

IL SIERO DI PAZIENTI PSICHIATRICI INIBISCE IL BINDING DEL ³H-FLUNITRAZEPAM *

D. MARAZZITI (a), G. GIANNACCINI (b) e C. MARTINI (b)

(a) Istituto di Clinica Psichiatrica, Università degli Studi, Pisa

(b) Istituto Policattedra di Discipline Biologiche, Università degli Studi, Pisa

Riassunto. - La scoperta dei recettori per le benzodiazepine ha fatto ipotizzare che nell'organismo esistano sostanze endogene in grado di legarsi ad essi e di modularne l'attività. Con la nostra ricerca ci siamo proposti di verificare se, nel siero di pazienti affetti da attacchi di panico o depressione, fossero presenti composti endogeni interagenti con i recettori benzodiazepinici. I nostri risultati hanno dimostrato che nei pazienti è presente una sostanza che inibisce in maniera specifica il binding del ³H-flunitrazepam, e che tale sostanza non è evidenziabile nei soggetti sani di controllo, nell'ambito delle concentrazioni di siero usate. Questo composto ha un peso molecolare inferiore a 1.000 Da, è resistente al calore ed agli enzimi proteolitici. La dimostrazione di questo inibitore apre nuove prospettive nello studio della biochimica dell'ansia.

Summary (Psychiatric patients' serum inhibits the binding of ³H-flunitrazepam). - *The demonstration of receptors for the benzodiazepines allowed to hypothesize the presence of endogenous substances able to bind and to modulate the activity of these receptors. We investigated the possible existence of endogenous compounds acting on benzodiazepine receptors in the serum of patients with panic attacks or depression. Our results showed the presence of a substance which inhibited the ³H-flunitrazepam binding specifically in the samples taken from the patients' group, and which was not present in normal controls, in the range of serum concentration used. This compound has a molecular weight below 1,000 Da, is heat-stable, and resistant to proteolytic degradation. The demonstration of this inhibitor opens new perspectives in the study of the biochemistry of anxiety.*

Introduzione

Molti dati sperimentali indicano che le azioni farmacologiche delle benzodiazepine (BDZ) sono mediate dall'interazione con specifici recettori presenti nel sistema ner-

vosso centrale ed in alcuni tessuti periferici [1, 2]. Sono state descritte strette relazioni funzionali tra i recettori BDZ, il recettore GABAergico di tipo A ed un canale di membrana per lo ione cloro [3]. Quando il GABA, o agonisti GABAergici si legano al proprio recettore, si realizza un aumento della conduttanza della membrana plasmatica allo ione cloro, con conseguente iperpolarizzazione del neurone [4]. Sembra che le BDZ siano in grado di facilitare l'azione del GABA sul canale al cloro [5, 6], ma i meccanismi molecolari di tale facilitazione sono tuttora sconosciuti.

L'esistenza di recettori specifici per le BDZ fa ipotizzare, come già avvenuto per le sostanze oppioidi, la presenza di modulatori endogeni per tali recettori. Partendo da questi presupposti, con la nostra ricerca ci siamo proposti di verificare se, nel siero di pazienti psichiatrici, fossero presenti sostanze interagenti con i recettori BDZ di tipo centrale.

Materiali e metodi

Abbiamo inserito nello studio 14 pazienti (11 donne e 3 uomini, di età compresa tra 18 e 45 anni), di cui 4 affetti da disturbi da attacchi di panico, 6 da agorafobia con attacchi di panico e 4 da depressione maggiore ricorrente, in accordo ai criteri del *Manuale diagnostico e statistico dei disturbi mentali della Società Americana di Psichiatria* (1980). Come gruppo di controllo sono stati inseriti 12 volontari sani (10 donne e 2 uomini, di età compresa tra 21 e 30 anni). Sia i pazienti che i controlli non erano affetti da malattie fisiche, né assumevano BDZ, come evidenziato da prove colorimetriche e da HPLC. Inoltre i soggetti di controllo non presentavano né una storia personale né familiare di disturbi d'ansia o affettivi.

Dieci ml di sangue venoso sono stati prelevati ai soggetti tra le 8 e le 10 ore. Il siero deproteinizzato dei pazienti e dei controlli è stato saggiato sul binding del ³H-flunitrazepam (³H-FLU) in membrane di cervello bovino, preparate essenzialmente come descritto in [7]. Le

* Lavoro presentato al 1° Convegno Nazionale "Giovani Cultori delle Neuroscienze" (Roma, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 11-12 dicembre 1987) su invito del Comitato scientifico del convegno.

membrane sono state incubate con 0,6 nM ^3H -FLU in tampone di Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), per 45 minuti e a 0 °C, in assenza (controllo) e presenza di siero deproteizzato dei pazienti e dei volontari sani. Dopo l'incubazione, i campioni sono stati filtrati in un apparecchio di filtrazione Millipore, attraverso filtri GF/B lavati due volte con tampone di incubazione. Il *binding* aspecifico è stato ottenuto in presenza di diazepam 0,01 mM.

La differenza tra soggetti sani e pazienti è stata valutata con l'analisi di varianza seguita dal test t di Student.

Risultati

I nostri risultati hanno evidenziato che il siero di tutti i pazienti psichiatrici inibiva il *binding* del ^3H -FLU con una percentuale di inibizione variabile dal 40 al 100% (media \pm DS: 78 ± 22). Non è stata rilevata nessuna differenza significativa nell'inibizione tra i vari gruppi di pazienti esaminati ($t = 0,565$, ns). Il siero dei controlli sani, nell'ambito delle concentrazioni usate, non dava invece inibizione. In due soli controlli è stata trovata una percentuale di inibizione di 5 e 10%, in tutti gli altri casi la percentuale era 0%. La differenza tra pazienti e controlli era significativa ($t = 13,216$; $p < 0,0001$).

Abbiamo esaminato l'attività dei sieri anche sul *binding* del RO 5-4864 che marca i recettori periferici delle BDZ [8], sul *binding* del ^3H -muscimolo e su quello del SCH 23390, che è specifico per i recettori dopaminergici di tipo 1. In questi casi non è stata riscontrata nessuna attività nei sieri dei pazienti né in quelli dei controlli. Un'analisi biochimica preliminare del composto inibito-

re ha evidenziato che: è dializzabile, ha un peso molecolare inferiore a 1.000 Da, è resistente al calore (1 ora a 100 °C) ed al congelamento (6 mesi a 80 °C), e non viene inattivato da alcune proteasi (tripsina, chimotripsina, pronasi) o da acidi forti (acido perclorico 0,1 M).

Discussione

In questi ultimi anni, varie sostanze sono state proposte come ligandi per le BDZ [9-12], ma per alcune di esse è problematico sostenere un ruolo come endocoidi, a causa o della ridotta affinità per i recettori (xantina, inosina, nicotina), o perché artefatti di laboratorio (beta-carbolina). Il nostro lavoro mostra per la prima volta evidenze di un inibitore nel siero di pazienti psichiatriche che è specifico per i recettori centrali delle BDZ, senza nessuna differenza nella percentuale di inibizione tra i vari gruppi diagnostici esaminati. Alla luce di questi risultati, appare interessante effettuare studi analoghi in diverse categorie di pazienti psichiatriche o neurologici.

I nostri risultati evidenziano inoltre che il composto con attività inibitoria non è presente nei soggetti sani, perlomeno nell'ambito delle concentrazioni di siero usate. Le ricerche future dovranno chiarire se tale sostanza sia presente in soggetti normali sottoposti a condizioni di stress, e rappresenti quindi un correlato fisiologico dell'ansia, o sia espressione solamente dell'ansia che compare in alcuni disturbi psicopatologici.

Ricevuto il 2 marzo 1988.

Accettato il 15 aprile 1988.

BIBLIOGRAFIA

1. MOHLER, H. & OKADA, T. 1977. Benzodiazepine receptors: demonstration in the central nervous system. *Science* **192**: 849-851.
2. SQUIRES, R.S. & BRAESTRUP, C. 1977. Specific benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* **266**: 732-737.
3. SKOLNICK, P. & PAUL, S.M. 1982. Molecular pharmacology of the benzodiazepines. *Int. Rev. Neurobiol.* **23**: 103-140.
4. TALLMAN, J.F., PAUL, S.M., SKOLNICK, P. & GALLAGER, D.W. 1980. Receptors for the age of anxiety. Pharmacology of the benzodiazepines. *Science* **207**: 274-281.
5. GALLAGER, D.W. & TALLMAN, J.F. 1983. Consequence of benzodiazepine receptor occupancy. *Neuropharmacology* **22**: 1943-1949.
6. SCHOFIELD, P.R., DARLISON, M.G., BURT, D.R., STEPHENSON, F.A., RODRIGUEZ, H., RHEE, L.M., RAMACHANDRAN, J., REALE, V., GLENCORSE, T.A., SEEBURG, P.H. & BARNARD, E.A. 1987. Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* **328**: 221-227.
7. MARTINI, C., RIGACCI, T. & LUCACCHINI, A. 1983. ^3H -muscimol binding sites on purified benzodiazepine receptors. *J. Neurochem.* **41**: 1183-1185.
8. MARTINI, C., LUCACCHINI, A., HRELIA, S. & ROSSI, C.A. 1985. Central and peripheral type benzodiazepine receptors. In: *Advances in biochemical psychopharmacology*. II. G. Biggio & E. Costa (Eds). Raven Press, New York. Vol. 41. pp. 1-10.
9. SKOLNICK, P., GOODWIN, F.K., EDWARDS, M. & PAUL, S.M. 1980. Identification of inosine and hypoxanthine as endogenous inhibitors of diazepam binding in the central nervous system. *Life Sci.* **23**: 1473-1480.
10. MOHLER, H., POLC, P., CUMIN, R., PIERI, L. & KETTLER, R. 1979. Nicotinamide is a brain constituent with benzodiazepine-like actions. *Nature* **287**: 563-567.

11. NIELSEN, M., GREDAL, O. & BRAESTUP, C. 1979. Some properties of ^3H -diazepam displacing activity from human urine. *Life Sci.* **25**: 679-686.
12. COLELLO, G.D., HOCKENBERRY, D.M., BOSMANN, H.B., FUCHS, S. & FOLKERS, K. 1978. Competitive inhibition of benzodiazepine binding by fractions from porcine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 6319-6323.
13. GUIDOTTI, A., FORCHETTI, C.M., CORDA, M.G., KONKEL, D., BENNET, C.D. & COSTA, E. 1983. Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 3531-3535.