

УДК 577.164.15+616-092.9

©Коллектив авторов

### ДЕЙСТВИЕ НИКОТИНАМИДА ДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА НА СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКУЮ МЕДИАТОРНУЮ СИСТЕМУ ПРИ ВВЕДЕНИИ 3-АЦЕТИЛПИРИДИНА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС

Т.М. Кучмеровская, Г.В. Чичковская, Л.В. Пакирбаева, А.А. Халмурадов

Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, 01601 Киев,  
ул. Леонтовича 9, тел: (38 044) 224-71-78, факс: (38 044) 229-63-65,  
эл. почта: kuch@biochem.kiev.ua

Изучено модулирующее действие NAD на функционирование серотонинергической и NAD-рецепторной систем головного мозга крыс при введении животным 3-ацетилпиридина (3-АП) - антивитамина В3. Обнаружено снижение содержания NAD и серотонина в головном мозге крыс при вызванной 3-ацетилпиридином В3-недостаточности. Обнаружено, что связывание [ $U-^{14}C$ ]NAD синаптическими мембранами изменяется за счет уменьшения емкости мест связывания динуклеотида мембранами нервных окончаний. Выявлено изменение захвата серотонина нервными окончаниями, а также влияние NAD ( $10^{-5}M$ ) *in vitro* на этот процесс. Введение никотинамида животным перед введением 3-АП приводило к восстановлению модулирующего действия NAD на серотонинергическую нервную передачу и предотвращало антивитаминозное и отрицательное неврологическое действие 3-АП.

**Ключевые слова:** витамин В3, 3-ацетилпиридин, NAD, серотонин, связывание, захват.

**ВВЕДЕНИЕ.** Витамин В3 и его биологически активные производные широко используются для лечения ряда заболеваний нервной системы, таких как шизофрения, эпилепсия, психозы различной этиологии, диабетическая нейропатия и т.п. [1,2]. Однако механизмы реализации их нейротропного действия остаются невыясненными. Ранее нами показано, что никотинамидные динуклеотиды, в частности, NAD (как биоактивный метаболит витамина В3) специфически связывается синаптическими мембранами головного мозга крыс и модулирует высвобождение и захват некоторых нейромедиаторов, таких как дофамин и серотонин [3,4]. Последующие исследования были проведены на модели В3-гиповитаминозных животных, которых содержали на рационе без никотиновой кислоты с включением 2% L-лейцина, который не только тормозит синтез никотинамидных коферментов, но и серотонина из триптофана [5]. В результате проведенных исследований было обнаружено существование функциональной связи между системами рецепции NAD и серотонина в головном мозге животных в зависимости от уровня обеспеченности организма животных витамином В3 [6,7].

Известно, что при недостаточном поступлении в организм витамина В3 развивается пеллагра, основными признаками которой являются дерматит, диарея и деменция, в то время как "мозговая" форма пеллагры сопровождается только нарушением психического состояния больных, а именно бессонницей, депрессией, эмоциональными расстройствами, галлюцинациями [8]. Нами установлено, что факторы, которые приводят к развитию дисфункций нервной системы при В3-недостаточности [6], обусловлены нарушением функционирования серотонинергической медиаторной системы и изменением

рецепции NAD синаптическими мембранами нервных окончаний. С целью более глубокого понимания механизма модулирующего действия витамина В3 и его биологически активных метаболитов на функционирование медиаторных систем мозга (в частности, на серотонинергическую медиаторную систему) в настоящей работе моделью В3-недостаточности служили животные, которым вводили 3-ацетилпиридин (3-АЦП) - антивитамин витамина В3, который вызывает не только признаки В3-гиповитаминоза, но и неврологические симптомы, такие как судороги, нарушение координации движений, к тому же не влияет непосредственно на метаболизм серотонина [9,10].

Настоящая работа посвящена исследованию биохимических механизмов модулирующего действия NAD на серотонинергическую медиаторную систему при введении животным 3-АЦП.

**МЕТОДИКА.** В работе использованы белые крысы-самцы породы Вистар массой 120-150 г. Животных разделяли на 4-е группы. Контрольных крыс содержали на стандартном рационе вивария (норма); второй группе животных вводили внутривенно никотинамид (NAm) в дозе 500 мг/кг массы тела за 6 час до забоя, третьей - 3-АЦП в дозе 50 мг/кг массы тела однократно в течение 2-х суток, четвертой - NAm за 6 час до введения 3-АЦП.

Синапсомы и синаптические мембраны головного мозга крыс выделяли по методу Abita et al. [11].

Содержание окисленных (NAD, NADP) и восстановленных (NADH, NADPH) никотинамидных динуклеотидов определяли, как описано нами ранее [6]. Содержание серотонина в головном мозге крыс определяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ [12].

Специфическое связывания [ $U-^{14}C$ ]NAD и [ $2-^{14}C$ ]серотонина синаптическими мембранами головного мозга крыс оценивали согласно радиолигандному методу [13]. Захват [ $2-^{14}C$ ]серотонина нервными окончаниями осуществляли согласно методу, описанному ранее [7]. Содержание белка определяли по Lowry et al. [14]. Статистический анализ полученных данных проводили, используя стандартный критерий t Стьюдента для некоррелированных выборок [15].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Для более глубокого понимания механизмов, лежащих в основе модулирующего действия NAD на процессы захвата и высвобождения некоторых нейромедиаторов, в проведенных исследованиях нами была выбрана модель В3-недостаточности, которую вызывали введением животным 3-АЦП. Это соединение является антивитамин В3, введение которого в организм животных сопровождается появлением многочисленных симптомов неврологической недостаточности, которые проявляются в виде нарушения координации движений, тремора конечностей и конвульсивных припадков [9]. В настоящее время установлено, что NAD-гликогидролаза (КФ 3.2.2.5), выделенная из различных тканей животных, может катализировать обменную реакцию между 3-АЦП и NAD с образованием "модифицированного" кофермента - ацетилпиридинадениндинуклеотида [16]. При этом необходимо подчеркнуть, что если в ткани печени животных преобладающее количество 3-АЦП быстро превращается через никотиновую кислоту, что сопровождается повышением содержания коферментных форм нуклеотидов, то в мозге из-за отсутствия детоксицирующего механизма уже через 2-4 часа обнаруживаются "модифицированные" NAD и NADP. При этом в мозге только от 4 до 6% NAD превращается в 3-АЦП-производное, тогда как 50% присутствующего NADP обнаруживается в мозге как 3-ацетилпиридинадениндинуклеотидфосфат (3-АЦПNADP) [17].

Биохимическим критерием В3-недостаточности может быть уровень никотинамидных динуклеотидов в тканях.

Как видно из таблицы, в мозге животных, которым вводили 3-АЦП, содержание NAD увеличивается на 34%, в то время как уровни NADP, NADH и NADPH уменьшаются на 82, 62 и 32% соответственно по сравнению с контролем.

В этих же условиях наблюдается значительное снижение (на 60 %) рецепции  $[U-^{14}C]NAD$  синаптическими мембранами головного мозга крыс (рис. 1, А, столб. 3). Анализ данных по связыванию нуклеотида синаптическими мембранами головного мозга крыс в координатах Скэтчарда показал (рис. 2, Б), что при введении животным 3-АЦП снижается количество NAD-рецепторных участков ( $B_3-ACIP \max < B \max$ ), тогда как их сродство к лиганду не изменяется ( $Kd_3-ACIP = Kd = 0,82 \text{ мкМ}$ ) (рис. 2, Б). Согласно данным литературы через месяц после однократного введения животным 3-АЦП в дозе 80 мг/кг массы тела в организме нарушается система синтеза белка, которая регулируется посредством РНК [7]. В условиях наших исследований уменьшение  $B_3-ACIP \max$  невозможно объяснить изменением синтеза NAD-рецепторного белка, поскольку 3-АЦП вводили непродолжительное время. Поэтому можно предположить, что в данном случае "модифицированные" коферменты оккупируют NAD-рецепторные участки, тем самым препятствуя связыванию вносимого меченого NAD. Это допущение не лишено основания, поскольку имеются данные, что 3-АЦNAD(P) образуют более прочные комплексы с некоторыми дегидрогеназами по сравнению с не модифицированными динуклеотидами [18].

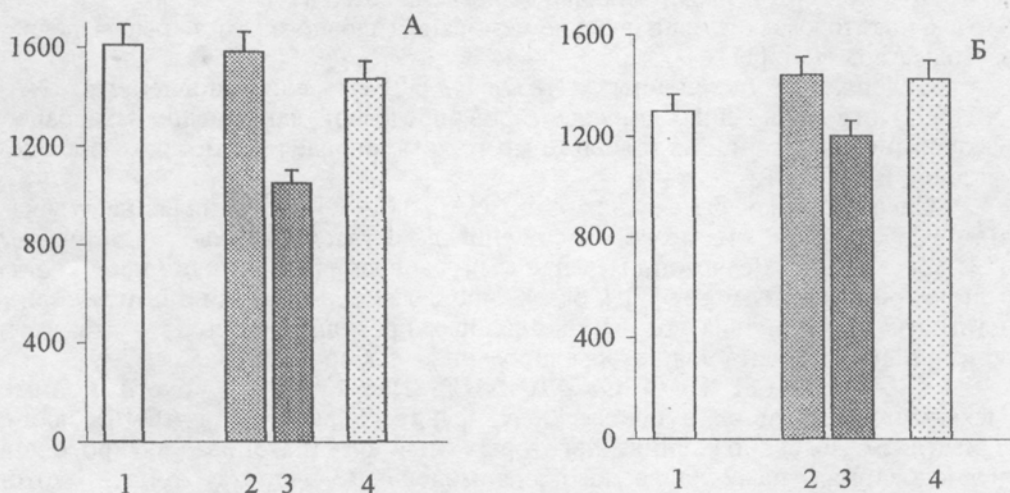


Рисунок 1.

Специфическое связывание  $[U-^{14}C]NAD$  (А) и  $[2-^{14}C]$  серотонина (Б) синаптическими мембранами головного мозга крыс: 1 - норма; 2 - норма + Nam (500 мг/кг на 6 час.); 3 - 3 АЦП (50 мг/кг, двое суток); 4 - Nam (500 мг/кг на 6 час.) + 3 АЦП. Связывание выражено в имп/мин на 1 мг белка.

Однако те неврологические нарушения со стороны ЦНС, которые возникают после введения животным 3-АЦП, невозможно объяснить только изменением рецепции NAD синаптическими мембранами, а также образованием "модифицированных" динуклеотидов, содержание которых невелико. В связи с этим не исключено, что изменяется функционирование некоторых медиаторных систем (особенно серотонинергической,) поскольку общим источником синтеза витамина B3 и серотонина является триптофан. В пользу правомочности подобного допущения свидетельствуют данные о том, что 3-АЦП нарушает метаболизм, высвобождение и захват биогенных аминов в срезах мозжечка, полученных из головного мозга крыс [19]. Кроме того, следует учитывать, что серотонинергическая медиаторная система головного мозга не является диффузной, она определенным образом пространственно организована и включает в себя синаптические и несинаптические участки, которые обеспечивают многочисленные контакты с нервными клетками многих отделов ЦНС [20].



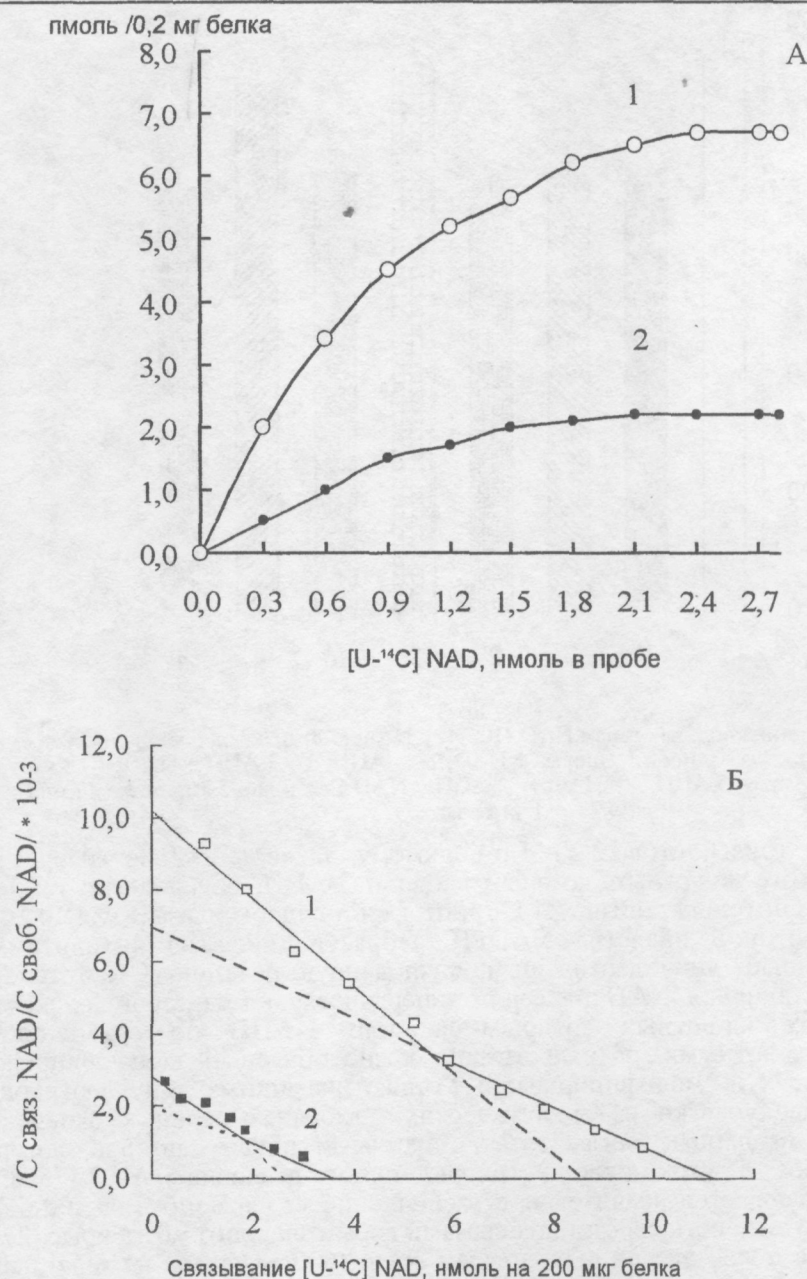


Рисунок 2.

Специфическое связывание [U-<sup>14</sup>C]NAD синаптическими мембранами головного мозга крыс в норме и при введении 3-АЦП (А) и графический анализ связывания в координатах Скэтчарда (Б) : 1 - контроль, 2 - 3-АЦП.

При определении содержания серотонина в головном мозге крыс было обнаружено его снижение при неизменной рецепции [2-<sup>14</sup>C]серотонина синаптическими мембранами после введения животным 3-АЦП (табл., рис.1,Б, столб.3). В этом случае (как видно из рис.3,) нарушается функционирование системы захвата нейротрансмиттера синапсосомами, а также изменяется действие NAD (10<sup>-5</sup> M) *in vitro* на этот процесс. Так, если в норме NAD тормозит захват [2-<sup>14</sup>C] серотонина синапсосомами на 18% (рис.3, столб 1,1'), то модулирующий эффект нуклеотида отсутствует в мозге экспериментальных животных, которым

### 3-АЦЕТИЛПИРИДИН И РЕЦЕПЦИЯ NAD В МОЗГЕ

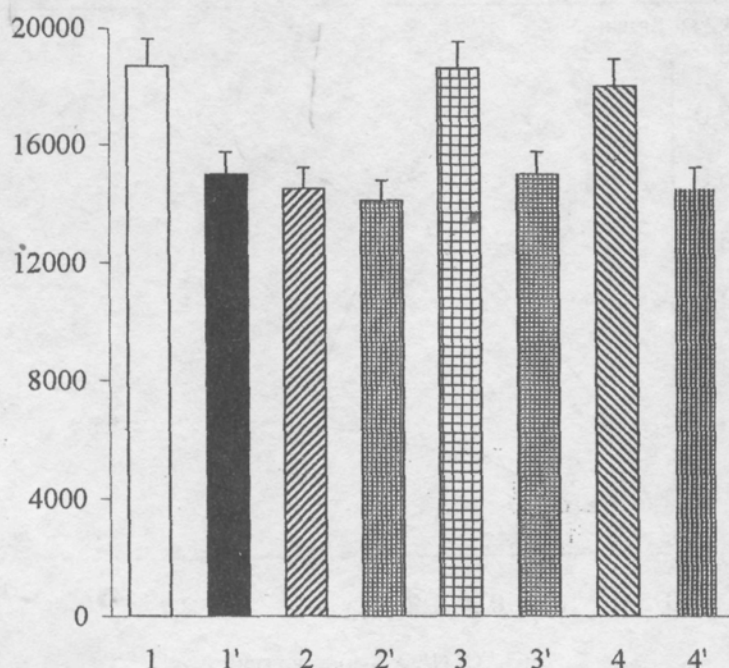


Рисунок 3.

Захват  $[2-^{14}\text{C}]$ серотонина под действием NAD ( $10^{-6}\text{M}$ ) и NAm (500 мг/кг на 6 час.) синапсами головного мозга крыс: 1 - норма; 1' - норма + NAD; 2 - 3 АЦП; 2' - 3 АЦП + NAD; 3 - NAm; 3' - NAm + NAD; 4 - NAm + 3 АЦП; 4' - NAm + 3 АЦП + NAD. Связывание выражено в имп/мин на 1 мг белка.

вводили 3-АЦП (рис.3, столб.2,2'). По-видимому, такое снижение содержания серотонина в мозге животных, которым вводили 3-АЦП, обусловлено тем, что первый этап его синтеза катализирует L-триптофан-5-гидроксилаза (КФ 1.14.16.4), коферментом которой является NADPH. Образующийся из антивитамина "модифицированный" динуклеотид ингибирует данную реакцию. Отсутствие же модулирующего влияния NAD на серотонинергическую медиаторную систему головного мозга животных которым вводили 3-АЦП по сравнению с контрольными животными, на наш взгляд, можно объяснить конкуренцией не модифицированных и "модифицированных" никотинамидных динуклеотидов за NAD-рецепторные участки на синаптических мембранах нервных окончаний. Полученные нами данные согласуются с данными других авторов, которые показали, что через 5 суток после внутрибрюшинного введения 3-АЦП (75 мг/кг массы тела) наблюдается значительное уменьшение содержания (на 100 %) и захвата (на 60 %) меченого серотонина срезами коры головного мозга крыс [21].

Через 6 час после введения животным NAm (500 мг/кг массы тела), когда наблюдается максимальный синтез NAD в организме [22], в мозге животных повышается содержание никотинамидных динуклеотидов и серотонина (табл.), в то время как остальные изученные параметры не отличаются от таковых в контроле (рис.1,А, столб.2,Б, столб.2, рис.3, столб. 3,3').

Никотинамид, введенный за 6 час до 3-АЦП, предотвращает антивитаминозное действие последнего. При этом (как видно из таблицы) содержание NAD и серотонина в мозге повышается, тогда как показатели, характеризующие состояние серотонинергической медиаторной системы (связывание и захват синапсами) остаются на уровне контрольных значений (рис.1,Б, столб.4, рис.3, столб.4,4').

В настоящее время известно, что некоторые лекарственные препараты (например, хлорамфеникол, 5-фторурацил и др.) при длительном применении могут вызывать у человека состояние подобное пеллагре, при котором изменяется

Таблица. Содержание никотинамидных динуклеотидов (нмоль на 1 г сырой ткани) и серотонина (мкг на 1 г сырой ткани) в мозге крыс при недостаточности в организме витамина РР.

Физиологическое состояние	NAD	NADP	NADH	NADPH	Серотонин
Полноценный полусинтетический рацион (контроль)	219±12	22,4±2,5	123±10	34±3	0,432±0,016
Введение 3-АЦП	293±17	4,1±0,4*	47±2*	23±3*	0,298±0,009*
Норма	215±12	24,3±2,7	120±9	32±4	0,429±0,018
Норма + NAm (500 мг/кг, 6 час)	281±18**	31,3±3,3**	165±13**	58±5**	0,509±0,018**

Примечание: \* - Достоверность отличий между контролем и 3-АЦП; \*\* - достоверность отличий между нормой и введением NAm. Представлены средние значения ( $\bar{X} \pm m$ ) семи независимых опытов

метаболизм витамина РР и серотонина [23]. Эти нарушения, как свидетельствуют полученные нами данные, могут быть предотвращены предварительным введением избыточных доз NAm, которые к тому же не оказывают побочного действия на организм.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что при некоторых патологиях ЦНС нарушается функциональная связь между NAD-модуляторной и серотонинергической медиаторной системами. Экспериментальная модель ВЗ-недостаточности с использованием 3-АЦП, который вызывает образование "модифицированных" динуклеотидов, продемонстрировала, что при его введении не только нарушается функционирование ферментных реакций, кофакторами которых являются никотинамидадениндинуклеотиды, но и, оккупируя NAD-рецепторные участки синаптических мембран нервных окончаний, 3-АЦП препятствует проявлению модулирующего действия NAD на серотонинергическую передачу. Исследования показали, что никотинамид (предшественник биосинтеза никотинамидных динуклеотидов), введенный перед введением 3-АЦП, обладает нейропротекторным действием на организм как на уровне его метаболизма, так и на уровне функционирования в мозге нейромедиаторных систем, в частности, серотонинергической, что свидетельствует о возможности применения витамина В3 в больших дозах, однако на протяжении не более двух недель в клинике заболеваний нервной системы.

#### ЛИТЕРАТУРА.

1. Максимович Я.Б. (1981) Фармакология и токсикология, Киев, 16, 3-8.
2. Kolb H., Burkart V. (1999) Diabetes Care, 22, B16-B20.
3. Халмуратов А.Г., Пархомец П.К., Кучмеровская Т.М., Чичковская Г.В. (1983) Биохимия, 48, 1287-1292.
4. Донченко Г.В., Кучмеровская Т.М., Пархомец П.К. и др. (1995) Укр. биохим. журн., 67, 105-111.
5. Stratigos J.D. Katsambas A.D. (1982) Acta Vitaminol.enzymol., № 4 (1-2), 115-121.
6. Чичковская Г.В., Пархомец П.К., Кучмеровская Т.М. и др. (1991) Вопр. мед. химии., 64, 63-65.
7. Кучмеровская Т.М. (1998) Нейрохимия, 15, 2, 153-158.
8. Ramanaamurthy R.S.V., Srikanth S.G. (1970) J.Neurochem., 17, 27-33.
9. Zedda M., Acone F., Panu R. et al. (1996) Ital.J.Embryol., 101, 57-66.



10. Font E., Desfilis E., Perez-Caeallas N. et. al. (1997) Brain Res., 754, 245-259.
11. Abita J.P., Chicheportiche R., Schweits H., Lasdunski M. (1977) Biochemistry, 16, № 9, 1838-1864.
12. De Long J., Tjander U.R. (1983) J.Chromatogr., 282, № 4, 443-456.
13. Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В. (1982) Кинетические методы в биохимических исследованиях, изд. Моск. Ун-та, М., 344 с.
14. Lowry O.W., Rosebrough N.J., Farr R.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265-275.
15. Плехинский И.А. (1970) Биометрия, изд-во МГУ, М., 368 с.
16. Bruce M. Anderson (1982) The Pyridine Nucleotide Coenzymes, J. Everse New York, 91-93.
17. Sttilwell S.N., Bizouam T., Jackson J.B. (1997) Biocim.Biophys.Acta, 1320, № 1, 83-94.
18. Воронцов Е.А., Гуревич В.М., Калачева Н.И. и др. (1976) Биохимия, 41, №7, 986-994.
19. Beas-Zarate C., Morales-Villagran A., Tapia-Arizmendi G., Feria-Velasco A. (1991) Eur. J.Pharmacol., 198, № 1, 7-14.
20. Ashby C.R., Edwards E., Wang R.J. (1992) Synapse, 10, 7-15.
21. Beas-Zarate C., Morales-Villagran A., Tapia-Arizmendi G., Feria-Velasco A. (1991) Eur. J.Pharmacol., 198, №1, 7-14.
22. Чаговец Р.В., Пархомец П.К., Великий М.М. и др. (1977) ДАН УРСР, № 4, 347-350.
23. Кац М.М., Лаврецкая Э.Ф. (1988) Итоги науки и техники, Биоорг.химия, 8, 130-138.

Поступила 10.09.99.

#### THE EFFECT OF NAD ON BRAIN SEROTONINERGIC TRANSMISSION OF RATS UNDER 3-ACETILPYRIDINE INJECTION

T.M. Kuchmerovskaya, G.V. Chichkovskaya,  
L.V. Pakyrbaeva, A.A. Khamuradov.

Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, , 9 Leontovich Street, Kiev, 01601 Ukraine  
phone: (38 044) 224-71-78, fax: (38 044) 229-63-65, E-mail:kuch@biochem.kiev.ua

The effect of administration of 3-acetylpyridine (antivitamin B3), on rat brain serotoninergic and NAD receptor systems was investigated. The injection of 3-acetylpyridine to rats caused a decrease of NAD and serotonin content in the brain and changes in [U-14C]NAD binding to synaptic membranes, serotonin uptake by nerve endings, as well as sensitivity of this process to NAD ( $10^{-5}$  M). Pretreatment of animals with nicotinamide restored modulating effect of NAD.

**Key words:** vitamin B3, 3-acetylpyridine, NAD, serotonin, binding, uptake.