ, АК – 0,53 мМ, орнитин – 0,61 мМ, цитруллин – 0,23 мМ). Через 15 мин после введения смеси животных обезглавливали и в печени определяли активность ГТТ по Орловскому и Майстеру [22].

Для определения активности ГТТ готовили реакционную смесь, 1 мл которой содержал 0,8 мл 0,1 М трис- $\text{HCl}$ , рН 8,2,  $\text{NaCl}$ -75 мМ,  $\gamma$ -глутамилпаранитроанилид (субстрат) – 2,5 мМ, глицил-глицин – 20 мМ, 10%-ный гомогенат – 0,2 мл. Инкубацию проводили в атмосфере воздуха при 37°C в течение 30 мин. Реакцию приостанавливали добавлением 1 мл 3 М раствора уксусной кислоты. Пробы центрифугировали в течение 20 мин при 20 тыс. об/мин и в надосадочной жидкости определяли активность ГТТ.

При инкубации реакционной смеси под действием ГТТ из субстрата выделяется нитроанилид, количество которого определяли спектрофотометрически при длине волны 410 нм против реакционной смеси, не содержащей субстрат. При изучении действия L-NAME, ингибитора NOS в опытах *in vitro* к реакционной смеси (1 мл) добавляли 0,27 мг L-NAME.

**Результаты и обсуждение.** При различных заболеваниях печени возникает гипераммонический синдром с частыми неврологическими осложнениями вплоть до энцефалопатии. В качестве лечебных средств, снижающих токсическое количество аммиака, используются дипептид L-орнитин-L-аспартат, промежуточные продукты орнитинового цикла, смесь из 20 аминокислот, входящих в состав белков, ингибиторы NOS [2].

Нами была предложена смесь аминокислот, которая оказалась эффективным аммиакснижающим средством [3]. Учитывая, что активность ГТТ значительно повышается при гипераммонемическом синдроме и снижается при его лечении [15, 19, 29], мы задались целью изучить сдвиги в активности ГТТ при гипераммонемии под действием указанной аминокислотной смеси, а также ингибитора NOS L-NAME.

**Таблица 1.** Активность  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы ( $\mu\text{M}$  нитроанилид/100 мг белка/ч) при гипераммонемическом синдроме и лечении аминокислотной смесью в печени белых крыс в опытах *in vivo*

Контроль	$\text{NH}_4\text{Cl}$	Разница, %	$\text{NH}_4\text{Cl}$ + аминокислотная смесь	Разница, %
43,73 $\pm$ 3,11 (7)	86,42 $\pm$ 8,56 (10)	+197,62 P<0,005	47,37 $\pm$ 6,66 (9)	-45,19 P<0,01

Исследования показали, что при двукратном в/б введении крысам 3 мМ/кг  $\text{NH}_4\text{Cl}$  активность ГТТ в печени увеличивается в 2 раза – на 197,62% (табл.1), а при последующем введении аминокислотной смеси повышенная активность ГТТ снижается почти до нормы. Таким образом, по снижению активности этого фермента можно судить об эффективности лечения гипераммонемического синдрома.

**Таблица 2.** Влияние L-NAME на активность  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы ( $\mu\text{M}$  нитроанилид/100 мг белка/ч) в печени белых крыс в опытах *in vitro*

Контроль	L-NAME	Разница, %
60,29 $\pm$ 1,88 (12)	40,26 $\pm$ 1,64 (12)	-33,39 P<0,001

Исследования, проведенные в опытах *in vitro*, показали, что под действием ингибитора NOS L-NAME в количестве 0,27 мг/мл активность ГТТ в гомогенатах печени снижается на 33,39%. Так, если активность этого фермента составляла 60,29, то под действием L-NAME снижается до 40,26 (табл.2). В аналогичных условиях под действием L-NAME содержание аммиака снижается и вследствие активирования глутамин синтетазы стимулируется синтез глутамина [2, 4, 16, 17, 25]. С указанными результатами созвучны данные о том, что под действием ацетил-карнитина у больных с циррозом печени четко снижается повышенное количество аммиака в крови, при этом активность ГТТ подвергается аналогичному изменению [19].

Исследования показали, что  $\gamma$ -глутамильным донором для ГТТ может служить также глутамин, при этом ГТТ проявляет глутаминазную активность с образованием свободного аммиака, однако этот путь не играет особой роли в образовании аммиака [18].

Хотя ГТТ была открыта в 1950 г. [13], роль её окончательно не выяснена. Не вызывает сомнения, что этот фермент отвечает за биосинтез  $\gamma$ -глутамил пептидов [14], которые становятся более устойчивыми

к действию пептидаз [11]. Несомненно, что ГГТ регулирует синтез и деградацию глутатиона [24] в организме,  $\gamma$ -глутамильный цикл связан со взаимопревращениями восстановленного и окисленного глутатиона [20].

ГГТ играет важную роль в транспорте аминокислот, хотя этот путь не единственный. Под действием мембраносвязанной ГГТ от внутриклеточного глутатиона, который подвергается транслокации из клеток, и внеклеточных аминокислот образуются  $\gamma$ -глутамил аминокислоты, которые транспортируются во внутрь клеток, где освобождаются аминокислоты [10, 12, 23].

Полученные нами результаты указывают, что ГГТ может служить показателем лечебного эффекта различных препаратов при печёночных заболеваниях, осложнённых гипераммонемическим синдромом.

Исследования по выяснению роли ГГТ в метаболизме и функции организма продолжаются.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Априкян Г.В., Княрян В.А., Шагинян В.А., Ахвердян Э.С. Роль N-ацетил-L-аспарагиновой кислоты в механизме действия нейромедиаторных аминокислот, *Нейрохимия*, 6, 1, 71-76, 1987.
2. Мисакян Г.С., Паронян Ж.А., Туршян Г.А., Априкян Г.В. Роль ингибиторов синтеза окиси азота в предотвращении токсического действия аммиака и глутамата в головном мозгу, *Мед. наука Армении, XLVI*, 2, 18-22, 2006.
3. Паронян Ж.А., Кочарян Н.В., Туршян Г.А., Априкян Г.В. Печёночная энцефалопатия, патогенез и терапевтические возможности, *Мед. наука Армении, L*, 17-27, 2010.
4. Паронян Ж.А., Туршян Г.А., Кочарян Н.В., Мисакян Г.С., Априкян Г.В. Участие окиси азота в регуляции азотистого обмена в печени, *Мед. наука Армении, XLIX*, 3, 66-74, 2009.
5. Туршян Г.А., Акопян Г.В., Сафразян С.С. Активность  $\gamma$ -глутамилтрансферазы в разных отделах и субклеточных фракциях мозга крыс, *Нейрохимия*, 3, 1, 47-50, 1984.
6. Туршян Г.А., Акопян Г.В., Сафразян С.С., Априкян Г.В. Взаимосвязь активности  $\gamma$ -глутамилтрансферазы и транспортной системы возбуждающих нейромедиаторных аминокислот, *Нейрохимия*, 9, 4, 427-431, 1990.
7. Bedogni G., Miglioli L., Masutti F. et al. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: The Dionysos nutrition and liver study, *Hepatology*, 42, 1, 44-52, 2005.
8. Braun J.P., Rico A.G., Bernard P., Burgat-Sacaze V. Gamma-glutamyltransferase. Human pathology and animal biology, *Ann. Biol. Clin.*, 35, 6, 433-457, 1977.
9. Dragosics B., Ferenci P., Pesendorfer F., Wewalka F.G. Gamma-glutamyl transpeptidase (GGTP), its relationship to other enzymes for diagnosis of Liver disease, *Progr. Liver Dis.*, 5, 436-449, 1976.
10. Elwyn D.H., Parikh H.C., Shoemaker W.C. Amino acid movements between gut, liver and periphery in unanesthetized dogs, *Amer. J. Physiol.*, 215, 15, 1260-1275, 1968.
11. Greenberg E., Wollaeger E.E., Fleisher G.A., Engstrom G.W. Demonstration of gamma-glutamyl transpeptidase activity in human jejunal mucosa, *Clin. Chim. Acta*, 16, 1, 79-83, 1967.
12. Griffith O.W., Bridges R.J., Meister A. Transport of gamma-glutamyl amino acids: role of glutathione and gamma-glutamyl transpeptidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76, 12, 6319-6322, 1979.
13. Hanes C.S., Hird F.J. Synthesis of peptides in enzymic reactions involving glutathione, *Nature*, 166, 288-292, 1950.
14. Hanes G.S., Hird F.J., Isherwood F.A. Enzymic transpeptidation reactions involving gamma-glutamyl peptides and alpha-amino-acyl peptides. *Biochem. J.*, 51, 1, 25-35, 1952.
15. Kasapoglu B., Turkay C., Bayram Y., Koca C. Role of GGT in diagnosis of metabolic syndrome: A clinicalbased cross-sectional survey, *Indian J. Med. Res.*, 132, 56-61, 2010.

16. *Kosenko E., Kaminsky Y., Grau E. et al.* Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthetase, attenuates ammonia toxicity and ammonia-induced alterations in brain metabolism, *Neurochem. Res.*, 20, 4, 451-456, 1995.
17. *Kosenko E., Liansola M., Montoliu C. et al.* Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide, *Neurochem. Internat.*, 43, 493-499, 2003.
18. *Lemieux G., Baverd G., Vinay P., Wadoux P.* Glutamine Synthetase and glutamyl transferase in the kidney of man, dog and rat, *Amer. J. Physiol.*, 231, 4, 1068-1073, 1976.
19. *Malaguarnera M., Bella R., Vacante M. et al.* Acetyl-L-carnitine reduces depression and improves quality of life in patients with minimal hepatic encephalopathy, *Scand. J. Gastroenterology*, 46, 6, 750-759, 2011.
20. *Meister A., Tate S.S.* Glutathione and related  $\gamma$ -Glutamyl compound: Biosynthesis and utilization Glutathione (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine) is predominantly intracellularly in relatively high concentration (0.5-10 mM), *Annual. Rev. Biochem.*, 45, 559-604, 1976.
21. *Orlowski M., Meister A.* Isolation of  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase from hog kidney, *J. Biol. Chem.*, 240, 1, 338-347, 1965.
22. *Orlowski M., Meister A.* The  $\gamma$ -Glutamyl cycle: A possible transport system for amino acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 67, 3, 1248-1255, 1970.
23. *Orlowski M., Wilk S.* Metabolism of  $\gamma$ -Glutamyl amino acids and peptides in mouse liver and kidney in vivo, *Europ. J. Biochem.*, 71, 549-555, 1976.
24. *Pelletique F., Batler E.J., Spilberg S.P. et al.* Normal amino acid uptake by cultured human fibroblasts does not require gamma-glutamyl transpeptidase, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 73, 4, 997-1002, 1976.
25. *Rees D.D., Palmer R.M.J., Schulz R. et al.* Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo, *Br. J. Pharmacol.*, 101, 746-752, 1990.
26. *Reichling J.J., Kaplan M.M.* Clinical use of serum enzymes in liver disease, *Digestive Diseases*, 33, 12, 1601-1614, 1987.
27. *Revel J.P., Ball E.G.* The reaction of glutathione with amino acids and related compounds as catalyzed by gamma-glutamyl transpeptidase, *J. Biol. Chem.*, 234, 3, 577-582, 1959.
28. *Sano I.* Simple peptides in brain, *Internat. Rev. Neurobiol.*, 12, 235-263, 1970.
29. *Selinger M.J., Matloff D.S., Kaplan M.M.* Gamma-Glutamyl transpeptidase activity in liver disease: Serum elevation is independent of hepatic GGTP activity, *Clin. Chim. Acta*, 125, 3, 283-290, 1982.
30. *Tate S.S., Meister A.* Interaction of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase with amino acids, dipeptides and analogs of glutathione, *J. Biol. Chem.*, 249, 7593-7602, 1974.
31. *Tate S.S., Meister A.*  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase, catalytic, structural and functional aspects, *Mol. and Cell. Biochem.*, 39, 1, 357-368, 1981.

Поступила 02.03.2012