

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 [^3H] 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 фмоль/мг белка соответственно. Никотинамид проявляет смешанный тип ингибирования связывания [^3H] флунитразепам 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 [^3H] флунитразепам с синаптическими мембранами.

NAD способен замещать [^3H] 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, неидентифицированные 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 [^3H] 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 эпилептические припадки [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-НСI 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 фенолметилсульфонилфторид. 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 фенолметилсульфонилфторид, из расчета 5 г мозга/1 мл и использовали в дальнейших экспериментах.

Связывание [³H]флунизепема (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 10⁻⁵ М немеченого флунизепема. Инкубацию проводили в среде общим объемом 0,2 мл, содержащим 50 мМ трис-НСI, рН 7,4 и различные концентрации [³H]флунизепема. 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 [³H]флунизепем из его специфических мест связывания. Для этой цели синаптические мембраны преинкубировали в используемой для связывания [³H]флунизепема среде с различными концентрациями никотинамида в течение 1 ч при 32°, а затем проводили связывание [³H]флунизепема при 0° в течение 1 ч, как указано выше.

Величину K_d и концентрацию центров, способных образовывать комплекс с лигандом, определяли в координатах Скотчарда, а IC₅₀ и п_H

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_i рассчитывали методом Диксона, а также из уравнения $K_i = IC_{50}/[1+[L]/K_d]$, 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 $[^3H]$ флунизепема синептическими мембранами головного мозга крыс, измеренному при восьми различных концентрациях меченого лиганда в

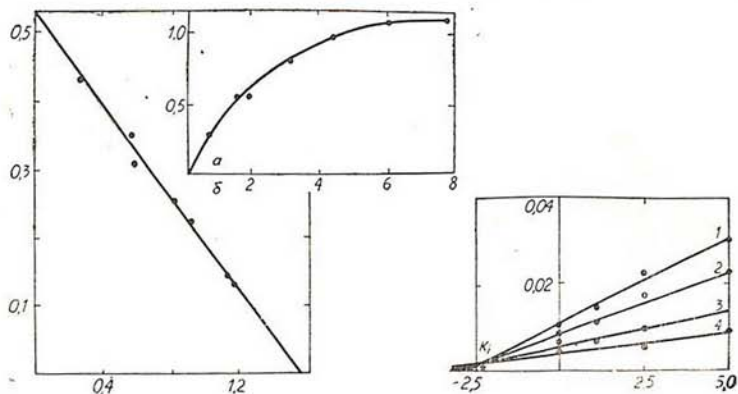


Рис. 1. Специфическое связывание $[^3H]$ флунизепема с синептическими мембранами (а) и выражение этих данных в координатах Скетчарда (б). а—по оси абсцисс—концентрация свободного лиганда (нМ), по оси ординат— количество связанного $[^3H]$ флунизепема (пмоль/мг белка); б— по оси абсцисс— количество связанного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

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

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

цией 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 насыщающую 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 $[^3H]$ флунитразема 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 $[^3H]$ флунитразема (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

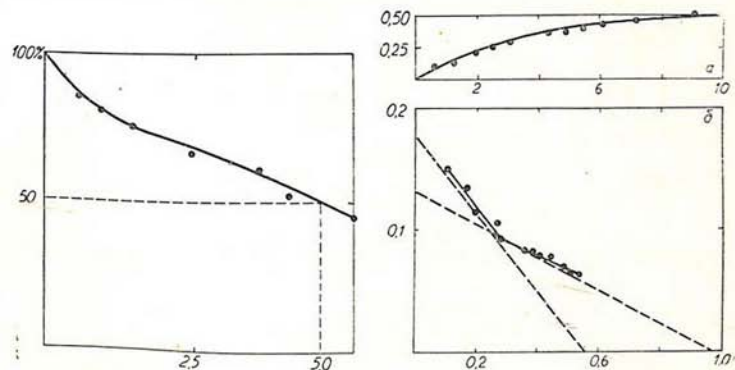


Рис. 3. Влияние никотинамида на специфическое связывание $[^3H]$ флунитразема синаптическими мембранами. По оси абсцисс—концентрация никотинамида (мМ), по оси ординат—специфическое связывание $[^3H]$ флунитразема и % от связанного радиолиганда в отсутствие ингибитора, принятого за 100%

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

никотинамидом процесса связывания $[^3H]$ флунитразема 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 $[^3H]$ флунитразема 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 $[^3H]$ флуниотразапама 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 $[^3H]$ флуниотразапама со специфическими участками на синаптических мембранах нами обнаружена отрицательная кооперативность. Внесение в среду никотинамида приводило к четко выраженному излому кривой на графике Скотчарда (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.

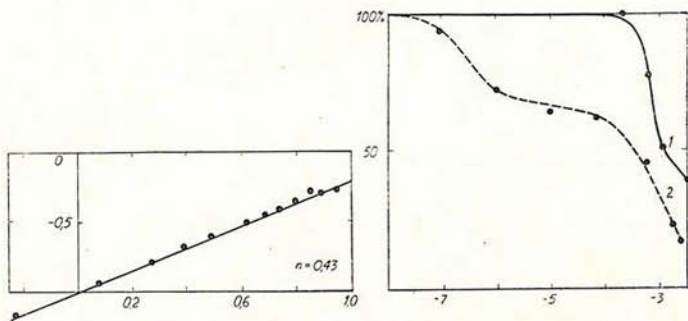


Рис. 5. Специфическое связывание $[^3H]$ флуниотразапама в присутствии никотинамида в координатах Хилла

Рис. 6. Замещение связанного $[^3H]$ флуниотразапама никотинамидом (1) и NAD (2). По оси абсцисс—десятичный логарифм концентрации ингибитора, по оси ординат—специфическое связывание радиолганда, % 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 $[^3H]$ флуниотразапама тормозилось. Так, если в контроле специфическое связывание $[^3H]$ флуниотразапама 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 [³H]флунизепам из его специфических мест связывания намного выразеннее, чем никотинамид в одних и тех же концентрациях (рис. 6). Кривая замещения [³H]флунизепамом внесенным в среду NAD, представленная в полулогарифмических координатах, имеет бифазный вид. Это свидетельствует о том, что NAD замещает [³H]флунизепам с большим родством 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 [³H]флунизепамом с синаптическими мембранами, хотя родство 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 [³H]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 [³H] 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 ³H 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 [³H] 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., Cumin R., Pierrri 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., Баттербен 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. *Вет. 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. Корниш—Боуден 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