

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДИНА

На правах
рукопису

ХАЛМУРАДОВ Алішер Аскарівч

**ВЗАЄМОДІЯ NAD З ГАМК- ТА СЕРОТОНІНЕРГІЧНИМИ
МЕДІАТОРНИМИ СИСТЕМАМИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ**

03.00.04 - біохімія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних
наук

Київ - 1997

Дисертацією є рукопис.
Робота виконана у відділі біохімії ко ферментів Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України.

Науковий керівник- доктор біологічних наук, член-кореспондент НАН України
ДОНЧЕНКО Георгій Вікторович

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
ХМЕЛЕВСЬКИЙ Юрій Володимирович
кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
ТЕРЛЕЦЬКА Яніна Тимофіївна.

Провідна організація – Національний університет ім.Тараса Шевченка (м.Київ)

Захист відбудеться " 23 " червня" 1997 р.
о 14⁰⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.84.01
в Інституті біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України (252601 м.Київ-30, вул.Леонтовича, 9)

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України.

Автореферат розісланий " 22 " травня" 1997 р

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради *Кірсенко* О.В.Кірсенко

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00753632 (Q)

Дб 37.950

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. Згідно з численними даними літератури недостатність вітаміну РР супроводжується різкими клінічними порушеннями з боку ЦНС (Ефремов и др., 1955), тому вже досить давно вітамін РР знайшов застосування у клініці для лікування "мозкової форми пелагри" та "енцефалопатичного" синдрому.

Такі розповсюджені захворювання нервової системи, як шизофренія, психози різної етіології, епілепсія характеризуються порушенням рівня нікотинамідних коферментів у мозку (Блиновский, 1960). Відомо, що нікотинова кислота (НА) та її похідні збільшують рівень серотоніну в мозку (Маликова и др., 1969; Williams, 1983), посилюють ефект ряду наркотичних та снотворних речовин (Barton et al., 1958), діють як транквілізуючі агенти. Це вказує на те, що ефективність функціонування центральної та периферійної нервової системи у певній мірі залежить від забезпеченості організму вітаміном РР, вміст якого у мозку набагато стабільніший, ніж у печінці (Spector, 1979). Отже, з'ясування механізму подібної залежності дозволило б цілеспрямовано впливати на процеси функціонування нервової системи при різних її патологіях.

Ключем до розшифрування механізму нейротропної дії вітаміну РР та біоактивної форми - NAD послужило відкриття центральних бензодіазепінових рецепторів, серед можливих ендогенних лігандів котрих значиться нікотинамід (NAм) (Mohler 1979).

У зв'язку з цими фактами у відділі біохімії коферментів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України була

ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ НАН УКРАЇНИ
АН України

сформульована гіпотеза про можливу реалізацію нейротропної дії вітаміну PP та NAD через пурино- та бензодіазепінові рецептори, оскільки у молекулі цього динуклеотиду міститься аденіловий фрагмент - специфічний ліганд пуринорецепторів типу P₁ та P₂, а також нікотинамід - ендogenousний ліганд бензодіазепінових рецепторів.

На сьогодні накопичена достатня кількість робіт, що показують функціональний зв'язок ГАМК-бензодіазепінового рецепторного комплексу з серотонінергічною системою (Lista, 1990, Schwores, 1989, Meyer, 1989), але практично немає відомостей про взаємозв'язок між NAD та ГАМК- і серотонінергічними медіаторними системами головного мозку.

Тому, на наш погляд, уявлялося актуальним з'ясувати молекулярні механізми нейротропної дії NAD. Дана робота є частиною фундаментальних досліджень відділу біохімії коферментів Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України по вивченню нейромодуляторної функції вітаміну PP.

МЕТА ТА ЗАВДАННЯ РОБОТИ. Метою роботи було вивчення особливостей взаємодії NAD з серотонін- та ГАМК-ергічними медіаторними системами головного мозку щурів при деяких патологіях (PP-гіповітаміноз та епілепсія).

Для досягнення поставленої мети необхідно було:

1. Вивчити взаємодію NAD з бензодіазепіновими рецепторами синаптичних мембран головного мозку щурів.
2. Дослідити нейротропну дію NAD на функціонування ГАМК-бензодіазепінового рецепторного комплексу при епілептогенезі.

3. Вивчити взаємодію NAD з серотонінергічною системою головного мозку щурів за умов різної забезпеченості організму вітаміном PP.

4. Дослідити особливості функціонування ГАМК-ергічної системи за умов різної забезпеченості організму вітаміном PP.

НАУКОВА НОВИЗНА РОБОТИ. В представленій роботі вперше встановлена здатність бензодіазепінів заміщувати NAD у ділянках його специфічного зв'язування на синаптичних мембранах та здатність NAD конкурувати за ділянки високоафінного зв'язування агоністу на бензодіазепінових рецепторах, що є доказом наявності певної функціональної взаємодії між рецепторами бензодіазепінів та білками-рецепторами NAD.

В умовах експериментального епілептогенезу зниження вмісту ГАМК і NAD в мозку супроводжується зниженням специфічного зв'язування ГАМК та збільшенням його захвату синапсосомами. Додаткове уведення тваринам NAm призводить до нормалізації досліджуваних показників та активації ГАМК-ергічної системи.

Вперше показано, що в мозку щурів в умовах PP-гіповітамінозу зниження рівня NAD та його зв'язування синаптичними мембранами супроводжується одночасним зниженням вмісту серотоніну в мозку, рівня його специфічного зв'язування синаптичними мембранами та вивільнення і захвату синапсосомами. Ці процеси нормалізуються лише за умов хронічного уведення NAm, що призводить до усунення ознак PP-гіповітамінозу та нормалізації гальмівного ефекту NAm на систему захвату ГАМК.

ПРАКТИЧНА ЦІННІСТЬ РОБОТИ. Отримані дані дозволяють доповнити і розширити положення про нейромодуляторну роль NAD, а також підійти до розкриття механізму нейротропної дії вітаміну PP та NAD в нервовій системі. Результати експериментальної роботи є основою для теоретичного обґрунтування практичного використання NAm та нікотинамідних коферментів у клініці для лікування та профілактики ряду захворювань нервової системи.

ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВІНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ .

1. Між рецепторами бензодіазепінів і білками-рецепторами, що зв'язують NAD існує певна взаємодія.

2. Нормалізація функціонування ГАМК - бензодіазепінового рецепторного комплексу при епілепсії може відбуватися за рахунок посилення ГАМК-ергічної передачі при надлишковому уведенні нікотинамідну.

3. У мозку PP-гіповітамінозних тварин порушується як зв'язування NAD синаптичними мембранами, так і функціонування серотонінергічної нервової передачі. Молулююча дія NAD на серотонінергічну нейромедіаторну систему відновлюється після тривалого уведення тваринам вітаміну PP.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ ТА ПУБЛІКАЦІЇ. Матеріали дисертації доповідались і обговорювались на конференції "Біохімія в медицині"(Ленінград,1988); X симпозіумі біохімічних товариств СРСР-ГДР "Механізми регуляції клітинної активності" (Ташкент,1989); Всесоюзній конференції по клінічній вітамінології (Москва,1991);VI Українському біохімічному з'їзді (Київ,1992); на конференціях молодих вчених, семінарах і засіданнях вченої

ради Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 3 статті та 5 тез доповідей.

ОСОБИСТИЙ ВНЕСОК АВТОРА полягає у виконанні експериментальної частини роботи, підборі та обробці літературних даних. Аналіз та обговорення проведено спільно з науковим керівником.

СТРУКТУРА ТА ОБСЯГ РОБОТИ. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, результатів та їх обговорення, заключення, висновків і списку літератури з 240 найменувань. Робота викладена на 168 сторінках друкованого тексту, ілюстрована 29 малюнками і 5 таблицями.

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В експериментах використовували щурів-самців вагою 120-150 г.

Модель епілептогенезу викликали внутрішньобрюшинним введенням щурам конвульсанту - бікукуліну із розрахунку 5 мг на кг маси тіла на різні інтервали часу.

Модель надлишку NAD в організмі викликали: а/ уведенням тваринам NAm на протязі тижня по 150 мг на кг маси тіла 2 рази на добу; б/ уведенням NAm на 6 год по 500 мг на кг маси тіла.

Модель нестачі NAD в організмі викликали утриманням тварин вагою 50-60 г на РР-авітамінозному раціоні з додаванням 2% L-лейцину (для інгібування синтезу нікотинамідних коферментів із триптофану) на протязі 18 діб. Контролем були тварини, які

утримувались на повноцінному напівсинтетичному раціоні, що містив вітамін PP.

Синаптосоми та синаптичні мембрани головного мозку щурів одержували за методом Abita (1977). Окислені та відновлені форми NAD та NADH визначали в кислоторозчинному екстракті за методом Klindenberg (1963). Вміст серотоніну визначали в перхлорному екстракті за допомогою HPLC. 100 мкл супернатанту наносили на колонку RepRPC (5x50) фірма "Pharmacia". Вміст ГАМК визначали радіолігандним методом по витісненню міченого мусцимолу з ділянок його специфічного зв'язку з ГАМК-рецепторним комплексом синаптичних мембран, які були оброблені тритоном X-100 (Mousah, 1987). Специфічне зв'язування [³H]флунітразепаму синаптичними мембранами визначали в інкубаційному середовищі об'ємом 0.2 мл, яке містило 5 мМ трис-НСІ, рН 7.4; 100 мкг білку; 1.1нМ [³H] флунітразепам (питома активність 86 Сі на ммоль, Amersham). Реакцію провадили 40 хв при 0° С і закінчували швидкою фільтрацією під вакуумом через фільтри GF/C "Whatman". Специфічне зв'язування визначали як різницю між загальним та неспецифічним зв'язування в присутності 1 мкМ флунітразепаму. Специфічне зв'язування [¹⁴C] NAD синаптичними мембранами головного мозку щурів визначали за допомогою радіолігандного методу з використанням [¹⁴C]NAD (питома активність 285 мСі на ммоль). Проби об'ємом 1мл містили 1 мкг білка та 1,1 мкМ [¹⁴C] NAD. Рівень неспецифічного зв'язування вимірювали в присутності надлишку неміченого NAD (1.1 мМ). У випадку солюбілізованого рецепторного білку специфічне зв'язування визначали в середовищі, яке використовували для

мембранозв'язаного рецепторного білка. Після інкубіції білок осаджували насиченим сульфатом амонію. Для визначення специфічного зв'язування [^3H]мусцимолу з рецептором ГАМК суспензію мембран (100 мкг білку) інкубували у середовищі загальним об'ємом 0.2 мл, яке містило 50 мМ трис-цитратний буфер, рН 7.4; 1 нМ [^3H]мусцимол, на протязі 30 хв при 2 $^{\circ}\text{C}$. Після інкубування суміш фільтрували під вакуумом через фільтри GF/C "Whatman". Для визначення неспецифічного зв'язування використовували мусцимол у концентрації 10 $^{-5}$ М. Захват [^{14}C]ГАМК синапсосомами визначали після інкубування 100 мкг білка синапсосом на протязі 3 хв при 32 $^{\circ}\text{C}$ з різними концентраціями [^{14}C]ГАМК (питома активність 232 мСі/ммоль). Початкову швидкість захвату визначали у пмоль захваченого синапсосомами [^{14}C]ГАМК за 3 хв. Вивільнення радіоактивної ГАМК та серотоніну із синапсосом вивчали за допомогою перфузійної камери. Специфічне зв'язування серотоніну синаптичними мембранами вивчали за допомогою радіолігандного методу. 0.5 мл інкубаційного розчину, містило 0.1 М фосфатний буфер; 125 мМ NaCl; 1.43 мМ MgCl $_2$; 5 мМ KCl; 0.87 мМ CaCl $_2$; 0,5 мкг білку; 1,75 мкМ [2- ^{14}C] серотонін та 10 $^{-5}$ М іпроніазід - інгібітор моноамінооксидази. Суміш інкубували на протязі 10 хв. По закінченні інкубації проби фільтрували під вакуумом. Специфічне зв'язування радіоліганду синаптичними мембранами визначали як різницю між загальним та неспецифічним зв'язуванням. Захват [2- ^{14}C]серотоніну (питома радіоактивність 58 мСі/ммоль) синапсосомами вивчали в інкубаційному середовищі, склад якого описано вище. Після передінкубації з білком до проб додавали 1,75 мкМ [2- ^{14}C]

серотонін та інкубували різні інтервали часу при 37 °С. Радіоактивність фільтрів вимірювали на сцинтиляційному лічильнику SL-100.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Незважаючи на досить широке практичне використання бензодіазепінів для лікування ряду неврологічних захворювань, центральний механізм їх дії не зовсім визначений.

Виходячи з цього, на першому етапі роботи були досліджені деякі механізми взаємодії NAm та NAD з специфічними ділянками зв'язування бензодіазепінів та вплив бензодіазепінів на зв'язування NAD синаптичними мембранами головного мозку щурів.

1. ВЗАЄМОДІЯ NAD З БЕНЗОДІАЗЕПІНОВИМИ РЕЦЕПТОРАМИ СИНАПТИЧНИХ МЕМБРАН ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ

Для вирішення питання про здатність нікотинаміду зв'язуватися з центральними рецепторами бензодіазепінів, був використаний прийом, заснований на інгібуванні зростаючими концентраціями NAm специфічного зв'язування синаптичними мембранами мозку щурів [^3H] флунітразепаму.

50 % інгібування зв'язування радіомітки бензодіазепіновими рецепторами синаптичних мембран мало місце при концентрації NAm - 4,5 мМ (рис.1).

Хронічне уведення щурам NAm *in vivo* також призводило до гальмування специфічного зв'язування [^3H]флунітразепаму синаптичними мембранами.

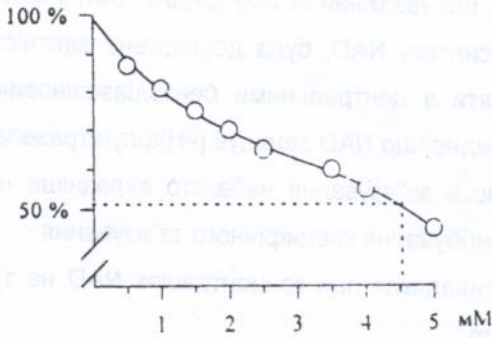


Рис.1 Специфічне зв'язування $[^3\text{H}]$ флунітразепаму синаптичними мембранами при дії Nam

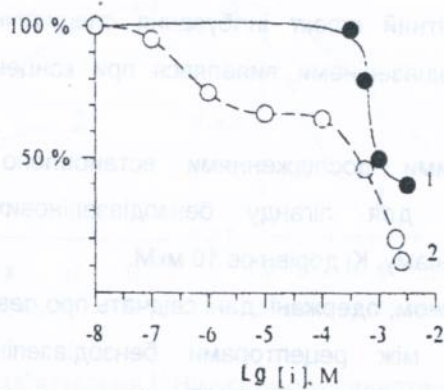


Рис. 2 Заміщення зв'язаного $[^3\text{H}]$ флунітразепаму NAM (1) та NAD (2)

Приймаючи до уваги, що уведений *in vivo* щуром NAM у мозку служить джерелом біосинтезу NAD, була досліджена здатність NAD *in vitro* взаємодіяти з центральними бензодіазепіновими рецепторами. З рис.2 видно, що NAD заміщує [³H]флунітрапам з його специфічних місць зв'язування набагато виразніше ніж NAM. Помітний ефект інгібування специфічного зв'язування [³H]флунітрапама виявлявся при концентраціях NAD на три порядки нижчих від NAM.

Зроблено висновок, що NAM взаємодіє з тими ж самими ділянками специфічного зв'язування на синаптичних мембранах, що і бензодіазепіни, опосередковано через NAD, джерелом біосинтезу котрого є уведений NAM.

При вивченні впливу бензодіазепінів на специфічне зв'язування [¹⁴C]NAD синаптичними мембранами були використані фенапам, нітропам, клонапам та флунітрапам в діапазоні концентрацій (10^{-9} - 10^{-3} М (рис.3). Помітний ефект інгібування специфічного зв'язування NAD бензодіазепінами виявлявся при концентраціях 10^{-5} М (рис.3).

Кінетичними дослідженнями встановлено змішаний тип інгібування для ліганду бензодіазепінових рецепторів - флунітрапама. K_i дорівнює 10 мкМ.

Таким чином, одержані дані свідчать про певну функціональну взаємодію між рецепторами бензодіазепінів та білками-рецепторами, які зв'язують NAD.

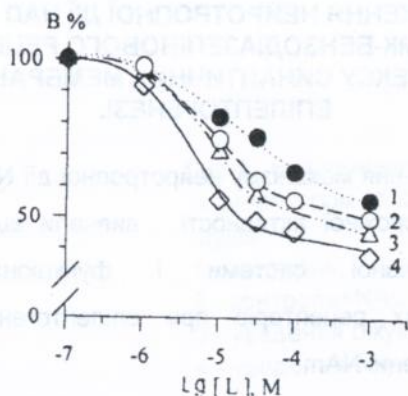


Рис.3. Специфічне зв'язування $[^{14}\text{C}]\text{NAD}$ синаптичними мембранами в присутності бензодіазепінів
1- феназепам; 2- нітрозепам;
3 - клоназепам; 4 - флунітразепам

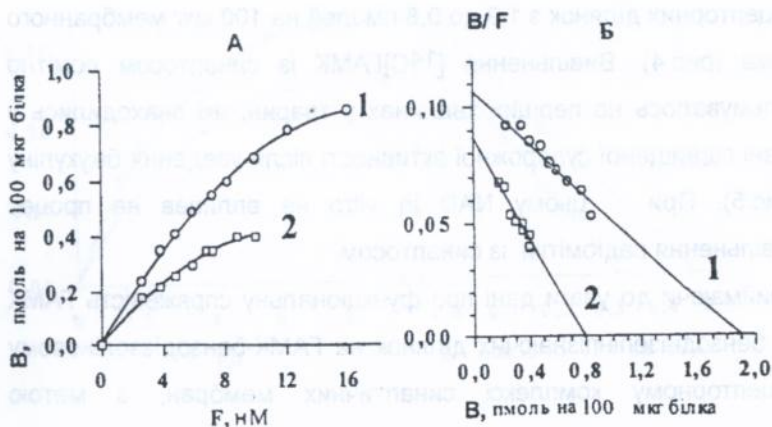


Рис.4. Специфічне зв'язування $[^3\text{H}]\text{мусцимолу}$ синаптичними мембранами при уведенні бікукуліну (А), та вираження цих даних у координатах Скетчарда (Б); 1- контроль, 2 - уведення бікукуліну

2. ДОСЛІДЖЕННЯ НЕЙРОТРОПНОЇ ДІЇ NAD НА ФУНКЦІОНУВАННЯ ГАМК-БЕНЗОДІАЗЕПІНОВОГО РЕЦЕПТОРНОГО КОМПЛЕКСУ СИНАПТИЧНИХ МЕМБРАН ПРИ ЕПІЛЕПТОГЕНЕЗІ.

З метою вивчення механізму нейротропної дії NAm і ролі NAD в регуляції судорожної активності, вивчали відповідь ГАМК-ергічної гальмівної системи і функціональний стан бензодіазепінових рецепторів при епілептогенезі та при хронічному уведенні NAm.

При експериментальному епілептогенезі одночасно зі зниженням вмісту ГАМК спостерігається і зниження вмісту NAD у мозку. При цьому зниження специфічного зв'язування [³H]мусцимолу, за допомогою якого провадили тестування рецепторів ГАМК, проходило за рахунок зменшення ємності рецепторних ділянок з 1,9 до 0,8 пмолей на 100 мкг мембранного білка (рис.4). Вивільнення [¹⁴C]ГАМК із синапсом помітно гальмувалось на перших хвилинах у тварин, які знаходились у стані підвищеної судорожної активності після уведення бікукуліну (рис.5). При цьому NAD *in vitro* не впливав на процес вивільнення радіомітки із синапсом.

Приймаючи до уваги дані про функціональну спряженість ГАМК та бензодіазепінопізнаючих ділянок на ГАМК-бензодіазепіновому рецепторному комплексі синаптичних мембран, з метою вивчення механізму протисудорожної дії NAm, досліджували функціональну активність бензодіазепінових рецепторів у нормі і при експериментальній епілепсії на фоні надлишку NAD в організмі. Функціональний стан бензодіазепінових рецепторів, які тестували по специфічному зв'язуванню [³H]флунітразепаму синаптичними мембранами, вивчали при уведенні бікукуліну на

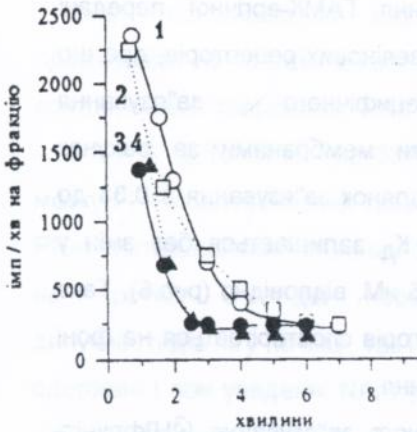


Рис 5. Вивільнення $[^{14}\text{C}]$ ГАМК із синапсом головного мозку щурів

- 1 - контроль;
- 2 - контроль+NAD;
- 3 - уведення бікукуліну;
- 4 - уведення бікукуліну+NAD

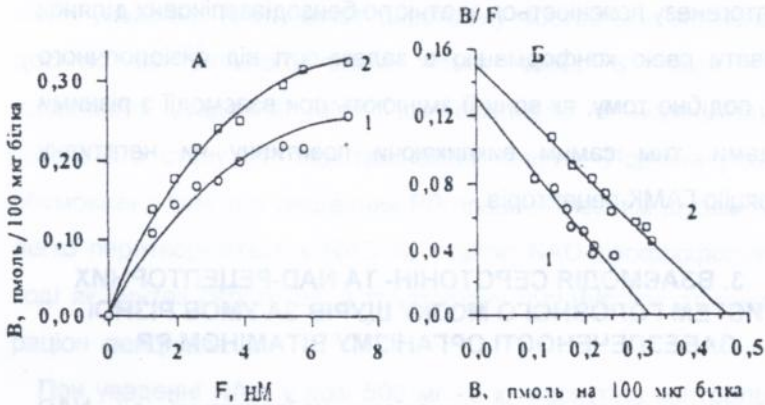


Рис.6. Специфічне зв'язування $[^3\text{H}]$ флунітразема синаптичними мембранами (А) та вираження цих даних у координатах Скетчарда (Б); 1 - контроль, 2 - уведення бікукуліну

такий часовий інтервал, коли судороги ще не почалися, але вже спостерігається порушення постсинаптичного ГАМК-ергічного гальмування. На фоні гальмування ГАМК-ергічної передачі спостерігається активація бензодіазепінових рецепторів, про що свідчить підвищення специфічного зв'язування [³H]флунітразепаму синаптичними мембранами за рахунок збільшення ємності рецепторних ділянок зв'язування з 0,33 до 0,46 пмолей на 100 мкг білку, а K_d залишається без змін у порівнянні з контролем - 3,05 та 2,5 нМ, відповідно (рис.6). Така активація бензодіазепінових рецепторів спостерігається на фоні зниження ГАМК-ергічного гальмування.

Можливо, підвищення специфічного зв'язування [³H]флунітразепаму бензодіазепіновими рецепторами при моделюванні епілептогенезу пояснюється здатністю бензодіазепінових ділянок змінювати свою конформацію в залежності від фізіологічного стану, подібно тому, як вони її змінюють при взаємодії з різними лігандами, тим самим викликаючи позитивну чи негативну модуляцію ГАМК-рецепторів.

3. ВЗАЄМОДІЯ СЕРОТОНІН- ТА NAD-РЕЦЕПТОРНИХ СИСТЕМ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ РІЗНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ ОРГАНІЗМУ ВІТАМІНОМ PP

Подальше дослідження механізму нейротропної дії NAD провадили при вивченні взаємодії його з серотонін- та ГАМК-ергічними медіаторними системами головного мозку за умов різної забезпеченості організму щурів вітаміном PP.

Найбільш зручною моделлю для вивчення цієї взаємодії є PP-гіповітаміноз, бо лейцин, який додається у раціон тварин,

порушує як синтез NAD, так і утворення серотоніну із триптофану.

Вміст нікотинамідних коферментів у мозку щурів, які одержували PP-авітамінозний раціон знижується у порівнянні з контрольними тваринами: NAD - на 30 %, NADP - на 83 %, NADH - на 34 % та NADPH - на 33%. При цьому рівень серотоніну у мозку PP-гіповітамінозних тварин знижується на 20 %. Уведення PP-гіповітамінозним тваринам NAM у дозі 40 мг на кг маси тіла на протязі 3-х діб нормалізує рівень нікотинамідних динуклеотидів як у печінці, так і у мозку щурів. Подібні результати одержані і при уведенні NAM у тій же концентрації на протязі 7 діб та 3-х тижнів на 20%. Однак, на відміну від нікотинамідних коферментів, вміст котрих нормалізується вже через 3 доби після уведення NAM, вміст серотоніну зостається зниженим і досягає контрольного рівня тільки через 3 тижні після щоденного уведення NAM, що співпадає з нормалізацією загального стану PP-гіповітамінозних тварин. Подібна різниця обумовлена тим, що уведений PP-гіповітамінозним щурам NAM легко перетворюється у NAD за участю NAD-пірофосфорілази, тоді як синтез серотоніну з триптофану гальмується доданим у раціон лейцином.

При уведенні NAM у дозі 500 мг на кг маси тіла контрольних тварин на 6 год (умови підвищеного синтезу NAD в організмі) вміст серотоніну у мозку зростає на 17%. Мабуть у цьому випадку має місце інгібування NAM триптофанпіролази, в результаті чого підвищується перетворення триптофану у серотонін. За цих умов процес рецепції NAD синаптичними мембранами не змінюється, незважаючи на підвищення рівня цього динуклеотиду у мозку.

У РР-гіповітамінозних тварин специфічне зв'язування NAD синаптичними мембранами головного мозку знижується на 40% у порівнянні з контролем і не відновлюється через 3 та 7 діб після уведення NAm. При цьому спорідненість NAD до рецептору не змінюється (рис.7). Специфічне зв'язування NAD приходить до норми тільки через 3 тижні щоденного уведення NAm. У випадку підвищеного синтезу NAD зв'язування [^{14}C]серотоніну синаптичними мембранами не відрізняється від контролю, незважаючи на те, що рівень серотоніну у мозку підвищений. В умовах РР-гіповітамінозу зв'язування серотоніну знижується на 20% і зостається низьким і через 7 діб після уведення тваринам NAm. Нормалізація системи рецепції серотоніну настає лише через 3 тижні.

Показано, що захват [^{14}C] серотоніну синаптосомами головного мозку РР-гіповітамінозних щурів знижується у порівнянні з контролем /рис.8, ст.1,3/ і нормалізується лише через 3 тижні при щоденному уведенні тваринам NAm у дозі 40 мг/кг (рис.8, ст.5). При цьому NAD (10^{-5} M) *in vitro* проявляє гальмівний ефект на процес захвату серотоніну синаптосомами мозку як у контрольних, так і у РР-гіповітамінозних тварин (рис.8, ст.2,4,6).

Вивільнення [^{14}C]серотоніну із синаптосом контрольних тварин під впливом NAD (10^{-5}M) *in vitro* підвищується на 25% у порівнянні із спонтанним вивільненням. В умовах РР-гіповітамінозу вивільнення серотоніну з синаптосом головного мозку щурів зменшується на 21% у порівнянні з контролем. Внесення в інкубаційне середовище NAD в цих умовах збільшує вивільнення серотоніну. Відновлення системи вивільнення

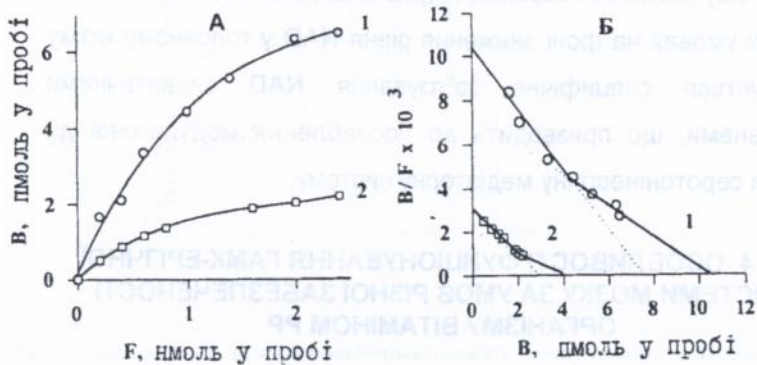


Рис.7. Специфічне зв'язування [¹⁴C]NAD синаптичними мембранами (А) та вираження цих даних у координатах Скетчарда (Б);
1 - контроль, 2- РР-гіповітаміноз.

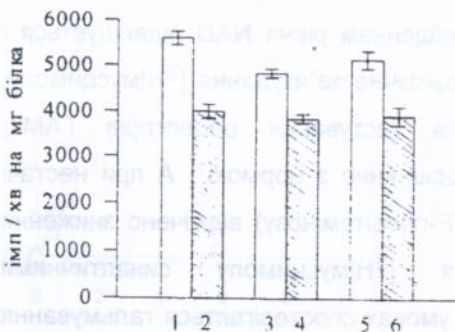


Рис.8. Захват [¹⁴C] серотоніну синаптосомами при дії NAD (10⁻⁵ M) in vitro
1 - контроль ; 2 - контроль + NAD ; 3 - РР-гіповітаміноз ; 4 - РР-гіповітаміноз + NAD ; 5 - РР-гіповітаміноз + NAm на 3 тижні ; 6 - РР-гіповітаміноз + NAm на 3 тижні + NAD

[¹⁴C]серотоніну з синапсом спостерігається через 3 тижні при щоденному введенні тваринам лікувальної дози вітаміну PP.

В цих умовах на фоні зниження рівня NAD у головному мозку зменшується специфічне зв'язування NAD синаптичними мембранами, що призводить до послаблення модулюючої дії NAD на серотонінергічну медіаторну систему.

4. ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ ГАМК-ЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ МОЗКУ ЗА УМОВ РІЗНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ ОРГАНІЗМУ ВІТАМІНОМ PP

Приймаючи до уваги дані про функціональний зв'язок ГАМК-та серотонінергічних систем, для дослідження можливих механізмів нейротропної дії вітаміну PP уявлялось доцільним вивчити стан головної гальмівної медіаторної системи при надлишку та нестачі NAD у організмі.

При введенні NAm на протязі тижня (модель надлишку NAD в організмі) одночасно з підвищенням рівня NAD підвищується і вміст ГАМК. При цьому специфічне зв'язування [³H]мусцимолу, який використовували для тестування рецепторів ГАМК, достовірно підвищується порівнянно з нормою. А при нестачі NAD в організмі (модель PP-гіповітамінозу) відмічено зниження специфічного зв'язування [³H]мусцимолу синаптичними мембранами (рис.9). В цих умовах спостерігається гальмування захвату [¹⁴C]ГАМК синапсами на 20% (рис.10). Гальмування захвату [¹⁴C] ГАМК при PP-гіповітамінозі не зовсім зрозуміло. Можливо це захисна реакція організму на патологічний стан. Вивчення впливу NAD *in vitro* у концентрації 10⁻⁶ М показало, що накопичення радіоліганду синапсами гальмувалось на 24% у контрольних тварин і всього на 9% - у PP-гіповітамінозних

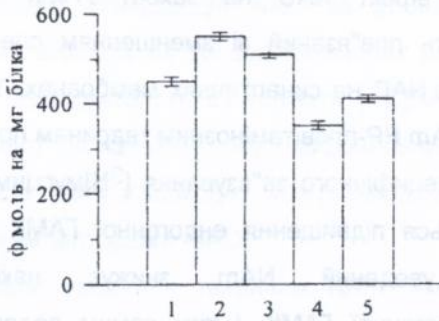


Рис. 9. Специфічне зв'язування $[^3\text{H}]$ мусцимолу синаптичними мембранами:
1 - контроль;
2 - уведення NAM *in vivo*;
3 - контроль + NAD *in vitro*;
4 - PP-рібофлавіноз; 5 - PP-рібофлавіноз + NAD *in vitro*

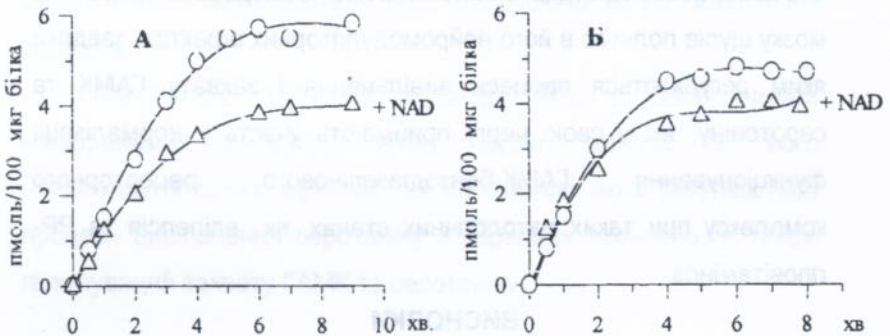


Рис. 10. Захват $[^{14}\text{C}]$ ГАМК синаптосомами головного мозку щурів у нормі (А) та при PP-рібофлавінозі (Б)

Менш виражений ефект NAD на захват ГАМК при РР-гіповітамінозі мабуть пов'язаний зі зменшенням специфічних ділянок зв'язування NAD на синаптичних мембранах. Уведення на протязі тижня NAm РР-гіповітамінозним тваринам призводить до нормалізації специфічного зв'язування [³H]мусцимолу, при цьому спостерігається підвищення ендогенної ГАМК у мозку. Таким чином, уведений NAm знижує накопичення синаптосомами екзогенної ГАМК, і тим самим подовжує час існування ГАМК у синаптичній щілині. Це призводить до активації ГАМК-ергічної передачі. Крім того, введення NAm сприяє підвищенню рівня NAD та активації NAD-зв'язуючих рецепторних білків і як наслідок, посилює ефект NAD на системи постсинаптичного зв'язування і захвату ГАМК.

Узагальнюючи отримані дані, можна сказати, що фізіологічне значення взаємодії NAD з синаптичними мембранами головного мозку щурів полягає в його нейромодуляторних ефектах, завдяки яким регулюються процеси вивільнення і захвату ГАМК та серотоніну, які у свою чергу приймають участь у нормалізації функціонування ГАМК-бензодіазепінового рецепторного комплексу при таких патологічних станах, як епілепсія та РР-гіповітаміноз.

ВИСНОВКИ

1. Взаємодія NAm з центральними бензодіазепіновими рецепторами реалізується не прямим шляхом, а опосередковано через NAD, на що вказує здатність NAD заміщувати [³H]флунітразепам з його специфічних місць зв'язування на синаптичних мембранах у концентраціях на три порядки менших, ніж NAm.

2. Виявлена конкуренція NAD за ділянки високоафінного зв'язування агоніста на бензодіазепінових рецепторах, а також здатність бензодіазепінів заміщувати [^{14}C]NAD у ділянках його специфічного зв'язування на нейрональних мембранах, що свідчить про певну взаємодію між рецепторами бензодіазепінів та білками рецепторами NAD.

3. Тривале уведення тваринам NAm, яке супроводжується підвищенням вмісту ГАМК та NAD у мозку, призводить до нормалізації функціонування ГАМК-бензодіазепінового рецепторного комплексу синаптичних мембран.

4. Вперше показано, що в мозку PP-гіповітамінозних тварин порушується функціонування серотонін- та ГАМК-ергічних медіаторних систем. Лікувальний ефект вітаміну PP при цій патології спрямований на відновлення рецепції NAD синаптичними мембранами і його модулюючої дії на синаптичну передачу.

5. Фізіологічне значення взаємодії NAD з синаптичними мембранами головного мозку щурів полягає в його нейромодуляторних ефектах, за допомогою яких регулюються процеси вивільнення серотоніну з нервових закінчень, а також гальмування захвату ГАМК та серотоніну.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Чичковская Г.В., Пархомец П.К., Кучмеровская Т.М., Халмурадов А.А., Рожанская О.П., Донченко Г.В. Функционально-

метаболические изменения в мозге при различной обеспеченности организма крыс витамином РР // Вопросы мед.химии.-1991.-N 4.-С.63-65

2. Фоменко А.И., Чичковская Г.В., Пархомец П.К., Донченко Г.В., Степаненко С.П., Халмурадов А.А. Особенности функционирования тормозных медиаторных систем синапсом головного мозга у РР-гиповитаминозных крыс //Укр.биохим.журн.-1992.-т.64,N6.-С.109-112.

3. Фоменко А.И, Донченко Г.В., Халмурадов А.А., Степаненко С.П. Участие ГАМК-ергического компонента во взаимодействии NAD с бензодиазпиновыми рецепторами при эпилептогенезе //Укр.биохим.журн.-1997.-т.69,N2.-С.58-65.

4. Чичковская Г.В., Кучмеровская Т.М., Пархомец П.К., Донченко Г.В., Рожанская О.П., Халмурадов А.А. Функционально-метаболические нарушения в мозгу крыс при РР-гиповитаминозе //Всесоюзная конференция "Биохимия в медицине. Тез.докл.Ленинград,1988.-.I54

5. Пархомец П.К., Кучмеровская Т.М., Чичковская Г.В., Рожанская О.П., Халмурадов А.А. Действие NAD на высвобождение и захват [2- ¹⁴C]- серотонина синапсосомами при различной обеспеченности крыс витамином РР //X объединенный симпозиум биохимических обществ СССР-ГДР "Механизмы регуляции клеточной активности". Тез.докл. Ташкент, 1989. – С. 57

6. Пархомец П.К., Чичковская Г.В., Халмурадов А.А. Влияние витамина РР на рецепцию серотонина в головном мозге крыс //Всесоюз.конф. "Проблемы микробиального синтеза витаминов и их производных" Тез.докл.,Ташкент,1990.-С.88-89

7. Чичковская Г.В., Пархомец П.К., Халмурадов А.А. Взаимодействие NAD и серотонинергических систем головного мозга крыс при РР-гиповитаминозе //Всесоюз.конф. по клинической витаминологии . Тез.докл., Москва,1991.- С.46-47

8. Фоменко Г.Й., Пархомец П.К., Халмурадов А.А. Степаненко С.П. Виділення та очищення діазепамзв'язуючого інгібітора //VI Укр.біохім.з'їзд.Тези доп. Київ, 1992.-С. 233

KHALMURADOV A.A. Interaction of NAD with GABA- and serotonergic mediators systems of the rat brain.

The dissertation work on the candidate of biological sciences, in the speciality 03.00.04 - Biochemistry.

A.V.Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences, Kyiv, 1997.

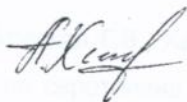
8 scientific works are going to be defended, revealing that physiological interaction of NAD with the synaptic membranes of the rat brain is pronounced in its neuromodulatory effects due to which GABA and serotonin release and uptake processes are regulated, participating in their turn in regulating GABA-benzodiazepine receptor complex functioning at various pathologic states.

Халмуратов А.А. Взаимодействие NAD с ГАМК- и серотонинергическими медиаторными системами головного мозга крыс.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04-биохимия, Институт биохимии им.А.В.Палладина НАН Украины, Киев, 1997.

Защищается 8 научных работ, в которых показано, что физиологическое значение взаимодействия NAD с синаптическими мембранами головного мозга крыс состоит в его нейромодуляторных эффектах, с помощью которых регулируются процессы высвобождения и захвата ГАМК и серотонина, которые в свою очередь принимают участие в нормализации функционирования ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса при различных патологических состояниях.

Ключові слова: нейромедіатори, вітамін PP, ГАМК-бензодіазепіновий рецепторний комплекс, синаптичні мембрани, серотонін.



Підписано до друку 19.05.97р. Формат 60x84/16.
Ум. друк. арк. 1,0. Обл.-вид. арк. 1,0.
Наклад 100. Зам. 186.

Відділ оперативної поліграфії
Центру Міжнародної освіти
227-12-75, 227-37-86

AB 37.950