

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612.822.1:[547.95:547.943].014.46:577.175.829

©Коллектив авторов

РЕГУЛЯЦИЯ ОPIOИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ АНАЛОГАМИ ТИРОЛИБЕРИНА

А.М.Балашов¹, Т.Н.Алябьева², Л.Ф.Панченко²

¹Московский НИИ Психиатрии МЗ РФ
107076, Россия Москва, ул. Погешная; 3 тел./факс - 963-7249,
эл.почта: ambal1007@mtu-net.ru

²НИИ Наркологии МЗ РФ, Москва, Малый Магилевский пер.,3

С помощью радиолигандного анализа изучали способность тиролиберина (ТРГ) и его аналогов взаимодействовать с опиоидными рецепторами (ОР). При анализе влияния ТРГ на рецепцию [³H]-налоксона установлено, что гипоталамический гормон не изменяет уровень специфического связывания лиганда. Однако в присутствии ТРГ сродство высокоаффинных к налоксону связывающих участков возрастало с увеличением концентрации ТРГ в реакционной смеси, тогда как сродство низкоаффинных рецепторов изменялось противоположным образом. Кинетический анализ насыщения низкоаффинных рецепторов налоксоном в присутствии ТРГ позволил предположить существование, по крайней мере, двух субпопуляций связывающихся участков, различающихся по сродству к налоксону и механизму взаимодействия с трипептидом. Установлено, что на связывание лиганда с рецепторами, характеризующимися наименьшим сродством, ТРГ влияет по механизму неконкурентного ингибирования, тогда как относительно селективную рецепцию пептид ингибирует конкурентно. Высказано предположение об аллостерическом характере влияния ТРГ на ОР.

Проведена сравнительная оценка способности аналогов ТРГ изменять связывающие параметры ОР. Исследованные пептиды не влияли на рецепцию [³H]-Д-ала²-энкефамин (5-D-лей) в анализе вытеснения, при этом по разному изменяя аффинность ОР. Способность повышать сродство δ-рецепторов изменяется в ряду: дигидрооротил-гистидил-пролинамид (ИОС 8-1101) > ТРГ > метионил-аспарагил-фенилаланинамид (МАФ), что соответствует данным литературы об относительной способности этих соединений влиять на дофаминергические процессы.

Ключевые слова: опиоидные рецепторы, тиролиберин, аллостерическая регуляция.

ВВЕДЕНИЕ. Многочисленные научные факты, полученные к настоящему времени, не позволяют сомневаться, что химическая передача сигнала от одного нейрона к другому в синапсе является лимитирующим звеном в проведении нервного импульса. Представляя собой сложно организованную структуру, синапс испытывает многочисленные регуляторные влияния. Наиболее изученным представляется процесс саморегуляции, реализующейся по принципу

было противоположным: аффинность рецепторов этого подтипа уменьшалась при добавлении трипептида. Сопоставление полученных результатов с нашими ранними данными о модификации ТРГ связывания ДАДЛ [7] позволяет сделать несколько заключений. Во-первых, ТРГ не взаимодействует со связывающим центром ОР и это отсутствие взаимодействия не зависит от природы, характера связывания или селективности опиоидного лиганда. Во-вторых, ТРГ модифицирует сродство ОР к налоксону, что в целом подтверждает предположение о возможности влияния ТРГ на опиоидную рецепцию по типу аллостерической регуляции. В-третьих, различия в направленности эффекта ТРГ на рецепцию ДАДЛ и налоксона делают оправданным предположение о гетерогенности мест регулирующего связывания гипоталамического гормона на ОР.

Таблица 1. Влияние ТРГ на сродство ОР к [³H]-налоксону в головном мозге крыс.

Концентрация ТРГ (мкМ)	K _D ОР (нМ)	
	высокоаффинное связывание	низкоаффинное связывание
0	2,0 ± 0,4	5,2 ± 0,8
0,1	1,4 ± 0,6	7,9 ± 1,1*
1	1,0 ± 0,3*	9,1 ± 0,5**

Примечание: Представлены результаты 3 независимых определений для каждой концентрации ТРГ. Достоверность отличия данных от контроля ([ТРГ] = 0): *p < 0,5, **p < 0,01.

Как следует из результатов, представленных в таблице 1, конечным результатом действия ТРГ на низкоаффинный компонент связывания налоксона является ингибирование за счет уменьшения сродства к налоксону. Таким образом, для анализа насыщения низкоаффинного связывания формально применимо преобразование Lineweaver-Burk [9].

На рисунке приведен анализ результатов насыщения налоксоном низкоаффинных рецепторов в координатах Lineweaver-Burk. Обращает на себя внимание тот факт, что изотерма имеет вид ломаной линии (А); это обстоятельство само по себе может означать наличие неоднородности в данной субпопуляции ОР. Добавление ТРГ приводит к усилению излома кривой и, следовательно, более выраженной гетерогенности. Кроме того, приведенные на рисунках 1Б и 1В данные о влиянии пептида на выявляемые подтипы связывающих участков свидетельствуют о различных типах ингибирования, вызываемого ТРГ. Так, на рецепторы с меньшим сродством он влияет по механизму неконкурентного ингибирования, тогда как связывание налоксона с относительно селективными рецепторами этот пептид ингибирует конкурентно. Последнее обстоятельство позволяет предполагать, что ТРГ может оказаться способным к вытеснению налоксона из связывающих участков выявленного "промежуточного" подтипа ОР. Однако прямые доказательства этого получены не были, поскольку результаты анализа вытеснения (см. выше) складываются из разнонаправленного влияния ТРГ на разные подтипы ОР. Более того, данные по определению эффекта трипептида на высокоаффинные и наименее низкоаффинные рецепторы к налоксону позволяют более уверенно говорить о взаимодействии ТРГ в локусе, отличном от связывающего центра. Возможно, это утверждение справедливо в отношении всех популяций ОР. С большой долей вероятности полученные результаты позволяют предполагать наличие множественности центров связывания ТРГ на ОР, взаимодействие с которыми вызывает различное изменение связывающих параметров активного центра.

Предположение о гетерогенности мест взаимодействия ТРГ с ОР в определенной степени делает понятным результаты физиологических тестов, в которых констатировали различное модифицирующее действие гормона на разные фармакологические эффекты морфина [2, 3, 5]. Вероятно, анальгетическое действие морфина обусловлено высокоаффинными (к налоксону) рецепторами, тогда как угнетение наркотиком дыхания опосредовано низкоаффинными связывающими участками.

РЕГУЛЯЦИЯ ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

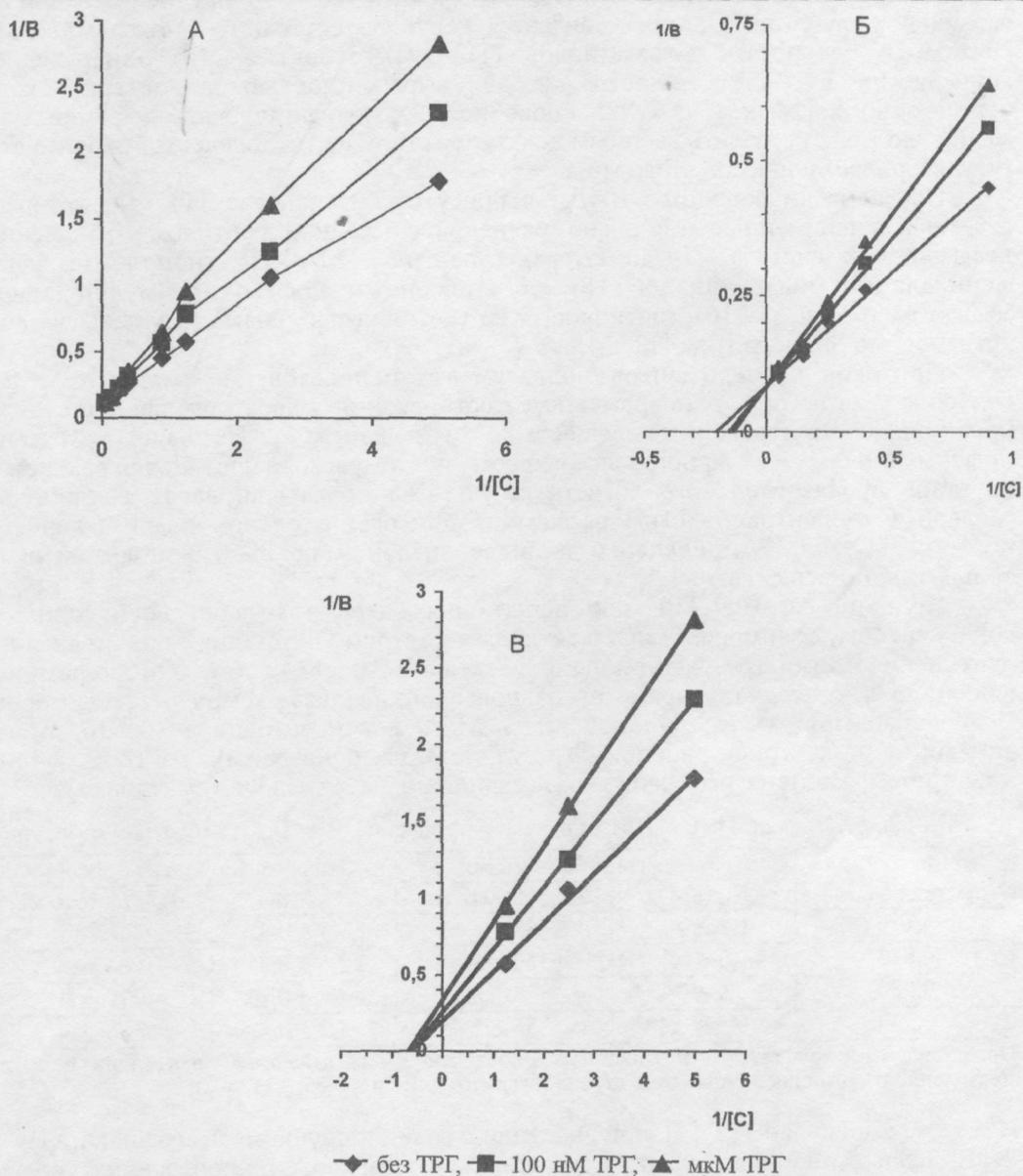


Рисунок.

Влияние ТРГ на низкоаффинные к налоксону ОР (ингибиторный анализ).

Возможно, различия в активности субпопуляций ОР лежат в основе генетической предрасположенности к опиатам. Так в работе [4] было показано, что ТРГ блокировал подкрепляющие свойства морфина только у животных, склонных к потреблению наркотика. Можно полагать, что предпочитающие и отвергающие морфин животные исходно различаются по чувствительности низкоаффинных рецепторов к гормону. Результаты, косвенно подтверждающие последнее предположение, можно найти в многочисленных молекулярно-генетических работах, посвященных исследованию полиморфизма опиоидных рецепторов [10].

Вторая часть работы посвящена анализу полученных нами прежде результатов по влиянию ТРГ на рецепцию ДАДЛ [7]. Необходимо отметить, что установленный факт увеличения сродства δ -рецепторов в присутствии гипоталамического гормона, если это явление имеет функциональный смысл,

должно отражаться на активности ОР. С нейрхимической точки зрения одной из важнейших функций ОР представляется контроль состояния катехоламиновых систем (в частности, дофаминовой [11, 12]). Понятно, что обнаружение корреляции в ряду веществ между выраженностью аллостерического регуляторного эффекта на ОР и способностью модифицировать дофаминовую медиацию может служить весомым доказательством физиологической значимости регуляторных процессов этого типа.

Исследовали рецепцию ДАДЛ в присутствии аналогов ТРГ, для которых известны существенные отличия по сравнению с исходным пептидом в отношении дофаминовой системы. Были выбраны пептиды: МАФ (метионил-аспарагил-фенилаланинамид) - аналог ТРГ со сниженным дофамин-стимулирующим эффектом и ИОС 8-1101 (дигидрооротил-гистидил-пролинамид) с повышенной активностью данного типа [13, 14].

Протокол экспериментов подразумевал использование слепого метода контроля, когда при одновременном тестировании оператору предоставляли пробирки, пронумерованные "вещество 1" и "вещество 2". Не было также дано информации о молекулярной массе веществ, поэтому в ходе постановки реакции и на этапе предварительного обчета результатов применяли весовые единицы. Молярная концентрация была рассчитана при окончательном анализе данных, поэтому в табл. 2 приведены дробные значения реально использованных концентраций веществ.

Подобно самому ТРГ оба испытанных вещества были неспособны к конкурентному взаимодействию с активным центром ОР при проведении анализа вытеснения метки (результаты не приведены). Вместе с тем, они по-разному влияли на кинетические параметры равновесного анализа насыщения рецепторов. Если добавление в реакционную смесь МАФ в концентрациях 10^{-10} - 10^{-3} М не влияло на показатели рецепции (результаты не приведены), то ИОС 8-1101 вызывал выраженные изменения связывающих параметров ОР (см. табл. 2).

Таблица 2. Влияние ИОС 8-1101 на показатели рецепции [³H]-ДАДЛ в головном мозге крыс.

Концентрация пептида (мкМ)	Высокоаффинное связывание		Низкоаффинное связывание	
	K _D (нМ)	V _{макс} (фмоль/мг)	K _D (нМ)	V _{макс} (фмоль/мг)
0	1,3 ± 0,1	58 ± 2	7,5 ± 0,8	86 ± 14
0,023	1,0 ± 0,1	56 ± 2	2,5 ± 0,2**	64 ± 2
0,233	0,9 ± 0,1**	58 ± 2	4,2 ± 0,1**	77 ± 3
2,333	0,7 ± 0,1**	55 ± 2	4,2 ± 0,4*	85 ± 5

Представлены результаты 6 независимых определений для каждой концентрации пептида. Достоверность отличия данных от контроля [без пептида]: *p < 0,05, **p < 0,01.

Как и в случае ТРГ [7], при внесении в реакционную смесь его аналога ИОС 8-1101 содержание рецепторов в тканях мозга оставалось на постоянном уровне, (однако пептид вызывал изменения в средстве связывающих участков). При этом характер изменений был одинаков в отношении ОР δ-типа и противоположен для μ-рецепторов. Разнонаправленный характер влияния испытанных веществ на показатели сродства ОР разных субпопуляций позволяет считать маловероятным высказанное нами ранее предположение о возможном неспецифическом влиянии пептидов на микроокружение рецептора [7], оставляя при этом как наиболее приемлемое предположение о реализации механизма аллостерической регуляции. Вопрос о расположении предполагаемого аллостерического модуляторного центра (или центров) на ОР и их количестве остается в настоящее время открытым. Однако, приведенные результаты могут свидетельствовать о множественности таких участков (схожая точка зрения высказывалась ранее в литературе [15]).

Предположение о возможной функциональной значимости феномена аллостерической регуляции ОР вытекает из следующего краткого анализа. В литературе имеются указания на то, что опиоидзависимая активация дофаминовой

РЕГУЛЯЦИЯ ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

системы может опосредоваться через ОР δ -типа [16]. Количественное сравнение испытанных трипептидов по их эффективности изменять сродство δ -рецепторов (включая данные, полученные нами прежде [7]) позволяет ранжировать их следующим образом: ИОС 8.1101>ТРГ>МАФ. Этот ряд полностью соответствует рангам соединений согласно их относительной способности влиять на дофаминергические процессы [13, 14]. Следовательно, можно предполагать, что ТРГ (и его аналоги) через усиление рецепции δ -типа по механизму аллостерической регуляции вызывает активацию δ -зависимых опиоидергических процессов, в конечном счете приводя к изменениям функций дофаминовой системы.

Явление аллостерической регуляции рецепторных структур в настоящее время интенсивно исследуется. В литературе имеются многочисленные свидетельства значимости аллостерических процессов в поддержании функционирования моноаминовых, пептидэргических, аминокислотных, гормональных и других систем (см. обзор [17]). Описана регуляция опиоидных рецепторов по аллостерическому механизму такими разными по химической структуре соединениями как бромкриптин [18], производные тетрагидроизохинолина [19, 20], оксиморфон [21], алкалоиды каннабиса [22], альфа-интерферон [23], D-серин [24]. Представляется вероятным, что дальнейшие изыскания в этом направлении могут привести к созданию новых классов фармацевтических препаратов для лечения патологических процессов, обусловленных нарушениями функционирования рецепторных систем [25] и, прежде всего, опиоид-зависимых наркологических заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Akil H, Owens C, Gutstein H, Taylor L, Curran E, Watson S. (1998) Drug Alcohol Depend., **51**, 127-140.
2. Булаев В.М., Войнов В.А., Лосев Н.И. (1984) Бюлл. эксп. биол. мед., № 3, 408-410.
3. Закусов В.В., Булаев В.М., Ганьшина Т.С. (1983) Бюлл. эксп. биол. мед., № 9, 61-63
4. Борисова Е.В., Судаков С.К. (1995) Ж. высш. нервн. деят. им. И.П.Павлова, **45**, 1174-1181.
5. Гусева А.А., Гурская И.Е., Романовский П.И., Ашмарин И.П. (1994) Бюлл. эксп. биол. мед., № 8, 1179-1181.
6. Holaday J.W., D'Amato R.J., Faden A.I. (1981) Science, **213**, 216-218
7. Балашов А.М., Щурин М.Р. (1986) Бюлл. эксп. биол. мед., № 8, 174-176
8. Балашов А.М., Балакирева Н.Н., Брусков О.С., Панченко Л.Ф. (1981) Биохимия, **46**, 1067-1072.
9. Lineweaver H., Burk D. (1934) J. Amer. Chem. Soc., **56**, 658-662.
10. Schinka J.A., Town T., Abdullah L., Crawford F.C., Ordorica P.I., Francis E., Hughes P., Graves A.B., Mortimer J.A., Mullan M. (2002) Mol Psychiatry, **7**, 224-228.
11. Buydens P., Velkeniers B., Golstein J. (1987) Life Sci., **40**, 1207- 1214.
12. Rauhala P. (1988) Acad. Diss., Helsinki, 1-41.
13. Мисиньш И.П., Клуша В.Е. (1986) Бюлл. эксп. биол. мед., № 1, 50-52.
14. Мисиньш И.П. (1988) Автореф. дисс. канд. биол. наук, Л., 1-21.
15. Demoliou-Mason C.D., Barnard E.A. (1986) J. Neurochem., **46**, 1118-1128.
16. Longoni R., Cadoni C., Mulas A., Di Chiara G., Spina L. (1998) Behav. Pharmacol., **9**, 9-14.

17. *Kukkonen J.P., Nasman J., Akerman K.E.* (2001) *Trends Pharmacol Sci.*, **22**, 616-622.
18. *Ogawa N., Yamawaki Y., Kuroda H., Ofuji T.* (1981) *Neurosci Lett.*, **23**, 215-218.
19. *Панченко Л.Ф., Брусов О.С., Балашов А.М., Гриневич В.П., Островский Ю.М.* (1982) *Вопр. мед. химии*, **28**, № 5, 88-92.
20. *Ярыгин К.Н., Ахундова О.Н., Котин А.М.* (1991) *Биоорг. химия*, **17**, 1172-1176
21. *Rothman R.B., Bowen W.D., Herkenham M., Jacobson A.E., Rice K.C., Pert C.B.* (1985) *Mol. Pharmacol.*, **27**, 399-409.
22. *Vaysse P.J., Gardner E.L., Zukin R.S.* (1987) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **241**, 534-539.
23. *Панченко Л.Ф., Алябьева Т.Н., Петриченко О.Б., Бумялис В.В., Балашов А.М.* (1988) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, № 9, 307-309.
24. *Hunter J.C., Atwal P., Woodruff G.N., Singh L.* (1994) *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 1002-1003.
25. *Narita M., Funada M., Suzuki T.* (2001) *Pharmacol. Ther.*, **89**, 1-15.

Поступила 05.02.02.

REGULATION OF OPIOID RECEPTORS BY THYROLIBERIN ANALOGUES

A.M.Balashov¹, T.N.Alyabieva², L.F.Panchenko²

¹Research Institute for Psychiatry, Ministry of Public Health
ul. Poteshnaya, 3, 107076 Moscow, Russia, tel./fax: +7 095 963 7249.
E-mail: ambal1007@mtu-net.ru

²Research Institute for Drug Abuse, Ministry of Public Health,
Malyi Magiltsevskii hane, 3, Moscow.

The ability of thyroliberin (TRH) to interact with opioid receptors (OR) was studied using radioligand analysis. TRH did not influence specific binding of [³H]-naloxone, but increased affinity of high affinity binding sites for the ligand in a dose-dependent manner. TRH also decreased affinity of low-affinity binding sites. Kinetic analysis of low-affinity binding sites suggests the existence of at least two subpopulations of OR, which differed in their affinity to naloxone and mode of interaction with TRH. TRH acted as non-competitive and competitive inhibitor of receptor binding sites with the lowest and moderate affinity, respectively. The allosteric pattern of TRH influence on OR with high and the lowest affinity to naloxone was suggested.

TRH analogues were estimated for their ability to change in OR binding characteristics. The level of [³H]-DADL specific binding was not influenced by the peptides tested but the affinity was changed. Blind control experiment showed the ability of the TRH relative substances to increase in affinity of d-receptors could be ranked in the row: dihydroorotyl-histidyl-prolinamide>TRH>methionyl-asparagyl-phenylalaninamide. This is consistent with ability of these compounds to influence the dopaminergic events.

Key words: opioid receptors, thyroliberin, allosteric regulation.