

УДК 612. 815. 1. 577. 354

ВЛИЯНИЕ БИЦИКЛИЧЕСКИХ ЭФИРОВ КИСЛОТ ФОСФОРА И ПИКРОТОКСИНА НА СВЯЗЫВАНИЕ ГАМК

Первухин Г. Я., Маслов А. А., Соколов В. Б.
Фетисов В. И., Мартынов И. В.

*Институт физиологически активных веществ
АН СССР, п. Черноголовка Московской области*

Рецептор ГАМК широко представлен в мозгу млекопитающих и играет важную роль в регуляции нейрональной активности [1, 2]. В результате многочисленных биохимических исследований сложилось представление о структуре постсинаптического рецептора ГАМК как мультикомпонентного комплекса, включающего участки специфического связывания для ГАМК и прямых агонистов, антагонистов ГАМК, бензодиазепинов, β -карболинов, барбитуратов, пикротоксина, а также хлор-ионофорного канала [3]. Производные бициклических эфиров кислот фосфора — 4-алкилпроизводные 2,6,7-триокса-1-фосфо-бицикло [2. 2. 2] октаны (бициклофосфиты) и соответствующие октан-1-оксиды (бициклофосфаты), относящиеся к группе непрямых ГАМК-антагонистов клеточной структуры, действуют подобно пикротоксину, а их [^{35}S] меченый аналог трет-бутил-бициклофосфат ([^{35}S]ТБФТ) является наиболее специфичным радиолигандом для этого места связывания [4].

Недавно нами на основании собственных экспериментальных данных было высказано предположение о том, что бициклические эфиры кислот фосфора (БЦФ) являются высокоэффективными блокаторами потенциал- и хемоправляемых хлорных каналов [5].

В работе Harris, Allman [6] было показано, что ГАМК-зависимая проницаемость для Cl^- в синаптической мембране, выделенных из мозга мышей, блокируется бикукуллином и пикротоксином (ПТ). Для БЦФ таких данных нет.

В последнее время появились работы, направленные на изучение проявления аллостерических взаимодействий между участками специфического связывания в структуре ГАМК-зависимого рецептор-канального комплекса в процессе парных конкурентных взаимодействий [7—9]. Исследование такого рода взаимодействий наряду с данными о влиянии изучаемых веществ на ГАМК-зависимую проницаемость $^{36}\text{Cl}^-$ позволяют обнаружить существующие различия в популяциях специфических мест связывания.

Целью настоящей работы было изучение влияния одного из представителей ряда БЦФ 4-пропил-бициклофосфата на ГАМК-зависимую проницаемость $^{36}\text{Cl}^-$ и изучение взаимодействия мест связывания для триады веществ: БЦФ—ПТ—[^3H]ГАМК.

Грубую фракцию мембран выделяли из мозга крыс-самцов линии

Wistar массой 200—250 г. Целый мозг гомогенизировали при 2° в 10 объемах 0,32 М сахарозы в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Затем гомогенат центрифугировали при 1000 г 10 мин, а супернатант — при 30000 г 30 мин. Осадок отмывали ледяной водой центрифугированием при 30000 г, суспендировали в 100 объемах деионизованной воды и замораживали при -24° на 12 ч. После этого суспензию повторно гомогенизировали и центрифугировали при 30000 г 30 мин. Осадок суспендировали в 50 мМ трис-цитратном буфере, рН 7,4, с 0,05%-ным Тритоном X-100 и снова центрифугировали при 30000 г 30 мин. Затем осадок трижды отмывали в деионизованной воде центрифугированием (30000 г, 30 мин). Полученную таким образом грубую фракцию мембран мозга разводили в 10 мМ трис-НСI буфере, рН 7,4 до конечной концентрации белка 1 мг/мл. Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [10].

Для выделения синапсом головного мозг из двух особей гомогенизировали в 30 мл ледяного 20 мМ НЕРЕС-трис буфера, рН 7,4 следующего содержания (в мМ): NaCl — 118, KCl — 4,7, MgSO₄ — 1,18, CaCl₂ — 2,5. Гомогенизацию проводили в мягких условиях в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (5—7 поднятий пестика без поворота). Затем гомогенат дважды фильтровали через капроновую сетку с диаметром пор 150—300 мкм. После фильтрования препарат центрифугировали при 1000 г 12 мин и температуре 2°. Супернатант удаляли, а осадок центрифугировали в тех же условиях. Полученный осадок доводили буфером до конечной концентрации белка в пробе 20 мг/мл и использовали в качестве синапсом.

Определение связывания [³H]ГАМК и количества ³⁶Cl⁻. Связывание [³H]ГАМК определяли на нитроцеллюлозных фильтрах «Synpro» (ЧССР) с диаметром пор 0,6—0,8 мкм, используя метод, описанный Кузнецовым и соавт. [11]. Конечные концентрации используемых веществ были следующие (в М): [³H]ГАМК — 10⁻⁸, БЦФ — 10⁻⁵—10⁻⁸, ПТ — 3,15 · 10⁻⁶. Для определения неспецифического связывания использовали 10 мМ немеченой ГАМК. Специфическое связывание определяли как разность между общим и неспецифическим связыванием.

Пробы, содержащие 0,5 мл препарата синаптонейросом и соответствующее количество ПТ и БЦФ, инкубировали при перемешивании 20 мин при температуре 30°. За 5 с до фильтрации в каждую пробу добавляли 0,5 мКи ³⁶Cl⁻ и 10⁻⁵ М ГАМК. Фильтрацию проводили под вакуумом на фильтрах «Whatman» GF/V с диаметром пор 24 мкм. После промывки (3 раза по 2 мл ледяным буфером) фильтры помещали в сцинтилляционные флаконы.

Активность определяли в толуольной сцинтилляционной жидкости на счетчике «Intertechnique» (Франция). Каждое определение вели в 3-х параллельных пробах. Опыт повторяли 4—5 раз.

4-метил, 4-этил, 4-пропил-2,6,7-триокса-1-фосфоблицкло [2. 2] октаны и соответствующие октан-1-оксиды синтезированы по методике Verkade, Reynolds [12].

Первоначально нами была получена зависимость специфического связывания [³H]ГАМК от концентрации ПТ, параметры которого были

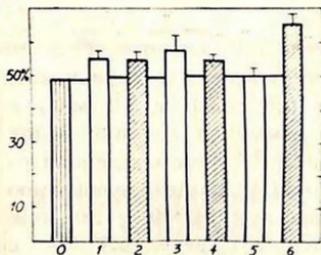


Рис. 1. Гистограмма зависимости специфического связывания [³H]ГАМК (в % к контролю) от присутствия в среде: 0-пикротоксина, 1-пикротоксина + 4-метил-бициклофосфата, 2-пикротоксина + 4-метил-бициклофосфата, 3-пикротоксина + 4-этил-бициклофосфата, 4-пикротоксина + 4-этил-бициклофосфата, 5-пикротоксина + 4-пропил-бициклофосфата, 6-пикротоксина + 4-пропил-бициклофосфата. Концентрация бициклических эфиров кислот фосфора - $4 \cdot 10^{-6}$ М

звязывающие участки (для бициклофосфитов подобных данных нет). Дело в том, что исследование зависимости структура—активность в ряду бициклофосфатов показало корреляцию между их активностью как антагонистов ГАМК, конвульсантной активностью и способностью замещать [³H]ДГП из его мест связывания [13, 14].

следующими: $V_{max} = 0,4 \mu\text{M}/\text{mg}$ белка, $K_d = 9$ нМ. Концентрация ПТ, при которой наблюдали 50%-ное уменьшение специфического связывания [³H]ГАМК, равна $3,15 \times 10^{-6}$ М, в то же время БЦФ в концентрации до 10^{-4} М не изменяли связывания [³H]ГАМК.

На рис. 1. представлены результаты изучения влияния смеси ПТ и каждого взятого в отдельности БЦФ (всего шесть веществ) на специфическое связывание [³H]ГАМК. В этих опытах ПТ был использован в концентрации, при которой наблюдали 50%-ное ингибирование связывания [³H]ГАМК.

При совместном использовании ПТ и каждого из шести исследованных веществ эффективность ингибирующего влияния уменьшается, за исключением опытов с 4-пропил-бициклофосфатом. Наблюдаемый эффект нельзя объяснить конкурентным замещением ПТ из его мест связывания БЦФ, так как величина этого эффекта не совпадает со способностью бициклофосфатов конкурировать с меченым аналогом пикротоксина [³H]дигидропикротоксином [³H]ДГП за свя-

Таблица

Влияние пикротоксина и 4-пропил-бициклофосфата на ГАМК-зависимую проницаемость ³⁶Сl⁻.

Название вещества	Концентрация (в М)	Ингибирующий эффект (в %)
Пикротоксин	10^{-6}	70 ± 10
4-пропил-бициклофосфат	10^{-9}	70 ± 13

Примечание. $p < 0,01$

В таблице представлены результаты изучения влияния ПТ и представителя ряда БЦФ 4-пропил-бициклофосфата на ГАМК-зависимую проницаемость ³⁶Сl⁻ в синаптонейросомы. Хотя ПТ и 4-пропил-бициклофосфат имеют сравнительно близкие характеристики специфического связывания [16], их влияние на проницаемость ³⁶Сl⁻ неодинаково. По-видимому, БЦФ являются более активными блокаторами хлорной проводимости, чем ПТ, что объясняет более выраженную конвульсантную активность БЦФ [14]. Этот факт позволяет предположить не только частичное совпадение мест связывания БЦФ и ПТ, но и то, что БЦФ взаимодействуют непосредствен-

но с ионофорной частью комплекса. Необходимо отметить, что изучение кинетики диссоциации комплекса рецептор— $[^{35}\text{S}]$ ТБФТ в присутствии пикротоксина также указывает на несовпадение мест связывания $[^{35}\text{S}]$ ТБФТ и ПТ [15].

Мы считаем, что полученные нами результаты можно объяснить, предположив существование двойной аллостерии в триаде БЦФ—ПТ—ГАМК (рис. 2). Данный вывод дает основание для уточнения гипотетической структуры ГАМК-А-рецепторного комплекса. Вероятно,

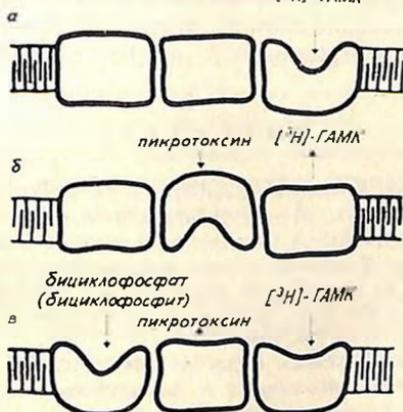


Рис.2. Взаимодействие мест связывания бициклических эфиров кислот фосфора, пикротоксина и $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$: а — связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ с рецепторным комплексом, б — связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ в присутствии пикротоксина, в — связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ в присутствии пикротоксина и бициклических эфиров кислот фосфора

места связывания ГАМК и БЦФ взаимодействуют через несколько участков, в частности, через участок связывания, специфичный к ПТ (рис. 2, в), причем место связывания БЦФ, по-видимому, расположено так, что способно влиять непосредственно на проницаемость ионов хлора.

THE INTERACTION OF BINDING SITES FOR BICYCLIC PHOSPHORUS ESTERS, PICROTOXIN AND $[^3\text{H}]\text{-GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID}$ IN THE GABA-A RECEPTOR IONOPHORE COMPLEX

Pervukhin G. Ya., Maslov A. A.,
Socolov V. B., Fetisov V.I., Martynov I. V.

*Institute of Physiologically Active Substances,
USSR Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region*

Experiments on binding of isotopically labelled substances with brain membrane fraction provide evidence for the complex structure of the GABA postsynaptic receptor (GABA-A receptor). Individual components of the receptor are capable of allosteric interactions with one another. In this study allosteric interactions between the specific binding sites in the GABA-dependent

receptor-channel complex were investigated. Pairwise competitive comparisons for three substances — bicyclic phosphorus esters (BPE), picrotoxin and [^3H] GABA — were performed. Also, the effects of BPE and picrotoxin on the GABA-dependent permeability for $^{36}\text{Cl}^-$ in vitro were examined. In experiments with the combined use of picrotoxin and 4-methyl, 4-ethyl and 4-propyl derivatives of BPE the inhibitory effect of picrotoxin on [^3H] GABA binding diminishes. In addition, differences in the effect of BPE and picrotoxin on the transport of $^{36}\text{Cl}^-$ into synaptoneurosomes were found. These results are discussed in terms of possible allosteric interactions between the binding sites for BPE, picrotoxin and [^3H]GABA.

ЛИТЕРАТУРА

1. Enna S. J., Gallacher J. P. *Int. Rev. Neurobiol.*, v. 24, p. 181—212, 1983.
2. Johnston G. A. R., Allan R. D., Skerritt *Handbook of Neurochemistry* (ed. A. Lajtha), v. 6, p. 213—237, 1984.
3. Olsen R. W. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 22, p. 245—277, 1982.
4. Squires R. F., Casida J. E., Richardson M., Salderup E. *Mol. Pharmacol.*, v. 23, p. 326—336, 1983.
5. Фетисов В. И., Редкозубов А. Е., Любимов В. С., Соколов В. Б., Мартынов И. В. *Биол. мембраны*, т. 73, с. 968—970, 1986.
6. Harris R. A., Allan A. M. *Science*, v. 228, p. 1108—1110, 1985.
7. Trifiletti R. W., Snowman A. M., Snyder S. H. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 106, p. 441—447, 1985.
8. Gallo V., Wise B. C., Vavarino F., Guidotti A. J. *Neurosci.*, v. 5, p. 2422—2438, 1985.
9. Пераухин Г. Я., Маслов А. А., Котельников С. А., Соколов В. Б., Фетисов В. И., Мартынов И. В. *Докл. АН СССР*, т. 293, с. 736—739, 1987.
10. Lowry D. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randell R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
11. Кузнецов В. И., Тонких А. К., Ким О. Н., Асланов Х. А. *Укр. биохим. журн.*, т. 54, с. 428—531, 1982.
12. Verkade J. G., Reynolds L. T. *J. Org. Chem.*, v. 25, p. 663—665, 1960.
13. Ticku M. K., Olsen R. W. *Neuropharmacology*, v. 18, p. 315—318, 1979.
14. Bowery N. G., Collins J. E., Hill R. G., Pearson S. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 57, p. 435—456, 1976.
15. Maksay G., Ticku M. K. *J. Neurochem.*, v. 44, p. 480—486, 1985.

Поступила 1.02.1988