



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 612.822.1 : 577.352.465

ЯВЛЯЮТСЯ ЛИ РЕГУЛЯТОРНЫЕ КАТИОНСВЯЗЫВАЮЩИЕ  
ЦЕНТРЫ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ЧАСТЬЮ  
ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ  
НЕЙРОМЕМБРАНЫ?*Породенко Н. В., Зайцев С. В. \*, Варфоломеев С. Д. \***Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
химический факультет;**\* Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория  
молекулярной биологии и биорганической химии им. А. Н. Белозерского*

В настоящее время активно обсуждается биохимический механизм влияния опиатов и опиоидов на нейроны, включающий в себя подавление транспорта универсальных клеточных регуляторов — ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и/или изменение связывания этих ионов с нейромембраной. Сообщается о том, что опиаты снижают содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в нервных окончаниях, уменьшают  $\text{Ca}^{2+}$ -стимулируемый выброс медиатора [1], а повышение концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  снимает эффекты опиатов [1, 2]. Показано, что морфин [3],  $\beta$ -эндорфин и энкефалины [3, 4] ингибируют потенциалзависимое поступление ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в синапсомы. В то же время ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , других щелочноземельных, а также переходных металлов являются мощными селективными регуляторами опиатной рецепции [1, 5, 6]. Возникает предположение, что центр связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на мембранном канале и является регуляторным участком опиатного рецептора. В настоящей работе ставилась задача проверить это предположение на основании сопоставления результатов исследования  $\text{K}^+$ -стимулируемого транспорта ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и влияния ионов металлов на опиатную рецепцию.

В качестве объекта для исследования транспорта ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в нервную терминаль были выбраны изолированные нервные окончания — синапсомы, полученные из головного мозга крыс по методу Хайоша [7]. Изучение захвата ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , инициированного повышением в среде инкубации концентрации ионов  $\text{K}^+$  ( $\text{K}^+$ -стимулируемого), проводили по методике, описанной в работе [3]. За характеристику начальной скорости захвата ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в синапсомы принимали уровень включения  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  за 10 с. На рис. 1 представлено включение  $\text{Ca}^{2+}$  в синапсомы в координатах Иди — Хофсти. Зависимость позволяет определить значение константы, характеризующей связывание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с насыщаемым центром связывания на ионном канале или переносчике ( $K_m$ );  $K_m = 0,27 \pm 0,04$  мМ.

Рецепцию меченных тритием морфина ( $[^3\text{H}]$ морфин) и стабильного аналога  $[\text{Leu}^5]$ энкефалина  $[[^3\text{H}]\text{Tyr}^1, D\text{-Ala}^2, D\text{-Leu}^5]$ энкефалина ( $[^3\text{H}]$ энкефалин), а также физико-химические параметры влияния ряда ионов металлов на их рецепцию изучали на препаратах головного мозга крыс по методике, описанной в работе [5].

Исследование эффекта ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и переходных металлов на рецепцию  $[^3\text{H}]$ морфина показало, что влияние ионов описывается схемой,

\* Принятые сокращения: НЕРЕС — 4-(2-оксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота,  $[^3\text{H}]$ энкефалин —  $[[^3\text{H}]\text{Tyr}^1, D\text{-Ala}^2, D\text{-Leu}^5]$ энкефалин.

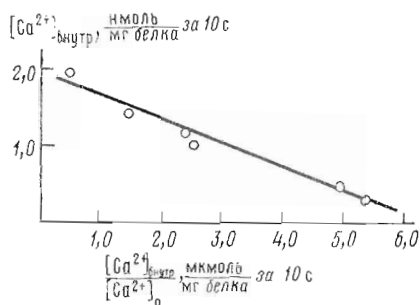


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость начальной скорости  $K^+$ -стимулируемого захвата ионов  $Ca^{2+}$  в синапсомы (уровень включения ионов за 10 с) от концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в среде инкубации. Условия: 70 мМ KCl, 75 мМ NaCl, 2 мМ  $MgCl_2$ , 10 мМ глюкоза, 5 мМ ЦВРЭС, pH 7,4.  $^{45}Ca^{2+}$  0,5 мкКи/мл

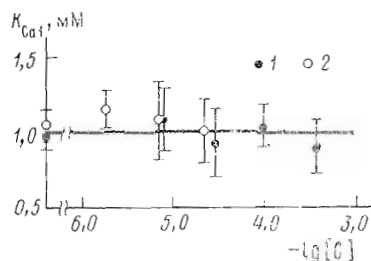


Рис. 2

Рис. 2. Влияние различных концентраций (С) верапамила (1) и хлорида цинка (2) на константу диссоциации комплекса иона  $Ca^{2+}$  с высокоаффинным рецептором  $[^3H]$ энкефалина

аналогичной предложенной в работе [5] для описания действия катионов на рецепцию  $[^3H]$ энкефалина, с той лишь разницей, что ионы  $Ca^{2+}$  оказывают ингибирующее действие на рецепцию  $[^3H]$ морфина, уменьшая сродство лиганда к высокоаффинному рецептору. Анализ схемы позволяет определить значения констант диссоциации комплексов ионов металлов с высокоаффинным рецептором  $[^3H]$ морфина ( $K_{Me}$ ), а также значения констант диссоциации комплексов ионов металлов с регуляторными катионсвязывающими участками высоко- ( $K_{Me1}$ ) и низкоаффинных ( $K_{Me2}$ ) рецепторов  $[^3H]$ энкефалина (см. таблицу). Значения  $K_{Ca1}$ ,  $K_{Ca2}$  и  $K_{Ca}$  на порядок отличаются от  $K_M$ .

Из литературы известно, что антагонист кальциевого транспорта — верапамил блокирует каналы, по которым осуществляется  $K^+$ -стимулируемый транспорт  $Ca^{2+}$  вовнутрь клетки [8, 9]. Нами показано, что верапамил в концентрациях до  $10^{-3}$  М не оказывает влияния на связывание  $[^3H]$ энкефалина с низкоаффинными рецепторами. В то же время на высокоаффинных рецепторах верапамил обратимо ингибирует связывание лиганда ( $IC_{50} = 0,3 \cdot 10^{-4}$  М), однако не конкурирует с ионами  $Ca^{2+}$  за катионсвязывающий участок рецептора (рис. 2).

Приведенные данные позволяют предположить, что центры связывания  $Ca^{2+}$  на ионном канале не совпадают с регуляторными катионсвязывающими участками опитных рецепторов. Это предположение подтверждается данными по конкурентному ингибированию ионами переходных металлов транспорта  $Ca^{2+}$ . Действительно, по эффективности ингибирования ионы металлов образуют следующий ряд [8]:  $Ni^{2+} > Co^{2+} > La^{3+} > Cd^{2+} > Mn^{2+}$ . Этот ряд не соответствует параметрам взаимодействия ионов металлов с высокоаффинными рецепторами  $[^3H]$ энкефалина. Ионы  $Ni^{2+}$  и  $Co^{2+}$  крайне слабо взаимодействуют с катионсвязывающим центром высокоаффинного рецептора. Ряд не соблюдается также и в случае низкоаффинных рецепторов  $[^3H]$ энкефалина и высокоаффинных —  $[^3H]$ морфина:  $K_{Mn2} < K_{La2}$  и  $K_{Mn} < K_{La}$  соответственно. Против предположения о прямой связи катионсвязывающих центров опитных рецепторов и кальциевых каналов говорят также следующие данные. Ионы  $Zn^{2+}$  являются ингибиторами кальциевого транспорта. Однако, как нами показано,  $Zn^{2+}$  не влияет на связывание  $[^3H]$ энкефалина с низкоаффинным рецептором, а на высокоаффинном рецепторе хотя и ингибирует связывание лиганда ( $IC_{50} = 7$  мМ), но не конкурирует с ионами  $Ca^{2+}$  за катионсвязывающий участок рецептора.

\*  $IC_{50}$  — концентрация ингибитора, снижающая связывание лиганда на 50%.

Значения констант диссоциации комплексов ионов металлов с высоко- ( $K_{Me1}$ ) и низкоаффинными ( $K_{Me2}$ ) рецепторами [ $^3H$ ]энкефалина и высокоаффинными рецепторами [ $^3H$ ]морфина ( $K'_{Me}$ ) при pH 7,4

Ион металла	$K_{Me1}$	$K_{Me2}$	$K'_{Me}$
	мкМ		
Ca <sup>2+</sup>	1050±98	2200±300	2600±400
Mn <sup>2+</sup>	210±70	70±18	75±6
Co <sup>2+</sup>	>5000	4,8±0,9	Не определено
Ni <sup>2+</sup>	>5000	1,8±0,2	6,6±0,5
La <sup>3+</sup>	40±12	210±48	270±35
Gd <sup>3+</sup>	14±5	5±1	11±2

Таким образом, результаты работы свидетельствуют о том, что регуляторные катионсвязывающие участки рецепторов энкефалина и морфина не идентичны центрам связывания ионов Ca<sup>2+</sup> на потенциалзависимых кальциевых каналах нейромембраны.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Chapman D. B., Way E. L. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1980, v. 20, p. 553-579.
2. Göthert M., Wehking E. Experientia, 1980, v. 36, № 2, p. 239-243.
3. Зайцев С. В., Породенко Н. В., Варфоломеев С. Д. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 829-851.
4. Кравцов Г. М., Рязжский Г. Г., Орлов С. Н. Биохимия, 1982, т. 47, № 12, с. 2006-2014.
5. Породенко Н. В., Зайцев С. В., Варфоломеев С. Д. Биооргани. химия, 1984, т. 10, № 7, с. 902-911.
6. Зайцев С. В., Породенко Н. В., Варфоломеев С. Д. Биооргани. химия, 1985, т. 11, № 2, с. 153-161.
7. Hajos F. Brain Res., 1975, v. 93, № 3, p. 485-489.
8. Kostyuk P. G. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 650, № 2, p. 128-150.
9. Janis R. A., Tuggles J. J. Med. Chem., 1983, v. 26, № 6, p. 775-785.

Поступило в редакцию  
18.II.1985

#### ARE THE REGULATORY CATION-BINDING SITES OF OPIATE RECEPTORS A PART OF POTENTIAL-STIMULATED CALCIUM CHANNELS OF NEUROMEMBRANE?

PORODENKO N. V., ZAITSEV S. V. \*, VARFOLOMEEV S. D. \*

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

Characteristics of <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> transport into rat brain synaptosomes have been studied. The value of an equilibrium constant of the Ca<sup>2+</sup> binding at a specific site of neuro-membrane's potential-stimulated calcium channel was determined ( $K_M=0,27±0,04$  mM). Stability constants of several metal-ion complexes with the cation-binding regulatory site at high- and low-affinity receptors for [*D*-Ala<sup>2</sup>, *D*-Leu<sup>5</sup>]enkephaline and morphine high-affinity receptors of rat brain membranes were estimated. Comparative analysis of the constants calculated along with the results of investigation of a calcium antagonist, Verapamil, and Zn<sup>2+</sup> ions influence on various types of opiate receptors allow to conclude that regulatory cation-binding sites of enkephaline and morphine receptors are not identical to Ca<sup>2+</sup>-binding centres of potential-stimulated calcium channels of the neuromembrane.