



УДК 577.25:547.833:612.826

ВЫСОКОЕ СРОДСТВО ТЕТРАГИДРОИЗОХИНОЛИНОВ К
ВЫСОКОАФФИННЫМ МЕСТАМ СВЯЗЫВАНИЯ
ДОФАМИНА В СТРИАТУМЕ КРЫС

ПАЦЕНКО А. А., ГРИНЕВИЧ В. П.

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Радиорецепторным методом путем конкурентного замещения [^3H]дофамина (ДА) изучено взаимодействие тетрагидроизохинолиновых алкалоидов с высокоаффинными ДА-рецепторами стриатума крыс. При вытеснении 67 нМ галоперидолом [^3H]ДА из D_4 рецепторов меченый лиганд селективно связывался с D_3 -участками. IC_{50} величины для тетрагидропапаверолина, тетрагидропапаверина, сальсолинола и сальсолина и D_3+D_4 и D_3 -участкам связывания [^3H]ДА равны соответственно $9,0 \cdot 10^{-8}$ М, $1,3 \cdot 10^{-5}$ М, $1,9 \cdot 10^6$ М и $3,0 \cdot 10^{-5}$ М для первых; $3,0 \cdot 10^{-8}$ М, $2,0 \cdot 10^{-5}$ М, $2,4 \cdot 10^{-6}$ М и $3,5 \cdot 10^{-5}$ М для вторых рецепторов, что предполагает реализацию эффектов сальсолинола и тетрагидропапаверина через дофаминергическую систему. Метилирование этих алкалоидов приводит к их частичной инактивации.

В последнее десятилетие накоплено большое количество данных, подтверждающих существование тетрагидроизохинолиновых алкалоидов как нормальных метаболитов животного организма [1]. Среди этого класса веществ наибольшее внимание исследователей привлекают сальсолинол (SAL) и тетрагидропапаверолин (THPL), образующиеся при конденсации дофамина с ацетальдегидом и дофальдегидом соответственно. SAL обнаружен в мозгу и печени животных, моче и цереброспинальной жидкости здоровых людей и алкоголиков [2—4]. THPL, согласно концепции Davis и соавт. [5], служит предшественником более сложных морфиноподобных алкалоидов. Чрезвычайно широк спектр фармакологического действия самих алкалоидов, нейротропность их метаболитов (основной процесс метаболизирования — метилирование с помощью катехол-О-метилтрансферазы [1]). Однако молекулярные механизмы действия тетрагидроизохинолинов не расшифрованы.

Одной из наиболее вероятных мишеней тетрагидроизохинолинов является ДА-ергическая система, непосредственно вовлеченная в патогенез шизофрении, паркинсонизма, алкоголизма [8]. Установлено, что SAL и THPL ингибируют в микромолярных концентрациях катехол-О-метил-

трансферазу, МАО, тирозингидроксилазу, обратный захват ДА [8], хотя в отношении эндогенных концентраций алкалоидов это маловероятно. Эксперименты по вытеснению SAL и THPL агонистов и антагонистов из D_1 - и D_2 -рецепторов также не дали удовлетворительных результатов [9].

В начале 80-х годов рядом исследователей были обнаружены высокоаффинные места связывания ДА и агонистов (D_3 -участки), ДА и бутирофеноновых антагонистов (D_4 -участки) [10, 11]. К настоящему времени доказано, что D_3 и D_4 -участки—это конформации D_1 и D_2 -рецептора соответственно [12].

Взаимодействие тетрагидроизохинолинов с высокоаффинными конформациями рецепторов ДА ранее не изучалось. Данная работа посвящена исследованию такого взаимодействия для SAL и THPL, а также их метилированных продуктов сальсолина (SAN) и тетрагидропаверина (THPN).

Материалы и методы

Выделение препаратов мембран и радиорецепторный анализ проводили по методу Lefi и Creese, использованному применительно к нашим условиям [13]. Беспородных крыс-самок массой 220—280 г декапитировали, быстро выделяли стриатум, взвешивали и гомогенизировали в 100 объемах холодного 50 мМ трис-НСI буфера, рН 7.7 (22°). Гомогенат центрифугировали 20 мин при 22000g (0—4°) и супернатант отбрасывали. Осадок ресуспендировали в 50 мл того же буфера, содержащего 2 мМ $MgSO_4$, инкубировали при 37° 20 мин, охлаждали добавлением равного количества буфера и повторно центрифугировали. Полученный осадок дополнительно промывали и ресуспендировали при 22° в буфере для анализа, который включал 20 мМ 4-морфолинпропансульфоновую кислоту (MOPS), 1 мМ ЭДТА· Na_2 , 0.1%-ную аскорбиновую кислоту, 4 мМ $MgSO_4$, 20 мкМ паргалин и 19 мМ трис-основание, рН 7.2. Аскорбиновая кислота в этих условиях уменьшала неспецифическое, но не ингибировала специфическое связывание [3H]ДА. Радиорецепторное связывание проводили в полистироловых пробирках, использовали две параллели на каждую пробу. Среда инкубации (общий объем—1 мл) включала меченый лиганд и нерадиоактивные вытесняющие агенты (в зависимости от вида анализа) галоперидол, SAL, SAN, THPL или THPN. Для определения неспецифического связывания вносили 10 мкМ ADTN (2-амино-6, 7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидронафтаген). Все ингредиенты готовили в буфере для анализа. Связывание ингибировали добавлением суспензии мембранного препарата в количестве 0.8—0.9 мг белка на пробу. После 90 мин инкубации при 22° реакцию останавливали добавлением 3 мл ледяного трис-буфера и фильтрованием под вакуумом через фильтры GF/B («Whatman», Англия). Фильтры предварительно промывали буфером, вносили среду инкубации, промывали 9 мл (3×3 мл) того же буфера. Процедура фильтрования занимала не более 12 с.

Радиоактивность высушенных фильтров определяли в 10 мл толуольного сцинтиллятора (эффективность счета—38%) на сцинтилляционном счетчике Mark II („Nuclear Chicago“, США). Специфическая активность связывания $[^3\text{H}]\text{ДА}$ составляла $42 \div 76\%$ для насыщающего ($0,2 \text{ мМ} \pm 20 \text{ нМ } [^3\text{H}]\text{ДА}$) и 64% ($2 \text{ нМ } [^3\text{H}]\text{ДА}$, $2400 \div 2900 \text{ срт/фильтр}$) для вытесняющего анализом. При обработке результатов значение вероятности определяли, используя t -критерий Стьюдента. В работе использовали $[^3\text{H}]\text{ДА}$, $49,7 \text{ Ки/ммоль}$ („Amersham“, Англия), ADTN („Calbiochem“, США), трис-основание, MOPS, паргилин и SAN („Serva“, ФРГ), галоперидол и дроперидол, („Гедеон Рихтер“, Венгрия), THPL и THPN („Sigma“, США), остальные реактивы—отечественного производства. квалификации х. ч. SAL синтезировали по методу Teitel, Brossi [14], чистоту препарата проверяли с помощью ВЭЖХ.

Результаты и обсуждение

Было установлено, что высокоаффинные места связывания $[^3\text{H}]\text{ДА}$ в стриатуме крысы и быка являются гетерогенными, так как бутирофеноновые антагонисты вытесняют $[^3\text{H}]\text{ДА}$ двухфазно: $40\text{—}45\%$ мест связывания $[^3\text{H}]\text{ДА}$ —с $\text{IC}_{50} 5 \div 50 \text{ нМ}$, остальные—с $\text{IC}_{50} 1 \div 10 \text{ мкМ}$ [15]. В связи с этим высокоаффинные D_3 -рецепторы дофамина были разделены на D_4 (наномолярное средство агонистов и антагонистов) и собственно D_3 (наномолярное средство агонистов и микромолярное—антагонистов). Далее было установлено, что они представляют собой высокоаффинные конформации D_2 и D_1 -рецепторов соответственно, а конформационное взаимопревращение регулируется ионным балансом $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ и гуаниловыми нуклеотидами [16, 17].

На рис. 1 представлены кривые вытеснения $[^3\text{H}]\text{ДА}$ из мембранных препаратов галоперидолом и дроперидолом. Кривые имеют два перегиба, $\text{IC}_{50} \text{D}_4$ равны 10 и 30 нМ, $\text{IC}_{50} \text{D}_3$ —10 и 100 мкМ для галоперидола и дроперидола соответственно. В дальнейших экспериментах для «высвобождения» D_3 -участков использовали 67 нМ галоперидол.

Графики Скэтчарда для специфического связывания $[^3\text{H}]\text{ДА}$ показаны на рис. 2. Плотность D_3 -участков составляет примерно 60% от общей популяции высокоаффинных конформаций рецепторов. Величины K_d (4,9 и 5,1 нМ для $\text{D}_3 + \text{D}_4$ и D_3 -участков соответственно) согласуются с литературными данными [13, 14]. Линейный характер кривой в отсутствие галоперидола также свидетельствует о том, что K_d для $\text{D}_3 + \text{D}_4$ и D_3 -участков отражают одинаковое средство к ним лиганда. Выявление D_3 -участков как высокоаффинных конформаций D_1 -рецепторов позволило во многом решить проблему несоответствия средства некоторых фармакологических препаратов к рецепторам с ингибированием ими ДА -зависимой аденилатциклазы, так как была обнаружена прямая корреляция $\text{IC}_{50} \text{D}_3$ -участков и K_i аденилатциклазы [14]. Этот факт является также косвенным свидетельством функциональной роли D_3 -участков.

На рис. 3 и 4 представлены кривые вытеснения тетрагидроизохинолинами [^3H]ДА из общих высокоаффинных мест связывания и «освобожденных» D_3 -участков. В пределах точности данного эксперимента они носят монофазный характер, кажущиеся величины p_i близки к 1. IC_{50} для ТНРЛ и ТНРХ равны $3,0 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ и $2,0 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ в случае вытеснения [^3H]ДА из D_3 -участков и $9,0 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ и $1,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ из $\text{D}_3 + \text{D}_4$ -участков.

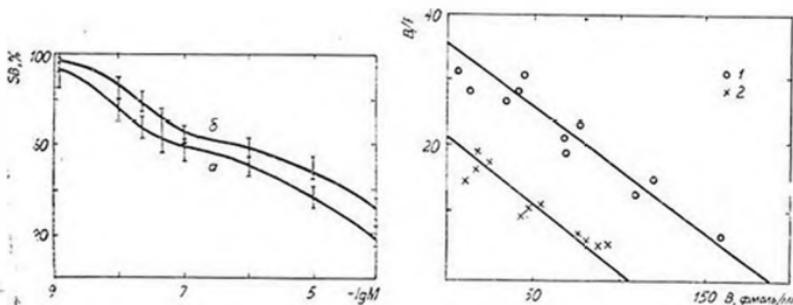


Рис. 1. Кривые вытеснения [^3H]дофамина из высокоаффинных мест связывания на мембранных препаратах стриатума галоперидолом (а) и дроперидолом (б). Результаты представлены как среднее из 3-х независимых экспериментов

Рис. 2. Связывание [^3H]дофамина с мембранами стриатума в отсутствие (1) и в присутствии (2) 67 нМ галоперидола. $\text{D}_3 + \text{D}_4$ участки: $K_d = 4,9 \pm 0,8 \text{ нМ}$, $B_{\text{max}} = 187 \pm 16 \text{ фемоль/мг белка}$; D_3 -участки: $K_d = 5,1 \pm 0,6 \text{ нМ}$, $B_{\text{max}} = 102 \pm 13 \text{ фемоль/мг белка}$

Для SAL и SAN IC_{50} соответственно равны $2,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ и $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ в первом случае, $1,9 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ и $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ —во втором. Из этих данных можно сделать следующие выводы: а) метилирование тетрагидроизохинолинов, вероятно, является частичной инактивацией их центрального действия; б) низкие значения величины полумаксимального ингибирования для SAL и ТНРЛ предполагают их эффективное воздействие на ДА-рецепторы ЦНС *in vivo*, особенно ТНРЛ на D_3 -участки.

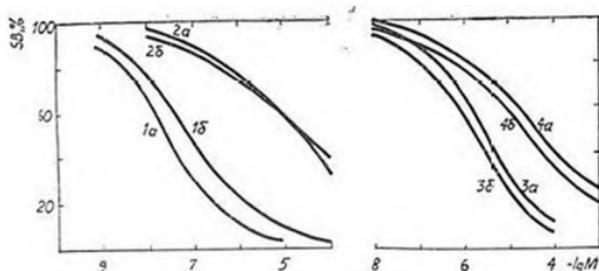


Рис. 3. Вытеснение ТНРЛ (1), ТНРХ (2) и SAL (3), SAN (4) [^3H]ДА из D_3 (а) и $\text{D}_3 + \text{D}_4$ -участков (б). Представлены средние результаты 3-х независимых экспериментов

Различная активность S(—)- и R(+)-энантимеров (у первого—более высокая) в ингибировании β -адренорецепторов [18], а также тот факт, что S(—)-THPL является естественным метаболитом в синтезе алкалоидов у растений [19], позволяют предположить более высокую активность S(—)-энантиомера THPL по сравнению с рацематной смесью в случае DA-рецепторов. Эти рассуждения приобретают значение в связи с гипотезой о возможности ферментативного синтеза бензилизохинолинов и протобербербинов у животных [5].

Таким образом, SAL и особенно THPL при интрацеребровентрикулярном введении могут реализовывать такие физиологические эффекты, как увеличение потребления и зависимость от этанола [9], через DA-ергическую систему. Метилированные тетрагидроизохинолины обладают слабым сродством к рецепторам. Но по результатам немногочисленных физиологических исследований они являются достаточно активными и проявляют свойства, зачастую противоположные своим неметилированным предшественникам [20]. Поэтому вопрос их физиологической значимости требует дальнейшего изучения.

HIGH AFFINITY OF TETRAHYDROISOQUINOLINES TO DOPAMINERGIC HIGH AFFINITY BINDING SITES IN RAT STRIATUM

PATSENKO A. A., GRINEVICH V. P.

Institute of Biochemistry, BSSR Academy of Science, Grodno

The interaction of TIQ alkaloids with [3 H] dopamine labeled high affinity binding sites of dopamine in rat striatum has been characterized by radioligand-binding technique. When the binding of [3 H] DA to D_1 high affinity receptors is blocked by the inclusion of 67 nM unlabeled haloperidol, this ligand appears to label selectively the D_2 binding sites. The IC_{50} values for tetrahydropapaveroline (THPL), tetrahydropapaverine, salsolinol (SAL) and salsoline against the binding of [3 H] DA to D_2 - D_1 and alone D_2 sites were $9,0 \cdot 10^{-8}$ M, $1,3 \cdot 10^{-8}$ M, $1,9 \cdot 10^{-6}$ M and $3,0 \cdot 10^{-8}$ M for the former and $3,0 \cdot 10^{-8}$ M, $2,0 \cdot 10^{-8}$ M, $2,4 \cdot 10^{-6}$ M and $3,5 \cdot 10^{-8}$ M for the latter, respectively. Data obtained indicate that the effects of THPL and SAL in vivo may be mediated through the dopaminergic system. The methylation of this alkaloids results in their partial inactivation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Collins M. A. The alkaloids, v. XXI, p. 329—357, 1983.
2. Sjoquist B., Borg S., Kvande H. Substance and alcohol actions misuse, v. 2, p. 63—77, 1981.
3. Sjoquist B., Liljequist S., Engel J. J. Neurochem., v. 39, p. 259—252, 1982.
4. Collins M. A., Nijm W., Borge G., Fess G., Goldforb C. Science, v. 205, p. 1184, 1979.
5. Davis V. E., Cashaw J. I., McMurtrey K. D., Ruchtrawat S., Nimt Y.—In: „Beta-Carbolines and Tetrahydroisoquinolines“ (ed. F. Bloom), p 99—112, N. Y., Alan R. Liss, 1982.

6. Airaksinen M. M., Saano V., Steidel E., Juvonen N., Huntzicker A., Gunther J. Acta pharmacol. et toxicol., v. 55, p. 330—335, 1984.
7. Ross D. H. Alcoholism: Clin. Exp. Res., v. 2, p. 139—143, 1978.
8. Melchior C., Collins M. A. CRC Crit. Rev. Toxicol., v. 9, № 4, p. 113—355, 1982.
9. Nimitkipaisan Y., Skolnick P. Life Sci., v. 23, № 4, p. 375—382, 1978.
10. Seeman P. Pharmacol. Rev., v. 32, p. 229—313, 1980.
11. Sokoloff P., Martres M. P., Schwartz J. C. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., v. 309, p. 119—124, 1980.
12. Leff S. E., Creese I. Mol. Pharmacol., v. 27, p. 171—183, 1984.
13. Leff S. E., Creese I. Mol. Pharmacol., v. 27, p. 184—192, 1984.
14. Teitel S., O'Brien Brossi A. J. Med. Chem., v. 15, p. 845—846, 1972.
15. Grigoriadis D., Seeman P. Can. J. Neurol. Sci., v. 11, p. 108—113, 1984.
16. Watanabe M., George S. R., Seeman P. J. Neurochem., v. 45, p. 1842—1849, 1985.
17. De Vries D. J., Beart P. Eur. J. Pharmacol., v. 109, p. 417—419, 1985.
18. Brossi A., Rice K., Mak C., Reden G., Jacobson A., Nimitkipaisan Y., Skolnick P., Daly J. J. Med. Chem., v. 23, p. 643—652, 1980.
19. Rueffer M., El-Shagi R., Nagakura N. FEBS Lett., v. 129, p. 5—9, 1981.
20. Nelson S. H., Steinsland O. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 224, p. 193, 1983.

Получила 9. I 1987

Нейрогормоны у беспозвоночных. Cambridge University Press, 256 с., 1987.

Neurohormons in invertebrates. (Ed. M. C. Thorndyke and G. J. Goldsworthy). Cambridge University Press, Cambridge, England, 256 p., 1988.

В книге дается подробный анализ современных представлений о пептидных гормонах беспозвоночных. В ней фокусируется внимание на двух важных и родственных вопросах, каждый из которых обстоятельно анализируется в этом издании. Многие из рассматриваемых пептидов оказались нейрогормонами с химическими характеристиками, близкими, если не сходными, со свойствами нейрогормонов позвоночных. Поэтому эти открытия могут значительно обогатить наше понимание природы и эволюции пептидных регуляторов. Во-вторых, с разработкой такой методологии, как ВЭЖХ и зонды цДНК, позволившей проводить детальное изучение пептидов позвоночных, удалось достичь существенных успехов в расшифровке физиологии и биохимии природных пептидов беспозвоночных. Целью издания является стремление к синтезу этих двух аспектов современной исследовательской деятельности. Книга вызывает широкий интерес у энтомологов, нейробиологов и эндокринологов.