



УДК 577.156:612.8.015

## РЕГИОНАЛЬНОЕ, КЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ, СУБКЛЕТОЧНАЯ И СУБОРГАНОИДНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ АМИНОТРИПЕПТИДАЗЫ НЕРВНОЙ ТКАНИ КОШЕК

ГЕНГИН М. Т., МЕЛЕШКО В. И., РЕВА А. Д.

кафедра биофизики и биохимии Днепропетровского госуниверситета

Исследуемые структуры мозга по возрастанию активности аминотрипептидазы располагаются в следующей последовательности: передние корешки, белое вещество, задние корешки спинного мозга, белое вещество больших полушарий, задние рога, передние рога поясничного утолщения, серое вещество больших полушарий, мозжечок. Активность аминотрипептидазы выше во фракции глиальных клеток в 1,5 раза по сравнению с нейрональной. Фермент обнаруживается во всех фракциях субклеточных структур (митохондриальной, синаптической, микросомной, миелиновой и растворимой), полученных из серого вещества больших полушарий. Субмитохондриальные фракции очищенных митохондрий (наружные, внутренние мембраны, матрикс и межмембранное пространство) различаются по уровню активности аминотрипептидазы.

Открытие нейропептидов и выяснение их функций вызвало интерес к изучению протеолитических ферментов как факторов, определяющих уровень пептидов в мозгу и систем, в определенной степени обеспечивающих функционирование пептидергических нейронов. Считают, что генез физиологически активных белков и пептидов осуществляется преимущественно пептидгидролазами с трипсиноподобной специфичностью действия [1]. Что же касается ферментов, участвующих в деградации нейропептидов, то здесь невозможно отдать предпочтение какой-то определенной группе пептидгидролаз с той или иной специфичностью действия. По-видимому, спектр ферментов, участвующих в инактивации и особенно в полной деградации пептидов, более широк и включает как эндо-, так и экзопептидазы [2—6]. Среди экзопептидаз мозга наиболее активна Leu-Gly-Gly-аминопептидаза. Показано, что аминотрипептидазная активность в различных отделах головного мозга крыс выше эндопептидазной активности в 20—60 раз [7, 8]. Функциональная роль аминотрипептидазы в мозгу остается неясной.

В представленной работе изучали региональное, клеточное распределение, субклеточную и суборганондную локализацию аминотрипептидазы (субстрат Leu-Gly-Gly) нервной ткани кошек.

## Материалы и методы

Опыты проводили на животных обоего пола. После декапитации извлекали головной и спинной мозг и помещали в охлажденный 0,25 М раствор сахаразы. Затем мозг очищали от оболочек и кровеносных сосудов, промывали в 0,25 М сахаразе, удаляли её остатки фильтровальной бумагой и разделяли на соответствующие отделы и структуры. При исследовании регионального распределения фермента

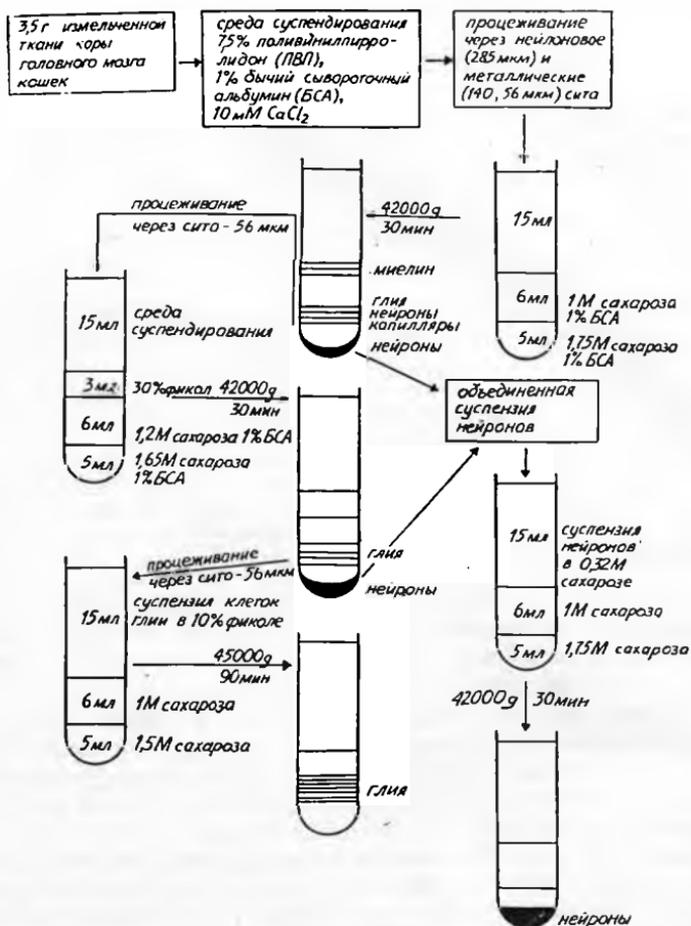
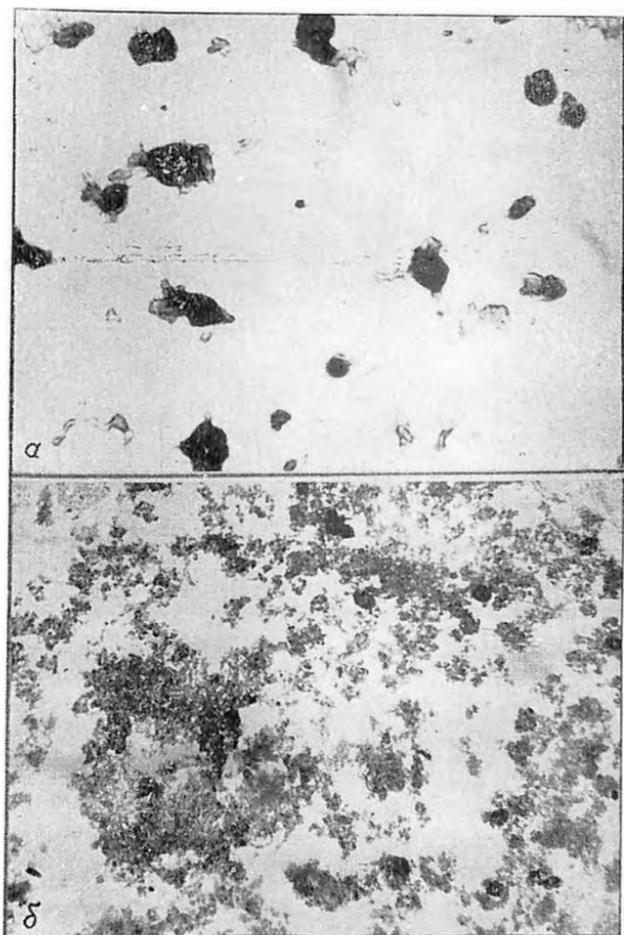


Рис. 1. Схема выделения обогащенных нейрональной и глиальной фракций из серого вещества головного мозга кошек.

его активность определяли в цельном гомогенате, приготовленном на 0,25 М сахаразе в соотношении 1:10 (вес/объем) и в растворимой фракции, которую получали центрифугированием гомогената при 90 000 g в течение 60 мин.

Обогащенные фракции нейронов и глии получали из серого вещества больших полушарий головного мозга по методу Sellinger и соавт. [9] в модификации Флёр-



*Рис. 2.* Микрофотографии обогащенных фракций нейронов (*a*) и глины (*б*), выделенных из серого вещества больших полушарий головного мозга кошек ( $\times 900$ ).

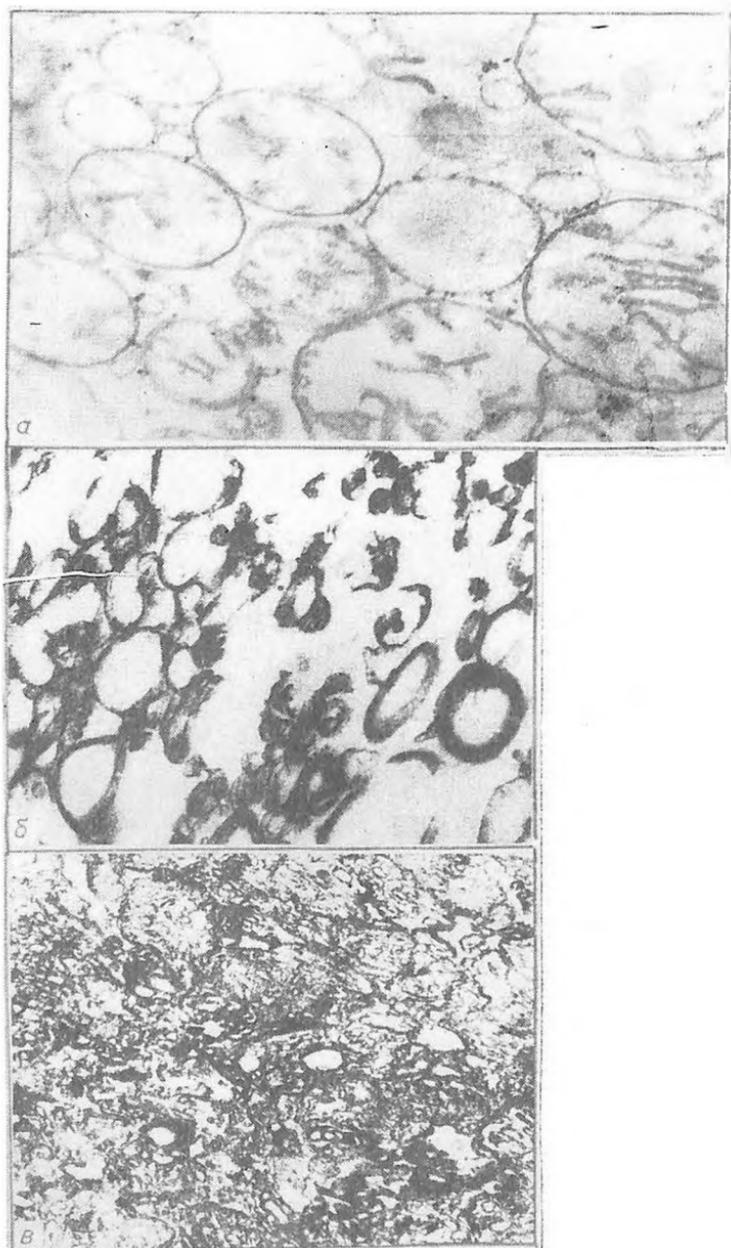


Рис. 3. Электронные микрофотографии очищенных митохондрий (а), наружных (б) и внутренних мембран (в) митохондрий, полученных из серого вещества больших полушарий головного мозга кошек (митохондрии— $\times 75\,000$ , фракции наружных и внутренних мембран— $\times 48\,000$ ).

ва [10]. Схема выделения обогащенных нейрональной и глиальной фракций представлена на рис. 1. Количественный выход по белку для фракции нейронов составлял 2,2, для нейроглии—21,8 мг/1 г ткани мозга. Контроль чистоты фракций проводили микроскопически (рис. 2).

Субклеточное фракционирование осуществляли по методу Whittaker и соавт. [11] в модификации Шаннской и соавт. [12]. Были получены следующие субклеточные фракции: митохондриальная, синапсомная, миелиновая и две подфракции микросом, обозначенные нами как  $P_1$  и  $P_2$ .  $P_1$  микросомную фракцию получали центрифугированием постмитохондриальной фракции при 17 000 g в течение 30 мин, а  $P_2$ —путем последующего центрифугирования надосадочной фракции при 100 000 g в течение 60 мин. Чистоту субклеточных структур оценивали энзиматически, определяя активность сукцинатдегидрогеназы [13], глюкозо-6-фосфатазы [14] и холинэстеразы [15].

Очищенные митохондрии получали из серого вещества больших полушарий по методу Панченко и соавт. [16]. Наружные и внутренние мембраны митохондрий разделяли в градиенте плотности сахарозы методом Sottocasa и соавт. [17]. Качество разделения мембран контролировали электронмикроскопически (рис. 3), а также путем определения активности МАО [18] и цитохромоксидазы [19].

Активность аминотрипептидазы определяли методом Marks, Lajtha [20] в нашей микромодификации. Инкубационная смесь состояла из 60 мкл 0,143 M меллал-ацетатного буфера, pH 7,6, 20 мкл водного раствора субстрата (Leu-Gly-Gly) в конечной концентрации  $5 \times 10^{-3}$  M и 40 мкл препарата фермента. Пробы инкубировали в течение 30 мин при 37°. Реакцию останавливали добавлением в среду инкубации 60 мкл 5%-ной ТХУ. В контрольные пробы ТХУ вносили перед добавлением субстрата. Осадок отделяли центрифугированием при 1000 g в течение 15 мин. На цветную реакцию отбирали 60 мкл ТХУ-центрифугата, переносили в пробирку, куда затем добавляли 1 мл нингидринглицериновой смеси (1 часть 0,85%-ного раствора нингидрина на 0,5 M цитратном буфере, pH 5,5 и 2 части глицерина). Пробы тщательно перемешивали и помещали на 12 мин в кипящую водяную баню, затем охлаждали до комнатной температуры и колориметрировали на ФЭК ( $\lambda$  570 nm). Активность фермента выражали в мкмоль аминогрупп, освобожденных в присутствии фермента за 60 мин инкубации при 37° в расчете на 1 мг белка фракции или 1 мг свежей ткани. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [21]. Результаты опытов обрабатывали статистически методом малых выборок [22].

## Результаты и обсуждение

### *Региональное и клеточное распределение аминотрипептидазы*

Данные, полученные при изучении регионального распределения аминотрипептидазы свидетельствуют о том, что содержание фермента неодинаково в функционально и морфологически различных отделах и структурах нервной ткани (табл. 1). По возрастанию активности фермента они располагаются в следующей последовательности: передние корешки, белое вещество, задние корешки спинного мозга, продолговатый мозг, белое вещество больших полушарий, задние рога, передние рога поясничного утолщения, серое вещество больших полушарий, мозжечок. Активность фермента коррелирует с содержанием белка в соответствующих структурах мозга и скоростью его обмена [23], что связано, по-видимому, с участием аминотрипептидазы в процессах белкового катаболизма. Показано также, что активность фермента выше в отделах, характеризующихся скоплением кле-

точных элементов. В структурах, образующих проводящие пути, его активность несколько ниже. По величине У.А. фермента различия между исследуемыми отделами менее выражены, то есть соотношение фермент/белок в структурах нервной ткани колеблется незначительно. Несколько выделяется мозжечок, где У.А. аминотрипептидазы выше по сравнению с другими отделами и структурами.

Установили, что активность аминотрипептидазы в задних корешках спинного мозга выше, чем в передних. Очевидно, афферентные и эфферентные пути различаются по содержанию в них пептидгидролаз. Более высокая активность в задних корешках по сравнению с передними показана ранее для дипептидгидролазы [24].

Определение активности аминотрипептидазы в растворимой фракции соответствующих отделов и структур показало, что фермент находится в нервной ткани в двух формах—растворимой и связанной с мембранами субклеточных структур. Причем их соотношение в исследуемых структурах и отделах различно. Почти все структуры поясничного утолщения спинного мозга содержат примерно одинаковые количества растворимой и связанной форм. Вышние отделы мозга, в основном, характеризуются более высоким содержанием растворимой формы фермента. Здесь же необходимо отметить, что доля растворимой формы аминотрипептидазы выше в структурах, представленных проводящими путями и глиальными элементами (белое вещество больших полушарий, продолговатый мозг), в то время как в сером веществе больших полушарий и мозжечке соотношение растворимой и связанной форм примерно одинаково.

Полученные данные о локализации аминотрипептидазы согласуются с представлениями об иерархии внутриклеточных пептидгидролаз, если предположить, что роль этого фермента заключается в деградации низкомолекулярных пептидов, накапливающихся в клетке по мере действия на белки клеточных эндопептидаз. Функции аминотрипептидазы, не связанные с катаболизмом пептидов, на сегодня не известны.

Определенный интерес в понимании роли аминотрипептидазы представляют данные о распределении фермента между клеточными элементами нервной ткани. В наших опытах показано, что его активность в обогащенной фракции глиальных клеток, полученных из серого вещества больших полушарий, составляет  $0,95 \pm 0,06$  мкмоль, что в 1,5 раза выше по сравнению с активностью в нейрональной фракции— $0,62 \pm 0,03$  мкмоль. Анализируя данные по активности фермента в обогащенных фракциях нейронов и глии, необходимо отметить, что уровень её в два раза ниже, чем в сером веществе, из которого получили нейроны и глиальные клетки. Возможно, что в процессе фракционирования происходит частичная инактивация. Или же (и) часть фермента ассоциирована с теми структурными компонентами мозга, которые отходят по мере очистки нейронов и глии. Различие в активности аминотрипептидазы между нейрональной и глиальной фрак-

Таблица 1

Активность аминотрипептидазы в функционально и морфологически различных отделах и структурах нервной ткани кошек (в мкмоль аминогрупп, освободившихся за 60 мин инкубации, в расчете на 1 мг белка и 1 мг свежей ткани; средние данные 6—9 опытов).

	Головной мозг					Спинальный мозг				
	больше полушария		мозжечок	продолговатый мозг	поясничное утолщение			передние корешки	задние корешки	
	серое вещество	белое вещество			белое вещество	серое вещество				
			передние рога	задние рога						
Активность в гомогенате	на ткань	0,210± 0,006	0,140± 0,04	0,260± 0,003	0,120± 0,002	0,090± 0,003	0,200± 0,002	0,190± 0,003	0,080 0,004	0,100± 0,002
Активность в супернатанте	на белок	1,680± 0,0034	1,370± 0,036	2,400± 0,064	1,260± 0,062	1,130± 0,053	1,580± 0,042	1,450± 0,055	0,940± 0,026	1,200± 0,032
Активность в расщепляемой фракции (в % от общей)	на ткань	0,105± 0,002	0,090± 0,004	0,150± 0,005	0,090± 0,001	0,044± 0,002	0,105± 0,002	0,095± 0,003	0,040± 0,003	0,055± 0,003
	на белок	4,020± 0,093	4,660± 0,045	6,24± 0,10	5,070± 0,097	2,180± 0,053	3,800± 0,094	3,470± 0,071	1,860± 0,055	2,380± 0,038
		50,7± 3,6	67,9± 4,8	57,3± 6,5	73,9± 7,8	47,8± 4,7	51,5± 3,8	51,6± 2,8	48,9± 3,6	54,5± 4,7

циями можно объяснить, исходя из возможной специфической роли данного фермента. Если предположить, что аминотрипептидаза принимает участие в специфической инактивации определенных пептидов (нейротрансмиттеров, нейромодуляторов), то преимущественная локализация этого фермента в глии является в некотором роде отражением особенностей межклеточного распределения ферментных систем обмена нейромедиаторов. Так, например, известно, что ферменты синтеза АХ локализованы в нейронах, в то время как АХЭ, наоборот, большей частью обнаруживается в глии [25]. Более высокая активность аминотрипептидазы в глиальной фракции, возможно, связана и с тем, что глиальные элементы, являясь компонентом ГЭБ, обеспечивают, благодаря высокой пептидазной активности, защиту нейронов от воздействия физиологически активных пептидов, которые могут привноситься в мозг с кровью.

#### *Субклеточная и суборганидная локализация аминотрипептидазы*

Субклеточные структуры получали из серого вещества больших полушарий. Как было показано (табл. 1), в сером веществе приблизительно 50% аминопептидазной активности ассоциировано с мембранами субклеточных структур. Активность фермента определяли в митохондриальной, синапсосомной, двух микросомных и миелиновой фракциях. Результаты опытов представлены в табл. 2.

Анализ данных по активности маркерных ферментов позволяет сделать заключение об относительно высокой степени чистоты полученных фракций субклеточных структур. Так, наибольшая активность сукцинатдегидрогеназы—маркерного фермента митохондрий—обнаруживается в митохондриальной фракции: АХЭ имеет четко выраженную синапсосомную локализацию. Активность глюкозо-6-фосфатазы сосредоточена во фракциях микросом.

Аминотрипептидаза обнаруживается во всех субклеточных фракциях, однако уровень её активности различен (табл. 2). Самая низкая активность обнаружена в миелиновой фракции. Значительно более высокая активность фермента выявлена во фракциях микросом и митохондрий. Функции мембраносвязанной формы аминотрипептидазы в клетке в значительной степени определяются её компарментализацией. Микросомная форма фермента, возможно, принимает участие в процессах модификации синтезированных белков [26]. В синапсосомной фракции, например, обнаружено несколько различающихся по свойствам аминопептидаз, гидролизующих энкефалины [27, 28].

Как было показано (табл. 2), митохондриальная фракция отличается высоким содержанием аминотрипептидазы. Представляло интерес изучение субмитохондриальной локализации фермента. Для

этой цели из серого вещества больших полушарий были получены очищенные митохондрии, которые затем обрабатывали ультразвуком и суспензию мембран разделяли центрифугированием в градиенте

Таблица 2.

Удельная активность аминокотрипептидазы и относительная удельная активность маркерных ферментов\* в субклеточных фракциях серого вещества больших полушарий головного мозга кошек

Ферменты	Фракции				
	митохондриальная	синаптосомная	микросомная		миеллиновая
			1	2	
Аминотрипептидаза	$5,14 \pm 0,10$	$2,20 \pm 0,14$	$3,02 \pm 0,18$	$2,58 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,04$
Сукцинатдегидрогеназа	$3,80 \pm 0,55$	$1,50 \pm 0,05$	$0,48 \pm 0,01$	$0,74 \pm 0,06$	0
Ацетилхолинэстераза	$0,340 \pm 0,014$	$7,30 \pm 0,18$	$3,15 \pm 0,22$	$2,90 \pm 0,15$	0
Глюкозо-6-фосфатаза	$1,24 \pm 0,20$	$1,90 \pm 0,05$	$2,40 \pm 0,40$	$3,35 \pm 0,30$	$0,69 \pm 0,10$

плотности сахарозы на фракции, содержащие наружные и внутренние мембраны. При этом была получена также растворимая фракция, которая включала содержимое матрикса митохондрий и межмембранного пространства. Электронномикроскопические фотографии сви-

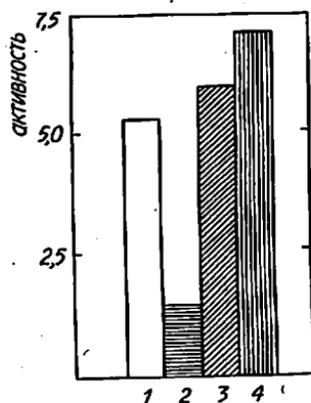


Рис. 4. Активность аминокотрипептидазы в очищенных митохондриях мозга кошек и субмитохондриальных фракциях (в мкмоль аминокотрипептида за 60 мин инкубации в расчете на 1 мг белка). 1—очищенные митохондрии, 2—внутренние мембраны, 3—наружные мембраны, 4—растворимая фракция (матрикс и межмембранное пространство).

детельствуют о высокой степени чистоты полученных митохондрий и качественном разделении мембран (рис. 3), на что указывают и данные определения активности маркерных ферментов. Так, активность МАО в наружных мембранах составляет  $36,9 \pm 2,0$  условных спектрофотометрических единиц в расчете на 1 мг белка: во фракции внутренних мембран— $6,5 \pm 0,3$  единиц. Активность цитохромоксидазы во фракции внутренних мембран выше в 3 раза по сравнению с наружными и равна  $18,2 \pm 0,6$  и  $5,6 \pm 0,2$  условных спектрофотометрических единиц/мг белка соответственно.

\* Активность аминокотрипептидазы (мкмоль аминокотрипептида/мл белка/г), сукцинатдегидрогеназы (мкмоль сукцината/мг белка/г), АХЭ (мкмоль АХ/мг белка/г) и глюкозо-6-фосфатазы (ммоль Р<sub>i</sub>/мг белка/мин).

Данные, касающиеся исследования активности аминотрипептидазы в очищенных митохондриях и субмитохондриальных фракциях приведены на рис. 4. Субмитохондриальные фракции различаются между собой по активности аминотрипептидазы. Самая высокая У. А. обнаружена в растворимой фракции (содержимое матрикса и межмембранного пространства), несколько ниже она во фракции наружных мембран. Величина У. А. фермента во фракции внутренних мембран в 4 раза ниже по сравнению с таковой наружных мембран.

Особенности локализации аминотрипептидазы в компартментах митохондрий связаны с определенными функциями данного фермента. По-видимому, митохондрии имеют полный набор как экзо-, так и эндопептидаз, в совокупности обеспечивающих и процессинг синтезированных и распад «отработанных» митохондриальных белков до свободных аминокислот [29, 30].

## REGIONAL, CELLULAR, SUBCELLULAR AND SUBORGANOIDAL DISTRIBUTION OF AMINOTRIPEPTIDASE IN CAT NERVOUS TISSUE

GENGIN M. T., MELESHKO V. I., REVA A. D.

Chair of Biophysics and Biochemistry, State University, Dnepropetrovsk

Regional, cellular (neuronal and glial) distribution, subcellular and suborganoidal localization of aminotripeptidase in cat brain was studied. The order of increasing enzyme activity in different areas of CNS is as follows: radix anterior of the spinal cord, white matter, radix posterior of the spinal cord, medulla oblongata, white matter of the big hemispheres, cornu posterior, cornu anterior of eminentia lumbalis, grey matter of big hemispheres, cerebellum. The activity of aminotripeptidase is 1,5-fold higher in the glial fraction than in neurons. All subcellular fractions studied exert enzyme activity, the maximal activity is detected in the mitochondrial fraction. The submitochondrial distribution of aminotripeptidase activity is different.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Локишина Л. А. Молекуляр. биология, т. 13, с. 1206—1229, 1979.
2. Galoyan A. A., Akopyan T. N., Karapetyan R. O., Arutunyan A. A., Oganisyan A. I.—In.: Endorphins' 78, Int. Workshop Conf., p. 37—59, Budapest, 1978.
3. Marks N., Suhar A., Benuck M. Neural Peptides and Neuronal Commun. Proc. 2nd Symp., Gardone, v. 1, p. 205—217, N. Y., 1980.
4. Ljörens C., Malfroy B., Schwartz J. C., Gacel G., Roques B. R., Roy J., Margat J., Javoy-Agid F., Agid Y. J. Neurochem., v. 39, p. 1081—1089, 1982.
5. Imai K., Hama T., Kato T. J. Biochem., v. 93, p. 431—437, 1983.
6. Shimamura M., Hazato T., Katajama T. Biochim. et biophys. acta, v. 756, p. 223—229, 1983.
7. Marks N., Galoyan A. A., Grynbaum A., Lajtha A. J. Neurochem., v. 22, p. 735—739, 1974.

8. Marks N., Datta R. K., Lajtha A. J. *Neurochem.*, v. 17, p. 53—56, 1970.
9. Sellinger O. Z., Azcurra L. M., Joson D. E., Oglson W. G., Lobin Z. *Nature* v. 230, p. 253—256, 1971.
10. Флёров М. А. *Вопр. мед. химии*, т. 242, с. 174—186, 1978.
11. Whittaker V. P., Michaelson I. A., Kircland R. I. A. *Biochem. J.*, v. 93, p. 293—303, 1964.
12. Шаинская А. М., Генгин М. Т., Березин В. А., Шевченко Г. М., Рева А. Д. Докл. АН УССР, № 7, с. 90—94, 1981.
13. Покровский А. А., Арчаков Л. А., Герасимова А. Н.—В кн.: *Современные методы в биохимии*, с. 38—56, М., Медицина, 1968.
14. Swanson M. A.—In: *Methods enzymology*, v. 2, p. 541—543, N. Y., Acad. Press. 1955.
15. Ellman G. L., Coorthney I. *Biochem. Pharmacol.*, v. 7, № 2, p. 88—95, 1961.
16. Панченко Л. Ф., Шпаков А. А., Дудченко А. М., Ивкова Л. А., Дудченко В. Ф., Капитонов А. Б. *Цитология*, т. 12, с. 1481—1486, 1973.
17. Sottocasa G. L., Kuylenstierna R., Erster L., Bergstrand A. J. *Cell. Biol.*, v. 32, p. 415—438, 1967.
18. Горкин В. З., Вережкина И. В., Гриднева Л. И., Жердева (Брусова) Л. В., Кляшторин Л. Б., Кривченко Р. С., Комиссарова Н. В., Леонтьева Г. А., Романова Л. А., Северина И. С., Фейгина С. М.—В кн.: *Современные методы в биохимии*, с. 155—177, М., Медицина, 1968.
19. Гулидова Г. П., Сорокина И. П. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 63, с. 41—44, 1967.
20. Marks N., Lajtha A. *Methods in Enzymology*, v. 19, p. 534—543, N. Y., Acad. Press, 1970.
21. Lowry O. H., Rosebrough M. I., Farr A. G., Randall R. I. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
22. Кокуни В. А. *Укр. біохім журн.*, т. 47, с. 776—790, 1975.
23. Паллади А. В., Белик Я. В., Полякова Н. М. Белки головного мозга и их обмен, с. 316, Киев, Наукова Думка, 1972.
24. Генгин М. Т., Шаинская А. М., Рева А. Д. *Биохимия*, т. 47, с. 1488—1493, 1982.
25. Nagata Y., Mikoshiba K., Tsucada Y. *Asian. Med.*, v. 19, p. 1211—1219, 1976.
26. Shields D., Blobel E. J. *Biol. Chem.*, v. 253, p. 3753—3761, 1978.
27. Hersh L. B., McKelvy I. F. *J. Neurochem.*, v. 36, p. 171—178, 1980.
28. Pert C. B., Pert A., Chang I. K., Fond B. T. *Science*, v. 194, p. 330—332, 1976.
29. Marks N., DMonte B., Bellman Ch., Lajtha A. *Brain. Res.*, v. 18, p. 309—324, 1970.
30. Зубатов А. С., Лузиков В. Н.—В кн.: *Функциональная активность ферментов и пути её регуляции*, с. 59—70, МГУ, 1981.

Поступила 16. V. 1984