



УДК 613.33 : 576.8.697.1

© 1991 г.

*Е. Н. Ярыгин, О. Н. Анкудинова, А. М. Котин***ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТЕТРАГИДРОИЗОХИНОЛИНОВ
И 3-АМИНОТЕТРАЛИНОВ
С ОПИОИДНЫМИ μ -РЕЦЕПТОРАМИ***НИИ экспериментальной кардиологии Всесоюзного кардиологического научного центра
АМН СССР, Москва;*** Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград*

Изучено взаимодействие производных тетрагидроизохинолина (ТНІQ) и 3-аминотетралина (3-АТ) с опиоидными μ -рецепторами. Показано, что изучение соединения подобно «классическим» опиатам, также включающим в себя 3-аминотетралиновую группу, связываются с «непептидным» центром связывания μ -рецептора, который находится в сильно аллостерическом взаимодействии с центром связывания энкефалинов. Эволюция непептидных природных лигандов опиоидных рецепторов, вероятно, шла в направлении от простых производных 3-АТ к морфинанам и бензоморфанам. Высказывается предположение, что многие биологические эффекты производных ТНІQ и 3-АТ объясняются их взаимодействием с опиоидными рецепторами.

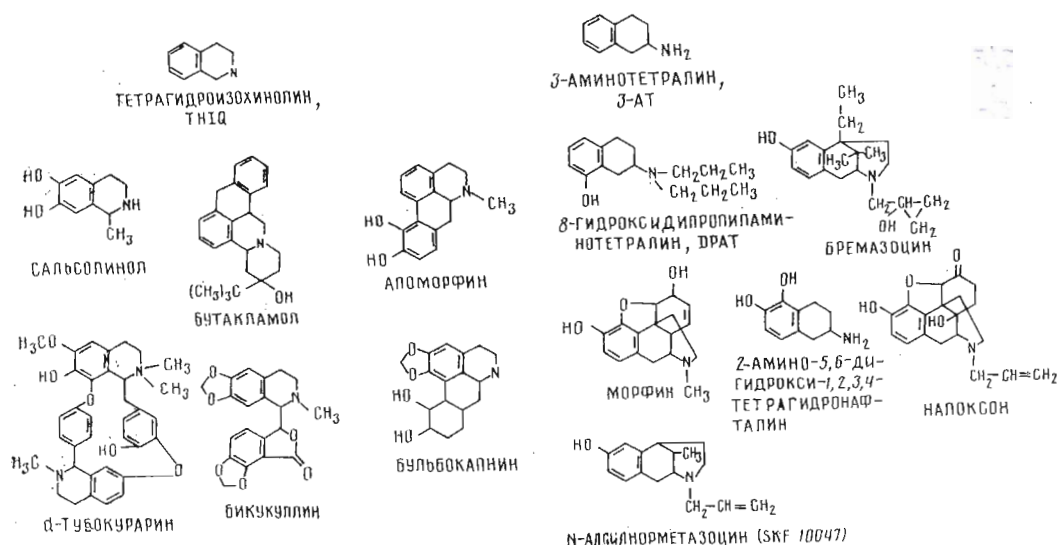
Современный этап изучения механизма действия опиатов начался после открытия опиатных рецепторов, специфически связывающих морфин и его структурные аналоги [1—3]. Вскоре были выделены первые эндогенные лиганды этих рецепторов — пентапептиды энкефалины [4], а затем и другие опиоидные пептиды, которые, как это было показано впоследствии, являются продуктами протеолитического процессинга трех высокомолекулярных предшественников — проэнкефалинов А и В и проопиомеланокортина [5]. Существовавшее в течение некоторого времени представление о монопольном положении этих пептидов как медиаторов межклеточной коммуникации в опиоидергической системе было подвергнуто сомнению, когда стало известно, что способностью взаимодействовать с опиатными рецепторами обладают и некоторые другие олигопептиды, образующиеся при гидролизе таких белков, как цитохром *b* и гемоглобин — цитохрофины [6] и геморфины [7]. Было также показано, что клетки животных способны синтезировать морфин [8], который, следовательно, является эндогенным опиоидом, и тетрагидроизохинолины, обладающие морфиноподобной активностью. Пептидные (экзорфины) [9, 10] и непептидные опиоиды обнаружены в пищевых продуктах.

Таким образом, лигандами опиатных рецепторов служат разные по химическому строению вещества, объединяемые понятием «опиоиды», в связи с чем сами рецепторы стали называть не «опиатными» (т. е. рецепторами, избирательно связывающими опиаты, к числу которых относятся морфин и его структурные аналоги), а «опиоидными».

«Классические» непептидные лиганды опиоидных рецепторов — это выделенный из мака *Papaver somniferum* алкалоид морфин и его структурные аналоги, представляющие собой довольно сложные соединения из классов морфинанов и бензоморфанов. Сравнительно недавно было показано, что способностью взаимодействовать с опиоидными рецепторами обладают более простые вещества — производные тетрагидроизохинолина (ТНІQ). Приводимые ниже данные наших экспериментов свидетельствуют о том, что существует еще одна группа непептидных лигандов опиоидных рецепторов — производные 3-аминотетралина (3-АТ). Настоящая работа посвящена исследованию кинетики взаимодействия производных ТНІQ и 3-АТ с опиоидными μ -рецепторами.

Производные ТНІQ привлекли к себе внимание исследователей в начале 70-х годов по нескольким причинам. Во-первых, эти соединения были обнаружены в моче пациентов, страдающих болезнью Паркинсона и получавших инъекции *L-DOPA* [11]. Во-вторых, было показано, что они могут синтезироваться при физиологических значениях температуры и рН путем неферментативной конденсации альдегидов с моноаминами [12]. Исходными субстратами в реакции конденсации могут служить, например, ацетальдегид и дофамин, а продуктом — сальсолинол. Оказалось, что сальсолинол и другие ТНІQ способны подобно морфину вызывать блокируемое налоксоном снижение уровня кальция в мозге крыс [13], ингибировать сокращения изолированной подвздошной кишки морской свинки [14] и индуцировать анальгезию [15, 16]. Было показано, что эти соединения стереоселективно подавляют связывание меченых опиоидов с рецепторами [16].

Сокращения: 3-АТ — 3-аминотетралин, АДТН — 2-амино-5,6-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидронафталин, ДРАТ — 8-гидроксидипропиламинотетралин, *L-DOPA* — дофамин, ТНІQ — тетрагидроизохинолин.



Производные 3-АТ до сих пор как самостоятельный класс соединений биохимически и фармакологическими методами не изучались. Как будет ясно из дальнейшего, присутствие в молекуле вещества 3-аминотетрапиновой структуры в определенной пространственной ориентации — достаточное условие его взаимодействия с μ -рецептором, что может служить основанием для более углубленного анализа фармакологических свойств производных 3-АТ. Следует иметь в виду, что к этой группе относятся все «классические» опиаты, а также ряд других природных и синтетических соединений, обладающих выраженной биологической активностью.

Как следует из приведенных формул, сальсолинол, бикукуллин, бутакламол и тубокуарин являются производными THIQ. Апоморфин и бульбокапнин можно рассматривать одновременно и как производные THIQ, и как производные 3-АТ. ADTN, DPAT, морфин, бремазоцин и N-аллилнорметазоцин представляют собой производные 3-АТ. Определенным структурным сходством с 3-АТ обладают опиоидные пептиды.

Представленные производные THIQ и 3-АТ способны ингибировать связывание специфического лиганда $[D-[^3H]Ala^2, Phe(Me)^3, Gly-ol]$ энкефалина ($[^3H]DAGO$) с μ -рецепторами (таблица).

Ингибирование производными тетрагидроизохинолина и 3-аминотетралина связывания 1,0 нМ $[^3H]DAGO$ с μ -рецепторами

Соединение	Концентрация, М	В/В ₀ *	Соединение	Концентрация, М	В/В ₀ *
Сальсолинол	$0,719 \cdot 10^{-7}$	98,3	(S)-(+)-Апоморфин	10^{-6}	115
	$0,719 \cdot 10^{-6}$	90,6		10^{-5}	106
	$0,719 \cdot 10^{-5}$	50,0		10^{-4}	81,3
	$0,719 \cdot 10^{-4}$	24,5	(±)-DPAT	10^{-6}	100
	10^{-6}	86,8		10^{-5}	84,8
d-Тубокуарин	10^{-5}	46,0		10^{-4}	39,0
	10^{-4}	16,4	(±)-ADTN	10^{-6}	90,7
	10^{-6}	117		10^{-5}	55,9
(—)-Бикукуллин	10^{-5}	101		10^{-4}	9,73
	10^{-4}	78,1	(—)-Бремазоцин	10^{-9}	71,5
	10^{-6}	107		10^{-8}	28,3
(+) -Бикукуллин	10^{-5}	99,1		10^{-7}	9,15
	10^{-4}	101	(±)-Бремазоцин	10^{-6}	106
	10^{-6}	91,2		10^{-5}	96,5
(—)-Бутакламол	$2 \cdot 10^{-5}$	76,5		10^{-4}	89,1
	10^{-4}	36,2	(—)-Налоксон	10^{-9}	66,3
	10^{-6}	106		10^{-8}	31,0
(+) -Бутакламол	$2 \cdot 10^{-5}$	81,6		10^{-7}	4,93
	10^{-4}	48	(+) -Налоксон	10^{-6}	102
	10^{-6}	122		10^{-5}	99,3
(+) -Бульбокапнин	10^{-5}	119		10^{-4}	86,3
	10^{-4}	95,9			
	10^{-6}	83,9			
(R)- (—)-Апоморфин	10^{-5}	83,6			
	10^{-4}	2,72			

* В/В₀ — отношение специфического связывания $[^3H]DAGO$ в присутствии и в отсутствие тестирующего вещества (в процентах).

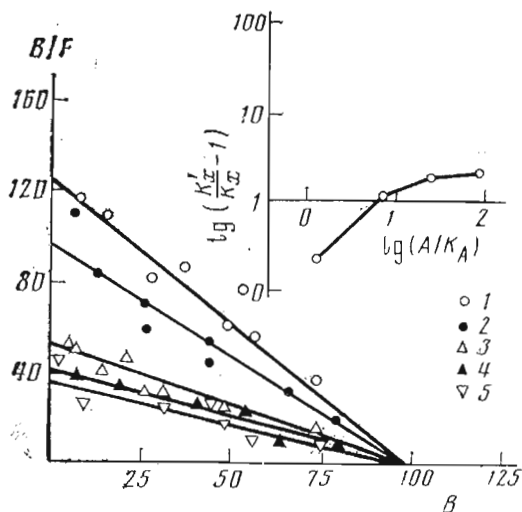


Рис. 1. Изотермы специфического связывания $[^3\text{H}]\text{DAGO}$ с мембранами мозга крысы в отсутствие сальсолинола (1) и в его присутствии в концентрации 5 (2), 30 (3), 100 (4) и 340 (5) мкМ в координатах Скэтчарда. На врезке — зависимость $\lg(K'_x/K_x - 1)$ от $\lg(A/K_A)$ (расшифровка символов дается в тексте)

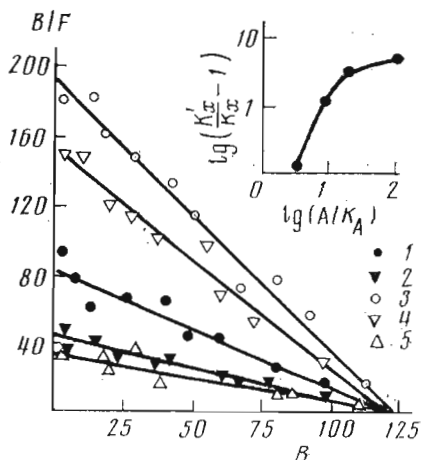


Рис. 2. Изотермы специфического связывания $[^3\text{H}]\text{DAGO}$ с мембранами мозга крысы в отсутствие ADTN (1) и в его присутствии в концентрации 20 (2), 50 (3), 100 (4) и 500 (5) мкМ в координатах Скэтчарда. На врезке — зависимость $\lg(K'_x/K_x - 1)$ от $\lg(A/K_A)$ (расшифровка символов дается в тексте)

Наиболее эффективными ингибиторами связывания $[^3\text{H}]\text{DAGO}$ из числа «чистых» THIQ являются сальсолинол и *d*-тубокурарин, бутакламол менее эффективен, бикукуллин же почти лишен активности. К сожалению, мы располагали лишь изомерами малоактивных соединений — бутакламол и бульбокапнина. Однако из таблицы видно, что (—)-изомеры THIQ более эффективны, чем (+)-изомеры, что соответствует литературным данным [16]. (—)-Изомеры всех без исключения производных 3-АТ ингибировали связывание метки с μ -рецепторами. (+)-Изомеры этих соединений (за исключением бутакламол) были практически неэффективны.

Отношение активности (—)- и (+)-изомеров представленных в таблице веществ, с помощью которого можно оценивать стереоселективность взаимодействия вещества с μ -рецептором, коррелировало с эффективностью (—)-изомера. Для (—)-изомеров «классических» опиатов величина IC_{50} (концентрация, в присутствии которой связывание $[^3\text{H}]\text{DAGO}$ подавляется на 50%) не превышала 10^{-8} М. (+)-Изомеры даже в концентрации 10^{-4} М практически не ингибировали связывание метки. Для (R)-(—)-апоморфина величина IC_{50} находилась в интервале концентраций 10^{-6} – 10^{-5} М, а (S)-(+)-апоморфин в концентрации 10^{-4} М вызывал лишь незначительное ингибирование связывания метки. Изомеры бутакламол мало различались по эффективности, а IC_{50} для (—)-изомера находилась в интервале концентраций $2 \cdot 10^{-5}$ – 10^{-4} М. Аффинность и стереоселективность производных 3-АТ в общем была выше по сравнению с производными THIQ .

Большой интерес представляет механизм ингибирования связывания $[^3\text{H}]\text{DAGO}$ производными THIQ и 3-АТ. Все изотермы специфического связывания $[^3\text{H}]\text{DAGO}$ с мембранами крыс в присутствии производного THIQ — сальсолинола (рис. 1) и ADTN — производного 3-АТ, не являющегося классическим опиатом (рис. 2), — прямые. При этом наклон изотерм, построенных в отсутствие немеченых лигандов, определяет константу диссоциации комплекса $[^3\text{H}]\text{DAGO}$ – μ -рецептор. Добавление ингибиторов приводит к уменьшению наклона изотермы к оси абсцисс без изменения величины отсекаемого на этой оси отрезка. Такой ход изотерм в координатах Скэтчарда соответствует двум теоретическим моделям: 1) модели конкуренции метки и немеченого лиганда за один и те же не взаимодействующие между собой центры связывания; 2) модели аллостерического взаимодействия между различающимися центрами связывания $[^3\text{H}]\text{DAGO}$ и немеченого лиганда, при котором связывание немеченого лиганда приводит к ингибированию связывания $[^3\text{H}]\text{DAGO}$ за счет изменения конформации рецептора. Дифференцировать эти модели можно по виду зависимости величины кажущейся константы диссоциации комплекса $[^3\text{H}]\text{DAGO}$ –рецептор в присутствии фиксированной концентрации немеченого лиганда (K'_x) от концентрации немеченого лиганда.

В случае конкуренции двух лигандов за одинаковые не взаимодействующие центры K'_x линейно зависит от концентрации немеченого лиганда, а при аллостерическом ингибировании наблюдается гиперболическая зависимость между этими величинами [17]. Зависимость K'_x от концентрации немеченого лиганда А может быть представлена в более удобных координатах, как это сделано на врезках рис. 1 и 2, где K_x — истинная рав-

новесная константа диссоциации комплекса рецептор — меченый лиганд, полученная в отсутствие немеченого ингибитора; K_A — константа диссоциации комплекса рецептор — немеченый лиганд (ингибитор), вычисленная на основании данных по ингибированию связывания $[^3H]DAGO$ производными $THIQ$ и 3-АТ с использованием уточненной формулы Ченга — Прусоффа [18]. Как видно из рис. 1 и 2, наши данные не соответствуют простой конкурентной модели. Можно предположить, что производные $THIQ$ и 3-АТ взаимодействуют с участками опиоидных μ -рецепторов, отличающимися от тех, с которыми связываются опиоидные пептиды, что приводит к изменению аффинности связывания $[^3H]DAGO$ с рецепторами.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о неконкурентном ингибировании производными $THIQ$ и 3-АТ связывания меченого пептидного лиганда с μ -рецепторами. Этот вывод подтверждает предположение о том, что μ -рецепторы обладают разными участками связывания для пептидных опиоидов и производных $THIQ$ и 3-АТ. Связывание последних со специфическим для них участком приводит к изменению конформации μ -рецептора, сопровождающемуся снижением его аффинности по отношению к пептидным опиоидам. Для подтверждения или опровержения этой модели необходимы дополнительные исследования. В частности, следовало бы изучить характер ингибирования (если таковое имеет место) опиоидными пептидами связывания сальсолинола и ADTN. Интересен также вопрос о том, идентичны ли участки связывания этих веществ и «классических» непептидных опиоидов, таких, как морфин. Для ответа на этот вопрос необходимо изучить кинетику ингибирования связывания $[^3H]$ морфина.

Представленный материал расширяет существующие знания о природных лигандах опиоидных рецепторов. Хотя аффинность связывания многих исследованных веществ с μ -рецепторами невысока, такого рода взаимодействия все же могут иметь место *in vivo*, поскольку некоторые из этих соединений присутствуют в крови и тканях в высоких концентрациях. Например, введение ацетальдегида значительно увеличивает содержание сальсолинола в некоторых зонах мозга [19]. Поскольку этанол после попадания во внутреннюю среду организма почти количественно превращается в ацетальдегид, высказано предположение [11], что после приема алкоголя в тканях должны создаваться высокие концентрации $THIQ$.

Почти все изученные нами вещества способны взаимодействовать с какими-то неопиоидными рецепторами. Так, *d*-тубокурарин является антагонистом Н-холино- и дофаминовых рецепторов, (+)-бремазоцин — лигандом σ и фенциклидиновых рецепторов, (+)- и (—)-биккуллин — антагонистами γ -аминомасляной кислоты. (+)-Бульбокапин, (+)-бутакамол и (S)-(+)-апоморфин являются антагонистами, а (R)-(-)-апоморфин и ADTN — агонистами дофаминовых рецепторов. DRAT — агонист серотониновых рецепторов.

На основании полученных данных может быть выдвинута следующая гипотеза. Можно предположить, что структуры $THIQ$ и 3-АТ являются «универсальными», т. е. определяющими способность веществ вступать в обратимое взаимодействие с белками, в том числе с рецепторами. Такое взаимодействие характеризуется относительно низкими сродством и стереоселективностью. В процессе эволюции часть белков приобрела способность принимать конформацию, особенно выгодную для связывания лишь некоторых веществ этих классов. При этом усиливались стереоселективность и аффинность связывания. Так можно представить себе один из механизмов возникновения и эволюции лигандсвязывающих участков рецепторов, в частности опиоидных.

Производные $THIQ$ и 3-АТ широко распространены в природе. Они продуцируются растительными и животными организмами и потому входят в состав пищевых продуктов, являясь действующим началом ряда лекарственных веществ, определяются в промышленных отходах. Обладая опиоидными свойствами, эти вещества, возможно, вызывают формирование толерантности и физической зависимости. Все это делает весьма актуальным дальнейшее изучение производных $THIQ$ и 3-АТ.

Множественность лигандов μ -рецепторов, конкурирующих за разные центры связывания, подтверждает гипотезу, согласно которой тип реакции клетки на гормон целиком определяется клеткой, а не гормоном. Основанием для выдвижения этой гипотезы послужили данные о том, что антитела против рецепторов, связываясь с последними, способны индуцировать такой же ответ клетки, что и агонисты этих рецепторов (см. ссылки в [20]). Было высказано предположение, что гормон и антитело связываются с идентичными участками рецептора. Если бы удалось показать, что опиоидные пептиды и производные $THIQ$ и 3-АТ, связываясь с опиоидными рецепторами, вызывают одинаковый ответ клетки, гипотеза получила бы хорошее экспериментальное обоснование.

Экспериментальная часть

$[^3H]DAGO$ (удельная радиоактивность 48 Ки/ммоль) синтезирован Н. Мясоедовым и Д. Зайцевым в Институте молекулярной генетики АН СССР из предшественника, изготовленного Ж. Беспаловой в ВКНЦ АМН СССР. Немеченый $DAGO$ синтезирован в лаборатории синтеза пептидов ВКНЦ АМН СССР. Морфинсульфат получен из Института фармакологии АМН СССР, (+)-налоксон, (+)- и (—)-бремазоцин — от проф. А. Херца из Института психиатрии им. Макса Планка (ФРГ), остальные производные $THIQ$ и 3-АТ — от фирмы RBI (США).

Получение препарата мембран мозга крыс. Крысы-самцы линии Wistar весом 180—200 г забивались декапитацией. Мозг взвешивали, промывали в холодном физиологическом растворе и гомогенизировали с помощью гомогенизатора Politron (позиция 7, 10 с) в ледяном 50 мМ буфере трис-HCl с pH 7,4. Отношение веса мозга к объе-

му буфера составляло 1 : 50. Мембраны осаждали центрифугированием, ресуспендировали в том же буфере и инкубировали 40 мин при 37° С. После повторного центрифугирования и ресуспендирования мембраны замораживали в жидком азоте и хранили до использования при -70° С.

Взаимодействие производных THIQ и 3-АТ с опиоидными μ -рецепторами. Селективное мечение μ -рецепторов осуществляли с помощью [³H]DAGO. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 500 нМ нераднорактивного лиганда. В экспериментах использовали препараты мембран с константой связывания 0,8 нМ и количеством участков связывания 49 фМ на 1 мг мембраносвязанного белка. В предварительных экспериментах было показано, что практически полная (95%) оккупация μ -рецепторов наблюдается уже при концентрации лиганда 100 нМ. Инкубацию мембран с меченым лигандом [³H]DAGO проводили в течение 1 ч при 25° С в 0,5 мл среды инкубации, содержащей 50 мМ трис-НСl с рН 7,4, 0,5% BSA, 0,2 мг/мл бацитрацина и немеченные лиганды в нужных концентрациях. При изучении ингибирования связывания [³H]DAGO немечеными соединениями концентрация метки была 1,4 нМ, при построении изотерм она варьировала от 0,1 до 4 нМ. Реакцию инициировали добавлением мембран. После инкубации связанную с мембранами метку отделяли фильтрованием под вакуумом (фильтры GF/C) и измеряли радиоактивность с помощью жидкостной сцинтилляционной спектрометрии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pert C. B., Snyder S. H. // Science. 1973. V. 179. № 4077. P. 1011—1014.
2. Simon E. J., Hiller J. M., Edelman I. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. P. 1947—1949.
3. Terenius L. // Acta pharmacol. et toxicol. 1973. V. 32. № 3—4. P. 317—320.
4. Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R. // Nature. 1975. V. 258. № 5537. P. 577—579.
5. Holtt V. // Trends Neurosci. 1983. V. 6. P. 24—26.
6. Brantl V., Gramsch Ch., Lottspeich F., Jaeger K.-H., Herz A. // Eur. J. Pharmacol. 1985. V. 111. № 2. P. 293—294.
7. Brantl V., Gramsch Ch., Lottspeich F., Mertz R., Jaeger K.-H., Herz A. // Eur. J. Pharmacol. 1986. V. 125. № 2. P. 309—310.
8. Kosterlitz H. W. // Nature. 1987. V. 330. № 6149. P. 606.
9. Zondrou C., Streaty R. A., Klee W. A. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 7. P. 2446—2449.
10. Brantl V., Teschemacher H. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1979. V. 306. P. 301—304.
11. Sandler M., Bonham Carter S., Hunter K. R., Stern G. M. // Nature. 1973. V. 241. № 5390. P. 439—443.
12. Davis V. E., Walsh M. J. // Science. 1970. V. 167. P. 1005—1007.
13. Ross D. H., Medina M. A., Cardenas H. L. // Science. 1974. V. 186. P. 63—65.
14. Hamilton M. G., Hirst M. // Eur. J. Pharmacol. 1976. V. 39. № 2. P. 237—243.
15. Marshall A., Hirst M., Blum K. // Experientia. 1977. V. 33. P. 754—755.
16. Fertel R. H., Greenwald J. E., Schwarz R., Wong L., Bianchine J. // Res. Commun. Chem. Path. Pharmac. 1980. V. 27. № 1. P. 3—16.
17. Tomlinson J., Hnatovich M. R. // J. Receptor Res. 1988. V. 8. № 6. P. 809—830.
18. Munson P. J., Rodbard D. // J. Receptor Res. 1988. V. 8. № 1—4. P. 533—546.
19. Myers W. D., Nh K. T., Singer G., Smythe G. A., Duncan M. W. // Brain Res. 1985. V. 158. № 1. P. 122—128.
20. Lichtstein D., Rodbard D. // Life Sci. 1987. V. 40. № 21. P. 2041—2051.

Поступила в редакцию
5.XI.1990

После доработки
15.IV.1991

K. N. YARYGIN, O. N. ANKUDINOVA, A. M. KOTIN * INTERACTION OF TETRAHYDROISOQUINOLINES AND 3-AMINOTETRALINES WITH OPIOID μ -RECEPTORS

Institute of Experimental Cardiology, Cardiology Research Centre of the USSR, Academy of Medical Sciences, Moscow;

** Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad*

The interaction of the tetrahydroisoquinoline (THIQ) and 3-aminotetraline (3-AT) derivatives with opioid μ -receptors has been studied. It is shown that THIQ and 3-AT derivatives bind to a site on the μ -receptor which these compounds are likely to share with «classical» opiates, whose structure also includes the 3-AT group. The binding site for nonpeptide substances is in a strong allosteric interaction with the binding site for enkephalins. Some biological effects of THIQ and 3-AT derivatives can be explained in terms of their interaction with opioid receptors. One may speculate that the evolution of the endogenous opioid receptor ligands proceeded from simple 3-AT derivatives towards morphinans and, probably, benzomorphans.