



УДК 612.822.1.014.467

СВОЙСТВА МЕСТ СПЕЦИФИЧЕСКОГО СВЯЗЫВАНИЯ ЭТИЛОВОГО ЭФИРА β -КАРБОЛИН-3-КАРБОЛОВОЙ КИСЛОТЫ, ОТЛИЧНЫХ ОТ БЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В МОЗГУ КРЫСЫ

*МЕЛИКСЕТАН М. Б., КОРНЕЕВ А. Я., СЕРЕДЕНИН С. Б.

Институт физиологии им. Л. А. Орбели АН Армении, Ереван

НИИ фармакологии АМН СССР, Москва

Радиорецепторным методом выявлено специфическое связывание [^3H]этилового эфира β -карболин-3-карболовой кислоты ([^3H]BCSE) в присутствии 20 мкМ AgNO_3 (CuSO_4) и 10 мкМ диазепама в мозгу крысы. Небензодиазепиновое связывание [^3H]BCSE возрастает при наличии в среде аскорбиновой кислоты и хлорид-ионов, при pH 7,4 и 0°. Связывание является обратимым, насыщаемым, относительно мозгоспецифичным. Концентрация небензодиазепиновых мест связывания в мозгу $=607 \pm 14$ пмоль/г ткани, $K = 105 \pm 10$ нМ, в то время как параметры связывания [^3H]BCSE с бензодиазепиновыми рецепторами имеют значения соответственно 81 ± 9 пмоль/г и $3,2 \pm 0,4$ нМ.

Согласно современным представлениям, ряд производных β -карболин-3-карболовой кислоты, в частности ее эфиры, обладают ярко выраженным анксиогенным действием и являются обратными агонистами бензодиазепиновых (БД) рецепторов.

Ранее высказывалось предположение о существовании участков связывания [^3H]BCSE, не блокируемых высокими концентрациями диазепама, причем в присутствии 50 мМ дитиотрептола (ДТТ) связывание было ничтожно мало [1].

Нопге и соавт. [2], Braestrup и соавт. [3] наблюдали небензодиазепиновое связывание [^3H] ДМСМ (метил 6, 7 диметокси-4-этил β -карболин-3-карбоксилата) при обработке мембран мозга крысы 0,1 мМ AgNO_3 . Методом радиационной инактивации было установлено, что эти участки представляют собой белок с величиной M_r 100 кД.

Специфическое связывание [^3H] поргармана с местами, не связывающими бензодиазепины, было описано ранее [4].

Основываясь на приведенных выше данных, попытались выявить небензодиазепиновые места связывания [^3H]BCSE в присутствии 20 мкМ AgNO_3 (CuSO_4) и 10 мкМ диазепама.

Материалы и методы

Крыс декапитировали, ткань мозга быстро извлекали, гомогенизировали в 10 объемах 50 мМ трис-НСI буфера (pH 7,4) на гомогенизаторе «Политрон» в течение 30 с.

Гомогенат центрифугировали в пробирках «эппендорф» на скорости 12000 g в течение 3 мин. Супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 10 объемах 50 мМ трис-HCl буфера и повторно центрифугировали. Процедуру повторяли 4 раза. Затем осадки замораживали при -20° . Перед употреблением осадки размораживали, ресуспендировали и центрифугировали 1 раз в тех же условиях. Суспензия мембран, используемая в экспериментах, имела концентрацию 15 мг/мл в пересчете на исходный вес ткани.

Из исходного препарата $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ (У. А. 29 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) готовили рабочий раствор метки в буфере, конечная концентрация которого находилась в пределах от 1 до 35 нМ.

Для определения величины специфического связывания $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ с БД рецепторами пробы объемом 1 мл, каждую из которых ставили в трех параллелях, инкубировали с радиолигандом и тестируемыми соединениями в 50 мМ трис-HCl буфере рН 7,4 в течение 40 мин в ледяной бане и затем фильтровали под вакуумом через GF/B фильтры (диаметр 2,4 см, «Whatman», Англия), после чего их промывали 3 раза по 3 мл буфера в течение 10 с.

Фильтры помещали во флаконы со сцинтилляционной жидкостью, и связанную радиоактивность пресчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Для определения величины неспецифического связывания $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ пробы инкубировали в присутствии 10 мкМ диазепам; специфическое связывание определяли как разность между общим и неспецифическим связыванием и выражали в пмоль/г исходного веса ткани.

Для определения небензодиазепинового связывания $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ нами был разработан следующий состав инкубационного буфера: N-2 гидроксипириразин-2-этансульфоная кислота (HEPES) — 20 мМ, Na_2CO_3 — 20 мкМ, диазепам — 10 мкМ, аскорбиновая кислота — 0,1%, NaCl — 200 мМ.

Неспецифическое связывание $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ с небензодиазепиновыми местами связывания определяли в присутствии 10 мкМ $\beta\text{ССЕ}$. Все процедуры, связанные с инкубацией проб, были те же, что и в случае определения связывания $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ с БД рецепторами.

Для оценки аффинности $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ к небензодиазепиновым местам связывания методом LOGIT-LOG преобразования определяли величину 50%-ного ингибирования связывания IC_{50} , K комплекса рецептор-лиганд и максимальную концентрацию мест связывания определяли из графика Скэтчарда.

Результаты и обсуждение

В первых сериях экспериментов обнаружено резкое возрастание как общего, так и неспецифического связывания $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ в присутствии 20 мкМ AgNO_3 в условиях, адантированных к выявлению специфического связывания $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ с БД рецепторами. При этом установлено, что неспецифическое связывание $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ в присутствии 10 мкМ диазепам на 50% превышает неспецифическое связывание в присутствии $\beta\text{ССЕ}$, что позволило предположить наличие мест связывания $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$, не блокируемых высокими концентрациями диазепам. Следовательно, наличие в среде инкубации 10 мкМ диазепам, полностью исключающей возможность связывания с БД рецепторами, позволяет наблюдать «небензодиазепиновое» связывание $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$, то есть связывание с местами, отличными от БД рецепторов.

Была изучена зависимость небензодиазепинового связывания от присутствия в среде ионов различных металлов. В концентрации 0,1 мМ не оказывали влияния на связывание $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$. Ионы меди обладали стимулирующим действием, однако, в отличие от ионов серебра, эффект наблюдался только в присутствии 0,1%-ной аскорбиновой кислоты. При концентрации ионов серебра (меди) 1 мкМ небензодиазепиновое связывание практически отсутствовало. Начиная с концентрации 20 мкМ, величина небензодиазепинового связывания в присутствии ионов серебра достигает максимума и при дальнейшем увеличении концентрации ионов не изменяется (рис. 1, а). Увеличение же концентрации ионов меди свыше 20 мкМ влечет за собой возрастание величины неспецифического связывания и некоторое уменьшение специфического связывания (рис. 1, б).

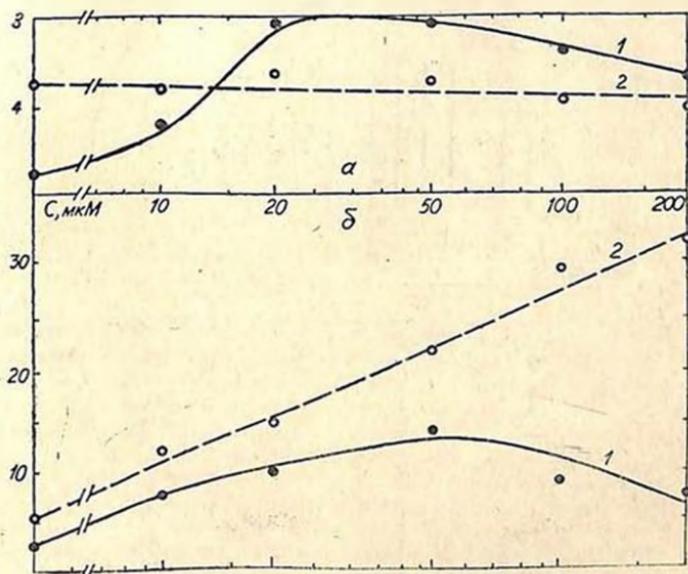


Рис. 1. Влияние ионов серебра (а) и меди (б) на небензодиазепиновое связывание этилового эфира β -карбонил-3-карбоксикислоты в мозгу крысы. По оси абсцисс—концентрация $\lg [\text{Ag}^+/\text{Cu}^{2+}]$ мкМ. 1—специфическое связывание, 2—неспецифическое связывание. Концентрация радиолиганда 2 нМ (а) и 1 нМ (б)

Влияние состава инкубационной среды на специфическое небензодиазепиновое связывание $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ продемонстрировано на рис. 2, а, б. Можно видеть, что наличие в среде инкубации 200 мМ NaCl стимулировало $\text{Ag}^+/\text{Cu}^{2+}$ -зависимое связывание $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$.

Как видно из табл. 1, небензодиазепиновое связывание $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ в присутствии 50 мМ ДТТ-агента, разрушающего дисульфидные связи в белках, практически не наблюдается, что позволяет предположить, что небензодиазепиновые места связывания имеют белковую природу.

Изучена также зависимость небензодиазепинового связывания $[^3\text{H}]\beta\text{ССЕ}$ от температуры и pH среды инкубации (рис. 3, а, б). Можно видеть, что при повышении температуры от 0 до 37° специфиче-

ское связывание уменьшается почти в 5 раз. Оптимум связывания находится вблизи значения pH 7,5, причем при снижении pH наблюдается резкое падение величины связывания.

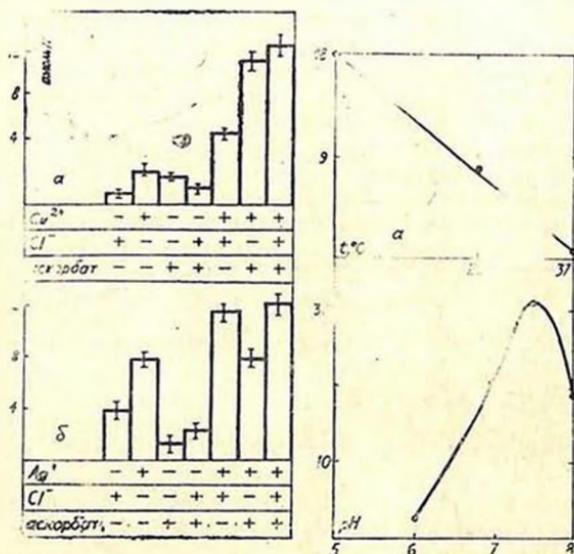


Рис. 2. Влияние состава среды инкубации на величину специфического связывания этилового эфира β-карболин-3-карболовой кислоты с небензодиазепиновыми местами связывания в мозгу крысы в присутствии ионов меди (а) и серебра (б). По оси абсцисс: в присутствии компонента (+), в отсутствие компонента (-). По оси ординат — величина специфического связывания, имоль/г. Концентрация радиолганда 3 нМ

Рис. 3. Зависимость специфического связывания этилового эфира β-карболин-3-карболовой кислоты с небензодиазепиновыми местами связывания от температуры и pH среды инкубации. По оси абсцисс — температура (а) и величина pH (б). По оси ординат — величина специфического связывания, имоль/г. Концентрация радиолганда 6 нМ (а) и 3,6 нМ (б)

Таблица 1

Влияние дитиотреитола (ДТТ) на небензодиазепиновое связывание этилового эфира β-карболин-3-карболовой кислоты (³H)BCCЕ)

| Активирующий ион | специфическое связывание, имоль/г | | % контрол. |
|------------------|-----------------------------------|------------|------------|
| | контр.ол. | ДТТ(50 мМ) | |
| Серебро | 10,2 ± 1,9 | 1,4 ± 0,2 | 13 |
| Медь | 22, ± 2,5 | 1,9 ± 0,3 | 8 |

Примечание. Здесь и в табл. 2 связывание определяли в присутствии 200 мМ NaCl, 10 мкМ диазепам, 0,1%-ной аскорбиновой кислоты. Концентрация радиолганда 2,5 нМ.

Для оценки специфичности эффекта Ag⁺(Cu²⁺) в отношении лиганда мы исследовали влияние этих ионов на связывание [³H]флуниотразепама ([³H]FNZ) и [³H] 8 гидроксидипропилоаминоптери-

на (^3H)ДРАТ) с серотониновыми рецепторами типа IA по методам, описанным ранее [5, 6]. Установлено, что ионы серебра (меди) в концентрации 20 мкМ не оказывают воздействия на связывание (^3H)ФНз с βCCE рецепторами и даже несколько ингибируют связывание (^3H)ДРАТ с серотониновыми рецепторами типа IA.

Для оценки аффинности (^3H) βCCE к небензодиазепиновым местам связывания в присутствии () определяли величины 50%-ного ингибирования связывания тремя различными производными β -карболин-3-карболовой кислоты. Как видно из табл. 2, значения

Таблица 2
Эффект производных β -карболин-3-карболовой кислоты (βCCE) на небензодиазепиновое связывание этилового эфира β -карболин-3-карболовой кислоты (^3H) βCCE)*

| Лиганд | IC_{50} , нМ | |
|-------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|
| | в присутствии Ag^+ (20 мкМ) | в присутствии Cu^{2+} (20 мкМ) |
| FG-7142 | 98.0 ± 6.2 | — |
| βCCE | 22.0 ± 2.2 | 31 ± 4.4 |
| βCCM | 46.0 ± 5.3 | — |

Примечание. * Концентрация радиолганда 4 нМ.

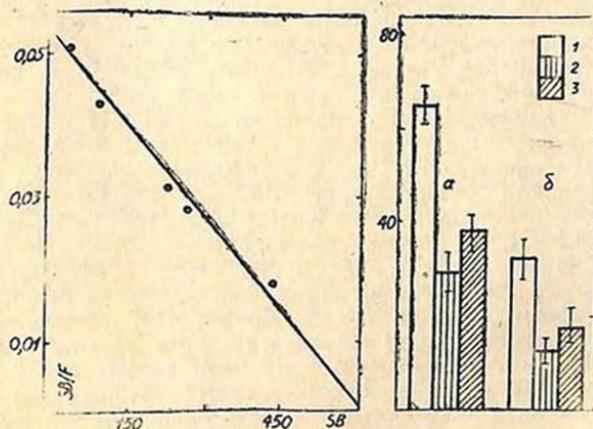


Рис. 4. График Скэтчарда для небензодиазепинового связывания этилового эфира β -карболин-3-карболовой кислоты с мембранами мозга крысы. По оси абсцисс—специфическое связывание (SB), пмоль/г ткани. По оси ординат—отношение специфического связывания (SB), пмоль/г к концентрации свободно-го лиганда F (нМ)

Рис. 5. Обратимость связывания этилового эфира β -карболин-3-карболовой кислоты с небензодиазепиновыми местами связывания в мозгу крысы в присутствии 20 мкМ Cu^{2+} (a) и 20 мкМ Ag^+ (б). По оси абсцисс: 1—общее связывание, 2—неспецифическое связывание в присутствии 10 мкМ β -карболин-3-карболовой кислоты, 3—инкубация пробы с этиловым эфиром β -карболин-3-карболовой кислоты в течение 50 мин с добавлением β -карболин-3-карболовой кислоты и фильтрованием через 5 мин

50%-ного ингибирования IC_{50} для β ССЕ в присутствии ионов серебра и меди различаются незначительно, что дает основание предполагать, что эти ионы инициируют связывание $[^3H]\beta$ ССЕ с одними и теми же местами связывания. Значения K и максимальная концентрация мест связывания для небензодиазепинового связывания, определенные из графика Скэтчарда (рис. 4), оказались следующие: $K_d = 105 \pm 10$ нМ, $B_{max} = 607 \pm 14$ пмоль/г ткани. Определенные в параллельных экспериментах аналогичные параметры для связывания $[^3H]\beta$ ССЕ с БД рецепторами составляют соответственно $3,3 \pm 0,4$ нМ и 81 ± 9 пмоль/г ткани. Таким образом, аффинность небензодиазепиновых мест связывания к $[^3H]\beta$ ССЕ на порядок ниже, чем у БД рецепторов, а их концентрация в мозгу на порядок превышает концентрацию БД рецепторов.

Небензодиазепиновое связывание характеризуется быстрой насыщенностью (равновесие в системе наступает за время порядка минуты) и обратимостью—при добавлении в пробы с радиолигандом 10 мкМ немеченого β ССЕ специфическое связывание резко падает (рис. 5).

Большой интерес представляет вопрос о характере распределения небензодиазепиновых мест связывания в различных тканях. Согласно полученным данным, специфическое небензодиазепиновое связывание $[^3H]\beta$ ССЕ в концентрации 3 нМ в мозжечке составляло $4,1 \pm 0,7$ пмоль/г, в то время как в коре головного мозга—соответственно $8,9 \pm 1,2$ пмоль/г. Специфическое связывание $[^3H]\beta$ ССЕ в печени и почках оказалось гораздо ниже, чем в коре головного мозга и составляло соответственно $2,1 \pm 0,4$ и $1,3 \pm 0,1$ пмоль/г, что позволяет говорить об относительной мозгоспецифичности эффекта.

На основании полученных результатов можно полагать, что активация ионами серебра (меди) связывания $[^3H]\beta$ ССЕ с небензодиазепиновыми местами связывания может иметь несколько возможных механизмов: во-первых, может происходить окислительно-восстановительный процесс с участием ионов серебра (меди) и лиганда, либо белка, связывающего $[^3H]\beta$ ССЕ. Во-вторых, возможно образование комплекса ионов серебра (меди) с белком или же с самим лигандом. Вследствие обоих процессов происходит резкое возрастание аффинности $[^3H]\beta$ ССЕ к небензодиазепиновым местам связывания. Приведенные данные о тканевой специфичности эффекта позволяют предположить, что модификация подвергается именно белок, а не лиганд. Вместе с тем, не исключено образование окисленной формы β ССЕ, представляющей собой фактически иной лиганд, взаимодействующий со своими специфическими местами связывания.

Таким образом, совокупность полученных данных позволяет заключить, что небензодиазепиновое связывание соответствует ряду критериев рецепторного связывания: оно относительно специфично для мозга, является обратимым, насыщенным, число мест связывания ограничено. При этом остается открытым вопрос об эндогенном лиганде этих мест связывания; возможно, что ими являются эндогенные β -карболины [7, 8]. Не исключено, что $[^3H]\beta$ ССЕ связывающий белок играет определенную роль в реализации фармакологических эффектов β ССЕ.

PROPERTIES OF SPECIFIC BINDING SITES FOR
 β -CARBOLINE-3-CARBOXYLIC ACID ETHYL ESTER DIFFERENT
FROM THE DIAZEPINE RECEPTORS IN RAT BRAIN

*MELIXETIAN M. B., KORNEYEV A. YA., SEREDENIN S. B.

*L. A. Orbell Institute of Physiology. Academy of Sciences of the Armenia,
Yerevan

Institute of Pharmacology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

Using the radioreceptor technique we have determined specific binding of [3 H]ethyl ester of β -carboline-3-carboxylic acid ([3 H]CCE) in the presence of 20 μ M AgNO₃ (CuSO₄) and 10 μ M diazepam in rat brain. Non-benzodiazepine binding of [3 H]CCE increase in the presence of ascorbic acid and chloride ions in the incubation medium at pH 7.4 and 0°. The binding is reversible, saturable and is relatively specific for the brain. Concentration of non-benzodiazepine binding sites in the brain is $B_{max} = 607 \pm 14$ pmol/g tissue and dissociation constant $K_d = 105 \pm 10$ nM, whereas parameters of [3 H]CCE binding with benzodiazepine receptors have the corresponding values equal to 81 ± 9 pmol/g and 3.2 ± 0.4 nM.

ЛИТЕРАТУРА

1. Korneyev A. Ya., Belonogof O. B., Zuzin V. N. *Neurosci. Lett.*, v. 61, p. 279-284, 1986.
2. Honore T., Nielsen M., Braestrup C. *Life Sci.*, v. 35, p. 2257-2268, 1984.
3. Braestrup C., Nielsen M., Honore T. J. *Neurochem.*, v. 41, p. 454-465, 1983.
4. Pawlik M., Rommelspacher H. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 147, p. 163-171, 1988.
5. Speth R., Wastek G. J., Tohson P. C., Yamamura H. J. *Life Sci.*, v. 22, p. 859-864, 1978.
6. Stephen J. Peroutka. *Biol. Psychiatry*, v. 20, p. 971-986, 1985.
7. Pena C., Medina J. H., Novas M. L., Paladini A. C., De Rober'tis E. *Neurobiology*, v. 83, p. 4952-4969, 1986.
8. Paul S. M., Marangos P. J., Skolnick P., Goodwin F. K. *L'Encephale*, v. VIII p. 131-144. 1982.

Поступила 20.III.1990