

УДК 612.822.3.577.112.38

УЧАСТИЕ NAD В ПРОЦЕССАХ СИНАПТОСОМНОГО
ВЫСВОБОЖДЕНИЯ И СВЯЗЫВАНИЯ ГАМК
В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС

ТОВМАСЯН Е. К., АНТОНЯН А. А., КОЧАРЯН М. Г., *РОЗАНОВ В. А.,
*ГЕРАСИМЯК Г. Р., АРУТЮНЯН А. В.

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

*Институт гигиены водного транспорта, Одесса

Изучено влияние NAD на процессы спонтанного и K^+ -стимулируемого высвобождения ГАМК синаптосомами, а также связывание ее синаптическими мембранами головного мозга крыс. Показано, что NAD в концентрации 0,1 мМ активирует спонтанное высвобождение $[^{14}C]$ ГАМК. Вместе с тем, NAD оказывает выраженный ингибирующий эффект на специфическое связывание $[^3H]$ ГАМК в дилазоне ее концентраций 8—10 нМ. Ингибирование носит неконкурентный характер. Полученные результаты, наряду с ранее опубликованными данными об ингибировании высокоаффинного захвата ГАМК под влиянием NAD, свидетельствуют, о его участии в процессах пре- и постсинаптической регуляции ГАМКергической системы в ЦНС.

В настоящее время внимание исследователей широко привлекает изучение некоферментных функций NAD. К ним относится, в первую очередь, участие NAD в посттрансляционной модификации белков путем ADP-рибозилирования и вызванное этим изменение матричной активности хроматина, дифференциации и трансформации клеток [1, 2]. Важным аспектом исследования некоферментной роли NAD в нервной ткани является его участие в модуляции синаптических процессов.

Известно, что NAD и его предшественники—никотинамид и никотиновая кислота используются при лечении шизофрении, эпилепсии и психозов различной этиологии. Как полагают некоторые авторы, благоприятный терапевтический эффект этих соединений обусловлен их взаимодействием со специфическими структурами синаптических мембран, что приводит к реализации еще окончательно не распознанной последовательности функциональных ответов возбудимых клеток [3]. Установлено, что синаптические мембраны содержат два участка связывания, отличающихся высоким и низким сродством к NAD [4]. Высказывается мнение, что NAD, как и аденозин, выполняющий функции нейромедиатора и нейромодулятора в ЦНС [5, 6], угнетает нейрональную активность, возможно, путем подавления процесса высвобождения возбуждающих нейромедиаторов [6, 7].

Ранее в нашей лаборатории был показан ингибирующий эффект физиологических концентраций NAD на высокоаффинный захват ГАМК синапсосомами головного мозга крыс [8]. Для более полного представления о нейромодуляторной функции NAD нами было предпринято изучение его действия на процессы синаптического высвобождения, а также связывания ГАМК.

Материалы и методы

Исследования проводили на половозрелых крысах-самцах массой 180—200 г. Синапсосомы выделяли из коры головного мозга крыс по методу Hajos [9]. Чистоту и морфологическую целостность выделенных синапсосом контролировали электронно-микроскопическим путем. Полученный осадок синапсосом суспендировали в 0,32 М растворе сахарозы и определяли высвобождение меченого лиганда, как было описано ранее [4]. Суть метода заключалась в предварительном обогащении синапсосом меченой [^{14}C]ГАМК, после чего синапсосомы выдерживали в инкубационной среде, содержащей NAD, аденозин (по 0,1 мМ) или KCl в деполяризующих концентрациях. Остаточное накопление [^{14}C]ГАМК оценивали после быстрого центрифугирования проб (16000 g, 10 мин, 4°). Связывание меченой ГАМК определяли во фракции синаптических мембран, выделенных по методу Аби́та и соавт. [10]. Инкубационная смесь содержала 50 мМ трис-HCl буфера, pH 7,4, [^3H]ГАМК («Amersham», Англия) от 2 до 12 нМ, синаптические мембраны (100 мкг) и эффектор. Неспецифическое связывание определяли при наличии в инкубационной среде 1 мМ немеченой ГАМК. Пробы инкубировали в течение 30 мин при 0—4°. Реакцию останавливали быстрой фильтрацией проб под вакуумом через целлюлозные фильтры диаметром проб 0,3 мм («Synprot», Чехословакия). Осажденные на фильтрах синаптические мембраны промывали 5-кратным объемом буфера. Радиоактивность измеряли в толуольном сцинтилляторе на счетчике «Intertechnique» (Франция). Специфическое связывание определяли путем вычитания значений неспецифического связывания из общего. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [11].

Результаты и обсуждение

Нами обнаружено, что при применении NAD в концентрациях 10^{-6} — 10^{-5} М, ингибирующий обратный захват ГАМК [8], он не оказывает существенного влияния на процесс ее спонтанного высвобождения синапсосомами коры головного мозга крыс. С повышением концентрации отмечается активирующий эффект, достигающий максимума при добавлении к синапсосомной фракции 10^{-4} М (стимулированное высвобождение [^{14}C]ГАМК на 38%). Аналогичное, еще более выраженное действие на этот процесс оказывает аденозин в эквимолярных NAD концентрациях (рис. 1). Исходя из полученных резуль-

татов можно предположить, что как NAD, так и аденозин, эффективность которых проявляется при применении достаточно высоких концентраций, выступают в данном случае в качестве агентов, индуцирующих деполяризацию мембраны синапсом и выброс ГАМК в синаптическую щель. Аналогичные данные в отношении стимулирующего влияния высоких концентраций NAD (10^{-3} M) были получены ранее Халмуратовым и соавт. в отношении высвобождения других нейромедиаторов, в частности серотонина и дофамина [4]. При изучении захвата [14 C]ГАМК синапсом головного мозга крыс было

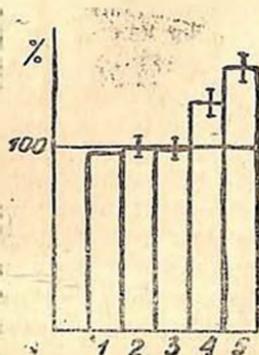
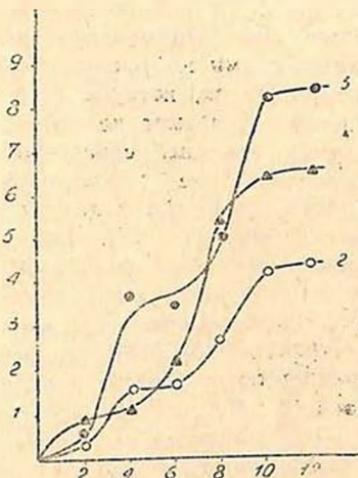


Рис. 1. Влияние NAD и аденозина на высвобождение [14 C]ГАМК из синапсом головного мозга крыс. 1—контроль, 2—NAD (10^{-6} M), 3—NAD (10^{-5} M), 4—NAD (10^{-4} M), 5—аденозин (10^{-4} M).

Рис. 2. Связывание [3 H]ГАМК с синаптическими мембранами головного мозга крыс. 1—контроль, 2—NAD (10^{-4} M), 3—аденозин (10^{-4} M). По оси абсцисс—концентрация [3 H]ГАМК (нМ), по оси ординат—связывание [3 H]ГАМК (фмоль/мг·мин)



показано, что ингибирующий эффект NAD не связан с образованием продуктов его метаболизма [8]. В связи с этим нами было исследовано высвобождение [14 C]ГАМК под влиянием NAD в присутствии никотинамида (10 мМ), ингибирующего NAD-азу, являющуюся единственным ферментом, ответственным за синапсомный распад NAD. Согласно полученным ранее в нашей лаборатории данным [13], активность NAD-азы во фракции синапсом, используемой нами для изучения влияния NAD на процессы захвата и высвобождения ГАМК, составляет всего 26,6 нмоль/мг белка·мин и ингибируется в присутствии 10 нМ никотинамида на 80%. Сам никотинамид в этой концентрации не оказывает существенного действия на стимулирующий эффект NAD в отношении высвобождения [3 H]ГАМК (данные не представлены). Известно, что высвобождение ГАМК, в основном,

осуществляется пресинаптическими нервными окончаниями. После высвобождения она подвергается обратному захвату клетками нейронов и глии при участии высокоаффинных Na^+ -зависимых транспортных систем [12]. Полученные нами результаты, наряду с опубликованными ранее данными о влиянии NAD на процесс высокоаффинного захвата ГАМК синапсом, свидетельствуют об участии никотинамидаденилиндинуклеотида в пресинаптической регуляции ГАМК-ергической системы.

В следующей серии опытов была предпринята попытка изучить влияние NAD на процесс постсинаптической рецепции ГАМК. С этой целью было исследовано специфическое связывание [^3H]ГАМК синаптическими мембранами головного мозга крыс. В первом варианте экспериментов, которые носили ориентировочный характер, было исследовано связывание возрастающих концентраций [^3H]ГАМК (2—12 нМ) фракцией синаптических мембран. Как видно из рис. 2, в этом диапазоне концентраций выявляются две системы рецепции ГАМК—с высоким и низким сродством, что соответствует литературным данным [14, 15]. Добавление в среду инкубации NAD и аденозина в концентрации 10^{-4} М, которая оказывает максимальный эффект на процесс высвобождения меченой ГАМК, приводит к отчетливым изменениям ее связывания. В диапазоне минимальных концентраций [^3H]ГАМК (до 2 нМ) оба соединения слегка ингибируют процесс связывания, при повышении концентрации меченого лиганда до 4—6 нМ аденозин значительно активирует его, в то время как NAD практически не оказывает эффекта. При дальнейшем увеличении концентрации [^3H]ГАМК (10—12 нМ) аденозин стимулирует ее специфическое связывание, тогда как NAD в значительной мере подавляет. Этот эффект NAD, выявляемый в зоне насыщения низкоаффинной системы связывания, представляет значительный интерес и нуждается в дополнительном изучении. Данные о влиянии пуринов и их производных на Na^+ -независимое связывание [^3H]ГАМК синаптическими мембранами мозга крыс несут противоречивый характер. Показано, в частности, что аденозин, наряду с другими пуринами (инозин, дезоксиаденозин, гипоксантин), ингибируют этот процесс, аденозинфосфаты—сАМР и АТР не влияют на него [16]. По нашим данным, аденозин и NAD, в зависимости от концентрации [^3H]ГАМК, оказывают разнонаправленное действие на его рецепторное связывание синаптическими мембранами мозга. Представляется вероятным, что оба соединения связываются на одних и тех же участках постсинаптического ГАМК-рецептора, на что указывает симметричный характер полученных в их присутствии кривых связывания [^3H]ГАМК.

Дальнейшие исследования преследовали цель детализировать феномен влияния NAD на связывание ГАМК, оценить его кинетические параметры и выявить концентрационную зависимость этого эффекта. Для этого была выбрана рабочая концентрация [^3H]ГАМК 6 нМ, находящаяся на линейном участке кривой зависимости связывания ГАМК от ее концентрации (рис. 2). В данном случае мембрана под-

вергали двукратному переосаждению в бидистиллированной воде с последующим ресуспендированием в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 7,4. Эта процедура, согласно данным литературы, способствует освобождению от эндогенных ингибиторов связывания [17, 18], что дает возможность повысить чувствительность метода. Как ожидалось, в этих условиях были получены более высокие значения связывания (примерно в 5 раз), при этом характер концентрационной зависимости

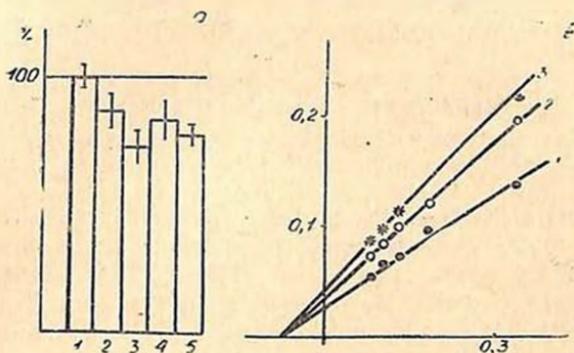


Рис 3. Влияние NAD на специфическое связывание $[^3\text{H}]$ ГАМК с синантическими мембранами головного мозга крыс: а—действие различных концентраций NAD на специфическое связывание $[^3\text{H}]$ ГАМК (6 нМ). 1—контроль, 2—NAD— 10^{-6} М, 3—NAD— 10^{-5} М, 4—NAD— 10^{-4} М, 5—NAD— 10^{-3} М; б—кинетика ингибирования связывания $[^3\text{H}]$ ГАМК в обратных координатах Лайнуивера-Бёрка: 1—контроль, 2—NAD 10^{-5} М, 3—NAD— 10^{-4} М.

в диапазоне 3—10 нМ $[^3\text{H}]$ ГАМК остался прежним. В соответствии с целями эксперимента вначале было проверено влияние возрастающих концентраций NAD (10^{-5} — 10^{-3} М) на связывание 6 нМ ГАМК. Как видно из представленных данных (рис. 3, а), ингибирующий эффект NAD в этих условиях проявлялся, начиная с концентрации 10^{-5} М, и при дальнейшем увеличении мало изменялся. Исследование кинетики ингибирования под влиянием NAD связывания ГАМК показало его неконкурентный характер (рис. 3, б). Как было установлено, NAD, не меняя сродства рецепторов к лиганду (K_d 14,3 нМ), снижает максимальную скорость процесса связывания. Примечательно, что эффект NAD наблюдается в области физиологических концентраций. Возможно, NAD, являясь эндогенным лигандом бензодиазепиновых рецепторов [19], функционально сопряженных с ГАМК-рецептором, оказывает косвенное влияние на сродство ГАМК к рецепторным участкам.

Представленные в данном сообщении данные, наряду с опубликованными ранее результатами [8], свидетельствуют о роли NAD в ГАМК-ергической передаче. Можно думать, что NAD, неконкурентным образом ингибируя связывание ГАМК, ограничивает возмож-

ности реализации его медиаторного эффекта. Наряду с этим, путем активации процесса высвобождения и ингибирования обратного захвата ГАМК, NAD может создавать условия для ее избыточного накопления в синаптической щели, что, в свою очередь, способствует метаболическим превращениям ГАМК в нервной ткани [20].

THE PARTICIPATION OF NAD IN THE PROCESSES OF GABA SYNAPTOSOMAL RELEASE AND BINDING IN RAT BRAIN

TOVMASIAN E. K., ANTONIAN A. A., KOCHARIAN M. G., *ROSANOV V. A.,
*GERASIMYAK G. R., ARUTUNIAN A. V.

G. Ch. Buniatian Institute of Biochemistry, Armenian Acad. Sci., Yerevan
*All-Union Institute of water transport, Odessa

The effect of NAD on the processes of spontaneous and K^+ -stimulated release of GABA in synaptosomes, as well, as its binding by rat brain synaptic membranes has been studied. The activation of [^{14}C] GABA spontaneous release by 0,1 mM NAD is shown. Besides in the ranges of 8—10 nM concentrations NAD exerts the pronounced inhibitory effect upon the [3H] GABA binding. The inhibition has noncompetitive character. Side by side with the earlier publications concerning the inhibition by NAD of high affinity uptake of GABA by NAD, the results obtained testify to its participation in the processes of pre- and postsynaptic regulation of GABA-ergic system in CNS.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ueda K., Hayaishi O. Ann Rev. Biochem., v. 54, p. 73—101, 1985.
2. Арутюнян А. В. Нейрохимия, т. 9, № 3, с. 373—389, 1990.
3. Крижановский Г. Н., Шандра А. А., Макулькин Р. Ф., Лобасюк Б. А., Годневский А. С. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 90, № 7, с. 37—41, 1980.
4. Халмурадов А. Г., Кучмеровская Т. М., Пархомец П. К. Нейрохимия, т. 6, № 4, с. 495—502, 1987.
5. Williams M. TIBS, v. 7, № 1, p. 164—168, 1984.
6. Stone T. N. Neuroscience, v. 6, p. 529—555, 1981.
7. Richards C. D., Snell C. R., Snell P. M. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 335, p. 63—64, 1983.
8. Арутюнян А. В., Гулян Э. А., Нерсисян Ц. М., Априкян Г. В., Кочарян М. Г. Нейрохимия, т. 7, № 3, с. 348—357, 1988.
9. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
10. Abita J., Chechirortiche R., Schuetz H., Lazdunsky M. Biochemistry, v. 16, № 9, p. 1838—1864, 1977.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randa'll R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—271, 1951.
12. Раевский К. С., Георгиев В. П. Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические аспекты, М., Медицина, 1986.
13. Арутюнян А. В., Мовсисян П. О., Урганджян М. Г., Бурназян Л. Б. Нейрохимия, т. 3, № 1, с. 41—46, 1984.

14. *Тонких А. К., Кузнецов В. И., Каримова М. В., Садыков А. А.* Нейрохимия, т. 4, № 3, с. 260—267, 1985.
15. *Сергеев П. В., Шимоновский Н. Л.* — В кн.: Рецензоры физиологических активных веществ, М., Медицина, 1987.
16. *Ticki M. K., Buch T.* Biochem. Pharmacol., v. 29, p. 1217—1220, 1980.
17. *Massotti M., Mazzari S., Schmid R., Guidotti A., Costa E.* Neurochem. Res., v. 6, p. 551—565, 1981.
18. *Парфенова Е. В.* Нейрохимия, т. 5, № 1, с. 61—73, 1986.
19. *Фоменко А. И., Халмурадов А. Г., Пожарун С. В., Степаненко С. П.* Нейрохимия, т. 7, № 1, с. 26—32, 1988.
20. *Розанов В. А.* Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 611—628, 1988.

Поступила 30. IV 1991