



УДК 577.156

ВЛИЯНИЕ ДВУХ- И ТРЕХВАЛЕНТНЫХ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ
НА ПРОЦЕСС КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ[³H-Тур¹, D-Ala², D-Leu⁵]ЭНКЕФАЛИНА С ОПИАТНЫМИ
РЕЦЕПТОРАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС*Породенко Н. В., Зайцев С. В., Варфоломеев С. Д.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,**Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Изучено влияние ионов Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Sr²⁺, La³⁺, Nd³⁺, Sm³⁺, Eu³⁺, Gd³⁺ на процесс комплексобразования меченого стабильного аналога энкефалина — [³H-Тур¹, D-Ala², D-Leu⁵]энкефалина с опиатными рецепторами препарата мембран головного мозга крыс. Процесс связывания описывается схемой с участием как минимум двух независимых типов центров связывания. Высокоаффинный центр связывания не проявляет специфичности к действию двух- и трехвалентных ионов металлов: все изученные катионы увеличивают сродство энкефалина к центру связывания. Сродство лиганда к низкоаффинному центру связывания увеличивается лишь в присутствии ионов Mn²⁺, Mg²⁺ и лантаноидов. Максимальная концентрация обоих типов центров связывания при действии катионов не меняется. Увеличение ионной силы раствора приводит к уменьшению сродства лиганда к высокоаффинному центру связывания. Показано, что влияние двух- и трехвалентных катионов металлов на связывание [³H-Тур¹, D-Ala², D-Leu⁵]энкефалина опосредуется через один и тот же участок связывания катиона на соответствующем рецепторе энкефалина.

Ионы металлов принимают активное участие в регуляции многих биохимических процессов, лежащих в основе жизнедеятельности организмов. Особая роль принадлежит катионам в функционировании возбудимой, в частности нервной, ткани. Общеизвестно значение катионов Ca²⁺, Mg²⁺ и Mn²⁺ в регуляции трансмембранных ионных потоков, в проявлении активности целого ряда ферментов нервной ткани. В последнее время большой интерес вызывает изучение влияния ионов металлов на процессы рецепции медиаторов и модуляторов центральной нервной системы. Так, активно изучается роль двухвалентных катионов щелочноземельных и переходных металлов в функционировании α- и β-адренорецепторов [1–4], дофаминовых рецепторов [5], рецепторов γ-аминомасляной кислоты [6, 7], глутамата [8] и простагландинов [9]. Все возрастающий интерес вызывает исследование регуляции ионами двухвалентных металлов взаимодействия опиатных рецепторов головного мозга с опиатами, опиоидными пептидами и их антагонистами [10–12].

Уже на ранней стадии изучения опиатных рецепторов вопрос о влиянии катионов металлов на рецепцию соответствующих лигандов был в центре внимания исследователей [10, 11]. В работах последних лет установлена важная регуляторная роль катионов металлов в функционировании опиатных рецепторов. Анализ литературы [1–16] показывает, что влияние катионов металлов на процессы комплексобразования различных медиаторов и модуляторов с соответствующими рецепторами мембранных препаратов из головного мозга животных во многом сходно. Так, замечено, что двухвалентные ионы металлов активируют рецепцию большинства лигандов в присутствии NaCl, причем ионы Mn²⁺ являются наиболее сильными активаторами [4, 5, 7, 14, 15]. При этом антагонисты большинства медиаторов и опиоидов нечувствительны к действию двухвалентных катионов [4, 5, 7, 9–11]. Дополнительным подтверждением

Принятые сокращения: [³H]энкефалин — [³H-Тур¹, D-Ala², D-Leu⁵]энкефалин, НЕРЕС — 4-(2-оксизтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота.

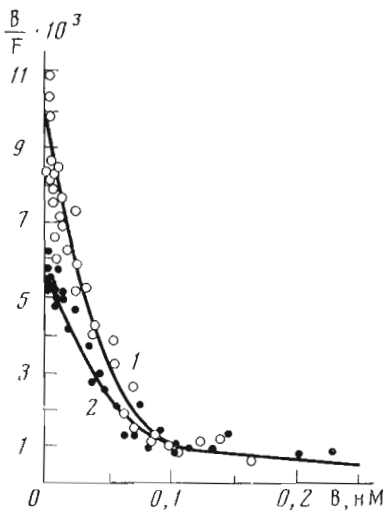


Рис. 1

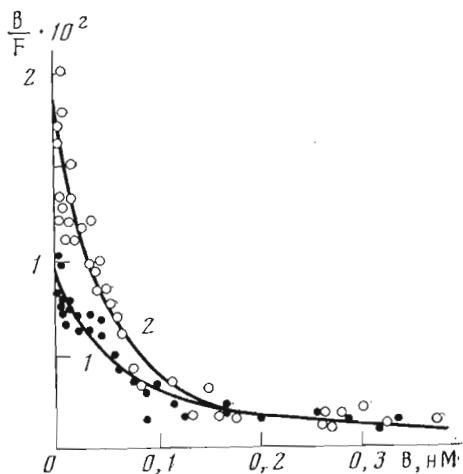


Рис. 2

Рис. 1. Специфическое связывание [^3H]энкефалина с препаратом мембран головного мозга крыс (1,2 мг белка на 1 мл), не подвергшимся преинкубации (1) и преинкубированным с 10 мМ EGTA (2). t 37° С. Координаты Скэтчарда: В — общая концентрация комплексов, F — концентрация свободного лиганда ($[L] - [L_b]$)

Рис. 2. Специфическое связывание [^3H]энкефалина с препаратом мембран (2,1 мг белка на 1 мл), преинкубированным с 10 мМ EGTA (1), и связывание в присутствии 3 мМ CaCl_2 (2), t 37° С. Координаты Скэтчарда

предположения о том, что в основе механизма «катионной модуляции» рецепции лежат общие для многих типов рецепторов принципы, являются указания на связь различных типов рецепторов с мембранными ионными каналами. Такая связь предполагается для специфических Na^+ -каналов [6, 7]. Большой интерес представляют также указания на возможную структурную сопряженность опиатных рецепторов головного мозга со специфическими Ca^{2+} -каналами [17—19]. Все это ставит задачу подробного изучения механизма влияния двухвалентных ионов на рецепцию опиоидов. Однако, несмотря на большое количество работ, вопрос о том, на какие параметры процесса связывания лиганда с рецептором влияют катионы, все еще остается открытым. Поэтому целью нашей работы явилось изучение механизма влияния катионов металлов (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , лантаноидов) на процесс связывания с опиатными рецепторами [^3H -Тур 1 , $D\text{-Ala}^2$, $D\text{-Leu}^5$]энкефалина — стабильного аналога Leu -энкефалина.

Изучение связывания [^3H]энкефалина с препаратами мембран головного мозга крыс, преинкубированными с комплексами двухвалентных катионов EGTA и EDTA, показало, что преинкубация мембран приводит к снижению уровня специфического связывания [^3H]энкефалина в 2—3 раза. Анализ изотерм комплексообразования [^3H]энкефалина с препаратами мембран, преинкубированными с EGTA, и препаратами, не подвергавшимися такой обработке, позволил установить, что процесс связывания [^3H]энкефалина с опиатными рецепторами описывается моделью, учитывающей наличие как минимум двух независимых центров связывания:



где L — лиганд, Q_1 и Q_2 — высокоаффинный и низкоаффинный центры связывания, K_{d1} и K_{d2} — константы диссоциации высоко- и низкоаффинных центров связывания соответственно. Отсюда концентрация специфич-

**Влияние преинкубации препарата мембран головного мозга крыс с EGTA
на параметры связывания [³H]энкефалина ***

Препарат мембран	K_{d1} , нМ	K_{d2} , нМ	$[Q_1]_0$, нМ	$[Q_2]_0$, нМ
Контроль	5,8	120	0,048	0,44
Преинкубированный с 10 мМ EGTA	16	130	0,052	0,39

* Нижние индексы 1 и 2 отвечают соответственно высоко- и низкоаффинному, центрам связывания.

чески связанного лиганда равна [20]:

$$[L_b] = [Q_1L] + [Q_2L] = \frac{[Q_1]_0[L]}{K_{d1} + [L]} + \frac{[Q_2]_0[L]}{K_{d2} + [L]}, \quad (2)$$

где $[L]$ — исходная концентрация лиганда в растворе, $[Q_1]_0$ и $[Q_2]_0$ — общие концентрации центров связывания. Рассчитанные с использованием ЭВМ значения равновесных констант диссоциации (K_d) и концентрации центров связывания (Q_0) приведены в табл. 1. Из рис. 1 и табл. 1 видно, что преинкубация мембранного препарата с EGTA приводит к увеличению значения K_{d1} . При этом в рамках предложенной модели концентрации обоих центров связывания и значения K_{d2} практически не меняются. Таким образом, для комплексообразования [³H]энкефалина с высокоаффинным центром связывания существенно падают эндогенные двухвалентных ионов, в то время как на связывание лиганда с низкоаффинным центром эндогенные двухвалентные ионы заметного влияния не оказывают. Полученные результаты позволяют предположить, что влияние двухвалентных катионов на связывание [³H]энкефалина с высоко- и низкоаффинными центрами связывания носит различный характер. Для более детального исследования влияния катионов металлов на процесс связывания опиоидов необходимо провести изучение в широком диапазоне концентраций лиганда.

Анализ литературных данных [1—19] свидетельствует о том, что из всех ионов щелочноземельных и переходных металлов наиболее важными для функционирования мембранно-связанных, в частности опиатных, рецепторов являются ионы Ca^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} . Это свидетельствует о важности изучения в первую очередь названной группы катионов. Результаты исследования влияния ионов Ca^{2+} на связывание [³H]энкефалина с препаратами мембран головного мозга крыс (рис. 2) позволяют сделать следующие выводы. Во-первых, процесс связывания [³H]энкефалина с рецепторами в присутствии ионов Ca^{2+} также описывается моделью (1) с двумя независимыми типами центров связывания. Во-вторых, наличие ионов Ca^{2+} в среде инкубации изменяет лишь равновесную константу диссоциации лиганда с высокоаффинным центром связывания (K_{d1}), тогда как K_{d2} и общие концентрации центров связывания Q_1 и Q_2 существенно не меняются. Следовательно, значения $[Q_1]_0$ и $[Q_2]_0$, определенные с помощью анализа изотермы равновесного связывания [³H]энкефалина с препаратами мембран, могут быть использованы для дальнейших вычислений как постоянные величины.

Существенное различие (более чем на порядок) значений равновесных констант диссоциации лиганда с высоко- и низкоаффинными центрами связывания позволяет использовать фиксированные низкие и высокие (~60 нМ) концентрации лиганда для более подробного исследования влияния ионов Ca^{2+} на связывание лиганда с обоими типами центров связывания. При высокой концентрации лиганда независимо от концентрации ионов Ca^{2+} высокоаффинный центр будет практически полностью насыщен лигандом и его вклад в общее связывание лиганда может быть

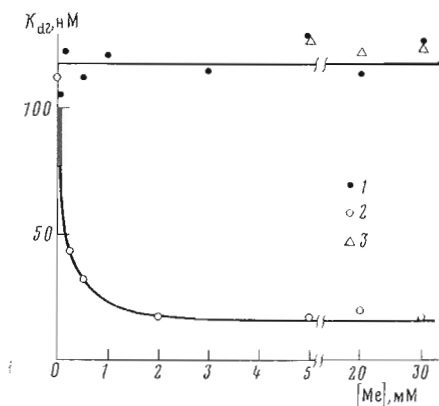


Рис. 3

Рис. 3. Влияние ионов Ca^{2+} (1), Mn^{2+} (2) и ионной силы раствора (3) на равновесную константу диссоциации комплекса $[^3\text{H}]$ энкефалина (60 нМ) с низкоаффинным центром связывания в препарате мембран головного мозга крыс

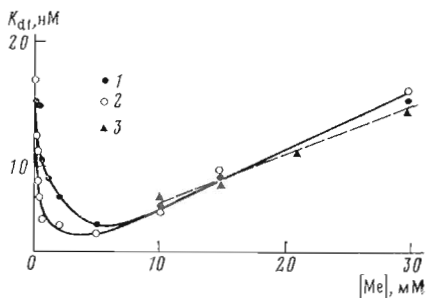


Рис. 4

Рис. 4. Влияние ионов Ca^{2+} (1), Mn^{2+} (2) и ионной силы раствора (3) на равновесную константу диссоциации комплекса $[^3\text{H}]$ энкефалина (0,07 нМ) с высокоаффинным центром связывания в препарате мембран головного мозга крыс

принят постоянным и равным общей концентрации этого центра связывания. Выражение (2) в этом случае преобразуется к виду

$$[L_b] = [Q_1]_0 + \frac{[Q]_0 [L]}{K_{d2} + [L]} \quad (3)$$

Экспериментально определяя значения $[L_b]$ при фиксированной высокой концентрации лиганда, из выражения

$$K_{d2} = \frac{[Q_2]_0 [L]}{[L_b] - [Q_1]_0} - [L] \quad (4)$$

находим значение K_{d2} . Результаты исследования влияния ионов Ca^{2+} на низкоаффинный центр связывания $[^3\text{H}]$ энкефалина, полученные при фиксированной концентрации лиганда (рис. 3), показали, что ионы Ca^{2+} в широком диапазоне концентраций не влияют на комплексообразование энкефалина с низкоаффинным центром связывания.

Как следует из выражения (2), при известных значениях $[Q_2]_0$ и K_{d2} вклад низкоаффинного центра связывания может быть точно учтен. Расчеты показывают, что при фиксированной низкой концентрации количество лиганда, связанного с высокоаффинным центром, даже в отсутствие ионов Ca^{2+} близко к количеству лиганда, связанному с обоими центрами связывания, т. е. вклад низкоаффинного центра довольно мал. В присутствии же ионов Ca^{2+} вклад высокоаффинного центра еще более увеличивается, так как K_{d1} уменьшается, а K_{d2} не меняется.

Данные, демонстрирующие влияние ионов Ca^{2+} на высокоаффинный центр связывания, полученные при фиксированной низкой концентрации лиганда, свидетельствуют (рис. 4), что в присутствии ионов Ca^{2+} вплоть до концентрации 5 мМ значения K_{d1} гиперболически уменьшаются, а при дальнейшем повышении концентрации Ca^{2+} в среде инкубации значения K_{d1} растут. Изучение влияния эквивалентных по полной силе концентраций KCl, не обладающего специфическим влиянием на рецепторы энкефалинов (рис. 4), приводит к выводу, что увеличение K_{d1} в данном случае, по-видимому, связано с изменением ионной силы раствора [10, 11]. Следует отметить, что в отличие от высокоаффинного центра связывания низкоаффинный центр нечувствителен к изменению ионной силы раствора (рис. 3).

Таким образом, наибольший интерес представляет «активирующее» влияние ионов Ca^{2+} на высокоаффинный центр связывания. Эффект активации может быть связан с комплексообразованием ионов Ca^{2+} как с

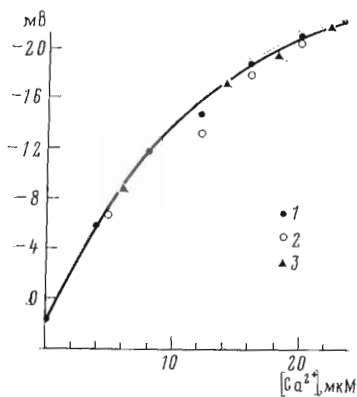


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость потенциала Ca^{2+} -селективного электрода от концентрации CaCl_2 в среде инкубации в отсутствие (1) и в присутствии 60 (2) и 90 мкМ (3) $[D\text{-Ala}^2, D\text{-Leu}^5]$ энкефалина

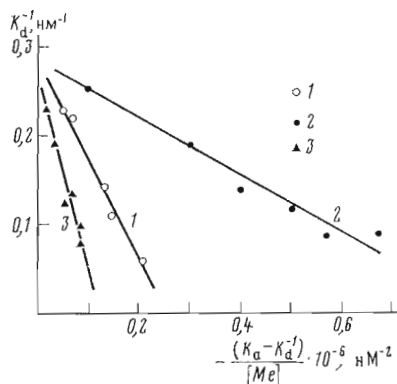


Рис. 6

Рис. 6. Влияние ионов Ca^{2+} (1), Mn^{2+} (2), Mg^{2+} (3) на процесс связывания $[^3\text{H}]$ энкефалина с высокоаффинным центром связывания (в координатах уравнения (8))

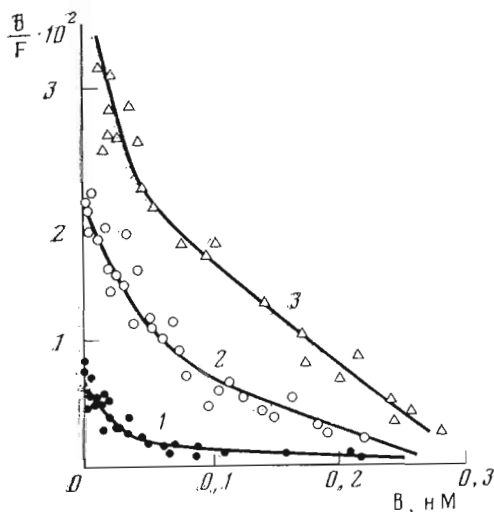


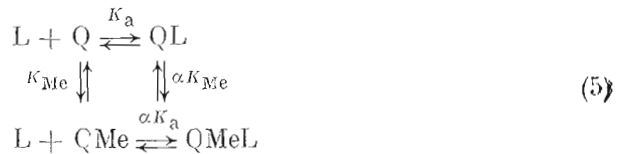
Рис. 7. Специфическое связывание $[^3\text{H}]$ энкефалина с препаратом мембран головного мозга крысы (1,5 мг белка на 1 мл), преинкубированным с EGTA (1) при добавлении 0,12 (2) и 1 мМ MnCl_2 (3). Координаты Скэтчарда

лигандом (что приводит к изменению характера процесса его взаимодействия с центром связывания), так и с самим центром связывания энкефалина в мембране. Для проверки первого предположения была изучена возможность связывания Ca^{2+} с $[D\text{-Ala}^2, D\text{-Leu}^5]$ энкефалином при концентрациях иона в среде инкубации до 5 мМ. Оказалось, что добавление энкефалина в среду инкубации не изменяет свободной концентрации ионов Ca^{2+} в растворе (рис. 5). Это указывает на отсутствие комплексобразования. К аналогичному выводу приводит и измерение концентрации ионов Ca^{2+} в среде инкубации в присутствии и в отсутствие $[D\text{-Ala}^2, D\text{-Leu}^5]$ энкефалина спектрофотометрическим методом с использованием индикатора Arsenaso-III. О том, что влияние ионов Ca^{2+} на равновесную константу диссоциации комплекса $[D\text{-Ala}^2, D\text{-Leu}^5]$ энкефалин — центр связывания ($K_{\text{дт}}$) опосредуется не через лиганд, свидетельствуют также результаты изучения спектров КД. Спектры КД контрольного раствора $[D\text{-Ala}^2, D\text{-Leu}^5]$ энкефалина и раствора, к которому добавляли до 5 мМ CaCl_2 , снятые в условиях инкубации, совпадали. Таким образом, можно сделать вывод, что эффект иона связан с его комплексобразованием с рецептором, а не с лигандом. Данные табл. 2 показывают, что это действие Ca^{2+} на рецептор обратимо.

Уровни связывания (распад в мин) [³H]энкефалина (7 нМ) с препаратом мембран, преинкубированным с EGTA, в присутствии различных катионов (контроль) и после отмывки от связанных катионов средой инкубации (1) или раствором 10 мМ EGTA (2)

Препарат мембран	Без добавления солей	1 мМ CaCl ₂	1 мМ MgCl ₂	0,5 мМ MnCl ₂	0,15 мМ LaCl ₃
Контроль	1960±390	2500±200	3200±380	5780±650	3500±480
1	1850±310	2200±180	2700±250	2950±230	1800±200
2	1780±210	1750±90	2050±310	1810±120	1550±200

Гиперболическое изменение равновесной константы диссоциации комплекса лиганд — центр связывания с увеличением концентрации иона Ca²⁺ до 5 мМ, отсутствие комплексообразования ионов металла с лигандом и обратимый характер действия ионов металла позволяют предложить следующую схему комплексообразования лиганда с рецептором в присутствии ионов металла:



где Q — центры связывания, Me — ионы металла, K_a — константа сродства лиганда к рецептору в отсутствие ионов металла, K_{Me} — константа ассоциации ионов металла со свободными центрами связывания, α — параметр, характеризующий влияние комплексообразования иона металла с центром связывания на константу сродства центра к лиганду. В соответствии со схемой (5) зависимость концентрации комплекса лиганд — центр связывания от концентрации лиганда и иона металла имеет вид

$$[QL_b] = \frac{[Q][L]}{K_d + [L]}, \quad (6)$$

где

$$K_d = \frac{1 + K_{Me} [Me]}{K_a + \alpha K_a K_{Me} [Me]}. \quad (7)$$

Из уравнения (7) следует, что при известной зависимости K_d от концентрации ионов металла можно определить все параметры процесса (5). Действительно, в отсутствие ионов металла K_d = K_a⁻¹, при его насыщающих концентрациях K_d = (K_aα)⁻¹. Линейная анаморфоза соотношения (7)

$$K_d^{-1} = K_{Me}^{-1} (K_a - K_d^{-1}) / [Me] + \alpha K_a \quad (8)$$

позволяет по зависимости K_d⁻¹ от (K_a - K_d⁻¹) / [Me] определить значение K_{Me}, а в случае, если максимальный эффект ионов на связывание лиганда экспериментально не может быть определен, — и параметр α.

На рис. 6 приведены данные по влиянию ионов Ca²⁺ на процесс комплексообразования [³H]энкефалина с опитными рецепторами головного мозга крыс, представленные в координатах уравнения (8). Линейный характер зависимости в этих координатах свидетельствует о справедливости модели (5). Результаты определения параметров влияния Ca²⁺ на высокоаффинный центр связывания даны в табл. 3.

Нами также было проведено исследование влияния ионов Mn²⁺ на процесс комплексообразования [³H]энкефалина с опитными рецепторами (рис. 7). Полученные результаты позволяют сделать вывод, что ионы Mn²⁺ в отличие от ионов Ca²⁺ оказывают влияние как на высокоаффинный, так и на низкоаффинный центр связывания. Изменение уровней связывания [³H]энкефалина обусловлено уменьшением значений равновес-

Влияние двух- и трехвалентных ионов металлов на процесс комплексообразования [³H]энкефалина с опиятными рецепторами мембран головного мозга *

Катион	K_{Me1}^{-1} , мМ	K_{Me2}^{-1} , мМ	α_1	α_2
Ca ²⁺	1,05±0,098	—	3,0±0,2	—
Sr ²⁺	1,4±0,18	—	2,3±0,2	—
Mn ²⁺	0,21±0,07	0,07±0,018	2,5±0,5	6,0±0,7
Mg ²⁺	2,36±0,63	1,3±0,17	2,9±0,6	6,2±1,2
La ³⁺	0,04±0,012	0,21±0,048	2,6±0,4	6,2±1,6
Nd ³⁺	0,011±0,002	0,05±0,011	2,0±0,3	4,6±1,2
Sm ³⁺	0,0021±0,0004	0,022±0,008	2,3±0,8	5,1±1,7
Eu ³⁺	0,0028±0,0005	0,008±0,001	2,0±0,7	4,9±1,6
Gd ³⁺	0,0014±0,0005	—	2,6±0,8	—

* Нижние индексы 1 и 2 отвечают соответственно высоко- и низкоаффинному, центрам связывания.

ных констант диссоциации комплексов лиганд — рецептор; концентрации центров связывания (Q_1 и Q_2) существенно не меняются. Изучение комплексообразования иона Mn^{2+} с лигандом с помощью индикатора Arsenaso-III показало, что комплекс Mn^{2+} — лиганд в растворе не образуется. Это указывает на то, что влияние иона опосредуется через центр связывания. Процесс связывания ионов Mn^{2+} , как и в случае связывания ионов Ca^{2+} , обратим. Действительно, из данных табл. 2 следует, что отмывка препарата мембран, преинкубированного в растворе $MnCl_2$, раствором EGTA, а также просто средой инкубации приводит к полному восстановлению начального уровня связывания. Более подробное изучение характера изменения K_{d1} и K_{d2} в присутствии ионов Mn^{2+} осуществляли с использованием описанного метода фиксированной концентрации лиганда, при этом учитывали постоянство значений $[Q_1]_0$ и $[Q_2]_0$. Для случая с Mn^{2+} , когда меняется характер связывания с высоко- и низкоаффинными центрами, этот метод был модифицирован.

Учет вкладов обоих центров связывания приводит к необходимости решения системы уравнений:

$$B_1 = \frac{[Q_1]_0 [L_1]}{K_{d1} + [L_1]} + \frac{[Q_2]_0 [L_1]}{K_{d2} + [L_1]}, \quad (9)$$

$$B_2 = \frac{[Q_1]_0 [L_2]}{K_{d1} + [L_2]} + \frac{[Q_2]_0 [L_2]}{K_{d2} + [L_2]},$$

где $[L_1]$ и $[L_2]$ — соответственно низкая и высокая концентрации лиганда, B_1 и B_2 — соответствующие им уровни связывания. Методом исключения неизвестных система (9) приводится к виду

$$a(K_{d1})^2 + bK_{d1} + c = 0, \quad (10)$$

где

$$a = B_2[L_1]([Q_2]_0 - B_1) - B_1[L_2]([Q_2]_0 - B_2), \quad (11)$$

$$b = B_2[L_1]^2([Q_1]_0 - B_1 + [Q_2]_0) - B_1[L_2]^2([Q_1]_0 - B_2 + [Q_2]_0) + [L_1][L_2](B_2[Q_2]_0 + [Q_1]_0 B_1 - B_1[Q_2]_0 - [Q_1]_0 B_2), \quad (12)$$

$$c = [L_1]^2[L_2]([Q_1]_0 - B_1 + [Q_2]_0)(B_2 - [Q_1]_0) - [L_2]^2[L_1]([Q_1]_0 - B_2 + [Q_2]_0)(B_1 - [Q_1]_0). \quad (13)$$

Вычисляя коэффициенты a , b , c и решая уравнение (10), находим K_{d1} . K_{d2} определяется из выражения

$$K_{d2} = \frac{[L_2]^2([Q_1]_0 - B_2 + [Q_2]_0) + [L_2]([Q_2]_0 K_{d1} - B_2 K_{d1})}{[L_2](B_2 - [Q_1]_0) + B_2 K_{d1}}. \quad (14)$$

Значения K_{d1} и K_{d2} , полученные с помощью решения системы (9) из данных по связыванию в присутствии различных концентраций иона Mn^{2+} ,

представлены на рис. 3 и 4. Видно, что кривые изменения K_{d1} и K_{d2} при концентрации Mn^{2+} до 5 мМ имеют гиперболический характер. Все вышесказанное позволяет утверждать, что механизм активирующего влияния ионов Mn^{2+} на связывание [3H]энкефалина с высоко- и низкоаффинными центрами связывания также описывается схемой (5). Увеличение значения K_{d1} при повышении концентрации Mn^{2+} выше 5 мМ, как и в случае с ионами Ca^{2+} , по-видимому, можно объяснить влиянием ионной силы раствора. Использование выражения (8) позволяет рассчитать значения K_{me} для ионов Mn^{2+} (рис. 6).

Исследование влияния ряда двух- и трехвалентных ионов: Mg^{2+} , Sr^{2+} , La^{3+} , Nd^{3+} , Sm^{2+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} на процесс комплексообразования [3H]энкефалина с опийными рецепторами препарата мембран головного мозга крыс приводит к заключению, что механизм действия всех изученных ионов на связывание описывается схемой (5). В табл. 3 представлены значения параметров схемы (5) для высоко- и низкоаффинных центров связывания [$D-Ala^2$, $D-Leu^5$]энкефалина, полученные в координатах уравнения (8). Анализ данных табл. 3 позволяет сделать следующие выводы:

1) высокоаффинный центр связывания энкефалина не проявляет специфичности к действию ионов металлов; в присутствии всех изученных ионов K_{d1} уменьшается, в то время как общая концентрация высокоаффинного центра практически не меняется;

2) группа катионов, включающая Mg^{2+} , Mn^{2+} и лантаноиды, специфически действует на низкоаффинный центр связывания энкефалина, уменьшая значение K_{d2} . Особого внимания заслуживает факт закономерного увеличения K_{me} по ряду лантаноидов;

3) значения параметра α для каждого центра связывания близки для всех рассмотренных катионов. Это может свидетельствовать о том, что влияние ионов металлов на связывание энкефалина опосредуется через один и тот же участок связывания на соответствующем рецепторе;

4) изученные катионы в свою очередь могут быть разделены на две группы: ионы, не оказывающие влияния на низкоаффинный центр связывания энкефалина (Ca^{2+} , Sr^{2+}), и ионы, влияющие на комплексообразование энкефалина с низкоаффинным центром связывания (Mg^{2+} , Mn^{2+} , лантаноиды). На основании представленных данных можно предположить, что различие во влиянии этих групп на связывание энкефалина с препаратом мембран головного мозга крыс связано с различием в физиологическом действии этих катионов.

Экспериментальная часть

Выделение мембранных препаратов из головного мозга крыс проводили по модифицированной стандартной методике [11]. Крыс-самцов линии Wistar весом 150–200 г забивали декапитацией. Головной мозг (без мозжечка) извлекали и промывали в среде выделения: 50 мМ трис, pH 7,4; 4°С. Гомогенизацию в 10-кратном объеме среды выделения проводили в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым ротором (зазор 250 мкм). Полученный гомогенат центрифугировали 15 мин при 20 000 *g* на центрифуге Beckman J-2-21 (США) при 0–4°С. Осадок ресуспендировали в среде инкубации: 5 мМ HEPES, 120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, pH 7,4; 37°С (50 мл среды инкубации на 1 мозг). Полученную суспензию выдерживали 30 мин при 37°С и интенсивном перемешивании, после чего добавляли раствор EGTA, pH 7,4 (Sigma, США), до конечной концентрации комплексона 10 мМ и выдерживали 10 мин при 0–4°С. В экспериментах, где изучалось влияние хелатирующих агентов на связывание лиганда, преинкубацию с EGTA не проводили. Суспензию преинкубированных мембран осаждали (20 000 *g*, 15 мин) и дважды промывали средой инкубации с последующим центрифугированием, чтобы отмыть от следов комплексона. Осадок, полученный после центрифугирования, ресуспендировали в среде инкубации (50 мл на 1 исходный мозг). Мембранный препарат при хранении во льду при 0–4°С полностью сохранял свои характеристики по связыванию опийных лигандов в течение 36 ч.

Равновесное связывание [^3H]энкефалина (Amersham, Англия; 22 Кв/ммоль) с препаратом мембран головного мозга измеряли по методике [11]. Аликвоты суспензии мембран инкубировали с [^3H]энкефалином при 37°C в течение 30 мин при интенсивном перемешивании. Для предотвращения гидролиза [^3H]энкефалина в препарат добавляли $3 \cdot 10^{-5}$ М бацитрацин (Sigma, США). Мембраны отделяли от среды инкубации путем быстрого фильтрования через фильтры Whatman GF-В (Англия), затем промывали охлажденной средой инкубации. Количество связанного [^3H]энкефалина определяли на сцинтилляционном счетчике Mark-III (США) с использованием раствора сцинтиллятора на основе толуола. Эффективность счета — 20%. Неспецифическое связывание [^3H]энкефалина определяли в присутствии 10^{-6} М немеченого [$D\text{-Ala}^2$, $D\text{-Leu}^3$]энкефалина.

Данные экспериментов обрабатывались с использованием ЭВМ PDP 11-45 (США) по разработанной нами программе [21], результаты представлены в координатах Скэтчарда [22].

Концентрацию мембранно-связанного белка определяли спектрофотометрически с использованием Кумасси-Blue G (Sigma, США) по методу, описанному в работе [23].

Использовались $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ос. ч.), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, ФРГ); хлориды лантаноидов получали при взаимодействии особо чистых оксидов лантаноидов с конц. HCl (ос. ч.).

Спектрофотометрический анализ концентрации ионов металлов в среде инкубации проводили с использованием 80 мкМ красителя Arsenazo-III (Sigma, США) на спектрофотометре Beckman DU-8 (США). Концентрации ионов Mn^{2+} определяли при 624 нм, ионов Ca^{2+} и всех остальных ионов — при 654 нм. При исследовании комплексообразования катионов с энкефалином (2 мМ) использовали концентрации ионов металлов 2–20 мкМ.

Определение концентрации ионов Ca^{2+} с помощью ион-селективного электрода (Radiometer, Дания) проводили в присутствии 60 и 90 мкМ [$D\text{-Ala}^2$, $D\text{-Leu}^3$]энкефалина. Концентрации катионов Ca^{2+} варьировали в пределах 5–20 мкМ.

Спектры КД изучали на спектрополяриметре Dichrographe Mark-IIIS (Jobin Yvon, Франция) в присутствии и в отсутствие 1 мМ CaCl_2 в диапазоне длин волн 300–240 нм, концентрация [$D\text{-Ala}^2$, $D\text{-Leu}^3$]энкефалина 10^{-4} М.

Авторы выражают благодарность заведующему лабораторией синтеза пептидов ВКНЦ АМН СССР М. И. Титову, любезно предоставившему [$D\text{-Ala}^2$, $D\text{-Leu}^3$]энкефалин, и заведующему сектором регуляции гемсодержащих белков НИИ по БИХС Министерства медицинской промышленности СССР А. М. Арутюняну за помощь в снятии спектров КД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rouot B. M., U'Prichard D. C., Snyder S. H. J. Neurochem., 1980, v. 34, p. 374–378.
2. U'Prichard D. C., Snyder S. H. J. Neurochem., 1980, v. 34, p. 385–394.
3. Williams L. T., Milliken D., Lefkowitz R. J. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 2984–2989.
4. Tsai B. S., Lefkowitz R. J. Mol. Pharmacol., 1978, v. 14, № 4, p. 540–548.
5. Hamblin M. W., Creese I. Life Sci., 1982, v. 30, № 15, p. 1587–1595.
6. Enna S. J., Snyder S. H. Mol. Pharmacol., 1977, v. 13, № 3, p. 442–453.
7. Kato K., Goto M., Fukuda H. Life Sci., 1933, v. 32, № 8, p. 879–887.
8. Baudry M., Lynch G. Nature, 1979, v. 282, № 12, p. 748–750.
9. McDermot J., Blair I. A., Cresp T. M. Biochem. Pharmacol., 1981, v. 30, № 18, p. 2041–2044.
10. Pasternak G. W., Snowman A. M., Snyder S. H. Mol. Pharmacol., 1975, v. 11, № 4, p. 735–744.
11. Simantov R., Snowman A. M., Snyder S. H. Mol. Pharmacol., 1976, v. 12, № 5, p. 977–986.
12. Kouakou Y., Zizac J. M., Moisan C., Mennier J. C. Mol. Pharmacol., 1982, v. 21, № 3, p. 564–569.
13. Балашов А. М., Брусев О. С., Балакирева Н. Н., Панченко Л. Ф. Биохимия, 1931, т. 46, № 6, p. 1067–1072.
14. Pasternak G. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 6, p. 3691–3694.

15. Chang K.-J., Cuatrecasas P. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 8, p. 2610-2618.
16. Chang K.-J., Miller R. J., Cuatrecasas P. Mol. Pharmacol., 1978, v. 14, № 5, p. 961-970.
17. Зайцев С. В., Породенко Н. В., Варфоломеев С. Д. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 849-851.
18. Göthert M., Wehking E. Experientia, 1980, v. 36, № 2, p. 239-243.
19. Guerro-Munoz F., Cerreta K. V., Guerrero M. L., Way E. L. J. Pharm. Exp. Ther., 1979, v. 209, № 1, p. 132-136.
20. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. Кинетические методы в биохимических исследованиях. М.: Изд-во МГУ, 1982, с. 276-299.
21. Грозов А. И., Курочкин И. Н., Зайцев С. В., Породенко Н. В. Тез. докл. IV Всес. симпозиума «Инженерная энзимология». М., 1983, с. 93.
22. Scatchard G. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1949, v. 51, p. 660-672.
23. Zuman Z., Werwilghem R. L. Anal. Biochem., 1980, v. 109, p. 454-459.

Поступила в редакцию
4.XI.1983

**THE INFLUENCE OF DI- AND TRIVALENT METAL IONS ON THE
[³H-Tyr¹, D-Ala², D-Leu⁵]ENKEPHALIN BINDING TO OPIATE
RECEPTORS OF RAT BRAIN**

PORODENKO N. V., ZAITSEV S. V., VARFOLOMEJEV S. D.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

The influence of Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Sr²⁺, La³⁺, Nd³⁺, Sm³⁺, Eu³⁺, and Gd³⁺ ions on the binding of labeled, stable enkephalin analogue, [³H-Tyr¹, D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin, to opiate receptors of the rat brain membrane preparations has been investigated. The formation of the complex can be described by a scheme involving at least two independent binding sites. The high affinity site does not discriminate the divalent and trivalent metal ions: all examined cations enhanced the enkephalin affinity for this site. The ligand binding to the low affinity site is potentiated only by Mn²⁺, Mg²⁺ and lanthanoides. The maximal concentration of the binding sites of the above two types is not affected by the cations. The increase in the ionic strength of the solution entails a decrease in the affinity of the ligand for the high affinity binding site. It is shown that the effect of both di- and trivalent metal cations on the [³H-Tyr¹, D-Ala², D-Leu⁵] enkephalin binding is mediated through one cation attachment site on the respective enkephalin receptor.