



УДК 543.8.612.822.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ ЛИОФИЛИЗОВАННЫХ МЕМБРАН ДЛЯ РАДИОРЕЦЕПТОРНОГО АНАЛИЗА ОПИАТОВ И ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ

СЕРГЕЕВА М. Г., КУРОЧКИН И. Н., СКЛЯНКИНА О. А., ЗАЙЦЕВ С. В.,
ВАРФОЛОМЕЕВ С. Д.

Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и биорганической химии им. А. Н. Белозерского, МГУ, Москва

Исследовано влияние условий лиофилизации мембранных препаратов головного мозга крыс на свойства опиатных рецепторов. Найден способ восстановления свойств опиатных рецепторов, изменяющихся при лиофилизации в обычных условиях до уровня свойств рецепторов свежeweделенных мембран. Определены условия приготовления лиофилизированных препаратов с неизменными по сравнению со свежeweделенными мембранами характеристиками. Рассматриваются пути оптимизации радиорецепторного анализа опиатов и опиоидных пептидов с применением лиофилизированных мембран: выбор среды изучения связывания (использование ионов, селективно влияющих на связывание лигандов с различными опиатными рецепторами), подбор концентрации меченого лиганда.

В исследовании свойств опиатов, выделении новых опиоидных пептидов, скрининге синтезированных на их основе препаратов важную роль играет радиорецепторный анализ [1—3]. Этот метод основан на использовании препаратов свежeweделенных или замороженных мембран головного мозга животных, содержащих опиатные рецепторы. Существенным недостатком метода является низкая стабильность и нестандартность препаратов мембран [4]. Нами было показано, что лиофилизация мембран головного мозга крыс позволяет получать препараты, сохраняющие высокую способность к специфическому связыванию лигандов опиатных рецепторов и обладающие высокой стабильностью [4, 5]. Однако проведенные ранее исследования показали, что в процессе получения лиофилизированных мембранных препаратов мембраны претерпевают некоторые изменения, что приводит, в частности, к уменьшению сродства лигандов к их высокоаффинным рецепторам [4]. В настоящей работе исследуется влияние условий лиофилизации мембран на свойства опиатных рецепторов, рассматриваются пути оптимизации радиорецепторного анализа опиатов и опиоидных пептидов с применением лиофилизированных мембран.

Материалы и методы

Получение препарата мембран клеток головного мозга крысы проводили методом, описанным ранее [4]: мозг без мозжечка гомогенизировали в 50 мМ трис-НСI-буфере («Merck», ФРГ), рН 7,4 при 4° из расчета 80 мл буфера на 1 мозг в гомогенизаторе типа стекло-тефлон. Полученную суспензию центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин при 4°. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в буфере А, близком по составу к физиологической среде, содержащей 120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 0,5 мМ NaH₂PO₄, 5 мМ HEPES («Sigma», США), рН 7,4 при 37°, и выдерживали 30 мин при 37°. Суспензию вновь центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в буфере А (свежeweделенный препарат мембран). Для получения препарата лиофилизированных мембран осадок ресуспендировали в требуемом объеме бидистиллированной воды (25—30 мл на 1 мозг). Полученную суспензию мембран помещали в круглодонные колбы емкостью 1 л так, чтобы объем суспензии не превышал 1/20 части объема колбы. Колбы с суспензией мембран быстро замораживали в жидком азоте и помещали на лиофильную установку НЕТО CD-52 (вакуум 10⁻³ мм рт. ст.). Процесс лиофилизации продолжался 10-12 ч. Непосредственно перед экспериментом лиофилизированные мембраны суспендировали в требуемом объеме среды инкубации. При исследовании влияния среды, в которой происходит лиофилизация на свойства получаемых мембран, осадок после второго центрифугирования ресуспендировали в следующих средах: 0,2 М сахарозе, аммонийбикарбонатном буфере—10 мМ NH₄HCO₃, рН 7,4, буфере А и воде. Далее препарат лиофилизированных мембран получали и исследовали обычным способом.

Равновесное связывание меченых соединений с препаратами мембран мозга изучали при 37° в буфере А или в «безнатриевой» среде, получающейся из буфера А при замене в нем 120 мМ NaCl на 120 мМ KCl. Реакционная смесь содержала 60 мкл суспензии препарата мембран, 50 мкл 1,4—2800 нМ ³H-морфина, 0,8—2800 нМ ³H-D-Ala²-D-Leu⁵-энкефалина, 50 мкл раствора немеченого лиганда или буферного раствора. Время инкубации лиганда с препаратом мембран составляло 30 мин. Разделение связанного и свободного лиганда проводили методом вакуумного фильтрования через фильтры фирмы «Whatman GF/B» [4]. Для этого реакционную смесь разбавляли 3 мл холодной среды инкубации и полученную суспензию переносили на фильтры. Фильтр трижды промывали 3 мл холодной среды инкубации. Количество связанного лиганда определяли по уровню радиоактивности фильтров, используя толуол-феноксольный сцинтиллятор [4]. За величину специфического связывания принимали разницу между уровнем связывания в отсутствие и в присутствии 1 мкМ немеченого лиганда.

Определение содержания опианых лигандов в крови собаки проводили следующим способом. Кровь собирали в гепаринизированные пробирки и центрифугировали. 100 мкл полученной плазмы добавляли к 500 мкл препарата лиофилизированных мембран (концентрация белка 1,2 мг/мл), ресуспендированных в буфере 10 мМ HEPES (N-2-оксэтилпиперазин-N-этансульфоновая кислота) рН 7,4 при 25° и добавляли 50 мкл 7 нМ ³H-налоксона и 50 мкл морфина (концентрация 0—1,4 · 10⁻⁵М). Смесь инкубировали 30 мин при 25° и изучали равновесное связывание обычным способом.

В работе использовали меченые лиганды ³H-налоксон с У. А. 59 Ки/ммоль и ³H-D-Ala²-D-Leu⁵-энкефалин с У. А. 22 Ки/ммоль («Amersham», Англия).

Чистоту меченных тритием соединений проверяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Обработку экспериментальных данных проводили с использованием ЭВМ РДР 1:45 по разработанной нами программе [6] в соответствии с моделями комплексообразования лигандов с одним или двумя независимыми типами центров связывания.

Результаты и обсуждение

Влияние условий лиофилизации на свойства мембран. При изучении влияния состава среды лиофилизации на способность лиофилизованных мембран специфически связывать лиганды одинаковое количество свежевыделенного препарата мембран суспендировали в сахарозе, аммонийбикарбонатном буфере, буфере А или воде, замораживали в жидком азоте и лиофилизовали. Полученные лиофилизованные

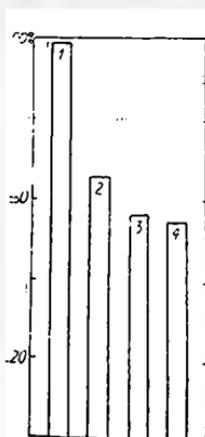


Рис. 1.

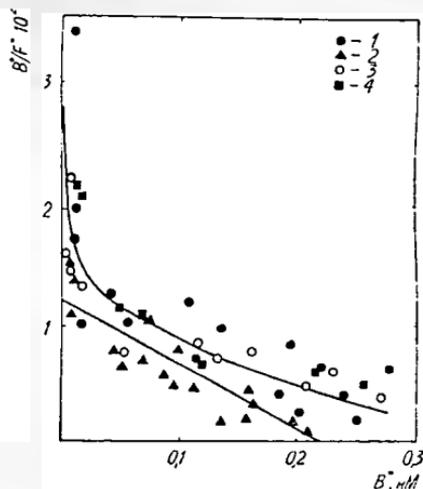


Рис. 2.

Рис. 1. Влияние состава среды лиофилизации на связывание $0.12 \mu\text{M}$ $^3\text{H-D-Ala}^2\text{-D-Leu}^5$ -энкефалина с лиофилизованными мембранами головного мозга крыс (в %). Концентрация белка 2 мг/мл . 1—свежевыделенные мембраны, 2—лиофилизованные в воде, 3—лиофилизованные в аммоний-карбонатном буфере, 4—лиофилизованные в сахарозе

Рис. 2. Влияние инкубации ресуспендированного препарата лиофилизованных мембран (концентрация белка 1.8 мг/мл) при 0° на специфическое связывание $^3\text{H-D-Ala}^2\text{-D-Leu}^5$ -энкефалина. 1—свежевыделенные мембраны, 2—4—лиофилизованные мембраны после 0-часовой, 3-часовой, 7-часовой инкубации соответственно (данные представлены в координатах Скэтчарда: по оси абсцисс—концентрация специфически связанного с мембранами лиганда, по оси ординат—отношение этой концентрации к концентрации лиганда в растворе)

ные препараты ресуспендировали в стандартной среде (буфер А) и изучали способность к связыванию пептида. При лиофилизации в буфере А получались трудно ресуспендируемые хлопья, что исключало возможность стандартизации процесса связывания лиганда и использования буфера А в качестве среды лиофилизации. Данные, полученные с другими средами, представлены на рис. 1, из которого видно, что вне зависимости от состава среды лиофилизации специфическое связывание мембран с $^3\text{H-D-Ala}^2\text{-D-Leu}^5$ -энкефалином снижается во всех случаях в 1,5—2 раза по сравнению со свежевыделенным пре-

паратом мембран. Это позволяет сделать вывод о том, что лиофилизация мембран в растворе сахарозы и аммоний-бикарбонатном буфере не имеет преимуществ перед лиофилизацией их в воде.

Для выяснения обратимости изменения опийной активности при лиофилизации изучено влияние инкубации ресуспендированного лиофилизованного препарата мембран на специфическое связывание опийных лигандов. Данные по влиянию инкубации суспензии лиофилизованных мембран головного мозга крыс в буфере А. при 0° на связывание D-Ala²-D-Leu⁵-энкефалина приведены на рис. 2. Установ-

Таблица 1

Влияние длительности инкубации препарата мембран (1,2 мг белка/мл) на параметры связывания 3H-морфина в буфере А.

Препараты	K ₁ , нМ	R ₁₀ пмоль/ мг белка	K ₂ , нМ	R ₂₀ пмоль/ мг белка
Свежевыделенные мембраны	4,1±1,4	0,09±0,01	122±31	0,25±31
Препарат лиофилизованных мембран инкубированный в воде не более 1 мин	5,0±1,0	0,08±0,01	100±28	0,23±0,06
Препарат лиофилизованных мембран, инкубированный в воде 7 мин	—	—	44±15	0,22±0,08

Примечание. K₁, K₂—константы диссоциации высокоаффинного и низкоаффинного центров связывания лиганда, R₁₀, R₂₀—концентрации центров

лено, что специфическое связывание энкефалина лиофилизованными мембранами становилось через 3 ч таким же, как и специфическое связывание свежевыделенных препаратов мембран. Аналогично энкефалину регенерация имеет место и в случае с морфином. Следует отметить, что дальнейшая инкубация лиофилизованного препарата мембран после регенерации 4—7 ч не приводила к существенным изменениям параметров специфического связывания. Такая же стабильность описана и для инкубации в тех же условиях свежевыделенных препаратов мембран [4]. Таким образом, полученные результаты показывают, что изменения опийной активности у лиофилизованных препаратов мембран обратимы и измененные мембраны могут быть регенерированы.

Чтобы выяснить, с каким из этапов процесса получения лиофилизованного препарата связаны наблюдаемые изменения опийной активности мембран, исследовано влияние продолжительности инкубации препарата мембран в воде перед лиофилизацией на свойства опийных рецепторов. Соответствующие результаты, приведенные в табл. 1, показывают, что свойства лиофилизованных мембранных препаратов зависят от длительности инкубации их в воде предшествующей лиофилизации. В то время как инкубация в воде не более 1 мин позволяла получать неизмененные лиофилизованные препараты, продол-

жительное выдерживание мембран в воде (7 мин) приводило к изменению их характеристик. Следовательно, наблюдаемые в процессе получения лиофилизованного препарата изменения опнатной активности мембран связаны не с замораживанием и обезвоживанием препарата, а с инкубацией мембран в воде.

Таким образом, проводя процесс суспендирования мембран в воде и замораживания в течение 1 мин можно получить лиофилизованные мембраны с неизменными характеристиками. К сожалению, далеко не всегда удается провести этот процесс за столь короткие сроки, особенно при выделении больших порций мембран. В этом случае при необходимости можно проводить регенерацию полученного мембранного препарата.

Получение лиофилизованного препарата мембран, содержащих опнатные рецепторы с неизменными характеристиками связывания, открывает широкие возможности в использовании радиорецепторно-

Таблица 2

Характеристики связывания опнатных лигандов с лиофилизованными мембранами (1,2 мг белка/мл) в безнатриевой среде (радиорецепторный анализ)

Параметры	D-Ala ² -D-Leu ⁵ -энкефалин		Морфин		Налоксон	
	регенерированные мембраны	нерегенерированные мембраны	регенерированные мембраны	нерегенерированные мембраны	регенерированные мембраны	нерегенерированные мембраны
K _d , нМ	2,5	—	1,7	—	0,7	1
R ₁₀ , нМ	0,1	—	0,08	—	0,07	0,1
K ₂ , нМ	30	10	62	12	17	18
R ₂₀ , нМ	0,2	0,2	0,23	0,25	0,3	0,3
Константа неспецифического связывания	0,004	0,005	0,007	0,006	0,006	0,007
Минимально определяемая концентрация лиганда (чувствительность L _{мин}), нМ	0,35	1,5	0,25	1,7	0,11	0,15
Максимально определяемая концентрация L _{макс} , нМ	674	320	240	680	1050	540
Точность при L=K _d (%)	19	21	20	18	23	16

Примечание. 120 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 0,5 мМ NaH₂PO₄, 5 мМ HEPES (pH 7,4; 37°). Расчеты проводились по формулам, предложенным в работе [7] исходя из того, что для определения концентрации меченого лиганда может быть использован меченый лиганд той же структуры; относительная ошибка определения концентрации связанного лиганда—7%.

го метода анализа для определения опиатов и опиоидных пептидов. В табл. 2 приведены характеристики радиорецепторного анализа, полученные для налоксона, морфина и энкефалина, указывающие на

то, что количественное определение опионных пептидов и опиатов радиорецепторным методом с использованием препарата лиофилизированных мембран позволяет с наибольшей точностью определять наномольные концентрации исследуемых лигандов.

При проведении радиорецепторного анализа важную роль играет среда, в которой он проводится. В табл. 3 представлены данные по влиянию Na^+ , Mn^{2+} и Ni^{2+} на чувствительность определения морфина, энкефалина и налоксона радиорецепторным методом. Используемые ионы, изменяя сродство опиатных лигандов к рецепторам, влияют и на чувствительность анализа, причем их эффект зависит от типа определяемого лиганда. Так, например, в присутствии Na^+ чувствительность определения μ -агониста морфина уменьшилась в 2,8 раза, δ -агониста D-Ala²-D-Leu⁵-энкефалина—в 1,6 раза, в то время как чувствительность определения антагониста налоксона возросла в 1,4 раза. В свою очередь, добавление в среду 1 мМ Mn^{2+} или 25 мкМ Ni^{2+} приводило к более чем 2-кратному увеличению чувствительности определения μ -агониста морфина, не влияя на чувстви-

Таблица 3

Влияние ионов металлов на чувствительность радиорецепторного определения морфина, налоксона и D-Ala²-D-Leu⁵-энкефалина

Лиганд	Ионы	Параметры связывания лиганда					Чувствительность $\text{L}_{\text{мин}}$, нМ
		K_1 , нМ	K_2 , нМ	R_{10} , нМ	R_{20} , нМ	константа неспецифического связывания	
D-Ala ² -D-Leu ⁵ -энкефалин	-NaCl	2,5	30	0,1	0,2	0,004	0,35
	+NaCl	3,8	55	0,1	0,2	0,004	0,56
	+NaCl+1 мМ MnCl_2	3,2	16	0,1	0,2	0,004	0,57
Морфин	+NaCl+25 мкМ NiCl_2	3,1	15	0,1	0,2	0,004	0,56
	-NaCl	1,7	62	0,08	0,23	0,007	0,25
	+NaCl	5,0	100	0,08	0,23	0,007	0,70
	+NaCl+1 мМ MnCl_2	2,5	50	0,08	0,23	0,007	0,32
	+NaCl+25 мкМ NiCl_2	2,4	100	0,008	0,23	0,007	0,29
Налоксон	-NaCl	0,7	17	0,07	0,3	0,006	0,11
	+NaCl	0,5	20	0,07	0,3	0,006	0,08

Примечание. Рассчитано по Зайцеву и соавт. [7] исходя из того, что для измерения концентрации меченого лиганда может быть использован меченый лиганд той же структуры; относительная ошибка определения концентрации связанного лиганда 7%; концентрация белка—1,2 мг/мл.

ность радиорецепторного определения энкефалина. Все это необходимо учитывать при выборе среды для анализа того или иного опиатного лиганда.

Чувствительность радиорецепторного анализа зависит не только от условий среды, но и концентрации меченого лиганда. На рис. 3 представлена зависимость чувствительности анализа (L мин) от величины отношения концентрации меченых $^3\text{H-D-Ala}^2\text{-D-Leu}^5\text{-энкефалина}$, налоксона, морфина (L^*) к константам связывания (K^*) этих лигандов с рецепторами лиофилизированных мембран. Чувствительность анализа повышалась с уменьшением L^* , имея максимальное значение при $L^* \ll K^*$, но практически уменьшение концентрации меченого лиганда имеет свои границы, что связано с увеличением времени счета радиоактивной метки при сохранении заданной точности счета. В табл. 4 представлена зависимость времени счета пробы от концентрации меченого лиганда. Из анализа таблицы видно, что выбор концентраций меньше $0,2 K^*$ не имеет практического смысла, так как резко увеличивается время, необходимое для просчета образца с требуемой точностью.

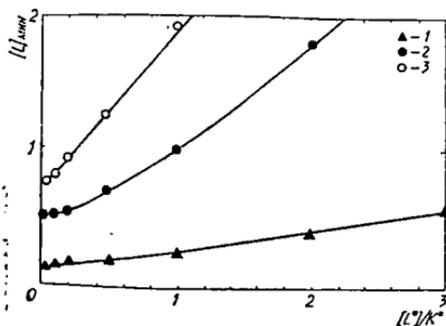


Рис. 3.

Рис. 3. Зависимость чувствительности радиорецепторного анализа от концентрации меченого лиганда. 1— ^3H -налоксон, 2— $^3\text{H-D-Ala}^2\text{-D-Leu}^5\text{-энкефалин}$, 3— ^3H -морфин

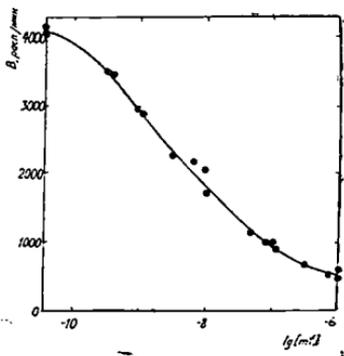


Рис. 4.

Рис. 4. Калибровочная кривая определения морфина (mg) в плазме крови собаки. Меченый лиганд— ^3H -налоксон ($0,5 \text{ нМ}$)

Высокая стабильность и стандартность лиофилизованного препарата позволяет предложить метод радиорецепторного анализа с использованием лиофилизированных мембран для определения опиатов и опиоидных пептидов в крови животных и человека [9], который позволяет определять наномолярные концентрации морфина. На рис. 4 приведена калибровочная кривая определения морфина в плазме крови собаки.

Таким образом, лиофилизированные мембраны могут быть с успехом применены для радиорецепторного анализа. Оптимальными условиями проведения анализа являются низкая концентрация мечено-

го лиганда ($0,2K^* < L^* \ll K^*$), использование безнатриевой среды для определения μ - и δ -агонистов среды, содержащей Na^+ для определения антагонистов, присутствие в среде анализа Mn^{2+} или Ni^{2+}

Таблица 4

Зависимость времени счета пробы от концентрации меченого лиганда

Удельная активность лиганда	Концентрация	Общее связывание			Неспецифическое связывание		
		имп/мин	время счета образца, мин	время счета фона, мин	имп/мин	время счета образца, мин	время счета фона, мин
22 Ки/ммоль	0,01 К	26,9	74	60	—	—	—
	0,05 К	135	4,8	2,0	27	74	60
	0,1 К	269	2,0	0,6	54	16	8
	0,2 К	538	0,9	—	108	6	2
	0,5 К	1342	0,3	—	269	1,8	0,6
59 Ки/ммоль	0,01 К	39	3,9	9	—	—	—
	0,05 К	78	7,8	3	16	250	200
	0,1 К	786	79	—	157	3,8	1
	0,2 К	1572	0,3	—	314	1,7	—
	0,5 К	3929	0,1	—	786	0,6	—

Примечание. Рассчитано по Donald и соавт. [8]. Условия эксперимента: связывается 5% от добавленной метки, неспецифическое связывание составляет 20% от общего (неспецифическое связывание определяется в присутствии $10^{-6} M$ немеченого лиганда); $K=5$ нМ (константа связывания меченого лиганда). Уровень радиоактивности посчитали с 5% ошибкой, эффективность счета 40%, фон уровня радиоактивности составляет 10 имп/мин

при определении μ -агонистов. Оптимальными условиями получения лиофилизированных препаратов мембран являются лиофилизация в воде, короткое время инкубации в воде перед лиофилизацией, регенерация мембран в буфере А при получении модифицированного препарата.

LYOPHILIZED MEMBRANES: USE FOR RADIORECEPTOR ASSAY OF OPIATES AND OPIOID PEPTIDES

SERGEEVA M. G., KUROCHKIN I. N., SKLYANKINA O. A.,
ZAITSEV S. V., VARFOLOMEEV S. D.

A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, Moscow State University, Moscow, USSR

The effect of lyophilization conditions of rat brain membrane preparations on the properties of opiate receptors has been studied. The procedure has been found to restore the opiate receptor properties, altered by lyophilization in routine conditions, to the state of freshly prepared membranes. The conditions have been developed to prepare lyophilized preparations with unaltered parameters compared to freshly prepared

red membranes. The ways of optimization of radioreceptor assay for opiate and opioid peptides based on lyophilized membranes are considered: the choice of ligand binding medium (use of ions selectively affecting the ligand binding to various opiate receptors) and the choice of the tracer concentration.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Zajac J. M., Gacel G., Petit F., Dodey P., Rossignol P., Roques B. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 111, № 2, p. 390—397, 1983.
2. Simantov R., Kuhar M. Y., Pasternak G. W., Snyder S. H. *Brain Res.*, v. 106, № 1, p. 189—197, 1976.
3. Hammonds R. G., Nicolas P., Li C. H. *Int. J. Peptide and Protein Res.*, v. 19, № 2, p. 556—561, 1982.
4. Зайцев С. В., Курочкин И. Н., Сергеева М. Г., Варфоломеев С. Д. *Биохимия*, т. 49, № 7, с. 1127—1133, 1984.
5. Зайцев С. В., Курочкин И. Н., Сергеева М. Г., Молокоздов А. С., Титов М. И., Варфоломеев С. Д. *Докл. АН СССР*, т. 272, № 4, с. 982—984, 1983.
6. Громов А. И., Курочкин И. Н., Зайцев С. В., Пороженко Н. В. Тезисы докл. IV Всесоюз. симпозиума «Инженерная энзимология», Киев, с. 93, М., Наука, 1983.
7. Зайцев С. В., Сергеева М. Г., Варфоломеев С. Д. *Биоорганич. химия*, т. 11, № 3, с. 370—380, 1985.
8. Donald L. H. *Application of liquid scintillation counting*, p. 306—331, Academic Press, N. Y., 1974.
9. Сергеева М. Г. Тезисы IX Всесоюз. конф. по биохимии нервной системы, с. 85, Ереван, Изд. АН АрмССР, с. 85, 1983.

Поступила 4 IX. 1985-