

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НИКОТИНАМИДА С  
БЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ  
СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

ФОМЕНКО А. И., ХАЛМУРАДОВ А. Г., ПОЖАРУН С. В., СТЕПАНЕНКО С. П.

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

Показано, что [ $^3\text{H}$ ] флунитразепам связывается с одним типом специфических участков связывания на синаптических мембранах с  $K_d = 2,9 \text{ нМ}$  и  $V_{\text{max}} = 1550 \text{ фмоль/мг}$  белка. При ингибировании связывания радиолганда никотинамидом обнаружено два типа участков связывания с  $K_d = 3,4$  и  $7,3 \text{ нМ}$  и  $V_{\text{max}} = 550$  и  $950 \text{ фмоль/мг}$  белка соответственно. Никотинамид проявляет смешанный тип ингибирования связывания [ $^3\text{H}$ ] флунитразепама с  $K_i = 2,0 \pm 0,09 \text{ мМ}$  и  $p_i = 0,43$ . Хроническое введение крысам никотинамида *in vivo* также приводит к торможению специфического связывания [ $^3\text{H}$ ] флунитразепама с синаптическими мембранами.

NAD способен замещать [ $^3\text{H}$ ] флунитразепам из его специфических мест связывания на синаптических мембранах в концентрациях на три порядка меньших, чем никотинамид. Сделан вывод, что никотинамид взаимодействует с теми же участками специфического связывания, что и бензодиазепины, опосредовано через NAD, источником биосинтеза которого служит введенный никотинамид.

Открытие в головном мозгу специфических участков связывания бензодиазепинов—специфических соединений с широким спектром фармакологического действия [1, 2], способствовало интенсивным исследованиям механизма их действия и поиска эндогенных веществ, которые могли бы имитировать или блокировать действие бензодиазепинов. Из ряда тканей животных были экстрагированы белки с различной величиной  $M_r$ , пептиды, пурины и другие нуклеотиды, идентифицированные компоненты, которые обладали способностью взаимодействовать с рецепторами бензодиазепинов [3—7]. В качестве одного из возможных эндогенных лигандов был идентифицирован никотинамид [8], хотя на физиологическом уровне требовались высокие его концентрации, чтобы эффективно вытеснить связанный [ $^3\text{H}$ ] диазепам [9, 10]. Несмотря на то, что никотинамид по сравнению с другими лигандами обладает низким сродством к бензодиазепиновым рецепторам, по нейрофармакологической активности он не уступает диазепину [11]. Так, никотинамид прекращает судорожные приступы [12, 13], обладает анксиолитиче-

ским [14] и седативным эффектом, замедляет оборот серотонина в гиппокампе и тормозит накопление ГАМК [15].

Цель настоящей работы—выяснение некоторых механизмов взаимодействия никотинамида со специфическими участками связывания бензодиазепинов, локализованными на синаптической мембране головного мозга крыс.

### Материалы и методы

Опыты проводили на белых крысах-самцах массой тела 150—180 г. Для получения препарата синаптических мембран использовали головной мозг без мозжечка. Суммарную функцию неочищенных синапсом и митохондрий получали, гомогенизируя ткань мозга в 20 объемах 50 мМ трис-НСl буфера, рН 7,4, содержащего 0,32 М сахарозу, 0,001 М ЭДТА, при 4° [2]. Кроме указанных ингредиентов в буфер вносили 2 мМ ингибитор протеолитических ферментов фенилметилсульфонилфторид. Суспензию центрифугировали 15 мин при 1500g, затем супернатант центрифугировали 20 мин при 30000g. Полученную фракцию подвергали осмотическому шоку [16], суспендируя в 20 объемах воды 15 мин при 0°. Суспензию центрифугировали 10 мин при 8000g и мембраны изолировали из супернатанта центрифугированием 10 мин при 30000g. Осадок ресуспендировали в двух объемах буфера для гомогенизации и замораживали на 18 ч. Гомогенат оттаивали и промывали три раза с 5 объемами вышеуказанного буфера без сахарозы. Полученный препарат мембран разводили буфером, содержащим фенилметилсульфонилфторид, из расчета 5 г мозга/1 мл и использовали в дальнейших экспериментах.

Связывание [<sup>3</sup>H]флунитразепама (специфическая активность 86,4 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) с бензодиазепиновыми рецепторами определяли радиолигандным методом [1], принимая специфическое связывание как разницу между общим связыванием и неспецифическим в присутствии 10<sup>-5</sup> М немеченого флунитразепама. Инкубацию проводили в среде общим объемом 0,2 мл, содержащим 50 мМ трис-НСl, рН 7,4 и различные концентрации [<sup>3</sup>H]флунитразепама. Реакцию начинали добавлением 200 мкг белка мембранной фракции. Инкубацию проводили 1 ч при 0°, затем в среду добавляли 10-кратный избыток буфера и быстро фильтровали под вакуумом с использованием фильтров GF/C («Whatman», Англия).

Интенсивность связывания никотинамида и NAD синаптическими мембранами определяли по их способности замещать [<sup>3</sup>H]флунитразепам из его специфических мест связывания. Для этой цели синаптические мембраны преинкубировали в используемой для связывания [<sup>3</sup>H]флунитразепама среде с различными концентрациями никотинамида в течение 1 ч при 32°, а затем проводили связывание [<sup>3</sup>H]флунитразепама при 0° в течение 1 ч, как указано выше.

Величину K<sub>d</sub> и концентрацию центров, способных образовывать комплекс с лигандом, определяли в координатах Скетчарда, а IC<sub>50</sub> и n<sub>H</sub>

рассчитывали из данных по ингибированию, используя зависимость  $\lg \frac{B'}{1-B'}$  от  $\lg L$ , где  $B' = B/B_{\max}$ ,  $B$ —специфическое связывание при различных концентрациях лиганда ( $L$ ) в присутствии ингибитора,  $B_{\max}$ —максимальная емкость центров связывания в отсутствие ингибитора [17].

Величину  $K_1$  рассчитывали методом Диксона, а также из уравнения  $K_1 = IC_{50}/[1 + [L]/K_d]$ , где  $L$ —концентрация свободного лиганда.

При проведении хронических опытов никотинамид вводили крысам подкожно на протяжении недели два раза в сутки по 250 мг/кг массы тела животного.

Содержание белка в пробах определяли по Lowry и соавт. [18].

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены данные по специфическому связыванию [ $^3H$ ]флуниотразема синаптическими мембранами головного мозга крыс, измеренному при восьми различных концентрациях меченого лиганда в

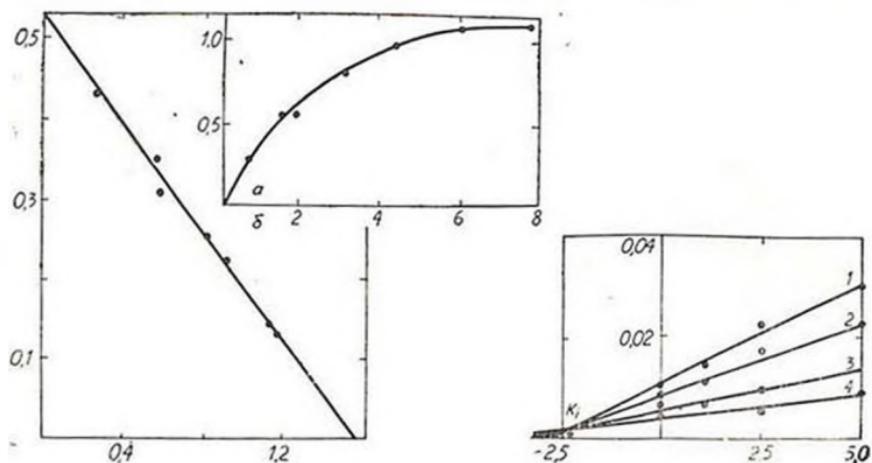


Рис. 1. Специфическое связывание [ $^3H$ ]флуниотразема с синаптическими мембранами (а) и выражение этих данных в координатах Скэтчарда (б). а—по оси абсцисс—концентрация свободного лиганда (нМ), по оси ординат— количество связанного [ $^3H$ ]флуниотразема (пмоль/мг белка); б— по оси абсцисс— количество связанного [ $^3H$ ] флуниотразема (пмоль/мг белка), по оси ординат—отношение количества связанного [ $^3H$ ]флуниотразема к свободному

Рис. 2. Ингибирование специфического связывания [ $^3H$ ]флуниотразема никотинамидом в координатах Диксона. По оси абсцисс—концентрация ингибитора (мМ), по оси ординат—специфическое связывание [ $^3H$ ]флуниотразема (пмоль/мг белка  $\times 10^{-4}$ ): 1—1,5 нМ [ $^3H$ ]флуниотразема, 2—3,0 нМ, 3—6,0 нМ, 4—9,0 нМ

области 1—7 нМ. Процесс связывания радиолиганда синаптическими мембранами имел насыщаемый характер (рис. 1, а). В координатах Скэтчарда это означает, что [ $^3H$ ]флуниотразем связывался с одной популя-

линей специфических участков связывания, характеризующихся  $K_d = 2.9$  нМ,  $V_{max} = 1550$  фмоль/мг белка (рис. 1, б). Неспецифическое связывание радиолиганда в этих опытах составляло от 5 до 10%, имело насыщаемую природу и возрастало линейно по мере увеличения концентрации радиолиганда в инкубационной среде.

Для выяснения вопроса о способности никотинамида связываться с центральными бензодиазепиновыми рецепторами нами был использован прием, основанный на ингибировании специфического связывания [ $^3$ H]флуниотразепама возрастающими концентрациями никотинамида. С помощью кинетических методов, используя график Диксона при трех различных концентрациях ингибитора (никотинамида) (1,0; 2,5; 5,0 мМ) и четырех концентрациях [ $^3$ H]флуниотразепама (1,5; 3,0; 6,0; 9,0 нМ) мы доказали, что никотинамид проявляет смешанный тип ингибирования по отношению к связыванию радиолиганда (рис. 2). Величина  $K_i$

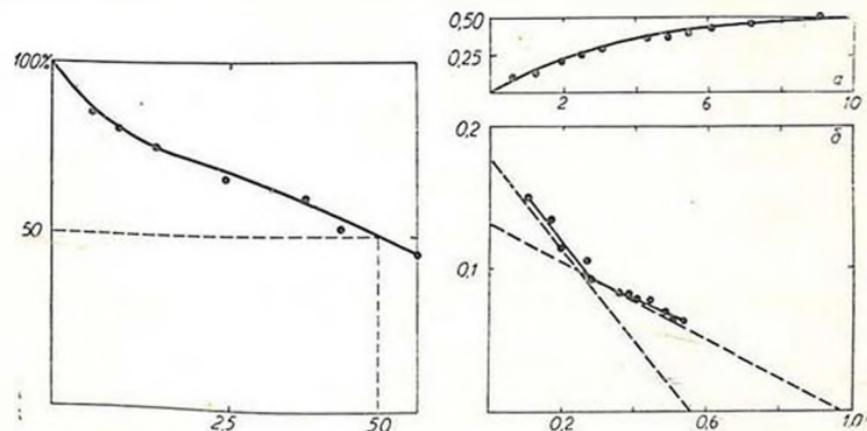


Рис. 3. Влияние никотинамида на специфическое связывание [ $^3$ H]флуниотразепама синаптическими мембранами. По оси абсцисс—концентрация никотинамида (мМ), по оси ординат—специфическое связывание [ $^3$ H]флуниотразепама и % от связанного радиолиганда в отсутствие ингибитора, принятого за 100%

Рис. 4. Специфическое связывание [ $^3$ H]флуниотразепама в присутствии никотинамида (а) и выражение этих данных в координатах Скотчарда (б). а—по оси абсцисс—концентрация свободного лиганда (нМ), по оси ординат—количество связанного [ $^3$ H]флуниотразепама (пмоль/мг белка); б—по оси абсцисс—количество связанного [ $^3$ H]флуниотразепама (пмоль/мг белка), по оси ординат—отношение количества связанного [ $^3$ H]флуниотразепама к свободному

никотинамидом процесса связывания [ $^3$ H]флуниотразепама синаптическими мембранами, определенная с помощью метода Диксона, равна  $2.30 \pm 0.15$  мМ, а при использовании уравнения  $K_i = IC_{50} / [1 + [L]/K_d]$ — $2.00 \pm 0.09$  мМ. 50%-ное ингибирование связывания [ $^3$ H]флуниотразепама имело место при концентрации никотинамида, равной 4,5 мМ (рис. 3). Представленные на рис. 3 данные являются средними величинами из

трех измерений.  $IC_{50}$  для никотинамида, определенная из кривой вытеснения  $[^3H]$ флуниотразепама из его комплекса с центрами связывания, имеет низкое сродство и не соответствует тем концентрациям, в области которых меченый лиганд связывается с синаптическими мембранами.

При анализе данных по ингибированию никотинамидом процесса связывания  $[^3H]$ флуниотразепама со специфическими участками на синаптических мембранах нами обнаружена отрицательная кооперативность. Внесение в среду никотинамида приводило к четко выраженному излому кривой на графике Скоттхарда (рис. 4). При этом было выявлено два типа участков, связывающих никотинамид с различным сродством. Величины  $K_d$  для этих участков были равны 3,4 и 7,3 нМ, а  $V_{max} = 550$  и 950 фмоль/мг белка соответственно.

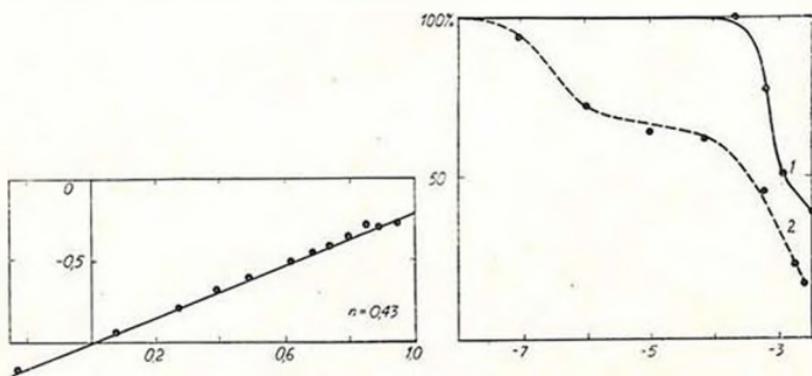


Рис. 5. Специфическое связывание  $[^3H]$ флуниотразепама в присутствии никотинамида в координатах Хилла

Рис. 6. Замещение связанного  $[^3H]$ флуниотразепама никотинамидом (1) и NAD (2). По оси абсцисс—десятичный логарифм концентрации ингибитора, по оси ординат—специфическое связывание радиолиганда, % от максимального, принятого за 100%

Отрицательную кооперативность мы обнаружили и в кинетических исследованиях с использованием графика Хилла. Так, связывание никотинамида происходило при величине  $n_H$ , равной 0,43, свидетельствующей о наличии отрицательной кооперативности во взаимодействии никотинамида с бензодиазепиновыми рецепторами (рис. 5). Такой вывод вытекает и из показателя кооперативности  $R_H$ , который в нашем случае оказался равным 6561 и лежал в пределах отрицательной кооперативности [19].

При хроническом введении никотинамида крысам на протяжении недели два раза в сутки по 250 мг/кг массы животного, так же как и в опытах *in vitro*, специфическое связывание  $[^3H]$ флуниотразепама тормозилось. Так, если в контроле специфическое связывание  $[^3H]$ флуниотразепама при его концентрации в среде, равной 3 нМ, составляло  $0,55 \pm 0,08$  пмоль/мг белка, то при введении животным никотинамида эта величина снижалась до  $0,36 \pm 0,05$  пмоль/мг белка.

Принимая во внимание, что введенный крысам никотинамид *in vivo* в мозг служит источником биосинтеза NAD [20], мы исследо-

вали способность последнего *in vitro* взаимодействовать с центральными бензодиазепиновыми рецепторами. Как выяснилось, NAD замещает [<sup>3</sup>H]флунизепам из его специфических мест связывания намного выразеннее, чем никотинамид в одних и тех же концентрациях (рис. 6). Кривая замещения [<sup>3</sup>H]флунизепамом внесенным в среду NAD, представленная в полулогарифмических координатах, имеет бифазный вид. Это свидетельствует о том, что NAD замещает [<sup>3</sup>H]флунизепам с большим сродством на одном центре связывания (в микромолярной области) и с низкой эффективностью на другом (в миллимолярной области).

Таким образом, результаты выполненных нами экспериментов доказали способность никотинамида и NAD ингибировать специфическое связывание [<sup>3</sup>H]флунизепамом с синаптическими мембранами, хотя сродство никотинамида к бензодиазепиновым рецепторам оказалось довольно низким. Однако большие дозы никотинамида, применяемые для выраженного фармакологического эффекта, объясняются его слабой проницаемостью через ГЭБ [21]. Не исключено, что взаимодействие никотинамида с центральными бензодиазепиновыми рецепторами реализуется не прямым путем, а опосредованно через NAD, на что указывает способность NAD замещать [<sup>3</sup>H]флунизепам из его специфических мест связывания на синаптических мембранах в концентрациях на три порядка меньших, чем никотинамид.

## INTERACTION OF NICOTINAMIDE WITH BENZODIAZEPINE RECEPTORS OF SYNAPTIC MEMBRANES

FOMENKO A. I., KHALMURADOV A. G., POZHARÜN S. V.,  
STEPANENKO S. P.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Academy of Science of the  
Ukrainian SSR, Kiev

It has been demonstrated that synaptic membranes have a single population of the [<sup>3</sup>H] flunitrazepam binding sites with  $K_d=2,9$  nM and  $B_{max}=1550$  fmoles/mg of protein. Nicotinamide inhibits the specific binding of labelled ligand having two independent binding sites with  $K_d=3,4$  and  $7,3$  nM and  $B_{max}=550$  and  $950$  fmoles/mg of protein, respectively. Nicotinamide demonstrates „mixed type“ of inhibition of binding with  $K_i$  for <sup>3</sup>H flunitrazepam displacement being  $2,0 \pm 0,09$  mM and Hill coefficient equal to  $0,43$ . Systemic administration of nicotinamide to rats *in vivo* also decreases the specific [<sup>3</sup>H] flunitrazepam binding.

Data obtained point to a probable nicotinamide interaction with benzodiazepine binding sites.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mohler H., Okada T. *Science*, v. 198, p. 849—851, 1977.
2. Braestrup C., Squires R. F. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 74, p. 3305—3309, 1977.
3. Wise B. C., Guidotti A., Costa E. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 80, p. 886—890, 1983.
4. Ticku M., Burch J. *Biochem. Pharmacol.*, v. 29, p. 1217—1220, 1980.
5. Marangos P., Paul S. M., Parma A. M., Skolnik P. *Biochem. Pharmacol.*, v. 30, p. 2171—2174, 1981.
6. Braestrup C., Nielsen M., Olsen C. E. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 77, p. 2288—2292, 1980.
7. Squires R. F. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, v. 26, p. 129—138, 1981.
8. Mohler H., Pole P., Cumtin R., Pierri L., Kettler R. *Nature*, v. 278, p. 563—565, 1979.
9. Skolnik P., Paul S. M. *Medicinal. Res. Rev.*, v. 1, p. 3—22, 1981.
10. Hamon M., Soubrie P. *Neurochemistry International.*, v. 5, p. 663—672, 1983.
11. Меллер Х., Баттербек М., Ричардс Дж. Р., Полюк П., Кумин Р., Пери Л., Кеттлер Р. Тезисы докл. симпозиума «Актуальные проблемы научных исследований в психиатрии», с. 8. М., 1979.
12. Браславский В. Е., Щавелев В. А., Крыжановский Г. Н., Никулин Е. В., Германов С. Б. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 92, № 8, с. 39—42, 1982.
13. Крыжановский Г. Н., Шандра А. А., Голлевский А. С. *Фармакология и токсикология*, т. 45, № 6, с. 13—17, 1982.
14. Воронина Т. А., Андронати С. А., Ахундов Р. А., Чепелев В. М. *Вест. Акад. мед. наук СССР*, т. 11, с. 13—20, 1984.
15. Kennedy B., Leonard B. E. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 8, p. 59—60, 1980.
16. Zukin S. R., Young A. B., Snyder S. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 71, p. 4802—4807, 1974.
17. Moody T., Schmidt J. *Biochem. Biophys. and Res. Commun.*, v. 53, p. 761—772, 1973.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. A., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
19. Кормиш—Бюден Э. *Основы ферментативной кинетики*, М., Мир, 1976.
20. Халмурадов А. Г. Докт. дис. К., 1974.
21. Spector R. J. *Neurochem.*, v. 33, p. 895—904, 1979.

Поступила 19. I 1987