



УДК 612.822.3:577.112.38

ВЛИЯНИЕ NAD И АДЕНОЗИНА НА ЗАХВАТ [³C] ГАМК СИНАПТОСОМАМИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА КРЫС

АРУТЮНЯН А. В., ГУЛЯН Э. А., НЕРСИСЯН Ц. М.,
АПРИКЯН Г. В., КОЧАРЯН М. Г.

Институт биохимии АН Арм.ССР, Ереван

Изучено влияние NAD и аденозина на высокоаффинный захват ГАМК синапсомы коры больших полушарий головного мозга крыс. Установлено, что NAD в концентрациях, близких к физиологическим (10^{-6} — 10^{-5} М), ингибирует этот процесс на 60—40%, причем ингибирование носит неконкурентный характер. Аденозин в этих же концентрациях вызывает незначительное повышение уровня захвата ГАМК.

Полученные данные рассматриваются с точки зрения существования различных механизмов, лежащих в основе нейромодуляторной функции NAD и аденозина.

Эксперименты, проведенные с применением различных производных NAD и ингибиторов NAD-гликогидролазы, свидетельствуют о том, что ингибирующий эффект на захват ГАМК обусловлен целой молекулой NAD и не связан с его синаптосомным распадом.

В статье обсуждается вопрос о возможном участии безаденозинных рецепторов, одними из лигандов которых является NAD, в реализации его эффекта на процесс высокоаффинного захвата ГАМК синапсомы головного мозга.

Концепция Burnstock [1] о нейромедиаторной и нейромодуляторной роли аденозина и АТР получила развитие на основе фармакологических исследований, выполненных на периферической НС. Постулируется, что действие аденозина осуществляется посредством специфических пурино-рецепторов типа P_1 , а АТР— P_2 . При этом P_1 -пуринорецепторы обладают незначительным сродством к АТР, а P_2 -пуринорецепторы—напротив, к аденозину.

Результаты биохимических, электрофизиологических и, в меньшей степени, ауторадиографических исследований свидетельствуют о том, что аденозин и адениннуклеотиды выполняют, главным образом, нейромодуляторную функцию в ЦНС [2].

Недавно появились данные, свидетельствующие о существовании в ЦНС независимой от аденозина и АТР системы рецепции NAD, содержание которого в синапсоме значительно превосходит концентрацию аденозина и составляет $4 \cdot 10^{-5}$ М [3]. Обнаружено наличие двух NAD-свя-

зывающих участков на синаптических мембранах коры мозга, отличающихся высоким и низким сродством [4, 5]. Показано также, что связывание NAD осуществляется, главным образом, за счет его аденозинового компонента [6].

Установлено, что как аденозин [7], так и NAD [5, 8] угнетают нейрональную активность. По мнению ряда исследователей, депрессантное действие аденозина связано с подавлением под его влиянием процесса высвобождения возбуждающих нейромедиаторов [2, 7]. Вопросы, связанные с участием NAD в синаптических процессах, мало изучены.

В данном сообщении приведены результаты исследования модуляторного влияния NAD и аденозина на захват ГАМК, обладающего, наряду с глицином и таурином, выраженной тормозной функцией в НС.

Материалы и методы

Исследования проводили на половозрелых крысах-самцах массой 180—200 г. Синапсомы выделяли из коры головного мозга крыс по методу Hajos [9]. Осадок синапсомы суспендировали в 0,32 М сахарозе. Состав среды поглощения: 0,1 М Na^+ -фосфатный буфер, pH 7,4—4,24 мл; 1 М NaCl—4,8 мл; 1 М KCl—0,2 мл; 0,1 М MgCl_2 —1 мл; 0,4 М глюкоза—2 мл и H_2O —27,8 мл. Пробы содержали 0,83 мл среды поглощения, 0,1 мл синапсомной суспензии (200 мкг белка), немеченую ГАМК в концентрации 10^{-5} М, аминоксиуксусную кислоту (АОУК) в той же концентрации для ингибирования трансаминирования и 0,05 мкМ/мл [^{14}C] ГАМК, а также 0,07 мл NAD или других ингредиентов в различных концентрациях. Захват ГАМК синапсомной фракцией определяли после инкубирования проб при постоянном встряхивании и температуре 37° в течение 20 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мл ледяной среды поглощения. Пробы центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин при 4°, или фильтровали через мембранные фильтры («Millipore», США; 0,45 мкм). Осадок или фильтры растворяли в 0,5 мл диметилсульфоксида.

Радиоактивность измеряли с использованием сцинтилляционной жидкости Брэя на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Intertechnique SL-4221» (Франция).

Белок определяли по методу Lowry и соавт. [10]. В опытах использовали следующие реактивы: ГАМК и АОУК («Sigma», США), [^{14}C] ГАМК (11,8 мКи/ммоль, Венгрия), NAD, никотинамид, изониазид («Serva», ФРГ), ADP-рибозу, никотинамидмононуклеотид, аденозин, дезаминдо- и дезамино-NAD (Sigma, США).

Результаты исследований

Как видно из данных, представленных в таблице, облегченная диффузия, а также Na^+ -независимый транспорт ГАМК в условиях наших опытов (свежеприготовленные синапсомы) составляют всего 5,2 и 5,9% соответственно от высокоаффинного захвата, являющегося актив-

ным Na^+ -зависимым процессом. Таким образом, накопление $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ в синапсосах за счет Na^+ -независимых механизмов весьма незначительно и, как показали наши исследования, не подвержено влиянию добавленных NAD или аденозина.

Наряду с этим, результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о разнонаправленном действии NAD и аденозина на процесс обратного захвата ГАМК синапсосами коры больших полушарий мозга крыс.

На рис. 1 показано изменение захвата $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ в зависимости от концентрации NAD и аденозина. В контроле захват ГАМК составляет $53,6 \pm 2,5$ нмоль/мг белка. Обнаружено, что NAD в концентрациях, близких к физиологическим (10^{-6} — 10^{-5} М), подавляет этот процесс на

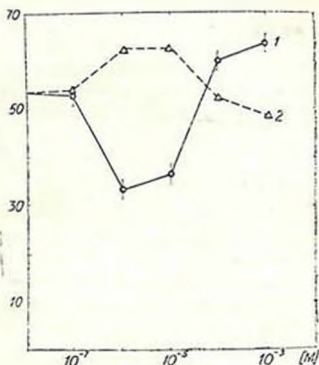


Рис. 1. Влияние NAD (1) и аденозина (2) на захват $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ синапсосами коры головного мозга крыс. По оси абсцисс — концентрация добавленного NAD или аденозина (М), по оси ординат — захват $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ (нмоль/мг белка · 20 мин)

60—40%. При повышении концентрации NAD вышеуказанного диапазона отмечается незначительное повышение поглощения ГАМК (в концентрации 10^{-3} М NAD усиливает обратный захват ГАМК приблизительно на 23%). Характерно, что эффективные в отношении ГАМК концентрации NAD не влияют на высокоаффинный синапсосный захват возбуждающих аминокислот — глутамата и аспартата (неопубликованные данные).

Эффект аденозина на захват ГАМК синапсосами мозга выражен значительно слабее по сравнению с NAD , причем динамика изменений при этом носит противоположный характер. В концентрациях 10^{-6} — 10^{-5} М аденозин вызывает незначительное (около 20%) повышение захвата ГАМК , а в концентрациях 10^{-4} — 10^{-3} М не влияет на этот процесс. Неэффективными в отношении захвата ГАМК оказались и низкие концентрации аденозина, так же как и NAD (10^{-7} М).

Полученные результаты не позволяют судить, связано ли действие NAD на захват $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ с целостностью молекулы этого динуклеотида или может быть обусловлено его синапсосным распадом. По

данным Кучмеровской и соавт. [11], в синапсоммах головного мозга крыс NAD расщепляется влиянием NADазы и в очень незначительной степени—NAD-пирофосфорилазы.

Таблица

Поглощение [14 C]ГАМК в синапсомной фракции коры мозга крыс при различных условиях инкубации.

Условия инкубации	Количество [14 C]ГАМК в синапсомной фракции (нмоль/мг белка·20 мин)
Среда поглощения, 37°	53,6±2,5
Среда поглощения, 37°; вместо 1M NaCl добавили 1M LiCl	3,2±0,2
Среда поглощения, 0° с 1M NaCl	2,8±0,1

Исходя из этого, в следующей серии экспериментов мы использовали ингибиторы NADазы никотинамид (NAM), никотинамидмононуклеотид (NMN), изониазид (INH). Согласно данным, полученным в нашей лаборатории Мовсисян, активность NADазы во фракции синапсом, используемой нами для изучения влияния NAD на захват аминокислот составляет 26,6 нмоль/мг белка/мин и ингибируется в присутствии NAM, INH (10—20 mM) и NMN (5·10⁻⁴ M) соответственно на 80, 95 и 98%.

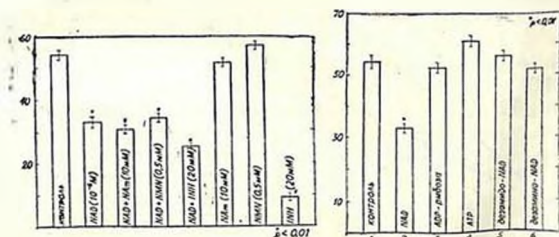


Рис. 2. Влияние ингибиторов NAD—гликогидролазы на захват [14 C]ГАМК (нмоль/мг белка·20 мин) синапсомами головного мозга крыс

Рис. 3. Влияние пуриновых нуклеотидов (10⁻⁶ M) на захват [14 C]ГАМК (нмоль/мг белка·20 мин) синапсомами головного мозга крыс

Из данных, приведенных на рис. 2, видно, что NAM и NMN не оказывают существенного влияния на ингибирование захвата ГАМК под воздействием NAD. Исключение составляет INH, в присутствии которого ингибирующий эффект NAD несколько ослабевает. При этом характерно, что INH в отличие от NAM и NMN сам по себе является мощным ингибитором захвата ГАМК.

Следует отметить, что к числу наиболее распространенных ингибиторов захвата ГАМК относятся никеитовая и аминоникеитовая кислоты, являющиеся насыщенными производными никеитовой кислоты, которая сама этим свойством не обладает [12]. Возможно, аналогичным образом действует на захват ГАМК изониазид, представляющий собой гидразид изоникеитовой кислоты. Полагают, что эффект ингибирования обусловлен приблизительно одинаковой величиной внутримолекулярного расстояния между заряженными центрами в молекуле ГАМК и указанных производных никеитовой кислоты [12].

Полученные данные указывают на то, что наблюдаемый эффект на захват ГАМК вряд ли может быть обусловлен его распадом под влиянием синаптических ферментов, прежде всего NADазы. Кроме того, продукты NADазного расщепления—ADP-рибоза и NAM подобным действием не обладают. Не влияют на этот процесс также АТР и NMN, которые могут образоваться из NAD при действии малоактивной NAD-пирогосфатазы (рис. 2, 3).

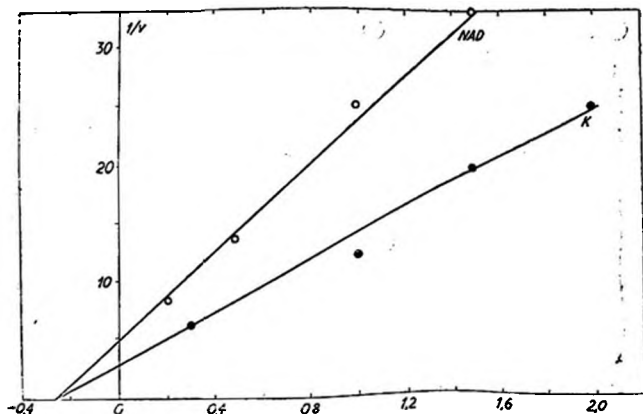


Рис. 4. Кинетика захвата $[^{14}\text{C}]$ ГАМК синаптическими головками мозга крыс по Лайнуверу-Берку в отсутствие и присутствии NAD (10^{-6} М). По оси абсцисс — величины $1/\text{ГАМК} \cdot 10^{-7}$ М, по оси ординат — количество $[^{14}\text{C}]$ ГАМК (нмоль/мг белка $\cdot 5$ мин) $^{-1}$

Ранее было обнаружено, что в мозговой ткани NAD подвергается дезамидированию и дезаминированию с образованием соответственно дезамидо- и дезамино-NAD [13]. Добавление этих производных NAD к синаптической фракции мозга, как видно из данных, приведенных на рис. 3, как и в случае ADP-рибозы, NAM, NMN и АТР, не отражается на захвате $[^{14}\text{C}]$ ГАМК синаптическими.

Кинетический анализ захвата [^{14}C] ГАМК в присутствии NAD показал, что вызванное им ингибирование носит неконкурентный характер, о чем свидетельствуют данные о снижении V с 0,33 до 0,19 нмоль/мг белка при неизменной величине K_m , равной $3,57 \cdot 10^{-7}$ М (рис. 4).

Обсуждение результатов

В настоящее время внимание исследователей широко привлекает изучение некоферментных функций NAD. К ним относится, в первую очередь, участие NAD в посттрансляционной модуляции белков путем ADP-рибозилирования и вызванное этим процессом изменение матричной активности хроматина, дифференциации и трансформации клеток.

В нервной ткани важным аспектом изучения некоферментной роли NAD является его участие в модуляции синаптических процессов. Ряд данных указывает на общность механизма действия NAD и аденозина на нейрональную активность. Оба соединения оказывают выраженное депрессантное влияние на биоэлектрическую активность корковых нейронов, которое полностью снимается под влиянием аминофиллина и других блокаторов P_1 -пуриnergических нервов [14]. Показано также, что антагонисты аденозина (теофиллин, изоамилбутилксантин и изобутилметилксантин) подавляют процесс специфического связывания NAD синаптическими мембранами [6].

Первоначально полагали, что депрессантное действие аденозина на корковые нейроны связано со стимулированием аденилатциклазной системы и повышением уровня внутриклеточного cAMP. Впоследствии было обнаружено, что в нейрональных мембранах, наряду с A_2 -рецепторами, ответственными за стимулирующий эффект аденозина на аккумуляцию cAMP, представлены A_1 -рецепторы, связывание аденозина с которыми приводит к снижению внутриклеточного содержания cAMP [15, 16]. Однако точная роль и локализация двух типов рецепторов в ЦНС до сих пор не представляется ясной, хотя установлено, что стимулирование A_1 -рецепторов вызывает ингибирование высвобождения «возбуждающих» нейромедиаторов [2].

Нейромедиаторная роль аденозина исследована довольно обстоятельно. Показано, что аденозин ингибирует пресинаптическое высвобождение АХ [17], норадреналина [18], дофамина [19] и аспартата [20].

Халмуратов и соавт. [21] наблюдали стимулирование высвобождения под влиянием NAD в концентрации 10^{-3} М дофамина и серотонина, что не характерно для аденозина, являющегося, как отмечалось, ингибитором пресинаптического высвобождения нейромедиаторов. Результаты этих исследований, так же как и полученные нами данные в отношении захвата ГАМК, выявили дозозависимый характер эффекта ГАМК. В относительно низких концентрациях ($6 \cdot 10^{-6}$ — $5 \cdot 10^{-5}$ М) NAD вызывал выраженное ингибирование высвобождения дофамина. Можно допустить, что при применении высоких концентраций наблюдается его неспецифическое деполаризирующее действие на синаптическую мембрану.

В настоящее время наличие на синаптической мембране специфических участков связывания NAD, как было сказано выше, не вызывает сомнений. Можно было бы полагать, что они соответствуют P₂-пурино-рецепторам по классификации Burnstock, которые обладают значительно более высокой чувствительностью к АТР, по сравнению с аденозином, не модулируют повышения уровня cAMP и не блокируются метилксантинами [1]. Однако, как показали наши предыдущие исследования, специфическое связывание [¹⁴C]ГАМК синаптическими мембранами коры мозга заметно подавляется в присутствии метилксантинов [6]. Это указывает на существование специфического рецептора NAD, отличающегося от описанных в литературе пуриновых и аденозиновых рецепторов. Полученные нами результаты о неодинаковом характере действия NAD и аденозина на синапсомный захват ГАМК подтверждают это предположение.

Недавно было обнаружено, что NAD способен взаимодействовать с бензодиазепиновыми рецепторами синаптических мембран, причем с большей аффективностью по сравнению с NAM, являющимся одним из возможных эндогенных лигандов этих рецепторов [22]. Наряду с этим: в последние годы сформировалось представление о сопряженности бензодиазепиновых рецепторов с участками связывания ГАМК на синаптической мембране [12, 23], благодаря чему в противосудорожное действие бензодиазепинов вовлекается ГАМК-ергическая система.

Исходя из этого, нельзя исключить, что наблюдаемый эффект NAD на процесс захвата ГАМК может быть также обусловлен его взаимодействием с бензодиазепиновыми рецепторами. В этой связи интересно отметить, что NAM, используемый нами в эквимоларной концентрации с NAD, не оказывает ингибирующего действия на захват ГАМК, тогда как повышение его концентрации до 100 мМ почти полностью подавляет этот процесс. Этот факт находится в полном соответствии с данными Фоменко и савт. [22], показавших, что концентрация NAM, способная замещать специфический лиганд бензодиазепиновых рецепторов [³H]флу-нитрозепам, на 3 порядка превосходит необходимую для этого концентрацию NAD.

Полученные нами результаты о функциональной связи между ГАМК-ергической системой и пуриновыми соединениями, к которым относится NAD, находят косвенное подтверждение в ранее опубликованных работах. Показано, в частности, что процесс Na⁺-независимого связывания [³H]ГАМК клеточными мембранами мозга крыс ингибируется различными пуринами [24]. Недавно было также установлено, что специфическое связывание ГАМК с ее рецептором ингибируется в присутствии нейротоксина апамина [25], который, помимо селективного действия на Ca²⁺-зависимые K⁺-каналы, является, по данным некоторых авторов, блокатором пуринергической передачи [26].

Как уже отмечалось, угнетение нейрональной активности под влиянием аденозина и адениннуклеотидов, связывают с подавлением процесса высвобождения возбуждающих нейромедиаторов. Значительный интерес

представляет в этой связи изучение влияния NAD на процесс синаптического высвобождения ГАМК, однако уже описанные в данной статье результаты свидетельствуют о том, что наблюдаемые в ЦНС физиологические эффекты могут быть обусловлены изменением функциональной активности системы ГАМК.

EFFECT OF NAD AND ADENOSINE ON THE UPTAKE OF [14 C] GABA BY RAT BRAIN CORTEX SYNAPTOSOMES

HAROUTUNIAN A. V., GULIAN E. A., NERSSISSIAN Tz. M., APRIKIAN G. V., KOCHARIAN M. G.

Institute of Biochemistry, Acad. Sci. of Arm. SSR, Yerevan

The effect of NAD and adenosine upon the high affinity uptake of GABA by rat brain cortex synaptosomes have been studied. It has been ascertained that in concentrations near to physiological (10^{-6} — 10^{-5} M) NAD inhibited this process by 40—60% and that the inhibition was noncompetitive. Within the same concentration limits adenosine aroused nonsignificant increase in the level of GABA uptake. The data obtained have been considered from the standpoint of the existence of various mechanisms being the basis of NAD and adenosine neuromodulatory function. Experiments in which various derivatives of NAD and inhibitors of NAD-glycohydrolase have been used testified that the inhibitory effect on GABA uptake was caused by native molecule of NAD and was not connected with its synaptosomal breakdown. Taking into consideration that nicotinamide is one of ligands of benzodiazepine receptors, their possible participation in the realization of nicotinamide effect upon the high affinity uptake of GABA by brain synaptosomes have been discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burnstock G.—In: *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones* (ed. R. W. Straub, L. Balis), p. 107—110. Raven Press, N. Y., 1978.
2. Phillips J. W., Wa P. H. *Prog. Neurobiol.*, v. 16, p. 187—239, 1981.
3. Mc Illwain H., *Practical Neurochemistry*, Acad. Press., London, 1975.
4. Халмурдов А. Г., Пархомец П. К., Кучмеровская Т. М., Чичковская Г. В. *Биохимия*, т. 48, № 8, с. 1287—1292, 1983.
5. Richards C. D., Snell C. R., Snell P. H. *Br. J. Pharmacol.*, v. 79, p. 553—564, 1983.
6. Халмурдов А. Г., Кучмеровская Т. М., Пархомец П. К., Клименко А. П., Арутюнян А. В., Мовсесян Н. О. *Нейрохимия*, т. 6, № 1, с. 133—138, 1987.
7. Stone T. N. *Neuroscience*, v. 6, p. 523—555, 1981.
8. Richards C. D., Snell C. R., Snell P. M. *J. Physiol. (Gr. Brit.)*, v. 336, p. 63—64, 1983.
9. Hajos F. *Brain Res.*, v. 93, p. 485—489, 1975.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.

11. Кучмеровская Т. М., Чичковская Г. В., Пархомец П. К., Халимурадов А. Г. Докл. АН УССР, серия «Б», № 3, с. 71—74, 1984.
12. Расовский К. С., Гсортисев В. П. Медиаторные аминокислоты, М., Медицина, 1986.
13. Арутюнян А. В., Мовсисян Н. О., Уриаджян М. Г., Бурназян А. Б. Нейрохимия, т. 3, № 1, с. 41—46, 1984.
14. Stone T. W., Perkins M. N. Brain Res., v. 229, p. 241—245, 1981.
15. Hamprecht B., Van Calcar D. Trends Pharmacol. Sci., v. 6, p. 153—154, 1985.
16. Williams M., Braunkwalder A. J. Neurochem., v. 47, p. 88—97, 1986.
17. Vizi E. S., Knoll S. Neuroscience, v. 1, p. 391—398, 1976.
18. Harms H. H., Würde H. G., Muelder A. H. Neuropharmacology, v. 18, p. 577—580, 1979.
19. Michaelis M. L., Michaelis E. K., Myers S. L. Life Sci., v. 24, p. 2033—2092, 1979.
20. Drejer J., Frandsen A., Honore T., Scholtsbue A. Neurochem. Intern., v. 11, p. 77—81, 1987.
21. Халимурадов А. Г., Кучмеровская Т. М., Пархомец П. К., Нейрохимия, т. 6, № 4, с. 495—502, 1987.
22. Фоменко А. И., Халимурадов А. Г., Пожарун С. А., Степаненко С. К. Нейрохимия, т. 7, № 1, с. 26—32, 1988.
23. Olsen R. W. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., v. 22, p. 245—277, 1982.
24. Ticku M. K., Burch T. Biochem. Pharmacol., v. 29, p. 1277—1283, 1982.
25. Кузнецов В. И., Тонких А. К., Каранова М. В., Ким О. Н., Таканава А. А., Садыков А. С. Нейрохимия, т. 4, № 2, с. 181—184, 1985.
26. Владимирова Н. А., Шуба М. Ф. Нейрофизиология, т. 10, с. 293—299, 1979.

Поступила 7. IV 1988