



УДК 577.175.8.02

**СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ЛИГАНДА  $\sigma$ -ОПИОИДНЫХ  
РЕЦЕПТОРОВ — N-АЛЛИЛНОРМЕТАЗОЦИНА  
(SKF 10047) — С МЕМБРАНАМИ ПЕЧЕНИ***Самовилова Н. Н., Ярыгин К. Н., Виноградов В. А.**Всесоюзный кардиологический научный центр  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Лиганд  $\sigma$ -опиоидных рецепторов — N-аллилнорметазоцин (SKF 10047) — специфически и обратимо связывается с мембранами печени крысы. По ряду свойств центры связывания SKF 10047 в печени похожи на  $\sigma$ -опиоидные рецепторы центральной нервной системы. Они не взаимодействуют с классическими опиатами (морфином, налоксоном) и опиоидными пептидами, но хорошо связывают бензоморфаны (бремазоцин, SKF 10047) и ряд соединений различной химической структуры с выраженным психотропным действием (галоперидол, имипрамин, фенциклдин и др.).

Фармакологические и биохимические данные указывают на то, что опиоиды и эндогенные опиоидные пептиды взаимодействуют с несколькими типами специфических рецепторов. Фармакологические методы позволяют выделить четыре типа опиоидных рецепторов:  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ,  $\sigma$  [1–3]. Биохимически хорошо охарактеризованы первые три типа. В последнее время появились работы, в которых приведена биохимическая характеристика  $\sigma$ -опиоидных рецепторов центральной нервной системы [4–7]. Показано, что специфическими лигандами этих рецепторов являются N-аллилнорметазоцин (SKF 10047), циклазоцин и 3-(3'-оксифенил)-N-пропилпиперидин [7–10].  $\sigma$ -Рецепторы отличаются от опиоидных рецепторов других типов по распределению в центральной нервной системе и по специфичности связывания различных биологически активных соединений [4–7]. Так,  $\sigma$ -рецепторы практически не взаимодействуют с классическими опиатами (морфином, налоксоном) и опиоидными пептидами, но хорошо связывают ряд соединений различной химической структуры с выраженным психотропным действием, причем в отличие от других типов опиоидных рецепторов обладают более высокой аффинностью по отношению к (+)-изомерам этих соединений.

В настоящей работе получены данные, свидетельствующие о существовании в печени специфических центров связывания SKF 10047, сходных по свойствам с  $\sigma$ -рецепторами центральной нервной системы.

Для изучения взаимодействия SKF 10047 с мембранами печени крыс использован радиоактивно меченый лиганд. На рис. 1 приведена кривая, отражающая кинетику специфического связывания [ $^3\text{H}$ ]SKF 10047 с этими мембранами. Видно, что количество связанного лиганда достигает максимальной величины через 40 мин инкубации, а затем несколько уменьшается, что, возможно, обусловлено постепенной инактивацией центров связывания. Добавление 1000-кратного избытка немеченого лиганда приводит к диссоциации образовавшихся комплексов ( $\tau_{1/2}$  2,5 мин), которая полностью завершается через 40 мин (рис. 2). Изотерма связывания SKF 10047, построенная в координатах Скэтчарда, представляет собой прямую (рис. 3), что свидетельствует о взаимодействии лиганда лишь с одним типом центров связывания. Найденные на основании этой изотермы значения константы диссоциации комплексов ( $K_d$ ) и концентрации центров связывания ( $B_{\text{макс}}$ ) равны соответственно 190 нМ и 9300 фмоль/мг белка.

Взаимодействие [ $^3\text{H}$ ]SKF 10047 с мембранами мозга крыс носит иной характер. Криволинейность изотермы равновесного связывания в координатах Скэтчарда (рис. 4) указывает на то, что в мозге существует не-

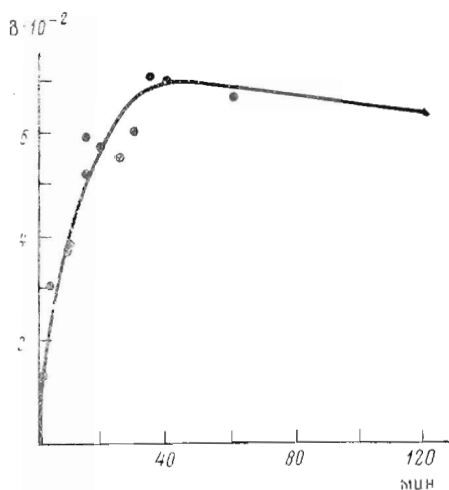


Рис. 1

Рис. 1. Кинетика специфического связывания  $[^3\text{H}]\text{SKF 10047}$  с мембранами печени крыс. Концентрация меченого лиганда 14,5 нМ.  $B_t$  — концентрации связанного  $[^3\text{H}]\text{SKF 10047}$ , фмоль/мг белка

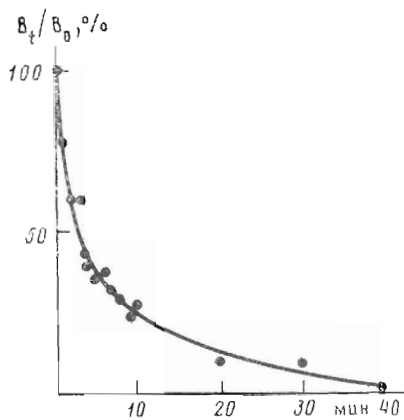


Рис. 2

Рис. 2. Кинетика диссоциации комплекса  $[^3\text{H}]\text{SKF 10047}$  с мембранами печени крыс. Мембраны печени предварительно инкубировали при 25°С в течение 45 мин в присутствии 2 нМ меченого лиганда, затем добавляли 1000-кратный избыток немеченого SKF 10047.  $B_t$  и  $B_0$  — концентрации связанного  $[^3\text{H}]\text{SKF 10047}$  в данный момент времени  $t$  и при  $t=0$

сколько типов центров связывания SKF 10047. Исходя из предположения, что таких центров два, с помощью графического метода [11] определены константы диссоциации соответствующих комплексов и концентрации центров связывания: для высокоаффинного центра  $K_d=0,69$  нМ,  $B_{\text{макс}}=125$  фмоль/мг белка, для низкоаффинного центра  $K_d=35$  нМ,  $B_{\text{макс}}=890$  фмоль/мг белка. Найденное значение  $K_d$  для низкоаффинного центра связывания близко к константе диссоциации комплекса  $[^3\text{H}]\text{SKF 10047}$  с  $\sigma$ -рецепторами [4, 5]. Таким образом, сравнение изотерм связывания  $[^3\text{H}]\text{SKF 10047}$  с мембранами печени и мозга показывает, что в обоих органах в довольно высоких концентрациях присутствуют центры, характеризующиеся близким средством к SKF 10047.

Нами были проведены эксперименты по ингибированию связывания  $[^3\text{H}]\text{SKF 10047}$  с мембранами печени и мозга различными биологически активными веществами и полученные результаты сопоставлены с литературными данными по связыванию с  $\sigma$ -опиоидными рецепторами центральной нервной системы крысы и морской свинки [4, 5]. В табл. 1 приведены значения  $\text{IC}_{50}$  для соединений, представляющих наибольший интерес, и перечислены вещества, оказавшиеся неактивными. Классические опиаты — морфин и налоксон, а также опиоидные пептиды практически не взаимодействуют с центрами связывания  $[^3\text{H}]\text{SKF 10047}$  в печени и с  $\sigma$ -рецепторами центральной нервной системы. Так же как и в случае  $\sigma$ -рецепторов, наиболее активным ингибитором связывания является галоперидол, несколько менее активны безморфаны бремасозин и SKF 10047, довольно высокой активностью обладают пропранолол, имипрамин, хлорпромазин и фенциклидин. Напротив, наилучшими ингибиторами связывания  $[^3\text{H}]\text{SKF 10047}$  с мембранами мозга являются налоксон, морфин и бензоморфаны. Галоперидол и фенциклидин имеют значительно меньшую активность, а пропранолол и имипрамин практически неактивны. По нашим данным и по данным других исследователей [3, 12, 13], в мембранах мозга существует два типа центров связывания  $[^3\text{H}]\text{SKF 10047}$ : высокоаффинные  $\mu$ -рецепторы и низкоаффинные  $\sigma$ -рецепторы [3].  $[^3\text{H}]\text{SKF 10047}$  при концентрации, которую мы использовали в ингибиторном анализе, взаимодействует преимущественно с высокоаффинными центрами связывания, т. е., по-видимому, с  $\mu$ -рецепторами. В таком случае найденные

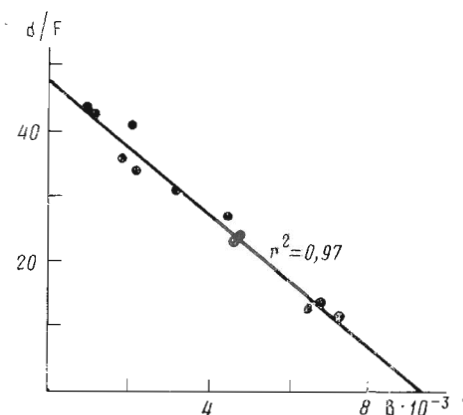


Рис. 3

Рис. 3. Связывание SKF 10047 с мембранами печени крыс. Мембраны инкубировали в присутствии 2 нМ [<sup>3</sup>H]SKF 10047 и 20–625 нМ немеченого SKF 10047. В — концентрация связанного SKF 10047, фмоль/мг белка, F — концентрация свободного лиганда, нМ

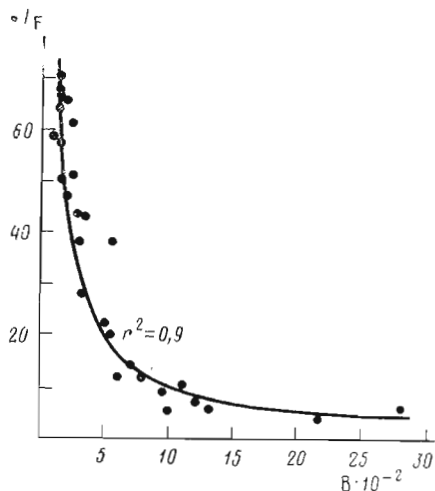


Рис. 4

Рис. 4. Связывание SKF 10047 с мембранами мозга крыс. Мембраны мозга инкубировали в присутствии 2 нМ [<sup>3</sup>H]SKF 10047 и 1–500 нМ немеченого SKF 10047. Обозначения те же, что и на рис. 3

значения  $IC_{50}$  для различных биологически активных соединений характеризуют их взаимодействие с  $\mu$ -рецепторами. Из табл. 1 видно, что чувствительность центров связывания [<sup>3</sup>H]SKF 10047 в печени к действию изученных ингибиторов практически идентична чувствительности  $\sigma$ -рецепторов центральной нервной системы и резко отличается от чувствительности  $\mu$ -рецепторов мозга.

Наличие центров специфического связывания [<sup>3</sup>H]SKF 10047 в печени крысы не является видовым признаком. Данные о связывании этого лиганда с мембранами печени мыши, морской свинки и человека (табл. 2) свидетельствуют, что центры связывания [<sup>3</sup>H]SKF 10047 присутствуют в печени всех перечисленных видов.

Таким образом, в печени млекопитающих имеются центры специфического связывания SKF 10047, по ряду свойств сходные с  $\sigma$ -рецепторами центральной нервной системы. Полученные данные являются первым указанием на присутствие специфических центров связывания SKF 10047 в органе не пейрального происхождения. Поскольку концентрация таких центров велика, трудно предположить, что они локализованы на расположенных внутри органов нервных элементах. Функциональное значение обнаруженных нами центров связывания SKF 10047 в печени неясно. Имеют ли они какое-нибудь отношение к известным эффектам  $\sigma$ -опиоидов (психотомиметические расстройства, влияние на сердечно-сосудистую, дыхательную системы и др.)? О том, что эти центры все же могут иметь какое-то физиологическое значение, свидетельствуют наши предварительные данные о наличии в экстрактах печени веществ, ингибирующих связывание [<sup>3</sup>H]SKF 10047 с мембранами печени (эндогенный лиганд?).

### Экспериментальная часть

В работе использованы следующие лиганды: сульфат атропина, дифосфат гистамина, креатинсульфат серотонина, гидрохлорид ( $\pm$ )-пропранолола, имипрамин, хлорпромазин (Sigma, США); гидрохлорид дофамина, битартрат норадреналина, октоамин (Koch-Light, Англия); мускарин, лизорфин<sub>1-13</sub>, нейротензин, фактор роста клеток печени (Calbiochem, ФРГ); галоперидол (Gedeon Richter, ВНР); тубокурарин (Orion Pharma-

Нигибирование связывания [<sup>3</sup>H]SKF 10047 с мембранами печени и мозга крысы различными биологически активными соединениями

Соединение	IC <sub>50</sub> , нМ			
	печень крысы *	мозг крысы *	о-опиоидный рецептор центральной нервной системы	
			мозг крысы **	мозг морской свинки ***
(+)-SKF 10047			50±8	294±45
(-)-SKF 10047			1000±80	2420±410
(±)-SKF 10047	154±6,7 (3)	6,5±2,5 (3)		
Бремазолин	101±1,5 (3)	0,8±0,4 (2)	190±32	
Налоксон	> 100 000 (3)	<1 (2)	> 100 000	> 25 000
(+)-Морфин				> 25 000
(-)-Морфин				> 25 000
(±)-Морфин	> 10 000 (3)	1,7 (1)		
Фенциклидин	1 300 (2)	13 000±2900 (3)	1470±490	
(+)-Пропропранолол				2574±441
(-)-Пропропранолол				2600±613
(±)-Пропранолол	290±66 (2)	> 100 000 (2)	320±80	627±31
Галоперидол	15±5,2 (3)	2 000 (1)	12±4	7±0,5
Имипрамин	316 (1)	63 000 (1)		231±9
Хлорпромазин	<1 000 (1)			443±63

\* Собственные данные: 50 нМ трис-НСl (рН 7,7), инкубирование при 25°С, 2 нМ [<sup>3</sup>H] SKF 10047, неспецифическое связывание определяли в присутствии 10 мкМ немеченого SKF 10047. В скобках указано число проведенных экспериментов. Соединения, не нигибирующие связывание [<sup>3</sup>H]SKF 10047 с мембранами печени крысы: фентоламин и атропина (IC<sub>50</sub>>10 мкМ); гистамин, серотонин, диазепам, адреналин, норадреналин, октонамин, мускарин, тубокурарин, α-эндорфин, γ-эндорфин, Туг-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg (даларгин) и некоторые его структурные аналоги, Туг-D-Ala-Gly-Phe-Leu, Туг-Gly-Gly-Phe-Leu, Туг-Gly-Gly-Phe-Met, динорфин-1а, пептидный морфоген из гидры, нейротензин, фактор роста клеток печени (IC<sub>50</sub>>100 мкМ).

\*\* Данные Тама [5]: 50 мМ трис-НСl (рН 7,4), инкубирование при 20°С, 5 нМ [<sup>3</sup>H] этилкетотрициклозона в присутствии 1 мкМ налоксона или 2 нМ (+)-[<sup>3</sup>H]SKF 10047, неспецифическое связывание определяли в присутствии 10 мкМ этилкетотрициклозона или 10 мкМ SKF 10047.

\*\*\* Данные Сю [4]: 100 мМ трис-НСl (рН 7,4), инкубирование при 22°С, 1 нМ [<sup>3</sup>H]SKF 10047 в присутствии 100 нМ (-)-эторфина, неспецифическое связывание определяли в присутствии 100 мкМ SKF 10047.

Таблица 2

Связывание [<sup>3</sup>H]SKF 10047 с мембранами печени млекопитающих \*

Биологический вид	Связывание [ <sup>3</sup> H]SKF 10047, фмоль/мг белка
Мышь	1335
Крыса	190
Морская свинка	145
Человек **	84

\* Мембраны печени (300—400 мкг белка) инкубировали в присутствии 3,2 нМ [<sup>3</sup>H]SKF 10047 при 25°С в течение 45 мин.

\*\* Концентрация [<sup>3</sup>H]SKF 10047 2,4 нМ.

ceuticals, Финляндия); фентоламин (Ciba-Geigy, Швейцария); гидрохлорид (±)-налоксона (Endo Laboratories, США); сульфат (±)-морфина (СССР); (±)-[<sup>3</sup>H]SKF 10047 (40 Ки/ммоль, New England Nuclear, США). (±)-SKF 10047 и (±)-бремазолин получены от д-ра Рёмера (Sandoz, Швейцария); фенциклидин и диазепам любезно предоставлены Г. Я. Бакалкиным (Минздрав СССР) и В. А. Ткачуком (ВКНЦ АМН СССР). α-Эндорфин, γ-эндорфин, даларгин (Туг-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) и его структурные аналоги, [метионин]энкефалин, [лейцин]энкефалин, пептидный морфоген из гидры (Туг-Met-Gly-Pro-Phe-Leu) синтезированы в лаборатории синтеза пептидов ВКНЦ АМН СССР классическими методами и охарактеризованы по хроматографической подвижности, аминокислотному составу и ЯМР-спектру.

Связывание [ $^3\text{H}$ ]SKF 10047 с мембранами печени и мозга. В опытах использовали самцов крыс Wistar, мышей Balb/c и беспородных морских свинок. После декапитации животных быстро извлекали печень и мозг с мозжечком и гомогенизировали в холодном 50 мМ трис-НСI-буфере (рН 7,7 при 25° С) с помощью гомогенизатора Brinkmann Polytron (Kinematica GmbH, Швейцария) (положение 5, 20 с). Гомогенат центрифугировали 10 мин при 49 000g (4° С), осадок суспендировали в 50 мМ трис-НСI-буфере (1:40, масса/объем). Суспензию инкубировали 40 мин при 37° С, затем центрифугировали 10 мин при 49 000g (4° С) и осадок суспендировали в том же буфере (1:20, масса/объем). В экспериментах по связыванию 200 мкл полученной суспензии, содержащей 200–500 мкг белка, инкубировали 45 мин при 25° С с [ $^3\text{H}$ ]SKF 10047 в присутствии или в отсутствие вытесняющего лиганда. По окончании инкубации пробы быстро фильтровали через стеклянные фильтры GF/B (Whatman, Англия), пробирки ополаскивали инкубационным буфером (2×1 мл), тем же буфером промывали фильтры (3×4 мл). Количество связавшегося лиганда оценивали по радиоактивности, которую измеряли с помощью жидкостного, сцинтилляционного счетчика Rackbeta II 1215 (ЛКВ, Швеция). Неспецифическое связывание [ $^3\text{H}$ ]SKF 10047 определяли в присутствии 10 мкМ SKF 10047.

Блок определяли по методу Лоури [14].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Zukin R. S., Zukin S. R. *Life Sci.*, 1981, v. 29, № 26, p. 2681–2690.
2. Paterson S. J., Robson L. E., Kosterlitz H. W. *Brit. Med. Bull.*, 1983, v. 39, № 1, p. 31–36.
3. Zukin R. S., Zukin S. R. *TINS*, 1984, v. 7, № 5, p. 160–164.
4. Za T.-P. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1982, v. 223, № 2, p. 284–290.
5. Tam S. W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci.*, 1983, v. 80, № 21, p. 6703–6707.
6. Tam S. W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci.*, 1984, v. 81, № 17, p. 5618–5621.
7. Largent B. L., Gundlach A. L., Snyder S. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci.*, 1984, v. 81, № 15, p. 4983–4987.
8. Gilbert P. E., Martin W. R. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1976, v. 198, № 1, p. 66–82.
9. Martin W. R., Eades C. G., Thompson J. A., Huppler R. E., Gilbert P. E. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1976, v. 197, № 3, p. 517–532.
10. Zukin R. S., Zukin S. R. *Mol. Pharmacol.*, 1981, v. 20, № 2, p. 246–254.
11. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. В кн.: Кинетические методы в биохимических исследованиях. М.: Изд-во МГУ, 1982, с. 285–292.
12. Pfeiffer A., Herz A. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1981, v. 101, № 1, p. 38–44.
13. Parternak G. W., Carroll-Buatti M., Spiegel K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1981, v. 219, № 1, p. 192–198.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. L. *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, № 1, p. 265–275.

Поступила в редакцию

22.II.1985

После доработки

12.V.1985

#### SPECIFIC BINDING OF N-ALLYLNORMETAZOCINE (SKF 10047), A LIGAND OF $\sigma$ -OPIOID RECEPTORS, TO RAT LIVER MEMBRANES

SAMOVILOVA N. N., YARYGIN K. N., VINOGRADOV V. A.

*All-Union Cardiology Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

A  $\sigma$ -opioid receptor ligand, N-allylnormetazocine (SKF 10047), binds specifically and reversibly to rat liver membranes. The rat liver binding sites for SKF 10047 are similar to  $\sigma$ -opioid CNS receptors. They fail to interact with classical opiates (morphine, naloxone) and opioid peptides but bind with high affinity benzomorphans (bremazocine, SKF 10047) and various psychotropic drugs (haloperidol, imipramine, phenacyclidine etc).