



УДК 577.17:612.815.1

АПАМИН—КОНКУРЕНТНЫЙ ИНГИБИТОР СВЯЗЫВАНИЯ  
3Н-ГАМК С РЕЦЕПТОРОМ ГАМККУЗНЕЦОВ В. И., ТОНКИХ А. К., КАРАНОВА М. В., КИМ О. Н.,  
ТАКАНАЕВ А. А., САДЫКОВ А. С.Институт биофизики АН СССР, Пущино; Институт биоорганической  
химии АН УзССР, Ташкент

Апамин-октадекапептид с двумя дисульфидными связями [1, 2] из яда медоносной пчелы *Apis mellifera* поражает преимущественно ЦНС [3]. Имеются данные о том, что апамин ингибирует неадренергические тормозные потенциалы [4] и является селективным блокатором  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого калиевого канала [5].

ГАМК—основной тормозной медиатор ЦНС позвоночных и периферической нервной системы [6]. В настоящей работе приведены результаты изучения действия апамина на связывание ГАМК и мусцимола (агониста ГАМК из *Amanita muscaria*) с рецептором ГАМК мозга крыс (в мембранном и в солюбилизованном виде) и с мембранами мышц креветки.

В работе были использованы 3Н-ГАМК, 24 Ки/ммоль («Изотоп» СССР); 3Н-мусцимол, 15,5 Ки/ммоль («Amersham», Англия); мусцимол, ДОХ-На и трипон X-100 («Serva», ФРГ). Все остальные реактивы—марки «осч», отечественные. Апамин был любезно предоставлен А. И. Мирошниковым из Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина. Фильтры нитроцеллюлозные, диаметр пор—0,4—0,8 мкм («Synpor», СССР).

Целый мозг гомогенизировали в 10 объемах 0,32 М сахарозы. Гомогенат центрифугировали при 1000 g, 10 мин, полученный супернатант—при 17000 g, 30 мин. Осадок замораживали, оттаивали, инкубировали с 0,05%-ным триконом X-100 и трижды отмывали в 20 объемах 50 мМ трис-HCl, pH 7,4. Отмытый препарат хранили в жидком азоте и использовали в опытах по связыванию или солюбилизировали. Для солюбилизации фракцию мембран инкубировали в 20 объемах 50 мМ буфера трис-HCl, pH 7,4, содержащего 0,2%-ный ДОХ-На и 1 М KCl, 15 мин при 4°. Суспензию центрифугировали при 105000 g, 60 мин. Надосадочную жидкость диализовали против 300 объемов 50 мМ трис-HCl, pH 7,4 с 0,1%-ным триконом X-100 и 0,15 М KCl 2 ч при 4°. После диализа и центрифугирования при 30000 g, в течение 20 мин к надосадочной жидкости добавляли сульфат аммония до 20%-ного насыщения, осадок собирали центрифугированием, растворяли его в 50 мМ трис-HCl, pH 7,4, с 0,1%-ным триконом X-100 и 0,15 М KCl до нужной концентрации белка и хранили в жидком азоте.

Мышцы креветок мелко разрезали, гомогенизировали в 10 объемах 0,25 М сахарозы (8000 об/мин, 4 мин) и процеживали через три слоя марли. Гомогенат центрифугировали при 700 g, 10 мин, надосадочную жидкость—при 100000 g, 1 ч. Осадок (фракцию мембран) собирали и хранили в жидком азоте.

Специфично связанную ГАМК (или мусцимол) определяли, как описано в работе Кузнецова и соавт. [7]. В пробирки вносили 10 мкл различных концентраций  $^3\text{H}$ -мусцимола, добавляли 10 мкл воды или немеченого мусцимола ( $10^{-4}$  М) в 80 мкл суспензии мембран или солибилизованного препарата (около 100 мкг белка). Смесь перемешивали, инкубировали 30 мин при  $3^\circ$  и наносили на фильтр, вымоченный в дистиллированной воде. Радиоактивность измеряли на счетчике «Interteknik» (Франция). Специфичное связывание определяли как разницу между общим и неспецифичным. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [8].

На рис. 1 приведены кривые вытеснения  $^3\text{H}$ -ГАМК апамином для синаптических мембран мозга крыс ( $K_i=3,3$  мкМ) и мембран мышц креветки ( $K_i=1$  мкМ). Величины  $K_i$  для апамина сопоставимы с таковыми для бикукуллина, единственного известного антагониста ГАМК. На рис. 2, а приведены кривые связывания  $^3\text{H}$ -ГАМК с солибилизованным рецептором ГАМК мозга крыс в норме и в присутствии апамина. Графики в координатах Лайнуивера-Берка указывают на конкурентный характер ингибирования ( $K_i=0,7$  мкМ). Аналогич-

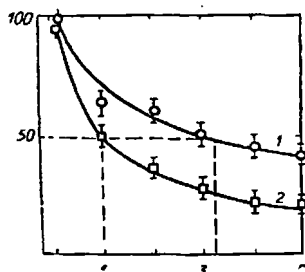


Рис. 1 Ингибирование апамином связывания  $^3\text{H}$ -ГАМК с синаптическими мембранами мозга крыс (1) и с мембранами мышц креветки (2). По оси абсцисс—концентрация апамина, мкМ; по оси ординат—специфическое связывание  $^3\text{H}$ -ГАМК, в %. Каждая точка представляет среднее из 3–6 измерений с указанными стандартными отклонениями.

ные кривые для связывания  $^3\text{H}$ -мусцимола приведены на рис. 2, б;  $K_i=1,1$  мкМ. Для сравнения показано действие фосфолипазы А на связывание  $^3\text{H}$ -мусцимола с солибилизованным рецептором ГАМК. Ингибирующее действие фосфолипазы носит неконкурентный характер.  $K_i$  несколько меньше для солибилизованного рецептора ГАМК, чем для мембран, возможно, благодаря лучшей доступности связывающего участка для апамина. Как известно, в активный участок апамина входят 2 остатка аргинина [9]. В связи с этим интересно сопоставить действие двух других веществ, также содержащих гуанидиновые группы, на связывание мусцимола. Одно из них, амилорид, совершенно не влияло на связывание. Тетродотоксин ингибировал специфичное связывание с  $K_i \approx 5\text{--}10$  нМ [10]. Помимо традиционного представления о тетродотоксине как специфичном блокаторе  $\text{Na}^+$ -каналов, из литературы известно также, что это вещество затрагивает примембранный цитоскелет, а также ингибирует связывание агонистов с М-холинорецептором [11]. Все это указывает на то, что

механизм действия апамина может не ограничиваться блокированием  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого  $\text{K}^{+}$ -канала. В одной из более ранних работ [12] утверждается, что апамин не взаимодействует с рецептором ГАМК. Расхождение этих результатов с нашими, возможно, объясняется различиями в методах приготовления мембран (отсутствует обработка мембран 0,05%-ным тритоном X-100) и определения связывания (метод центрифугирования).

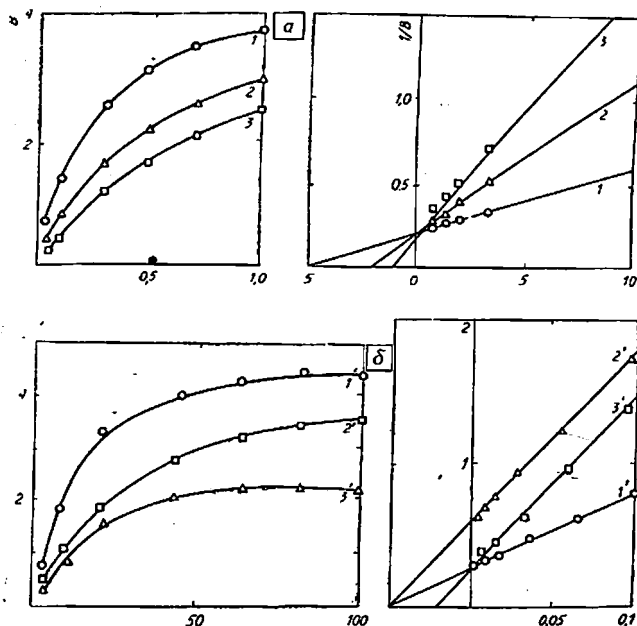


Рис. 2. Связывание  $^3\text{H}$ -ГАМК (а) и  $^3\text{H}$ -мусцимола (б) с препаратом солиubilизированного рецептора ГАМК в прямых и двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка. 1—в отсутствие апамина,  $K=0,2$  мкМ; 2—в присутствии 1 мкМ апамина,  $K=0,47$  мкМ; 3—в присутствии 2 мкМ апамина,  $K=0,8$  мкМ; 1'—в отсутствие апамина; 2'—в присутствии 1 мкМ апамина; 3'—после обработки фосфолипазой А. Каждая точка представляет среднее из 3–6 измерений. По оси абсцисс—концентрация  $^3\text{H}$ -ГАМК (а) или  $^3\text{H}$ -мусцимола (б); (10 мкг фермента, 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ ,  $37^\circ$ , 15 мин), по оси ординат—связанная  $^3\text{H}$ -ГАМК (а) или  $^3\text{H}$ -мусцимол (б).

Таким образом, апамин является специфичным блокатором ГАМК-ергической передачи как у позвоночных, так и беспозвоночных. Апамин как антагонист ГАМК имеет ряд преимуществ по сравнению с бикуккуллином—хорошо растворим в воде, стабилен при физиологических рН, в нем возможны химические модификации без потери активности.

# APAMIN—A COMPETITIVE INHIBITOR OF $^3\text{H}$ -GABA-BINDING WITH RECEPTOR

KUZNETSOV V. I., TONKYKH A. K., KARANOVA M. V., KIM O. N.,  
TAKANAEV A. A., SADYKHOV A. S.

Institute of Biophysics, Academy of Sciences USSR, Poustchino,  
Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
Uzbek. SSR, Tashkent

Apamin—a neurotoxin from bee venom—inhibits coupling of  $^3\text{H}$ -GABA with muscle membranes more drastically than with brain membranes in rats. It turned to be a more potent inhibitor than bicucullin. Inhibition of  $^3\text{H}$ -GABA binding with solubilized membranes is competitive with  $K_i$  of 0,7  $\mu\text{M}$ .

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Haux P., Sawerthai H., Habermann E., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., v. 348, p. 727—732, 1967.
2. Callewaert I. L., Shipolini R., Vernon A. FEBS Lett., v. 1, p. 111—115, 1968.
3. Habermann E., Cheng-Rande D. Toxicon, v. 13, p. 465—469, 1975.
4. Байдан А. В., Владимирова И. А., Мирошников А. И., Таран Г. А. Докл. АН СССР, т. 241, с. 1224—1227, 1978.
5. Hugues M., Romey G., Duval D., Vincent I. P., Lazdunski M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 79, p. 1308—1312, 1982.
6. Krnjevic K. Physiol. Rev., v. 54, p. 418—540, 1974.
7. Кузнецов В. И., Тонких А. К., Ким О. Н., Леданов Х. А. Укр. биохим. журн., т. 54, с. 428—431, 1982.
8. Lowry O. H., Rosenbrough N. Y., Farr A. L., Randall R. I. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
9. Vincent I. P., Schweitz H., Lazdunski M. Biochemistry, v. 14, p. 2521—2525, 1975.
10. Кузнецов В. И., Тонких А. К., Каранова М. В., Орлов В. И. I Всесоюзн. биофизич. съезд, Тезисы докл., т. 1, с. 60, М., 1982.
11. Baumgold I., Gallant P., Terakawa S., Pant H. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 103, p. 653—658, 1981.
12. Cavey D., Vincent I. P., Lazdunski M. Toxicol., v. 17, p. 176—179, 1979.

Поступила 3. I. 1985