

УДК 577.352.:577.152.3

## ЭНДОГЕННЫЙ ИНГИБИТОР СПЕЦИФИЧЕСКОГО СВЯЗЫВАНИЯ [<sup>3</sup>H]УАБАИНА С Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазой ИЗ МОЗГА БЫКА

\*Корнеев А.Я., Левицкий Ю.А.,

Брусованик В.И.

\*НИИ фармакологии АМН СССР

МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва

Радиорецепторным методом исследовано АТФ/фосфатзависимое связывание [<sup>3</sup>H]уабаина с Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы мозга быка. В присутствии фосфата участки специфического связывания [<sup>3</sup>H]уабаина характеризуются K<sub>d</sub>=5,1 нМ и V<sub>max</sub>=2120 пМ/г ткани. Эндogenous ингибитор специфического связывания уабаина с величиной M<sub>i</sub> 500—1000 Д частично очищен из мозга быка при помощи кислотно-метанольной экстракции и гель-хроматографии.

\* \* \*

Градиент концентрации натрия и калия между клеткой и внеклеточной средой поддерживается при участии Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы. Особенно велика роль этого фермента в деятельности возбудимых тканей: мышц, сердца, нервной ткани, где мембранный потенциал подвержен постоянным и сильным изменениям [1-3].

Ингибиторами Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы являются сердечные гликозиды группы строфантина: уабаин, дигоксин, дигитоксин и другие. Эти соединения способны с высоким сродством и избирательностью связываться с регуляторным центром, локализованным на внешнем по отношению к клетке участке α-субъединицы фермента, что приводит к подавлению его активности [1,3]. Вместе с тем, в ряде работ показано, что сродство сердечных гликозидов к центрам специфического связывания уабаина и их способность ингибировать Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазу не коррелируют между собой [4]. Одно из возможных объяснений этих данных основано на предположении о существовании в организме соединений, способных модулировать активность Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы и/или конкурировать с гликозидами за места специфического связывания. В последнее время появились сообщения о выявлении таких соединений (в основном в плазме крови человека), однако их структура и способность в физиологических концентрациях действовать на Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазу остаются неизвестными [5,7,13,16]. В настоящей работе изучены параметры специфического связывания [<sup>3</sup>H]уабаина и [<sup>3</sup>H]дигоксина в коре мозга быка и свойства

присутствующего в мозгу ингибитора связывания [ $^3\text{H}$ ]уабаина, который, возможно, является одним из соединений, регулирующих активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в организме.

### Материалы и методы

Специфическое связывание [ $^3\text{H}$ ]уабаина и [ $^3\text{H}$ ]дигоксина (соответственно 15,5 и 16 Ки мМ, «Amersham», Англия) с 4-кратно отмытым в 30 объемах ледяного 50 мМ трис- $\text{HCl}$  буфера (рН 7,2) мембранами [8] мозга быка определяли, как описано ранее [3], с модификациями. Использовали два инкубационных буфера—буфер А: 20 мМ  $\text{HEPES}$ , 2,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 150 мМ  $\text{NaCl}$ , 1 мМ аскорбат, 3 мМ АТФ (аскорбат и АТФ вносили перед началом инкубации),  $\text{NaOH}$  до рН 7,2 при 20°; буфер Р: 50 мМ имидазол, 2,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , ортофосфорная кислота до рН 7,2 при 20°.

Суспензию мембран в конечном объеме 1 мл соответствующего буфера инкубировали при 37° в течение 90 мин с радиоактивным лигандом и добавками исследуемых веществ, после чего фильтровали под вакуумом через стекловолокнистые фильтры GF/B (2,4 см, «Whatman», Англия) и промывали 15 мл ледяного 50 мМ трис- $\text{HCl}$  буфера. Определяли радиоактивность, задержанную фильтрами.

Для оценки неспецифического связывания в инкубационную смесь добавляли уабаин до концентрации 5 мкМ. Общее связывание определяли в 3 параллельных пробах, неспецифическое—в двух и вычитали из первых значений вторые, чтобы получить величину специфического связывания. Специфическое связывание [ $^3\text{H}$ ]уабаина (1 нМ) и [ $^3\text{H}$ ]дигоксина (1 нМ) характеризуется насыщаемостью (выход на плато через 90 и 70 мин для буферов А и Р соответственно), обратимостью и пропорционально концентрации ткани в пробе содержит до 20 мг/мл для буфера А и до 4 мг/мл для буфера Р. Неспецифическое связывание для [ $^3\text{H}$ ]уабаина составляло 2—4% и для [ $^3\text{H}$ ]дигоксина до 18% от общего связывания. Кипячение мембран в течение 5 мин устраняло специфическое связывание обоих лигандов. Таким образом, описанные условия позволяют выявить центры специфического связывания сердечных гликозидов на мембранах нервных клеток.

### Результаты и обсуждение

Специфическое связывание [ $^3\text{H}$ ]уабаина и [ $^3\text{H}$ ]дигоксина в буфере Р было в 4—6 раз больше, чем при использовании буфера А. Необходимо отметить, что специфическое связывание в буфере А является обратимым только в присутствии аскорбата. В отсутствие АТФ (буфер А) или фосфата (буфер Р) специфическое связывание не выявляется. Внесение в буфер Р  $\text{NaCl}$  в концентрациях 15 и 150 мМ (характерных для внутри- и внеклеточной среды) ингибирует специфическое связыва-

ние [ $^3\text{H}$ ] уабаина (1 нМ) на 40 и 95% соответственно. Аналогичным образом »К»СI в концентрациях 150 и 4 мМ (внутри- и внеклеточная среда) ингибировал специфическое связывание [ $^3\text{H}$ ]уабаина на 96 и 90%.

Для оценки величины  $K_d$  и концентрации мест связывания ( $B_{\text{max}}$ ) [ $^3\text{H}$ ]уабаина определяли специфическое связывание при 5—6 разных концентрациях лиганда в диапазоне 1—40 нМ. Полученные данные представляли в координатах Скетчарда и обсчитывали методом линейной регрессии. При использовании буфера Р и концентрации ткани в пробе 0,5 мг/мл на мембранах клеток мозга быка были выявлены высокоаффинные места связывания [ $^3\text{H}$ ]уабаина с  $K_d = 5,4 \pm 1,1$  нМ и  $B_{\text{max}} = 2120 \pm 320$  пМ/г исходной ткани (коэффициент корреляции 0,93, рис.1). Обращает на себя внимание исключительно высокая плотность мест связывания уабаина в коре мозга как по сравнению с концентрацией рецепторов нейромедиаторов в мозгу (обычно до 200—300 пМ/г ткани), так и по сравнению с содержанием мест связывания уабаина в других органах, например, в сердце (300 пМ/г ткани) [3].

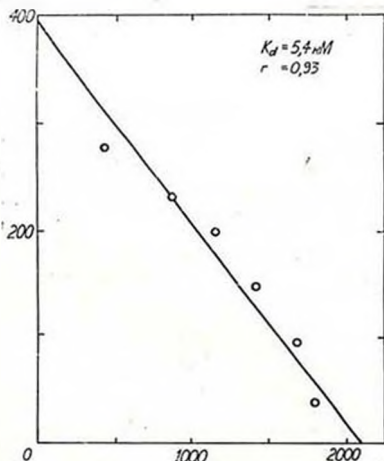


Рис.1. Сатурационный анализ специфического связывания [ $^3\text{H}$ ] уабаина с мембранами мозга быка. Данные получены при концентрации ткани в пробе 0,5 мг/мл для диапазона концентраций [ $^3\text{H}$ ]уабаина 1—40 нМ в буфере Р. По оси абсцисс-величина специфического связывания (SB) [ $^3\text{H}$ ]уабаина в пМ/г исходного веса ткани, по оси ординат-отношение величины специфического связывания (SB) и пМ/г ткани к концентрации свободного лиганда в инкубационной среде в нМ (С)

При инкубации мембран мозга в буфере А не было выявлено насыщения центров специфического связывания уабаина (снижение отношения величины специфического связывания к концентрации лиганда) в концентрациях до 40 нМ. Таким образом, сродство центров связывания уабаина в буфере А значительно (на 1—2 порядка) ниже, чем в буфере Р. Причиной данного различия мог бы быть гидролиз АТФ при инкубации мембран в условиях буфера А, например, под действием Mg-АТФазы. Однако в контрольных экспериментах показано, что внесение АТФ в инкубационную среду тремя порциями, каждая до конечной концентрации 1 мМ, на 0, 30, 70 мин опыта, а также повторное внесение АТФ на 60 мин до конечной концентрации 6 мМ не влияют на величину специфичес-

кого связывания [ $^3\text{H}$ ]уабаина в буфере А. Другими причинами снижения сродства участков связывания [ $^3\text{H}$ ]уабаина в условиях буфера А по сравнению с буфером Р может быть влияние ионов натрия (данные настоящей работы, [3]), а также аскорбата [3].

В предварительных экспериментах было показано, что водные экстракты из печени, почек, селезенки, сердца и мозга быка, приготовленные как описано ранее [9], ингибируют специфическое связывание [ $^3\text{H}$ ]уабаина (1 нМ) на 80% и более в дозах, соответствующих 50—100 мг исходной ткани. При этом кипячение экстракта снижало ингибиторную активность не более чем на 20%. Однако такие экстракты содержат ряд высокомолекулярных соединений, способных сорбировать как уабаин, так и эндогенный ингибитор и в значительной степени ингибируют неспецифическое связывание [ $^3\text{H}$ ]уабаина. Для очистки эндогенного ингибитора связывания уабаина (ИСУ) навеску ткани коры мозга быка гомогенизировали в 10 объемах 2 М уксусной кислоты, кипятили 10 мин, центрифугировали 15 мин при 10000 г, осадок отбрасывали, супернатант выпаривали под вакуумом. Полученный сухой остаток растворяли в минимальном количестве 20 мМ HEPES-NaOH (pH 7,2) и наносили на колонку Biogel P6-DG («Biorad», США) размером 2,5×15 см. Колонку элюировали тем же буфером со скоростью 10 мл (рис.2). Фракции, содержащие ИСУ, объединяли, лиофилизировали, растворяли в минимальном количестве воды и наносили на колонку Sephadex G-15 («Pharmacia», Швеция) размером 1,5×50 см, которую элюировали водой со скоростью 20 мл. Фракции, содержащие ИСУ (рис.3), объединяли. Выделенный описанным выше образом ИСУ ингибирует специфическое связывание [ $^3\text{H}$ ]уабаина и [ $^3\text{H}$ ]дигоксина с мембранами мозга быка в обоих типах использованных буферов, однако не влияет на специфическое связывание [ $^3\text{H}$ ]флуни-разепама (1 нМ), которое определяли, как описано ранее [8,9].

Для оценки величины  $M_r$  ингибитора использовали метод ультрафильтрации, при этом ИСУ свободно проходил через ультрафильтры с пропускной способностью 1000 Д и выше. Вместе с тем, ультрафильтр UM-0,5 («Amicon», США) с границей пропускания 500 Д задерживал ИСУ на  $80 \pm 20\%$ . Эти данные свидетельствуют, что  $M_r$  ингибитора находится в диапазоне 500—1000 Д и указывают на его возможную гетерогенность (присутствие низкомолекулярного компонента), что подтверждается результатами, полученными при гель-хроматографии (рис.3).

Интересно отметить, что описанный в работе Akagawa и соавт. [10] ингибитор  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы и связывания уабаина был, как и ИСУ, не гомогенен: по данным ТСХ ингибирующая активность выявлялась, как минимум, в двух фракциях. Ингибитор был устойчив к действию трипсина и лейцинаминопептидазы, однако обработка карбоксипептидазой А вызывала значительную потерю активности, что позволило авторам отнести его к соединениям пептидной природы [10]. Вместе с тем, другой

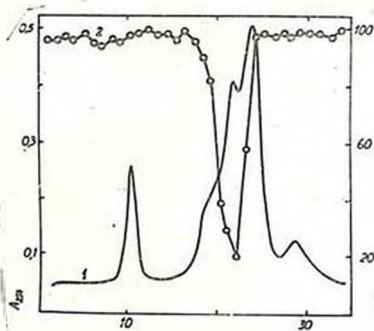


Рис.2. Гель-хроматография кислотно-метанольного экстракта коры мозга быка на колонке 2,5×15 Biogel P6-DG. По оси абсцисс—номер фракции, по оси ординат: 1—поглощение при 254 нм, 2—специфическое связывание (SB) [ $^3\text{H}$ ]уабана (1 нМ) в буфере А в присутствии аликвоты элюата из данной фракции, в % от контроля

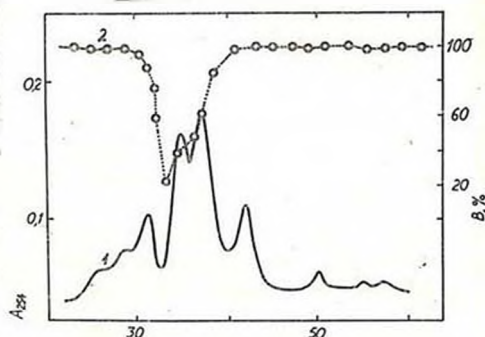


Рис.3. Гель-хроматография на колонке 1,5×50 см Sephadex G-15 ингибитора связывания уабина из мозга быка. По оси абсцисс—номер фракции, по оси ординат: 1—поглощение при 254 нм, 2—специфическое связывание (SB) [ $^3\text{H}$ ]уабана (1 нМ) в буфере Р в присутствии аликвоты элюата из данной фракции, в % от контроля

фактор, ингибирующий активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы и связывание уабина, также выделенный из гипоталамуса быка [11,14], по-видимому, не является пептидом, так как устойчив к 24-часовому гидролизу в 6 М  $\text{HCl}$  при  $110^\circ$ . Вопрос об идентичности описанного в настоящей работе ИСУ с ингибирующим фактором [11,14] в настоящее время остается открытым. Можно отметить, что предварительные данные свидетельствуют об устойчивости ИСУ к обработке протеиназой К (500 ЕД/мл,  $37^\circ$ , 1 ч). В то же время ингибитор  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы и связывания уабина, описанный Akagawa, как можно предположить на основании сравнения результатов хроматографии на Sephadex G-15, не идентичен ИСУ. Пик активности данного ингибитора соответствует мертвому объему колонки (элюируется одновременно с  $\text{KCl}$ ) [10], в то время как ИСУ выходит в значительно более «ранних» фракциях (рис.3).

Рассмотренные результаты свидетельствуют о наличии в мозговой ткани нескольких соединений, способных ингибировать специфическое связывание уабина. К их числу можно отнести также некоторые ненасыщенные жирные кислоты (арахидоновая, эйкозапентаеновая и др.) и такие двухвалентные катионы, как  $\text{Hg}^{2+}, \text{Cu}^{2+}, \text{Zn}^{2+}$  [12,15].

Выяснение роли каждого из них в регуляции активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы *in vitro* является задачей дальнейших исследований.

# ENDOGENOUS INHIBITOR OF THE SPECIFIC [<sup>3</sup>H]-OUABAIN BINDING WITH BOVINE BRAIN

Na<sup>+</sup> · K<sup>+</sup> -ATPase

\*Korneyev A.Ya., Levitsky Yu.A.,  
Brusovanik V.I.

*Institute of Pharmacology, Academy of Medical  
Sciences, Moscow*

We used the radioreceptor technique to study the ATP/phosphate-dependent binding of the [<sup>3</sup>H]-ouabain to Na,K-ATPase from the bovine brain. In the presence of phosphate specific binding sites for [<sup>3</sup>H]-ouabain have K<sub>d</sub> 5,1 nM and B<sub>max</sub> 2120 pmoles/g tissue. An endogenous inhibitor of the specific [<sup>3</sup>H]-ouabain binding (molecular weight 500—1000 D) was isolated from the bovine brain and partially purified by acid/methanol extraction and gel-chromatography.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырев А.А. Биологические мембраны и транспорт ионов, М., МГУ, 1985.
2. Болдырев А.А., Мельгунов В.И. — В кн.: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТРаза -АТРаза и ее биологическое значение. Итоги науки и техники, сер.Биофизика, т.17, с.5—120, М., ВИНТИ, 1985.
3. Erdman E. Handbook of Experimental Pharmacology, v.56, N1, p.337—380, Berlin, Springer Verlag, 1981.
4. Deth R., Smart J., Lynch C., Walsh R. Eur.J.Pharmacol., v.99, p.44—45, 1984.
5. Valdes R. Clin.Chem., v.31, N9, p.1525—1532, 1985.
6. Wilkins M.R. Trends Pharmacol.Sci., v.6, p.286—288, 1985.
7. La Bella F.S. Federat.Proc., v.44, p.2780—2781, 1985.
8. Korneyev A.Ya., Belonogoff O.B., Zuzin V.N. Neurosci.Lett., v.61, p.279—284, 1985.
9. Кorneyev А.Я., Фактор М.И. Бюлэксперим.биол. и мед., N7, с.64—65, 1984.
10. Akagawa K., Hara N., Ksukada Y. Neurochem., v.42, p.775—780, 1984.
11. Carilli C.T., Berne M., Cantley L.C., Haupert G.T. J.Biol.Chem., v.260, p.1027—1031, 1985.
12. Bidard J.N., Rossi B., Renaud J.F., Lazduski M. Biochim.et biophys.acta, v.769, p.245—252, 1984.
13. Лопина О.Д., Стецюк Н.У., Котлобай А.А. Укр.биохим.журн., т.58, с.74—85, 1986.
14. Haupert G.T. Hypertension, v.10, N5/2, p.161—167, 1987.
15. Cloix J.-F. Hipertension, v.10, N5/2, p.167—171, 1987.
16. Kelly R.A. Hypertension, v.10, N5/2, p.187—193, 1987.

Поступила 25.02.1988