

22. Katunuma N., Towatari T., Kominami E., Heshida S., Takio K., Titani K. *Acta biol. med. Germ.*, v. 40, p. 1419-1425, 1981.
23. Pohl J., Davinic S., Blaha J., Strop P., Kostka V. — In: *Cysteine Proteinases and their Inhibitors* (ed. V. Turk), p. 37-43, Walter de Gruyter, Berlin, 1986.
24. Takio K., Towatari T., Katunuma N., Teller D., Titani K. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, v. 80, p. 3666-3671, 1983.
25. Ritonja A., Popovic T., Turk V., Wiedenmann K., Machleidt W. *FEBS Lett.*, v. 181, p. 169-172, 1985.

Поступила 9. IX 1986

УДК 577.352.354.46:577.113.3

ВЛИЯНИЕ АНАЛОГОВ NAD НА ЕГО СВЯЗЫВАНИЕ СИНАПТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

ХАЛМУРАДОВ А. Г., КУЧМЕРОВСКАЯ Т. М., ПАРХОМЕЦ П. К.,
КЛИМЕНКО А. П., АРУТЮНЯН А. В., *МОВСЕСЯН Н. О.

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев
*Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Было исследовано влияние ряда адениловых (аденозин, адениннуклеотиды) и никотинамидных (NADP, NADH, NADPH, дезамино- и дезамидо-NAD, N⁶-карбек и метил-NAD, никотинамидмононуклеотид и 3'-ацетил-пиридин) аналогов NAD, а также антагонистов аденозина—метилксантинсв на процесс связывания ¹⁴C-NAD синаптическими мембранами мозга крыс. Установлено, что способность связываться с рецепторными участками мембран зависит от пространственной структуры исследуемых соединений. Показано, что в связывании синаптическими мембранами принимают участие как аденозиновый, так и никотинамидный фрагменты молекулы NAD.

При исследовании синаптических мембран коры больших полушарий головного мозга [1, 2], а также гиппокампа [3] крыс ранее была выявлена специфическая система взаимодействия NAD с двумя участками связывания, характеризующимися высокой и низкой степенью сродства к радиоактивному лиганду [1, 2]. Данные о наличии на синаптических мембранах двух NAD-связывающих участков соответствуют представлениям о существовании разных типов пуринорецепторов, отличающихся селективностью в отношении действия агонистов и антагонистов P₁ и P₂, преимущественными лигандами которых являются соответственно аденозин и АТР [4].

Не исключено, что молекула NAD может взаимодействовать как с рецепторами синаптической мембраны обоих типов, так и исключительно с одним из них. С другой стороны, наличие никотинамидного кольца в молекуле NAD указывает на возможность его связывания с бензодиазепиновыми рецепторами, одним из возможных специфических лигандов которых является никотинамид [5].

Целью настоящего исследования явилось выяснение роли аденозинового и никотинамидного фрагмента молекулы NAD в рецепции этого динуклеотида синаптическими мембранами головного мозга.

Материалы и методы

Фракцию синаптических мембран из коры больших полушарий крыс получали методом Abita и соавт. [6]. В опытах по связыванию меченого NAD синаптическими мембранами использовали никотинамид [U - ^{14}C]-аденидинуклеотид (^{14}C -NAD) ($9 \cdot 10^{-11}M$) с удельной радиоактивностью 287 мКи/ммоль («Amersham», Англия). Синаптические мембраны предварительно никубировали в течение 15 мин в присутствии 1000-кратного избытка по концентрации ($6 \cdot 10^{-7}M$) аналогов NAD в среде, состав которой, так же как и расчет общего, неспецифического и специфического связывания синаптическими мембранами, описан ранее [1].

Исследования по изучению влияния некоторых антагонистов аденозина (теофиллин, изоамилбутилксантин и изобутилметилксантин) были также проведены после 15-минутной преинкубации их в концентрации 4,9 мМ с синаптическими мембранами. Деградацию NAD предотвращали путем добавления никотинамида (0,003 мМ), являющегося эффективным ингибитором гликогидролазного расщепления динуклеотида [7].

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены данные по влиянию адениловых (аденозин, AMP, ADP, ATP) аналогов на процесс связывания ^{14}C -NAD синаптическими мембранами. Полученные результаты свидетельствуют о том,

Таблица 1

Влияние адениловых аналогов и антагонистов аденозина на связывание ^{14}C -NAD синаптическими мембранами коры больших полушарий головного мозга крыс ($n=8$)

Исследуемые соединения	Специфическое связывание	
	в имп. мин./мг белка	% ингибирования
Контроль	1579 ± 129	—
<i>Адениловые аналоги</i>		
Аденозин	725 ± 51	54
AMP	521 ± 38	67
ADP	251 ± 22	84
ATP	229 ± 18	86
<i>Антагонисты аденозина</i>		
Теофиллин	363 ± 33	77
Изоамилбутилксантин	395 ± 35	75
Изобутилметилксантин	474 ± 45	70

что в присутствии адениловых аналогов связывание NAD синаптическими мембранами снижается. Относительная эффективность адениловых аналогов в отношении ингибирования связывания NAD может быть представлена в следующем порядке: $ATP > ADP > AMP > \text{аденозин}$. Что

же касается пуринорецепторов типа P_1 и P_2 , эффективность действия их агонистов представлена следующим образом: аденозин $\geq$ AMP $\geq$ ADP $\geq$ АТР и АТР $\geq$ ADP $\geq$ AMP $\geq$ аденозин соответственно [4]. Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что NAD обладает большим сродством к рецепторам типа P_2 по сравнению с P_1 .

Однако перечисленных фактов недостаточно, чтобы исключить возможность связывания NAD пуринорецепторами типа P_1 или другим, до настоящего времени неизвестным типом рецепторов, специфичным, возможно, исключительно к NAD. В связи с этим следует отметить, что, по предварительным данным, NAD в условиях наших экспериментов приводил к ингибированию на 30—40% специфического связывания ^3H -аденозина синаптическими мембранами мозга.

Метилксантины, в том числе теофиллин, кофеин, изобутилметилксантин и другие сильно ингибируют действие аденозина на различные ткани [4, 8], не оказывая влияния на действие АТР, в частности, на вызванное им расширение сосудов в почках и сердце [9]. Теофиллин же и другие метилксантины являются ингибиторами рецепции аденозина срезами коры мозга морских свинок [10]. В этой связи представляло интерес выяснить, какое влияние оказывают некоторые из антагонистов аденозина метилксантинового ряда на процесс связывания NAD синаптическими мембранами. Как видно из данных, представленных в табл. 1, исследуемые соединения конкурируют за места связывания NAD синаптическими мембранами. Ингибирование связывания NAD теофиллином, изоамилбутилксантином и изобутилметилксантином составляло соответственно 77, 75 и 70%. Проведенные с антагонистами аденозина эксперименты подтверждают значение аденозиновой части молекулы NAD для его рецепции синаптическими мембранами.

Для выяснения роли никотинамидного фрагмента NAD в связывании синаптическими мембранами в следующей серии опытов исследовали влияние на этот процесс различных его никотинамидных аналогов.

Из приведенных в табл. 2 данных видно, что в присутствии никоти-

Таблица 2

Влияние никотинамидных аналогов на связывание [^{14}C] NAD $^+$ синаптическими мембранами головного мозга крыс ($n=8$)

Исследуемые соединения	Специфическое связывание	
	в 1 мл мин. мг белка	% ингибирования
Контроль	1579 $\pm$ 129	—
NADH	125 $\pm$ 11	92,1
NADP $^+$	116 $\pm$ 10	92,7
NADPH	212 $\pm$ 16	86,6
N 6 -карбоксиметил-NAD	294 $\pm$ 28	81,4
Дезамино-NAD	330 $\pm$ 26	79,1
Дезамидо-NAD	130 $\pm$ 11	91,8
NMN	830 $\pm$ 66	47,5
3'-ацетилпиридин	1275 $\pm$ 79	19,5

намидных аналогов связывание NAD синаптическими мембранами заметно снижалось, причем в ряде случаев (NADH, NADP, дезамидо-NAD, NADPH) было более выражено по сравнению с адениновыми аналогами (табл. 1). Относительная эффективность никотинамидных аналогов как ингибиторов связывания NAD может быть расположена в следующем порядке: NADP > NADH > дезамидо-NAD > NADPH > N⁶-карбоксиметил-NAD > дезамино-NAD > NMN > 3'-ацетилпиридин. Очевидно, что ингибирующая способность исследуемых соединений зависит в большей степени от адениннуклеотидной части молекулы NAD, чем от никотинамидной. К такому выводу можно прийти на основании того, что NMN приводил к менее значительному, чем в случае динуклеотидных аналогов NAD, ингибированию его связывания синаптическими мембранами: 3'-ацетилпиридин — соединение, лишенное карбоксамидной группировки, почти не оказывал влияния на этот процесс. Эти данные согласуются с результатами исследований Richards и соавт. [3], установивших, что NAD, NADH и NADPH, в отличие от NMN, подавляли синаптическую передачу возбуждения в гиппокампе крыс. Полученные нами данные указывают также на то, что рецепция не связана с бензодиазепиновыми рецепторами, для которых характерна высокая чувствительность к никотинамиду [5].

Наряду с этим, можно заключить, что определенное значение в данном процессе имеет 6-аминогруппа аденинового кольца, так как соединения, в которых этот участок молекулы NAD модифицирован (N⁶-карбоксиметил-NAD, дезамино-NAD), обладают меньшим по сравнению с другими никотинамидными аналогами NAD ингибирующим действием на его связывание синаптическими мембранами.

При сопоставлении данных, приведенных в табл. 1 и 2, видно, что для проявления максимальной ингибирующей способности в отношении связывания NAD синаптическими мембранами необходимо сохранение цельности молекулы адениндинуклеотида и неизменности аденинового кольца. Этим требованиям отвечают такие соединения, как NADH, NAD⁺ и дезамидо-NAD.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что способность связываться с рецепторными участками мембран зависит от пространственной структуры исследуемых соединений и подчеркивают значение в этом процессе обоих фрагментов (аденинового и никотинамидного) молекулы NAD.

Ранее связывание NAD изучали в отношении различных дегидрогеназ [11]. Однако восстановленная форма NAD связывается цитоплазматическими дегидрогеназами со сродством, в 100 раз большим, чем окисленная [11, 12]. На основании наших исследований (табл. 2) можно предположить, что оба нуклеотида обладают почти одинаковой способностью связываться с синаптическими мембранами. Из этого следует, что рецепция NAD синаптическими мембранами имеет совершенно другую природу, чем связывание его как кофермента цитозольных белков.

Проведенными ранее исследованиями [13] было установлено, что

рецепторные участки синаптических мембран, связывающие NAD, представляют собой протеолипиды, окруженные олигосахаридной частью ганглиозидов, в структуру которых входят SH-группы. Взаимодействие NAD с синаптическими мембранами может иметь физиологическое значение, о чем свидетельствует тот факт, что он стимулирует опосредованное Ca^{2+} высвобождение дофамина и серотонина из нервных окончаний (неопубликованные данные).

В этом отношении значительный интерес представляют данные об ингибировании процесса связывания NAD синаптическими мембранами под влиянием дезаминно- и дезамидо-NAD. Ранее нами было обнаружено [14], что образование в ткани мозга упомянутых производных NAD приводило к изменению его коферментной активности. Исходя из этого, можно полагать, что в таких условиях изменяются и другие функциональные характеристики NAD, а это может отражаться на его нейромодуляторной функции.

Это предположение находит подтверждение в исследованиях Richards и соавт. [3], обнаруживших, что дезаминно-NAD, в отличие от NAD, не оказывает действия на синаптическую передачу возбуждения, что проявляется в различном эффекте этих соединений на биопотенциалы, вызванные электрическим раздражением гиппокампа.

EFFECT OF NAD-ANALOGS ON ITS BINDING WITH RAT BRAIN SYNAPTIC MEMBRANES

KHALMURATOV A. G., KUCHMEROVSKAYA T. M., PARKHOMETS P. K., KLIMENKO A. P., HARUTOUNYAN A. V., MOVSESYAN N. O.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Ukr. SSR Acad. Sci, Kiev
*Institute of Biochemistry, Arm. SSR Acad. Sci, Yerevan

The effect of a number of NAD adenylyl analogs (adenosine, adenylyl nucleotides) and NAD nicotinamide analogs (NADP^+ , NADH and NADPH , desamino and desamido-NAD, N^{α} -carboxymethyl-NAD, nicotinamide mononucleotide and 3-acetyl-pyridine) and antagonists of adenosine (methylxanthines) on binding of NAD with rat brain synaptic membranes has been investigated. Data obtained indicate that ability of the compounds mentioned to bind with receptor sites of membranes depends from their conformation. Both adenosine and nicotinamide moieties of NAD^+ molecule contribute to the binding with synaptic membranes.

ЛИТЕРАТУРА

1. Халмуратов А. Г., Пархомец П. К., Кучмеровская Т. М., Чичковская Г. В. Биохимия, т. 48, № 8, с. 1287—1292, 1983.
2. Snell C. R., Snell P. H., Richards D. J. Neurochem., v. 43, №6, p. 1610—1615, 1984.
3. Richards C. D., Snell C. R., Snell P. H. Brit. J. Pharmacol., v. 79, №2, p. 553—564, 1983.
4. Бернсток Ж.—В кн.: Рецепторы клеточных мембран для лекарств и гормонов (под ред. Р. Штрауба и А. Болле), с. 120—132, М., Медицина, 1983.
5. Воронина Т. А. Фармакология и токсикология, т. 41, № 6, с. 680—683, 1981.

6. Abita J., Chicheportliche R., Schvets H., Lazdunsky M. Biochemistry, v. 16, №9, p. 1838—1864, 1977.
7. Yost D. A., Anderson B. M. J Biol. Chem., v. 257, p. 767—777, 1982.
8. Oberdorster L., Lung R., Zimmer R. Eur. J. Pharmacol., v. 3¹, p. 197—204, 1975.
9. Haddy T. J., Scott J. B. Physiol. Rev., v. 48, p. 688—707, 1968.
10. May H. D., Daly V. W. Pharmacol. Rev., v. 8, p. 65—79, 1976.
11. Daziel K. — In: Enzymes (ed. Boyer P. P.), p. 166, Academic Press, N. Y., 1975.
12. Subramaniam S., Ross P. D. Biochemistry, v. 17, p. 2192—2197, 1978.
13. Кучмеровская Т. М., Пархомец П. К., Чичковская Г. В., Халимрадов А. Р., Романская О. П. Нейрохимия, т. 4, № 4, с. 373—378, 1985.
14. Арутюнян А. В., Мовсесян Н. О., Урианджян М. Г., Бирназян Л. Б. Нейрохимия, т. 3, № 1, с. 41—46, 1984.

Поступила 10. IX 1986

УДК 547.953+612.115+591.481+612+646

ЛИПИДЗАВИСИМОСТЬ ТРОМБОПЛАСТИНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА, РЕГУЛИРУЮЩИХ ГЕМОКОАГУЛЯЦИЮ

КАРАГЕЗЯН К. Г., МКРТЧЯН М. Е., ОВАКИМЯН С. С.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Продемонстрирована зависимость гемокоагуляционной активности тромбопластинного тисаи головного мозга развивающегося куриного эмбриона и мембран эритроцитов больных острым инфарктом миокарда от фосфолипидов, поддерживаемая эндогенным α -токоферолом в физиологической концентрации. Установлена также стабильность существующего в норме постоянства соотношений между нейтральными и кислыми фосфолипидами, оказывающими соответственно активирующее и ингибирующее воздействие на интенсивность свертывания крови.

Тромбопластины представляют собой сложные вещества липопротеидной природы, содержание которых в головном мозгу достигает значительных величин; их истинное биологическое значение до настоящего времени остается неразгаданным. Имея самое непосредственное отношение к процессу свертывания крови, тромбопластины, по всей вероятности, наделены и рядом других функциональных свойств, пока плохо изученных.

При возбужденных состояниях у собак методом определения артерио-венозной разницы показано повышение свертываемости крови, оттекающей от головного мозга, ее тромбопластической (ТП) активности [1, 2] и содержания в ней фосфолипидов (ФЛ) и холестерина [3—8] при соответствующих отклонениях в СМЖ [9, 10]. Аналогичные отклонения были обнаружены и при одностороннем удалении верхнего шейного симпатического ганглия [11, 12], экспериментально вызванных внут-