

**С. Г. Галактионов,
В. П. Голубович,
М. Д. Шендерович,
А. А. Ахрем**

ВВЕДЕНИЕ В ТЕОРИЮ РЕЦЕПТОРОВ

**МИНСК
«НАУКА И ТЕХНИКА»
1986**

Галактионов С. Г., Голубович В. П., Шейдерович М. Д., Ахрем А. А. **Введение в теорию рецепторов.**— Мн.: Наука и техника, 1986.— 199 с.

В монографии излагаются современные представления о физико-химических механизмах действия физиологически активных соединений, основанные на рецепторной теории. Дано систематическое изложение элементов теории (кинетика и равновесие процессов образования комплексов эффектор — рецептор, развитие биологической реакции). На конкретных примерах продемонстрированы возможности идентификации типов механизмов биологической реакции, вызываемых различными эффекторами. Значительное внимание уделено описанию различных методов оценки параметров взаимодействия эффектора с рецептором.

Рассчитана на специалистов в области биофизики, биохимии, химии природных соединений, фармакологию, а также аспирантов и студентов соответствующих специальностей.

Табл. 14. Ил. 56. Библиогр.— 257 назв.

Рецензенты:

В. Л. Калер, д-р биол. наук,
Д. И. Метелица, д-р хим. наук

2001040000—120

Г—————53—86

М316—86

© Издательство
«Наука и техника», 1986.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Эта книга задумана как краткий очерк основных модельных представлений, идей и интерпретационных возможностей теории рецепторов — междисциплинарного направления, приобретающего в последнее время все большее значение и известную автономию.

Термин «теория рецепторов» используется обычно применительно к сравнительно узкой области учения о рецепторных механизмах регуляции, а именно к проблемам исследования и интерпретации процессов связывания агониста рецептором, а также зависимостей доза — эффект или концентрация — эффект [16, 42, 43, 197]. Мы будем следовать этой традиции, избегая обсуждения таких важных аспектов, как условия структурной комплементарности эффектора и рецептора (эти вопросы подробно рассматриваются, в частности, в монографиях [2, 6, 25]), а также совершенно не касаясь конкретных деталей реализации пострецепторных механизмов развития реакции (изменение ионных потоков через мембрану, синтез циклических нуклеотидов и т. п.).

Итак, предметом рассмотрения будут исключительно *кинетика и равновесие связывания лиганда и развития индуцируемой им биологической реакции.*

Условно книгу можно разделить на две части: математические модели, предложенные для описания этих процессов (гл. 2—4), и техника интерпретации с их помощью экспериментальных зависимостей (гл. 5, 6). Мы не пытались представить читателю все модели этого класса, имеющиеся в литературе, да и не все они в равной мере этого заслуживают. Что же касается средств количественной интерпретации результатов эксперимента, то нам кажется, что именно в настоящее время происходит знаменательный перелом в отношении биофизиков, биохимиков, фармакологов к этому вопросу: широ-

коё использование представлений теории рецепторов является фактором внедрения в соответствующие научные дисциплины более высокой математической культуры и более совершенных вычислительных методов. При написании книги мы постоянно имели в виду эту тенденцию.

Наиболее популярная монография на ту же тему на русском языке — книга И. В. Комиссарова «Элементы теории рецепторов в молекулярной фармакологии» [16], — несомненно, сыграла значительную роль в распространении основных идей и методов теории рецепторов в среде потенциальных «потребителей» и повлияла на дальнейшее ее развитие. Однако с момента ее выхода прошло уже более пятнадцати лет... Среди зарубежных публикаций наиболее систематическое изложение основ теории рецепторов предпринято в книге «Кинетика действия лекарств», представляющей собой один из томов известной «Фармакологической Энциклопедии» [153]. Эта книга устарела в меньшей степени (год издания — 1977), однако она представляет собой скорее справочное руководство, чем сводку основных концепций, — форма, которую мы пытались придать нашей монографии.

НЕСКОЛЬКО ОБЩИХ ЗАМЕЧАНИЙ ПО ПОВОДУ ТЕОРИИ РЕЦЕПТОРОВ

Нередко на прилавках книжных магазинов или библиотечных полках встречаются издания типа «Частотный англо-русский словарь по ядерной физике», «Частотный словарь современного белорусского языка», «Частотный словарь Адама Мицкевича» и т. п. Нам ничего не известно о существовании «Частотного словаря терминов из области биофизики, биохимии, физиологии и фармакологии». Впрочем, может быть, он и существует — в виде, например, приложения к диссертации, защищенной где-нибудь в Ванкувере или Каракасе, так что воспользоваться им в данный момент сможет не каждый. Однако, даже и не заглядывая в такой словарь, берем на себя смелость утверждать: термин «рецептор» наверняка фигурирует в нем среди наиболее часто употребляемых. Спору нет, иногда применяется он не вполне оправданно; тем не менее популярность этого понятия отражает степень проникновения основных концепций теории рецепторов в идеологию современных исследователей, занятых изучением механизмов действия физиологически активных соединений.

1.1. РЕЦЕПТОРЫ

Истоки теории рецепторов принято обычно искать в работах Лэнгли и Эрлиха. Действительно, Лэнгли, изучавший антагонизм между атропином и пилокарпином, писал еще в 1878 г.: «...я считаю, без особого риска можно предположить, что в нервных окончаниях или в клетках желез существует вещество или вещества, с которыми и атропин, и пилокарпин способны образовывать соединения. Согласно такому предположению, такие соединения атропина или пилокарпина образуются по некоторому закону, основными факторами которого являются их от-

носительная масса и химическое сродство к упомянутому веществу» [165].

В принципе это и есть суть теории рецепторов, а все тома, написанные в течение последующего столетия, — лишь комментарий.

На рубеже прошлого и нынешнего веков все эти представления энергично пропагандировал Эрлих [35], сформулировавший знаменитый принцип: «вещества не действуют, не будучи связанными». Позднее, в 20—30-е годы, некоторые элементы теории рецепторов получили дальнейшее развитие [81, 82, 84, 197, 220], однако в рабочий инструмент биологической и фармакологической науки она по-настоящему превратилась лишь в 50—60-е годы, заняв довольно скоро те позиции, которые и обеспечили столь почетное место термину «рецептор» в несуществующем пока частотном словаре, о котором шла речь в первых строках этой книги.

Естественно было бы начать изложение рецепторной теории с определения понятия «рецептор». Сделать это, однако, совсем не просто. Вот результаты двух попыток дать такого рода определение, предпринятых ведущими авторитетами в области теории рецепторов.

Первое относится к 1968 г. и принадлежит Во [244]: «Многие агенты¹ обладают следующими четырьмя признаками: 1) они действуют в низких (микромолекулярных) концентрациях; 2) их активность в сильной мере зависит от изменений в химической структуре; 3) их активность может подавляться селективными антагонистами (например, атропин может сильно блокировать действие ацетилхолина на восходящую ободочную кишку морской свинки, но не изменяет практически активность гистамина); 4) активность антагонистов также сильно зависит от изменений в химической структуре.

Все эти признаки указывают на то, что в ткани имеет место специфическая реакция между данным агентом и специализированным центром связывания (рецептором)».

В другом определении, данном Куатрсаказасом [22, 89], перечисляются следующие основные признаки рецепторов: «Первое: взаимодействие эффектора с рецептором должно отвечать требованиям определенной про-

¹ Здесь и далее мы позволяем себе некоторую вольность в переводе английского drug; использование буквального перевода — лекарство — во многих случаях создает опасность неточного восприятия смысла цитаты.

странственной и структурной специфичности. Второе: количество связывающих мест должно быть ограниченным, и, следовательно, связывающие места должны быть насыщаемыми. Третье: связывание эффектора должно иметь тканевую специфичность, соответствующую его биологической специфичности. Четвертое: связывающие места должны обладать высоким сродством к гормону, а их концентрация должна соответствовать физиологической концентрации гормона. Пятое: связывание эффектора рецептором должно быть обратимым».

На примере двух рассмотренных попыток дать определение понятия «рецептор» отчетливо видны связанные с этим трудности и, прежде всего, неопределенность таких оборотов, как «*сильно* зависит от структуры», «обладает *высоким* сродством» и т. п. (что такое «*сильно*», что считать «*высоким*», а что «*низким*» сродством?). Далее, признаки второй и пятый по Куатреказасу просто излишни — очевидно, что количество «связывающих мест» в клетке (органе, ткани) всегда конечно, а любая реакция в принципе обратима. Наконец, признак 3) у Во: что значит «активность может подавляться антагонистами»? Скажем, антагонисты¹ какого-либо белкового гормона неизвестны; в этих условиях спор о том, возможно ли их существование, — это спор убеждений, и проверить приложимость обсуждаемого критерия нельзя. Между тем в интуитивном представлении всякого биохимика или фармаколога центры связывания, взаимодействуя с которыми гормон инициирует какую-то специфическую реакцию, бесспорно, следует именовать рецепторами.

Приведенный пример может подсказать еще одно определение рецептора — как центра связывания агента, выполняющего в организме определенную регуляторную функцию, причем такое связывание инициирует специфическую реакцию. Но опять же непонятно, что считать биорегулятором? Как быть с рецепторами неоткрытых еще биорегуляторов? Опиатные наркотики, например, известны с древности и интенсивно исследовались фармакологами задолго до того, как стал известен эндогенный биорегулятор, с рецепторами которого они взаимодействуют, — энкефалин. Так что же, вплоть до этого открытия центры связывания морфина в тканях мозга не следовало именовать рецепторами?

¹ Заметим, что Во, по-видимому, имеет в виду конкурентные антагонисты.

Читателям, листавшим когда-либо оригинальные научные трактаты XVII или XVIII века, все рассуждения подобного толка покажутся чем-то знакомым, всем прочим — чем-то изрядно нудным. Уместно, видимо, немедленно прекратить дальнейшие рассуждения на эту тему, предоставив в заключение слово Во¹: «Каждый автор имеет свое собственное определение понятия «рецептор». Я определяю его как содержащуюся в ткани структуру, которая ведет себя как Q в рассматриваемых здесь схемах. Это аналогично определению температуры как того, что ведет себя как T в распределении Масквелла — Больцмана». Мы целиком принимаем это последнее определение.

1.2. О ПРИМЕНЕНИИ ТЕОРИИ РЕЦЕПТОРОВ

Несмотря на отсутствие точного определения понятия «рецептор», теория рецепторов успешно используется в наши дни, причем не только в исследовательской практике, но и во многих приложениях. На ее основе оказалось возможным навести кое-какой порядок в накопившемся ныне огромном объеме экспериментальных данных о физиологически активных соединениях; более того, обсуждение данных такого рода именно в терминах рецепторной теории стало в известном смысле обязательным.

И здесь, пожалуй, следует упомянуть о некоторых теневых сторонах такого положения вещей.

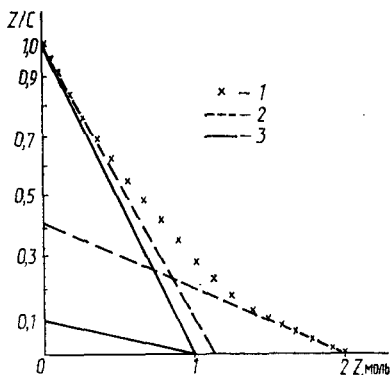
Внедрение элементов теории рецепторов в повседневный обиход исследователей способствовало широкому распространению стереотипных приемов обработки результатов эксперимента; использование многих из них уже освящено традицией, они применяются зачастую без всяких размышлений, по принципу «все так делают». Между тем среди этих приемов попадаются сомнительные, а то и откровенно неверные. По-видимому, наиболее показательный пример — обработка вогнутых скэтчардовских графиков, которые, как считается, указывают на наличие двух различных типов центров связывания (на самом деле, не обязательно двух и не обязательно различных, как будет показано в параграфе 5.5; впрочем, пока это несущественно).

Группа датских биохимиков обнаружила в международных биохимических журналах за 1975—1979 гг. как

¹ Примечательно, что это цитата из той же работы [244], которая начинается приведенным на с. 6 определением рецептора.

раз такие графики более чем в 50 статьях [191]. И в большинстве случаев «разложение на компоненты с высоким и низким сродством» осуществлялось одинаковым способом: через слабо искривленные крайние участки кривой проводились прямые (рис. 1.1), их наклон полагался равным величинам $1/K$ для центров с высоким (крутой участок) и низким (пологий участок) сродством к лиганду, а точка пересечения первой прямой с осью

Рис. 1.1. Скэтчардовская зависимость связывания лиганда материалом, содержащим центры связывания с высоким и низким сродством: 1 — расчетная кривая согласно (1.2.1), $Q_1 = Q_2 = 1$ моль, $K_1 = 1$ моль, $K_2 = 10$ моль; 3 — прямые, соответствующие первому и второму члену (1.2.1); 2 — экстраполяция крайних фрагментов кривой, обычно используемая для оценок Q и K



абсцисс определяла концентрацию рецепторов первого типа. Между тем, как справедливо отмечают авторы работы [191], прямые, соответствующие в координатах Скэтчарда двум различным типам центров связывания, имеют совершенно иной наклон и пересекают ось абсцисс в другом месте. На рис. 1.1 в координатах Скэтчарда представлена кривая

$$Z(C) = \frac{Q_1 C}{K_1 + C} + \frac{Q_2 C}{K_2 + C} \quad (1.2.1)$$

для $Q_1 = Q_2 = 1$, $K_1 = 1$, $K_2 = 10$, а также прямые, соответствующие каждому из слагаемых (1.2.1) в отдельности. Как видим, различие оценок в приведенном случае примерно двукратное. Описанный выше метод получения оценок K , Q для «центров связывания с высоким и низким сродством» стал почти классическим, будучи принципиально неверным.

К счастью, занимающие до недавнего времени доминирующее положение упрощенные, преимущественно графические и глазомерные средства обработки кривых (линеаризации зависимостей, оценки начальных накло-

нов и т. п.) принадлежат, бесспорно, докомпьютерной эпохе. Внедрение ЭВМ в исследовательскую практику соответствующих областей науки происходило довольно медленно, однако, наконец, и здесь наблюдается отрадный прогресс. Например, вот уже несколько лет в системе математического обеспечения ЕС ЭВМ существует комплекс программ для обработки данных медико-биологического эксперимента [24, 27], содержащий, в частности, процедуры нелинейной регрессии.

Но главное, в очень многих лабораториях появились мини-ЭВМ. Чаше, правда, в качестве комплектующего агрегата какой-либо экспериментальной установки, однако постоянное их присутствие под рукой и быстро приобретенные элементарные навыки работы с ними резко изменили отношение экспериментаторов к численной обработке своих результатов.

Примечательно, например, что в международном журнале «Трендс ин фармаколоджи кл сайенс» появилась рубрика «Компьютерный клуб»; вот что пишут в этой рубрике, например, по поводу пакета программ, максимально доступных пользователю-фармакологу и предназначенных для аппроксимации экспериментальных зависимостей заданным уравнением [206]: «Какие преимущества можно получить, анализируя данные таким способом? Главным преимуществом этих методов является то, что отсутствуют какие-либо ограничения на форму математических зависимостей (моделей), которые можно использовать. Это дает пользователю огромные возможности в выборе уравнений, описывающих данные; они могут быть сколь угодно сложными или простыми. Это особенно ценно в тех случаях, когда данные описываются сложными зависимостями, которые трудно или невозможно преобразовать к линейному виду. Например, это исключительно полезный инструмент для анализа данных по связыванию радиоактивного лиганда препаратом с несколькими типами центров связывания, когда уравнения не могут быть решены относительно параметров другими методами. Анализ задач многокомпартментной фармакокинетики или сложной ферментативной кинетики являет собой другие примеры, когда может оказаться полезной техника подгонки кривых (curve fitting). Далее, легкость, с которой могут анализироваться различные модели, делает возможными проверку и сравнение любого числа уравнений. Если различные модели определены математически, процедура подгонки кривых может быть

использована для проверки всех возможных решений и с помощью простых статистических тестов может помочь решить вопрос о том, которая модель наилучшим образом соответствует данным».

Исследователям других специальностей, возможно, странно, что такие вещи приходится рекламировать как новинку в международном журнале, посвященном наиболее актуальным проблемам фармакологической науки в 1983 г.; но что поделать — лучше поздно...

Именно специалистам по физиологически активным соединениям, освоившим обращение с процедурами, подобными описанной, и понявшим смысл работы с ними, адресована в первую очередь наша книга. Дело в том, что эта процедура снимает с пользователя заботу о вычислительных проблемах; мы их не касаемся вовсе. Однако уже вопрос о приложимости той или иной модели чаще всего не может быть решен однозначно чисто формальными средствами; неясно зачастую, как можно распорядиться полученными оценками значений параметров модели и т. д. Иными словами, интерпретация «сырых», необработанных кривых в содержательно определенных терминах — дело трудное, но и интерпретация уже обработанных данных (выбран круг приемлемых моделей, получены оценки параметров) может быть также далеко не однозначной.

Здесь мы должны коснуться феномена, бурно распространившегося в последнее время в фармакологии и смежных дисциплинах, — феномена, который мы условно называем «фармакологическим романтизмом». Знаком он, безусловно, многим читателям, и суть его заключается в следующем. Например, измерена концентрационная зависимость связывания лиганда препаратом клетками-мишеней и делается безапелляционный вывод: для этого процесса характерен эффект отрицательной кооперативности. Одна молекула эффектора, связываясь с рецептором, вызывает изменение конформации не только его самого, но и соседних рецепторов, что указывает на наличие дальнедействующих факторов, обуславливающих перестройку мембранных структур. Кстати, зная поверхностную плотность рецепторов на мембране, легко вычислить радиус этого дальнего действия.

Можно было бы задать вопрос автору такого вот утверждения (чего, к сожалению, почти никогда не делается): откуда такое точное видение молекулярной картины случившегося? Как же, последует незамедли-

тельный ответ, здесь же имеет место типичный признак отрицательной кооперативности — коэффициент Хилла меньше единицы. И уже совершенно бесполезно пытаться советовать поискать причины в чем-либо другом: может быть, например, препарат содержит несколько типов центров связывания? Бесполезно потому, что предлагаемое вами объяснение, если даже оно и справедливо, — это нечто будничное, обыденное, а кооперативность и особенно конформационные перестройки — волнующий намек на тайные свойства биологических мембран, живой клетки. В этом, по-видимому, одна из особенностей фармакологического романтизма: выбирая между гипотезой тривиально простой и волнующе-сложной, романтик, безусловно, выберет вторую вопреки всякой научной логике.

Поучительно в этой связи вспомнить сравнительно недавнюю историю с обнаружением той самой отрицательной кооперативности рецепторов инсулина.

В работе [101] было показано, что с ростом концентрации в инкубационной среде немеченого инсулина возрастает скорость диссоциации ^{125}I -инсулина, которым ранее был насыщен препарат; это и было истолковано как бесспорный признак отрицательной кооперативности процесса связывания, т. е. в лучших традициях «фармакологического романтизма». Однако упоминавшийся Куатреказас и Холленберг, повторив эксперименты, выполненные в [101], только вместо рецепторсодержащих препаратов используя тальк, стекло, кремнезем, получили точно те же признаки «отрицательной кооперативности» [90]. Все дело оказалось, по-видимому, в самоагрегации молекул инсулина (образование димеров) при высоких концентрациях [11, 90]. Заметим в заключение, что опыты Куатреказаса и Холленберга не отвергают возможности существования отрицательной кооперативности у рецепторов инсулина — может быть, она и есть. Только это не следует из результатов работы [101] ¹.

Даже в тех случаях, когда концентрационная зависимость связывания лиганда представляет собой безукоризненную гиперболу, а в координатах Скэтчарда — прямую, простор для фантазии «фармакологических ро-

¹ Впрочем, выход в свет работы Куатреказаса и Холленберга не установил полет фантазии авторов гипотезы «отрицательной кооперативности» рецепторов инсулина; напротив, она получила дальнейшее развитие в виде «модели диссоциирующих субъединиц» [146].

мантиков» все еще достаточно велик. Распространеннейший пример: под действием некоторого фактора увеличилась раза в полтора константа диссоциации лиганд-рецепторного комплекса K и примерно во столько же раз увеличилась концентрация рецепторов Q . Из-за чего может измениться константа диссоциации? Ясное дело, здесь опять не обошлось без конформационных перестроек рецепторных структур. А изменение концентрации рецепторов? Уж не происходит ли их усиленная деградация в связи с активацией каких-то протеаз? Или заторможен синтез?

На самом же деле скорее всего под действием злополучного фактора не случилось ровным счетом ничего: пропорциональные изменения оценок K и Q , как правило, оказываются расчетным артефактом (см. параграф 5.2). Кстати, при простом рассматривании обеих кривых можно было бы убедиться, что они почти неразличимы. Это как раз тот случай, когда численная обработка способна исказить истинное положение дел при некачественном использовании ее результатов.

Приведенные примеры «фармакологического романтизма» несколько одиозны, но взяты из жизни; их можно было бы без труда умножить. Мы, однако, этого делать не будем, полагая, что достаточно ясно изложили свою точку зрения на данный феномен.

Искать в первую очередь возможно более прозаические причины изменения значений параметров или формы кривых — таков, по-видимому, должен быть девиз всякого, не желающего пополнить собственной персоной ряды «фармакологических романтиков».

1.3. МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ В ФАРМАКОЛОГИИ

Как уже упоминалось, в последующих трех главах книги рассматриваются исключительно математические модели процессов взаимодействия различных эффекторов с рецепторами и развития вызываемой в результате этого биологической реакции. Совершенно не затрагивается вопрос о том, существуют ли такие процессы в действительности, и если да, то в каких именно случаях. Некоторые из моделей могут показаться чрезмерно сложными или содержащими элементы, наделенные весьма странными свойствами. Порой, наблюдая за полетом фантазии авторов таких моделей, хочется и их упрекнуть

в склонности к тому самому «фармакологическому романтизму». Однако чаще всего такие модели появляются на свет при попытках объяснить эффекты, которые стабильно воспроизводятся в независимых экспериментах, но упорно не желают укладываться в рамки существующих представлений. В этих случаях почти всегда возможности более простого объяснения были тщательно проверены и отвергнуты; введение новых элементов в существующие модельные конструкции здесь совершенно неизбежно. Конечно, выдвигаемые гипотезы могут быть более или менее удачными.

В сущности математические модели, вполне корректно описывающие развитие биологической реакции того или иного тест-объекта под действием некоторого биорегулятора, и не могут в общем случае быть простыми, поскольку механизмы, лежащие в основе этой реакции, очень сложны. Поэтому чаще всего задачей математического моделирования является не столько расшифровка механизма во всех деталях, сколько возможно более лаконичная его параметризация. Информация, содержащаяся в семействах кривых типа доза—эффект и время—эффект, ограничена, и воссоздать на ее основе подробную картину механизма реакции нельзя; с другой стороны, естественное требование к любой математической модели — используя минимальное количество эмпирически определяемых параметров, описать возможно более широкий круг экспериментальных данных.

Усложнение модели есть в конечном счете увеличение числа параметров, и существует опасность, что новая модель, давая качественное объяснение какого-то эффекта, перестанет быть пригодной для количественного анализа экспериментальных зависимостей именно из-за обилия входящих в нее параметров. Их оценки, получаемые на основании обработки экспериментальных кривых, окажутся неоднозначными, обремененными большими ошибками, очень чувствительными к погрешностям эксперимента и т. п. Вопрос о том, какое количество параметров следует считать в некотором конкретном случае «неприемлемо большим», к сожалению, не может быть решен вполне четко; некоторые соображения по этому поводу содержатся в параграфе 5.1.

На практике обычно критерием недопустимого обилия параметров является как раз появление при попытках количественной обработки результатов перечисленных признаков нестабильности получаемых оценок.

Подавляющее большинство результатов, получаемых в экспериментах обсуждаемого типа, может быть интерпретировано в рамках сравнительно простых моделей; долгое время всякие случаи отклонения от них пытались просто определить с помощью специально введенных терминов типа «тахифилаксия», «десенситизация» и т. п. Бесспорно, использование для характеристики некоторых особенностей наблюдаемых на опыте зависимостей вместо этих крайне расплывчатых и нечетких терминов математической модели, пусть лишь качественно описывающей анализируемый процесс, позволяет исследователю более точно выразить свои представления о возможной организации этого процесса. Но круг замкнулся: здесь опять усиливается соблазн ступить на тропу «фармакологического романтизма».

Теперь о других терминах, используемых при описании моделей. Относительно трудностей с точным определением понятия «рецептор» уже шла речь выше; добавим сюда еще и то обстоятельство, что зачастую речь идет о связывании молекул эффектора с несколькими типами центров связывания, часть из которых рецепторами не является. В этом случае следует избегать термина «рецептор». Строго говоря, вообще нет необходимости использовать этот термин при обсуждении, например, результатов экспериментов по связыванию меченого лиганда.

Преимущественно кругом таких экспериментов, по-видимому, целесообразно ограничить и применение термина «лиганд». В тех случаях, когда речь идет об анализе развития биологической реакции, используется термин «агонист» или более общее понятие «эффектор» (сюда относятся наряду с полными или частичными агонистами также и антагонисты).

Наконец, вместо термина «биологическая реакция» иногда говорят «биологический ответ», «биологический эффект». Мы будем пользоваться всеми этими терминами с учетом отмеченной выше специфики их применения; надеюсь, нам удастся избежать какой-либо путаницы по этому поводу.

* *

*

Многие рассматриваемые нами модели, соответствующие им уравнения и методы обработки данных применимы как в теории рецепторов, так и в ферментативной кинетике. Мы нигде не подчеркиваем этот факт (даже если соответствующие подходы берут свое начало именно в ферментативной кинетике), избегая тем самым соблазна объявить физическую энзимологию частным разделом теории рецепторов.

ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ: КИНЕТИКА И РАВНОВЕСИЕ

Модели процессов лиганд-рецепторного взаимодействия, обсуждаемые в настоящей главе, соответствуют некоторым механизмам, наиболее часто привлекаемым для анализа экспериментальных данных; не все они в равной степени правдоподобны с точки зрения современных представлений. Основное назначение приводимых ниже сведений — продемонстрировать особенности концентрационных или временных зависимостей образования лиганд-рецепторных комплексов, соответствующих различным моделям. Эти уравнения могут быть привлечены к анализу данных экспериментов, в которых количество связанного лиганда определяется непосредственно (прежде всего в опытах с радиоактивными лигандами); с другой стороны, они органически входят в более сложные модели, описывающие временное поведение или концентрационную зависимость реакций тест-объекта.

2.1. ПРОСТЕЙШАЯ МОДЕЛЬ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ. УРАВНЕНИЕ ЛЭНГМЮРА

Рассмотрим вначале простейший случай образования комплекса лиганд — рецептор со стехиометрией 1 : 1 в предположении, что рецепторы полностью независимы друг от друга, т. е. образование комплекса некоторым рецептором не влияет на взаимодействие остальных рецепторов с молекулами лиганда.

В этих условиях реакция связывания лиганда A с рецептором R запишется в виде



где k, k' — константы скоростей прямой и обратной реакции соответственно. Полагая общую концентрацию рецепторов (занятых и незанятых) в данной системе равной Q при концентрации лиганда, равной C , имеем для скорости изменения концентрации Z комплексов лиганд—рецептор в условиях избытка лиганда ($C \gg Q$)

$$\frac{dZ}{dt} = k(Q - Z)C - k'Z. \quad (2.1.2)$$

В равновесии $\left(\frac{dZ}{dt} = 0\right)$

$$Z^{\text{равн}} = \frac{QC}{K + C} \quad (2.1.3)$$

($K = k'/k$ — константа диссоциации комплекса лиганд — рецептор).

При скачкообразном изменении концентрации лиганда кинетика процесса достижения нового равновесия описывается уравнением

$$Z(t) = \frac{kQC + [(kC + k')Z^0 - kQC]e^{-(kC + k')t}}{kC + k'}, \quad (2.1.4')$$

где Z^0 — начальная концентрация комплексов.

Чаще всего в исследовательской практике встречаются два предельных случая:

1) препарат рецепторов, находившийся в среде, лишенной лиганда, в момент времени $t=0$ приводится в контакт с раствором лиганда, и выражение для $Z(t)$ приобретает вид

$$Z(t) = \frac{QC}{K + C} [1 - e^{-(k' + kC)t}]; \quad (2.1.4)$$

2) процесс отмыва (после переноса насыщенного до определенной степени лигандом препарата рецепторов в раствор, не содержащий лиганда) описывается выражением

$$Z(t) = Z^0 e^{-k't}. \quad (2.1.5)$$

Характер зависимостей (2.1.3)—(2.1.5) иллюстрирует рис. 2.1.

Сделаем несколько замечаний по поводу величины Q , входящей в уравнения (2.1.2)—(2.1.4) и другие зависимости подобного рода.

Поскольку обычно рецепторы иммобилизованы на фрагментах препарата, собственно процесс образования комплексов происходит в малой доле общего объема инкубационной среды, в сравнительно тонком слое раствора лиганда, прилегающем к препарату. Если, например, рецепторы локализованы на поверхности частиц и S — плотность рецепторов на единице поверхности ча-

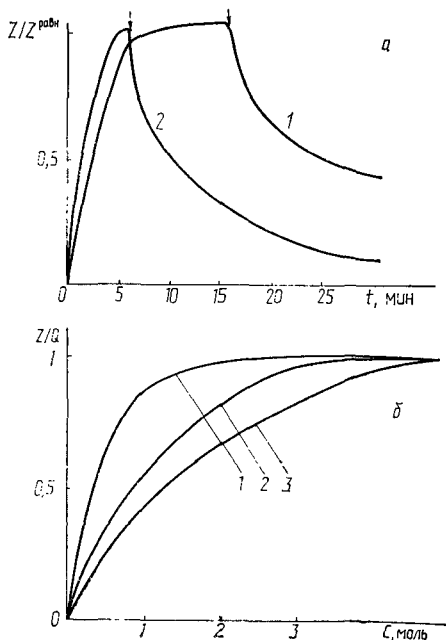


Рис. 2.1. Стандартная модель (2.1.2), случай избытка лиганда: *a* — кинетика ассоциации и диссоциации (начало отмыва помечено стрелкой); 1 — $k=0,1$ моль $^{-1}\cdot$ с $^{-1}$, $k'=0,1$ с $^{-1}$; 2 — $k=0,1$, $k'=0,2$; *б* — концентрационная зависимость связывания лиганда в равновесии: 1 — $K=0,25$ моль; 2 — 0,5; 3 — 1

стицы, «истинную» величину \bar{Q} , имеющую размерность объемной концентрации, можно представить в виде

$$\bar{Q} = S/l,$$

где l — некоторое эффективное значение «радиуса захвата» рецептором молекулы лиганда. Обычно принято представление \bar{Q} в виде усредненной концентрации рецепторов в инкубационной системе (их общее количество, деленное на объем). Поскольку, однако, в (2.1.2) —

(2.1.4) и выражениях, им подобных, эта величина входит в масштабный множитель, для оценки эффективных значений констант равновесия и констант скоростей реакции не имеет значения вопрос об «истинном» значении величины Q . Отметим тем не менее, что в некоторых случаях физический смысл получаемых оценок k_i , K_i существенно зависит от того обстоятельства, являются ли рецепторы равномерно распределенными по всему объему инкубационной смеси или иммобилизованы на поверхности клеток (субклеточных частиц и т. п.) [98, 99].

Если условие избытка лиганда не выполняется, уравнение (2.1.2) принимает вид

$$\frac{dZ}{dt} = k(Q - Z)(C - Z) - k'Z \quad (2.1.6)$$

и соответственно усложняются соотношения (2.1.3) и (2.1.4):

$$Z^{\text{равн}} = \frac{1}{2} [Q + C + K - \sqrt{(Q + C + K)^2 - 4QC}], \quad (2.1.7)$$

$$\begin{aligned} Z(t) &= \frac{q_1 [1 - \exp(-\beta t)]}{2k \left[1 - \frac{q_1}{q_2} \exp(-\beta t) \right]} \approx \\ &\approx Z^{\text{равн}} \frac{1 - \exp(-\beta t)}{1 - \frac{Z^{\text{равн}}}{QC} \exp(-\beta t)}, \end{aligned} \quad (2.1.8)$$

где $\beta = \sqrt{(kQ + kC + k')^2 - 4k^2QC}$; $q_1 = (kQ + kC + k') - \beta$; $q_2 = (kQ + kC + k') + \beta$.

Уравнение (2.1.2) часто называют изотермой сорбции Лэнгмюра; на самом деле зависимости аналогичной формы встречаются в работах более ранних исследователей. Мы предпочитаем уклониться от обсуждения вопроса об авторстве соотношений (2.1.2) — (2.1.8).

2.2. СВЯЗЫВАНИЕ ЛИГАНДА НЕСКОЛЬКИМИ ТИПАМИ РЕЦЕПТОРОВ

Если молекулы лиганда связываются (по-прежнему независимо) несколькими типами центров связывания с различными константами диссоциации и константами

скоростей, общее количество связанного лиганда определяется очевидными соотношениями

$$Z^{\text{равн}} = \sum_i \frac{Q_i C}{K_i + C} \quad (\text{равновесие}), \quad (2.2.1)$$

$$Z(t) = \sum_i \frac{Q_i C}{K_i + C} [1 - e^{-(k_i' + k_i C)t}] \quad (\text{связывание}), \quad (2.2.2)$$

$$Z(t) = \sum_i Z_i^0 e^{-k_i' t} \quad (\text{отмыв}). \quad (2.2.3)$$

При большом разнообразии центров связывания (n , следовательно, большом количестве констант k_i , k_i' и K_i) соотношения (2.2.1)–(2.2.3) оказываются неработоспособными. Можно, однако, предположить, что эти величины подчиняются некоторому распределению, и, например, оценить стационарный уровень связанного лиганда в виде

$$Z^{\text{равн}} = \tilde{Q} \int_{K^{\min}}^{K^{\max}} P(K) \frac{C}{K + C} dK, \quad (2.2.4)$$

где \tilde{Q} — общая концентрация центров связывания всех типов.

Число параметров такого уравнения может быть сравнительно невелико, однако неопределенность представлений о форме распределения $P(K)$ не позволяет рассчитывать на получение достаточно надежных соотношений вида (2.2.4).

В простейшем случае равномерного распределения K в интервале (K^{\min} — K^{\max}) имеем для равновесия:

$$Z^{\text{равн}} = \frac{\tilde{Q} C}{K^{\max} - K^{\min}} \ln \frac{C + K^{\max}}{C + K^{\min}}. \quad (2.2.5)$$

По-видимому, более оправданным было бы предположение о нормальном распределении величин F энергии связывания молекулы лиганда различными центрами. В самом деле, в терминах попарно-аддитивного приближения [10] можно рассматривать F как сумму вкладов U_{ij} парных взаимодействий атомов связывающего центра и молекулы лиганда; в этом случае, как известно, при любом распределении таких парных вкладов распреде-

ление $P(F)$ будет близко к нормальному при достаточно большом числе U_{ij} . Поскольку молекулы большинства биологически активных соединений сравнительно велики, можно полагать, что последнее требование выпол-

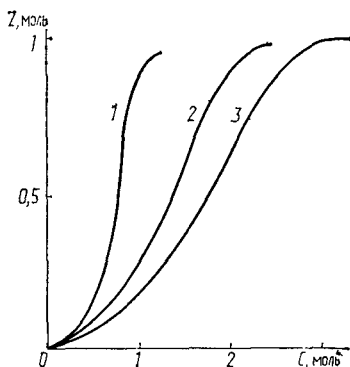


Рис. 2.2. Связывание лиганда набором центров связывания с параметрами, распределенными согласно (2.2.6): 1 — $\sigma_F=3$; 2 — 2; 3 — 1 ($F=10$ кДж/моль, $K=1$ моль)

няется. Тогда искомое распределение $P(K)$ окажется нормально-логарифмическим:

$$P(K) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_F} \exp \left[-\frac{(RT \ln K - \bar{F})^2}{2\sigma_F^2} \right], \quad (2.2.6)$$

где \bar{F} , σ_F^2 — соответственно среднее и дисперсия $P(F)$.

Зависимость $Z(C)$ не может быть в этом случае получена в аналитической форме; некоторое представление об особенностях ее поведения может дать рис. 2.2, на котором приведены результаты численного расчета функции (2.2.4) с распределением $P(K)$, заданным в форме (2.2.6) при различных значениях параметра σ_F .

Для описания кинетики связывания лиганда в рамках только что рассмотренных моделей необходимо сделать предположения о распределении уже двух величин — констант скоростей k , k' ; интерпретационная ценность полученных на этой основе соотношений была бы, очевидно, невысока.

2.3. СВЯЗЫВАНИЕ РЕЦЕПТОРОМ НЕСКОЛЬКИХ ТИПОВ ЛИГАНДОВ

Значительный интерес представляет случай взаимодействия с одновалентными рецепторами одного типа нескольких типов лигандов, присутствующих в различных концентрациях и различающихся величинами k_i , k'_i ,

K_i . При значительном избытке всех лигандов для каждого из них можно записать

$$\frac{dZ_i}{dt} = k_i \left(Q - \sum_j Z_j \right) C_i - k'_i Z_i. \quad (2.3.1)$$

Система уравнений в принципе интегрируется в квадратурах, однако при наличии более чем двух типов различных лигандов выражения для коэффициентов, входящих в решение, оказываются либо очень громоздкими, либо вообще не могут быть получены в аналитической форме. Впрочем, именно случай двух различных лигандов представляет наибольший интерес. Выражения для $Z_{\text{равн}}$, $Z(t)$ имеют вид [40, 184]:

$$Z_1^{\text{равн}} = \frac{QC_1}{C_1 + \left(1 + \frac{C_2}{K_2} \right) K_1}, \quad (2.3.2)$$

$$Z_2^{\text{равн}} = \frac{QC_2}{C_2 + \left(1 + \frac{C_1}{K_1} \right) K_2},$$

$$Z_i = Z_i^{\text{равн}} - E_i e^{-\beta_1 t} - F_i e^{-\beta_2 t}, \quad (2.3.3)$$

$$i = 1, 2,$$

$$\beta_{1,2} = \frac{1}{2} [k'_1 + k'_2 + k_1 C_1 + k_2 C_2 \pm \sqrt{(k'_1 - k'_2 + k_1 C_1 - k_2 C_2)^2 + 4k_1 k_2 C_1 C_2}]. \quad (2.3.4)$$

Коэффициенты E и F зависят от начальных условий; наибольший интерес представляют случаи одновременного применения двух эффекторов

$$Z_1|_{t=0} = 0, \quad Z_2|_{t=0} = 0 \quad (2.3.5)$$

и применения первого эффектора после установления равновесного уровня связывания второго

$$Z_1|_{t=0} = 0, \quad Z_2|_{t=0} = \frac{QC_2}{C_2 + K_2}, \quad (2.3.6)$$

При начальных условиях (2.3.5) коэффициенты E_i и F_i имеют вид:

$$E_i = \frac{\beta_2}{\beta_2 - \beta_1} D_i - \frac{QC_i k_i}{\beta_2 - \beta_1}, \quad (2.3.7)$$

$$F_i = -\frac{\beta_1}{\beta_2 - \beta_1} D_i + \frac{QC_i k_i}{\beta_2 - \beta_1}, \quad D_i = Z_i^{\text{равн}}. \quad (2.3.8)$$

При начальных условиях (2.3.6) коэффициенты уравнений (2.3.2) задаются выражениями

$$E_1 = \frac{\beta_2}{\beta_2 - \beta_1} Z_1^{\text{равн}} - \frac{1}{\beta_2 - \beta_1} \frac{QC_1 k_1}{1 + C_2/K_2}, \quad (2.3.9)$$

$$F_1 = -\frac{\beta_1}{\beta_2 - \beta_1} Z_1^{\text{равн}} + \frac{1}{\beta_2 - \beta_1} \frac{QC_1 k_1}{1 + C_2/K_2},$$

$$E_2 = -\frac{\beta_2}{\beta_2 - \beta_1} \left(\frac{QC_2}{C_2 + K_2} - Z_2^{\text{равн}} \right), \quad (2.3.10)$$

$$F_2 = \frac{\beta_1}{\beta_2 - \beta_1} \left(\frac{QC_2}{C_2 + K_2} - Z_2^{\text{равн}} \right).$$

Отмыв лигандов обоих типов осуществляется независимо и подчиняется соотношениям вида (2.1.5).

Соотношения (2.3.2) — (2.3.4) могут использоваться, в частности, для интерпретации результатов экспериментов по совместному применению агонистов и антагонистов или частичных агонистов (см. параграф 4.2), а также экспериментов по вытеснению меченого лиганда немеченым. В последнем случае чаще всего полагается $k_1 = k_2 = k$, $k'_1 = k'_2 = k'$, и соотношения (2.3.3), (2.3.4), (2.3.7) — (2.3.10) несколько упрощаются.

Все рассмотренные уравнения получены в предположении большого избытка обоих лигандов. В случае сравнимых концентраций свободных и связанных лигандов

$$\frac{dZ_1}{dt} = k_1(Q - Z_1 - Z_2)(C_1 - Z_1) - k'_1 Z_1, \quad (2.3.11)$$

$$\frac{dZ_2}{dt} = k_2(Q - Z_1 - Z_2)(C_2 - Z_2) - k'_2 Z_2.$$

В равновесии концентрации комплексов Z_1 и Z_2 связаны соотношением

$$Z_2 = \frac{Z_1 K_1 C_2}{Z_1 (K_1 - K_2) + K_2 C_1} \quad (2.3.12)$$

и Z_1 оказывается решением кубического уравнения

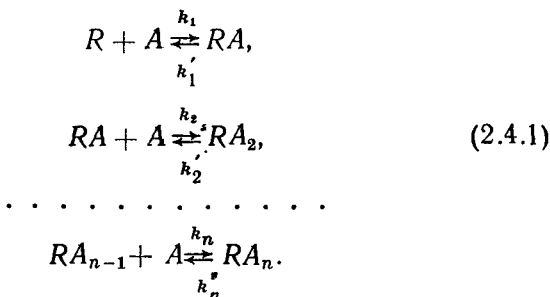
$$(K_1 - K_2) Z_1^3 + [K_2 C_1 + K_1 C_2 - (K_1 - K_2)(Q + K_1 + C_1)] Z_1^2 + \\ + [(K_1 - K_2) Q C_1 - K_2 C_2^2 - Q K_2 C_1 - K_1 K_2 C_1 - K_1 C_1 C_2] Z_1 + \\ + Q K_2 C_1 = 0.$$

Соответствующие кинетические зависимости не могут быть получены в аналитической форме.

2.4. ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ПРОИЗВОЛЬНОЙ СТЕХИОМЕТРИИ. КООПЕРАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ

Все рассмотренные выше модели предполагают связывание одним рецептором одной молекулы лиганда. В принципе, однако, можно допустить существование комплексов лиганд—рецептор $R_m A_n$ с любыми стехиометрическими коэффициентами. В сущности модели, описанные в параграфе 2.2, можно рассматривать как частный случай механизма образования комплексов вида RA_n .

Более подробно исследовались именно модели этого класса, предполагающие существование многовалентных рецепторов, одновалентных лигандов и образование комплекса RA_n путем последовательного присоединения лигандов:

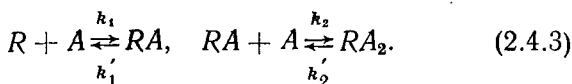


Если величины констант диссоциации

$$K_j = k_j' / k_j \quad (2.4.2)$$

одинаковы независимо от j , т. е. связывание каждой последующей молекулы лиганда не зависит от количества ранее связанных рецептором молекул, процесс связывания должен подчиняться соотношениям (2.1.3) — (2.1.5).

В противном случае имеют место эффекты, обычно именуемые кооперативными. Проиллюстрируем их простейшим случаем связывания каждым рецептором двух молекул лиганда [5, 67]:



При избытке лиганда

$$\frac{dZ_1}{dt} = 2k_1(Q - Z_1 - Z_2)C - k'_1Z_1 + 2k'_2Z_2 - k_2Z_1C, \quad (2.4.4)$$

$$\frac{dZ_2}{dt} = k_2Z_1C - 2k'_2Z_2, \quad (2.4.5)$$

где Z_1, Z_2 — концентрация комплексов RA, RA_2 . Коэффициенты 2 в правой части (2.4.4) и (2.4.5) обусловлены тем, что комплекс типа RA может образоваться путем присоединения молекулы лиганда к «первому» или «второму» сайту рецептора, и соответственно распад комплекса RA_2 может произойти за счет отделения одной из двух молекул лиганда. В равновесии

$$Z_1^{\text{равн}} = \frac{QC}{C + C^2/2K_2 + K_1/2}, \quad (2.4.6)$$

$$Z_2^{\text{равн}} = \frac{C}{2K_2} Z_1^{\text{равн}} = \frac{QC^2}{C^2 + 2CK_2 + K_1K_2}, \quad (2.4.7)$$

$$Z^{\text{равн}} = Z_1^{\text{равн}} + 2Z_2^{\text{равн}} = \frac{2QC(K_2 + C)}{(K_2 + C)^2 + K_2(K_1 - K_2)}. \quad (2.4.8)$$

Интегрируя (2.4.4), (2.4.5), получаем

$$Z_1 = Z_1^{\text{равн}} - Ee^{-\beta_1 t} - Fe^{-\beta_2 t}, \quad (2.4.9)$$

$$Z_2 = Z_2^{\text{равн}} - E^*e^{-\beta_1 t} - F^*e^{-\beta_2 t}, \quad (2.4.10)$$

$$\beta_{1,2} = \frac{1}{2} [(2k_1 + k_2)C + k'_1 + 2k'_2 \pm$$

$$\pm \sqrt{(2k_1C + k_2C + k'_1 + 2k'_2)^2 - 8(k_1k_2C^2 + 2k'_2k_1C + k'_1k'_2)}. \quad (2.4.11)$$

При начальных условиях

$$Z_1|_{t=0} = 0, \quad Z_2|_{t=0} = 0 \quad (2.4.12)$$

$$E = \frac{\beta_2 Z_1^{\text{равн}} - 2k_1 QC}{\beta_2 - \beta_1}, \quad F = \frac{2k_1 QC - \beta_1 Z_1^{\text{равн}}}{\beta_2 - \beta_1}, \quad (2.4.13)$$

$$E^* = -\frac{\beta_2 Z_2^{\text{равн}}}{\beta_2 - \beta_1}, \quad F^* = -\frac{\beta_1 Z_2^{\text{равн}}}{\beta_2 - \beta_1}. \quad (2.4.14)$$

Общее количество связанного лиганда

$$Z = Z_1 + 2Z_2 = (Z_1^{\text{равн}} + 2Z_2^{\text{равн}}) - (E + 2E^*)e^{-\beta_1 t} - (F + 2F^*)e^{-\beta_2 t}. \quad (2.4.15)$$

В случае отмыва

$$Z_1|_{t=0} = Z_1^0, \quad Z_2|_{t=0} = Z_2^0 \quad (2.4.16)$$

имеем

$$Z_1 = \left(Z_1^0 - \frac{2k_2' Z_2^0}{k_1' - 2k_2'} \right) e^{-k_1' t} + \frac{2k_2' Z_2^0}{k_1' - 2k_2'} e^{-k_2' t}, \quad (2.4.17)$$

$$Z_2 = Z_2^0 e^{-k_2' t}, \quad (2.4.18)$$

$$Z = Z_1 + 2Z_2 = \left(Z_1^0 - \frac{2k_2' Z_2^0}{k_1' - 2k_2'} \right) e^{-k_1' t} + \frac{2(k_1' - k_2')}{k_1' - 2k_2'} Z_2^0 e^{-k_2' t}. \quad (2.4.19)$$

Заметим, что при $C \gg K_2$, K_1 кривая $Z_1(t)$ может носить переходной характер (рис. 2.3, а), так же как и кривая отмыва (2.4.17) при $Z_2^0 \gg Z_1^0$. Если предположить, что отмыв начинается после достижения равновесия в среде с концентрацией лиганда \tilde{C} , то с учетом (2.4.8) такой эффект должен наблюдаться при $\tilde{C} \gg K_2$ (рис. 2.3, б). Равновесная концентрационная зависимость $Z_1(C)$ также носит переходной характер.

Рассмотренная выше модель (2.4.3) симметрична в том смысле, что оба связывающих сайта рецептора одинаковы. Можно, однако, обобщить ее и на тот случай, если они различаются величинами констант диссоциации. Обозначим через R^1A и R^2A комплексы, образованные с

одним лигандом посредством сайтов первого и второго типов соответственно:

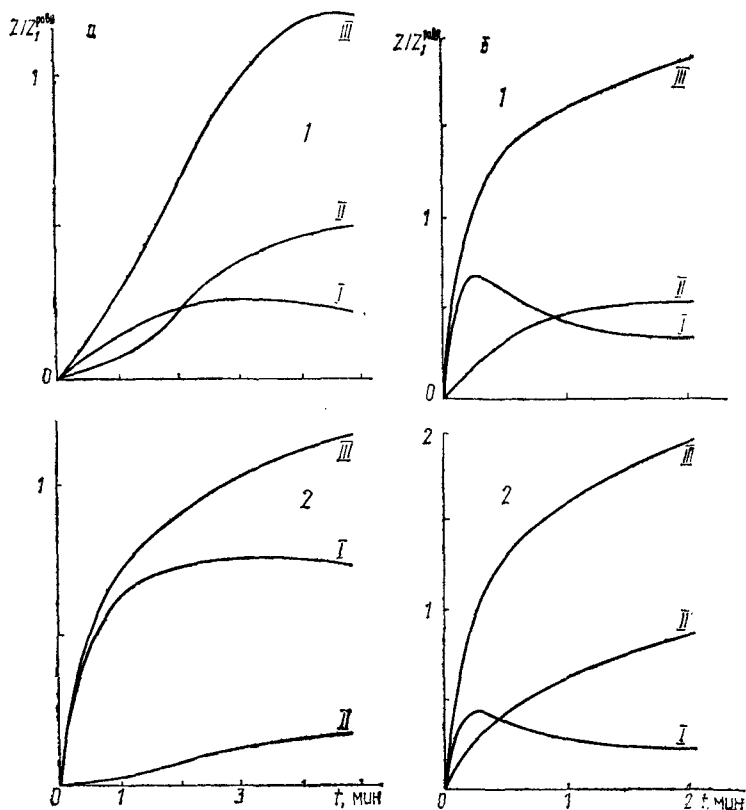
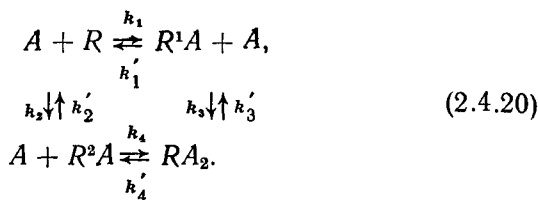


Рис. 2.3. Эффекты кооперативности: модель двух взаимодействующих лигандов (2.4.3): а — кинетика ассоциации; б — кинетика диссоциации (I — Z_1 ; II — Z_2 ; III — $Z = Z_1 + 2Z_2$; 1 — $K_1/K_2 = 0,1$ (положительная кооперативность); 2 — $K_1/K_2 = 10$ (отрицательная кооперативность))

Четыре константы диссоциации $K_i = k_i^*/k_i$ в (2.4.20) связаны условием

$$K_1 K_3 = K_2 K_4. \quad (2.4.21)$$

В равновесии

$$Z^{\text{равн}} = \frac{QC [K_3(1 + K_1/K_2) + 2C]}{K_1 K_3 + CK_3(1 + K_1/K_2) + C^2}. \quad (2.4.22)$$

При

$$K_1 > K_3 \quad (2.4.23)$$

(или $K_1 > K_2$ в предыдущей модели) процесс образования комплексов характеризуется положительной кооперативностью, если же

$$K_1 < K_3, \quad (2.4.24)$$

говорят об отрицательной кооперативности. Используется также понятие фактора взаимодействия (положительного или отрицательного)

$$I_{1,2} = K_1/K_3. \quad (2.4.25)$$

Понятия положительной или отрицательной кооперативности естественным образом могут быть обобщены на случай сложной стехиометрии комплекса RA_n ; условия (2.4.23) и (2.4.24) приобретают вид

$$K_1 > K_2 > \dots > K_i > \dots > K_n \quad (2.4.26)$$

и

$$K_1 < K_2 < \dots < K_i < \dots < K_n. \quad (2.4.27)$$

Возможны, очевидно, и более сложные смешанные случаи.

Вариант модели (2.4.1), соответствующий случаю $n = 4$, был предложен Эдером [39] для описания процесса связывания кислорода гемоглобином; в этой модели все связывающие центры полагались равноправными, а величины констант диссоциации K_j для каждого промежуточного комплекса — различными.

В равновесии

$$Z^{\text{равн}} = \frac{Q(K_2 K_3 K_4 C + 3K_3 K_4 C^2 + 3K_4 C^3 + C^4)}{K_1 K_2 K_3 K_4 + 4K_2 K_3 K_4 C + 6K_3 K_4 C^2 + 4K_4 C^3 + C^4}. \quad (2.4.28)$$

Происхождение целочисленных коэффициентов в (2.4.28) такое же, как множителей 2 в (2.4.4), — они появляются в результате учета числа возможных способов

образования каждого из комплексов RA_j . Работа [39] сыграла важную роль в развитии представлений о механизмах процессов связывания белками различных лигандов.

Кинетика процессов, описываемых моделью с отрицательной кооперативностью, $n=4$, исследовалась в серии машинных экспериментов в работе [163]. Как и в примере, приведенном на рис. 2.3, рассматривались два варианта: увеличение константы диссоциации промежуточного комплекса при присоединении очередной молекулы лиганда за счет изменения константы скорости только прямой или только обратной реакции. Во втором случае равновесный уровень достигается быстрее; кстати, именно этот механизм представляется в настоящее время более вероятным [158, 247].

Несколько отличная модель, предполагающая линейную зависимость константы диссоциации вновь образуемых комплексов от количества уже существующих, рассмотрена в работах [95, 96].

Предельному случаю сильно выраженной положительной кооперативности соответствует популярное уравнение Хилла. Здесь речь идет о механизме, допускающем лишь одновременное присоединение всех молекул эффектора к рецептору без образования промежуточных комплексов RA , RA_2 , RA_3 , ..., RA_n , т. е. о реакции $(n+1)$ -го порядка:



Тогда

$$\frac{dZ}{dt} = k(Q - Z)C^n - k'Z, \quad (2.4.30)$$

так что

$$Z^{\text{равн}}(C) = \frac{QC^n}{K + C^n}, \quad (2.4.31)$$

$$Z(t) = \frac{QC^n}{K + C^n} \{1 - \exp[-(k' + kC^n)t]\}. \quad (2.4.32)$$

Для отмыва

$$Z(t) = Z^0 e^{-k't}. \quad (2.4.33)$$

Соответствующее семейство кривых $Z^{\text{равн}}(C)$ представлено на рис. 2.4. Формально эту модель можно рассматривать как частный случай (2.4.1), полагая, что в

последовательности реакций образования комплексов RA, RA_2, \dots, RA_n константа диссоциации, соответствующая последней стадии, много меньше всех предыдущих:

$$K_n \ll K_1, K_2, \dots, K_{n-1}.$$

Можно, например, убедиться, что при $K_1 \gg K_2$ (2.4.8) переходит в

$$Z^{\text{равн}} \simeq \frac{QC^2}{K_1K_2 + C^2}, \quad (2.4.34)$$

причем эффективная константа диссоциации, равная K_1K_2 , есть не что иное, как константа диссоциации реакции, протекающей по механизму (2.4.29).

На основании представлений о том, что рецепторы могут диффундировать в плоскости мембраны, образуя кластеры [106], возник ряд моделей, предполагающих существование многовалентных лигандов и образование сложных комплексов структуры R_mA_n . Характерный пример — так называемая двухшаговая модель [63, 66]; здесь описывается ее вариант, исследованный в работе [58].

Предполагается существование рецепторных единиц двух типов: регуляторной R_1 и эффекторной R_2 . На первом этапе происходит образование комплекса лиганда с рецепторами первого типа:



затем вновь образовавшийся комплекс связывает рецепторную единицу второго типа:

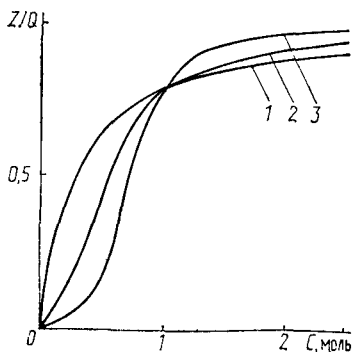
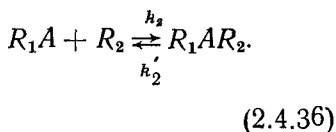
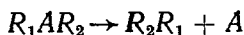


Рис. 2.4. Концентрационная зависимость связывания лиганда в равновесии (модель Хилла (2.4.29): 1 — $n=1$; 2 — 2; 3 — 4

Следует обратить особое внимание на то обстоятельство, что диссоциация тройного комплекса по схеме



не предполагается.

Процесс описывается системой дифференциальных уравнений

$$\frac{dZ_1}{dt} = k_1C(Q_1 - Z_1 - Z_2) - k_1'Z_1 - k_2Z_1(Q_2 - Z_2) + k_2'Z_2, \quad (2.4.37)$$

$$\frac{dZ_2}{dt} = k_2Z_1(Q_2 - Z_2) - k_2'Z_2,$$

где Q_1 , Q_2 — концентрации соответственно рецепторов первого и второго типов; Z_1 — концентрация комплексов R_1A , а Z_2 — комплексов R_1AR_2 .

Система (2.4.37) не интегрируется в квадратурах; равновесные концентрационные зависимости Z_1 , Z_2 определяются соотношениями

$$Z_1^{\text{равн}} = \frac{CQ_1 - CK_2 - K_1K_2 - CQ_2}{2(K_1 + C)} - \frac{\sqrt{(CQ_1 - CK_2 - K_1K_2 - CQ_2)^2 + 4(K_1 + C)CQ_1K_2}}{2(K_1 + C)}, \quad (2.4.38)$$

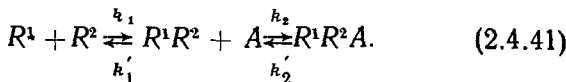
$$Z_2^{\text{равн}} = \frac{Z_1^{\text{равн}}Q_1}{K_2 + Z_1^{\text{равн}}}. \quad (2.4.39)$$

Последняя величина в удобной форме может быть выражена также через общее количество связанного лиганда:

$$Z = Z_2^{\text{равн}} + Z_1^{\text{равн}},$$

$$Z_2^{\text{равн}} = \frac{1}{2} [Z + Q_2 + K_2 - \sqrt{(Z + Q_2 + K_2)^2 - 4ZQ_2}]. \quad (2.4.40)$$

Этой модели близки две другие схемы. Согласно первой, сначала происходит образование комплекса двух типов рецепторов, а лишь затем — связывание лиганда [58]:



Тогда

$$\frac{dZ_1}{dt} = k_1(Q_1 - Z_1 - Z_2)(Q_2 - Z_1 - Z_2) - k'_1 Z_1 - k_2 Z_1 C + k'_2 Z_2, \quad (2.4.42)$$

$$\frac{dZ_2}{dt} = k_2 Z_1 C - k'_2 Z_2,$$

где Q_1, Q_2 — по-прежнему концентрации двух типов рецепторов, а Z_1, Z_2 — комплексов типа R^1R^2 и R^1R^2A соответственно.

В равновесии

$$Z_1^{\text{равн}} = \frac{[(Q_1 + Q_2)q - K_1] - \sqrt{[(Q_1 + Q_2)q - K_1]^2 - 4q^2 Q_1 Q_2}}{2q^2},$$

$$Z_2^{\text{равн}} = \frac{C}{K_2} Z_1^{\text{равн}}, \quad q = \frac{K_2 + C}{K_2}. \quad (2.4.43)$$

В этом случае в отличие от предыдущего процесс диссоциации комплекса Z_2 будет протекать по экспоненциальному закону.

Другая группа моделей отличается от (2.4.35), (2.4.36) тем, что предполагается наличие лишь одного сорта рецепторов; образование тройного комплекса R_2A происходит вследствие индуцированной лигандом самоагрегации рецепторов [168] или «двухвалентности» лиганда [181]:

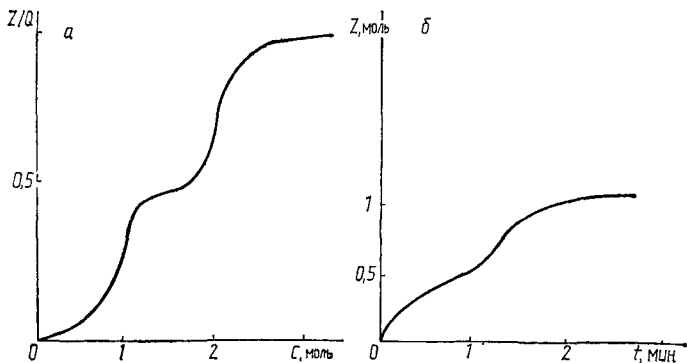
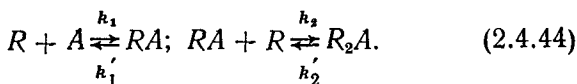


Рис. 2.5. Модель двухвалентного лиганда (2.4.44): а — концентрационная зависимость; б — кинетика ассоциации

Представление о «двухвалентном лиганде», приводя к модели, формально близкой моделям (2.4.35), (2.4.36) и (2.4.41), с точки зрения содержательного смысла предпочтительнее в том отношении, что на его основании объясняется отмечавшаяся выше особенность — отсутствие диссоциации тройного комплекса на лиганд и комплекс пары рецепторов.

Модель, предложенная в работе [94] для описания механизма действия β -адренергических рецепторов, является комбинацией двух предыдущих; в этом случае формирование тройного комплекса R^1AR^2 возможно как по схеме (2.4.41), так и по схеме (2.4.35), (2.4.36).

Равновесные зависимости $Z_i^{\text{равн}}$ в этом случае являются решениями кубического уравнения с довольно громоздкими коэффициентами и содержат пять параметров, подлежащих экспериментальному определению.

Зависимости $Z^{\text{равн}}(C)$, $Z(C, t)$, характерные для некоторых моделей, рассмотренных выше, представлены на рис. 2.5.

2.5. МНОГОКОМПАРТМЕНТНЫЕ МОДЕЛИ

Во всех рассмотренных выше случаях предполагалось, что рецепторы локализованы на поверхности препарата и легко доступны молекулам лиганда. Тем самым игнорировались два момента: возможное ограничение диффузии эффекта к рецептору и влияние средства эффектора к среде, составляющей непосредственное окружение рецептора.

Этот недостаток устранен в «модели биофазы», предложенной в 1955 г. Фурхготтом [123]. Рецепторы предполагаются в этом случае расположенными в некоем компартменте («биофазе»), который в свою очередь находится в контакте с инкубационной средой (рис. 2.6).

Система уравнений, описывающая процесс образования комплексов, тогда примет вид

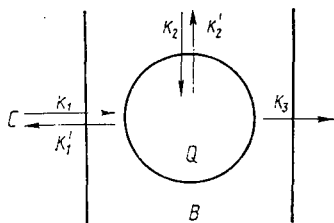


Рис. 2.6. «Модель биофазы»

$$\begin{aligned} \frac{dZ_1}{dt} &= k_1 C (B - Z_1) - k'_1 Z_1 - k_2 Z_1 (Q - Z_2) + \\ &\quad + k'_2 Z_2 - k_3 Z_1, \\ \frac{dZ_2}{dt} &= k_2 Z_1 (Q - Z_2) - k'_2 Z_2. \end{aligned} \quad (2.5.1)$$

Здесь Z_1 — концентрация эффектора в биофазе; Z_2 — концентрация комплексов; B — предельная емкость биофазы, а смысл констант скорости $k_1, k'_1, k_2, k'_2, k_3$ ясен из рис. 2.6.

Для стационарной зависимости получаем выражение

$$Z_2^{\text{равн}} = \frac{QCB}{K_2(K_1 + k_3/k_1) + C(B + K_2)}, \quad (2.5.2)$$

где $K_1 = k'_1/k_1$; $K_2 = k'_2/k_2$.

Заметим, что форма зависимости (2.5.2) не отличается от (2.1.3); достаточно положить

$$\tilde{Q} = \frac{QB}{B + K_2}, \quad \tilde{K} = \frac{K_2(K_1 + k_3/k_1)}{B + K_2}. \quad (2.5.3)$$

Система (2.5.1) также не интегрируется; в аналитической форме могут быть получены лишь некоторые приближенные решения. Так, при $Q \gg Z_2, B \gg Z_1$ имеем [7]

$$Z_2 = \frac{QC}{K_1 K_2} \left(1 - \frac{\beta_2}{\beta_2 - \beta_1} e^{-\beta_1 t} - \frac{\beta_1}{\beta_2 - \beta_1} e^{-\beta_2 t} \right), \quad (2.5.4)$$

где

$$\begin{aligned} \beta_{1,2} &= \frac{1}{2} [k'_2 + k'_1 + k_2 Q \pm \\ &\quad \pm \sqrt{(k'_2 + k'_1 + k_2 Q)^2 - 4k'_1 k'_2}], \\ &\quad \beta_1 < \beta_2. \end{aligned}$$

Соответственно для процесса отмыва

$$Z_2 = Z_2^0 \left(\frac{\beta_2}{\beta_2 - \beta_1} e^{-\beta_1 t} - \frac{\beta_1}{\beta_2 - \beta_1} e^{-\beta_2 t} \right). \quad (2.5.5)$$

Другой предельный случай: $Z_1 \gg Z_2$ [6]. Тогда

$$Z_2 = \frac{k_2 Q}{\delta} \Theta(t) \exp(-Dt - Fe^{-\delta t}), \quad (2.5.6)$$

где

$$\Theta(t) = \int_0^1 (1-y) y^{-[(D/\delta)+1]} e^{Fy} dy;$$

$$\delta = k_1 C + k'_1 + k_3, \quad F = k_1 C B / \delta^2; \quad (2.5.7)$$

$$D = (k_1 k_2 C B / \delta) + k'_2.$$

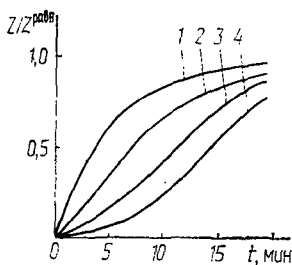


Рис. 2.7. «Модель биофазы» (2.5.1).
Кинетика ассоциации: 1 — $k_1 = 2 \cdot 10^6$ моль \cdot с $^{-1}$; 2 — $2 \cdot 10^5$; 3 — $2 \cdot 10^4$; 4 — $k_1 = 2 \cdot 10^3$ моль \cdot с $^{-1}$

Некоторое представление о форме зависимостей $Z_2(C, t)$, характерных для «модели биофазы», дает рис. 2.7.

Естественным обобщением «модели биофазы» является модель, предполагающая, что на пути к рецептору молекуле эффиктора приходится преодолеть несколько различных по физико-химическим свойствам фаз (рис. 2.8). Очевидно, из-за обилия подлежащих опреде-

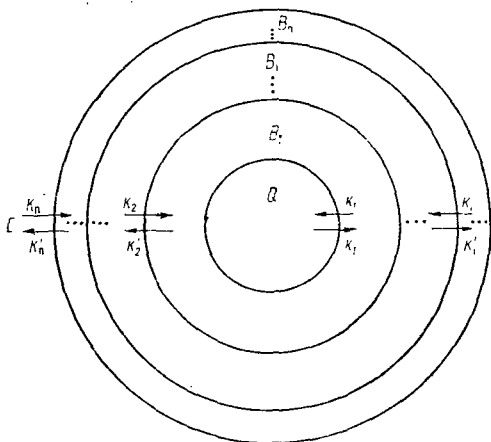


Рис. 2.8. Обобщенная «модель биофазы»

лению констант модели такого рода вряд ли пригодны для непосредственной интерпретации экспериментальных зависимостей; стоит, однако, указать на некоторое важное свойство равновесных кривых $Z(C)$, характерных для подобного рода механизмов. Продемонстрируем его на примере иерархически вложенных друг в друга «биофаз» (рис. 2.8).

В условиях избытка эффектора каждая из фаз достигает равновесного насыщения:

$$Z_i = \frac{B_i Z_{i-1}}{K_i + Z_{i-1}}. \quad (2.5.8)$$

С помощью преобразований типа (2.5.3) могут быть получены зависимости $Z_i(Z_{i-2})$, $Z_i(Z_{i-3})$ и т. д., причем всякий раз это будут гиперболические функции, имеющие форму (2.1.3). Такую же форму будет иметь окончательно равновесная зависимость концентрации лиганд-рецепторных комплексов Z_n от концентрации лиганда.

2.6. РАВНОВЕСИЕ: ЭЛЕМЕНТЫ ОБЩЕЙ ТЕОРИИ

Рассмотренные выше модели достаточно просты по своей структуре, содержат небольшое число параметров, и, как следствие, равновесные зависимости $Z_{\text{равн}}(C)$ почти всегда могут быть получены в виде компактных и наглядных аналитических выражений. В задачах анализа процессов связывания молекул биорегуляторов специфическими рецепторными структурами необходимость обращения к более громоздким моделям возникает крайне редко (речь идет именно о **необходимости**, т. е. о тех случаях, которые принципиально не могут быть интерпретированы в рамках простых моделей).

Однако для полноты картины полезно рассмотреть и обобщенный подход, позволяющий анализировать модели гораздо более сложные. Его начала были развиты в работах Эдера [39] и Клотца [14, 154, 155]; здесь он приводится в трактовке, принадлежащей Флетчеру [117, 119].

Обсуждаемая теория применялась главным образом для описания процессов связывания белками низкомолекулярных лигандов, а также сложных моделей аллостерических ферментов [54, 55, 57, 59, 61, 79, 80, 160, 183; 215]. Предполагается, что на одной белковой молекуле есть N центров связывания; в наиболее общем случае все константы диссоциации полагаются различными, а про-

цессы связывания молекул лиганда отдельными центрами — взаимозависимыми, т. е. величина константы диссоциации, соответствующей данному центру, зависит от того, заняты или свободны прочие центры.

В растворе, очевидно, будут представлены различные типы комплексов разной стехиометрии; каждый из них может диссоциировать по нескольким механизмам с раз-

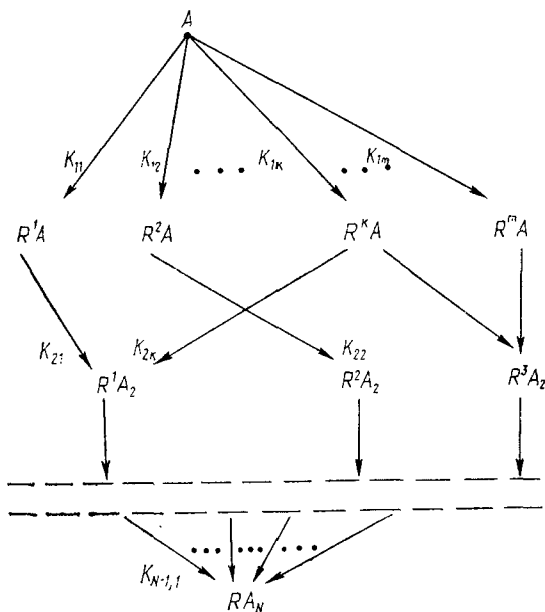


Рис. 2.9. К выводу уравнения (2.6.8)

ными константами диссоциации K^{ij} (рис. 2.9). Для каждого из таких путей диссоциации справедливо соотношение

$$Z_i^{hj} = K^{hj} Z_{i-1}^{hj}. \quad (2.6.1)$$

Так, может реализоваться N комплексов структуры RA , и общее их количество окажется равным

$$Z_1 = \sum_{i=1}^N Z_1^i = Z_0 C \sum_i K_1^{0i} = Z_0 C S_1, \quad (2.6.2)$$

где Z_0 — концентрация свободного белка. Концентрация комплексов вида RA_2 опишется выражением

$$Z_2 = \sum_k \sum_j K_2^{kj} Z_1^j C = Z_0 C^2 \sum_k \sum_j K_2^{kj} K_1^{0j} = Z_0 C^2 S_2; \quad (2.6.3)$$

аналогично

$$Z_3 = Z_0 C^3 S_3, \quad (2.6.4)$$

$$\cdot \quad \cdot \quad \cdot \quad \cdot \quad \cdot$$

$$Z_N = Z_0 C^N S_N.$$

Общее количество связанного лиганда

$$Z = \sum_k k Z_k = Z_0 \sum_k k S_k C^k. \quad (2.6.5)$$

Поскольку

$$Z_0 + Z_1 + \dots + Z_N = Q, \quad (2.6.6)$$

имеем с учетом (2.6.2)—(2.6.4)

$$Z_0 = Q \left(1 + \sum_k S_k C^k \right)^{-1}. \quad (2.6.7)$$

Таким образом,

$$Z = \frac{Q \sum_k k S_k C^k}{1 + \sum_k S_k C^k}. \quad (2.6.8)$$

Знаменатель (2.6.8)

$$P_N(C) = 1 + \sum_{k=1}^N S_k C^k \quad (2.6.9)$$

— величина, обратная доле свободного белка, называется полиномом связывания (binbing polynomial); это понятие играет важную роль в термодинамике процессов рассматриваемого типа [62, 227, 256].

Общее количество связанного лиганда можно выразить через полином $P_N(C)$ следующим образом:

$$Z = QC \frac{d \ln P_N(C)}{dC}. \quad (2.6.10)$$

Рассмотрим простейшую систему: молекула белка обладает независимыми центрами связывания лиганда с константами диссоциации K_1, K_2, \dots, K_N .

Равновесная зависимость $Z(C)$ в этом случае, очевидно, имеет рассмотренную ранее форму (2.2.1):

$$Z(C) = \sum_i \frac{Q_i C}{C + K_i}. \quad (2.6.11)$$

Можно положить (как будет показано ниже, без утраты общности)

$$Q_1 = Q_2 = \dots = Q_i = \dots = Q.$$

После приведения к общему знаменателю имеем

$$Z(C) = \frac{QC \sum_i \prod_{j \neq i} (K_j + C)}{\prod_i (K_i + C)}. \quad (2.6.12)$$

С другой стороны, выразим полином $P_N(C)$ через его корни Φ_i в виде:

$$P_N(C) = S_N \prod_i (C - \Phi_i). \quad (2.6.13)$$

Подставляя это выражение в (2.6.10), получаем

$$Z = QC \frac{\sum_i \prod_{j \neq i} (C - \Phi_j)}{\prod_i (C - \Phi_i)} = \frac{QC}{\sum_i (C - \Phi_i)}. \quad (2.6.14)$$

Сходство между (2.6.14) и (2.6.11) очевидно. Отметим, что в силу положительности всех коэффициентов S_i вещественные корни Φ_i должны быть отрицательными, так что можно обозначить

$$K_i = -\Phi_i.$$

Далее, некоторые корни могут оказаться кратными; группируя соответствующие совпадающие члены (2.6.14), получаем

$$Z = QC \sum_i \frac{m_i}{C + K_i},$$

где m_i —кратность корня Φ_i . Последнее выражение не отличается от (2.6.11), если принять

$$Q_i = m_i Q.$$

Таким образом, зависимость $Z(C)$, характеризующаяся полиномом связывания, у которого все корни вещественны, формально эквивалентна модели с независимыми центрами связывания. Если среди корней полинома $P_N(C)$ есть комплексные, то суммы пар слагаемых (2.6.14), соответствующие

ющих комплексно-сопряженным корням $\Phi_j = a_j + ib_j$ и $\bar{\Phi}_j = a_j - ib_j$, образуют вещественное выражение

$$\frac{C}{C - \Phi_j} + \frac{C}{C - \bar{\Phi}_j} = \frac{2C(a_j + C)}{C^2 + 2a_jC + a_j^2 + b_j^2},$$

что совпадает с выражением $Z(C)$ для модели двух взаимодействующих рецепторов с положительной кооперативностью (2.4.22), если принять

$$a_j = \frac{1}{2} K_3 (1 + K_1/K_2), \quad a_j^2 + b_j^2 = K_1 K_3.$$

Следовательно, всякая изотерма связывания может формально трактоваться в терминах модели, содержащей определенное количество независимых центров связывания и некоторое количество взаимодействующих пар центров с положительной кооперативностью. В случае достаточно сложных систем с многими центрами связывания это порождает ряд проблем при дискриминации моделей [56, 60, 117, 118]; однако анализ результатов экспериментов с фармакологическими рецепторами обычно предполагает использование моделей с немногими центрами связывания. Следствия приведенных выше заключений для анализа кривых $Z^{\text{равн}}(C)$ в терминах некоторых простейших модельных представлений будут рассмотрены в параграфе 5.9.

РАЗВИТИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ

Схематически достаточно общий случай механизма развития биологической реакции, индуцированной действием на специфические рецепторы соответствующего биорегулятора, можно рассматривать в терминах связей между величиной реакции и количеством образовавшихся комплексов эффектор—рецептор (вообще говоря, разных типов), их состоянием, а также состоянием систем, обеспечивающих развитие реакции [136, 186, 213, 214, 231] (рис. 3.1). Оправданно предположить, что влияние уровня Z на реакцию и состояние обеспечивающих систем будет односторонним, а характеристики развития реакции и состояния обеспечивающих систем могут взаимно влиять друг на друга [136, 142, 186]. Каналы связи,

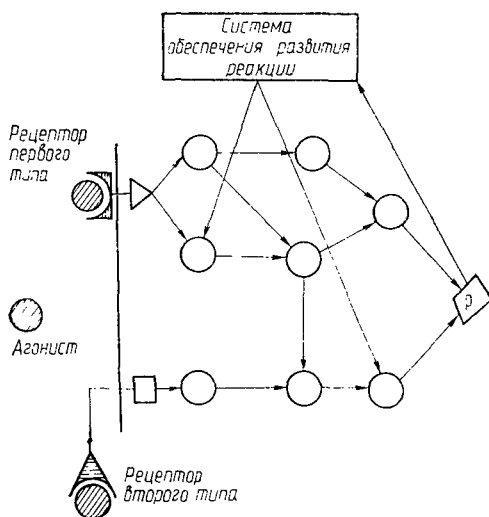


Рис. 3.1. Общая схема развития биологической реакции под действием некоторого эффектора

обозначенные на рис. 3.1 просто стрелками, на самом деле могут иметь более сложную структуру; возможно, например, что сигнал от рецептора к системе, в которой развивается реакция, распространяется по нескольким (в общем случае взаимодействующим) каналам.

Рассмотрим вначале подробнее эту систему, полагая, что состояние обеспечивающих систем не изменяется в течение развития биологической реакции.

Обычно нет и речи о том, чтобы пытаться описать количественно такую громоздкую схему во всех деталях; даже в случае биорегуляторов, механизмы действия которых сравнительно хорошо изучены, структура многих звеньев такой схемы известна лишь приблизительно. Впрочем, если бы и удалось выписать соответствующие уравнения, вряд ли они оказались бы пригодными для анализа кривых доза — эффект и время — эффект по упоминавшейся уже причине — из-за обилия подлежащих определению констант.

На практике, таким образом, приходится пользоваться моделями, сильно редуцированными, может быть даже примитивными. Это разумеется, не следствие невежества их авторов, а попытка найти выход из положения. Можно ли, в самом деле, лаконично, не вдаваясь в подробности, одним-двумя, от силы тремя параметрами охарактеризовать особенности «пострецепторных» процессов развития биологической реакции тест-объекта на некий физиологически активный препарат?

3.1. ОБЩИЕ СООБРАЖЕНИЯ

Вообще говоря, величина биологической реакции тест-объекта в ответ на применение некоторого агониста в определенных условиях есть функционал вида

$$\rho(C, t) = \rho[Z(C, \tau), \rho(\tau)], \quad (3.1.1)$$

т. е. значение ρ в момент t зависит от «предыстории» развития реакции — формы функции $Z(C, \tau)$, $\rho(\tau)$ в промежутках времени $\tau \leq t$.

В случае, если константы скоростей k'_i , β_i , определяющих развитие реакции формирования комплексов рецептор — эффектор, велики по сравнению с константами скоростей p_j , характерными для «пострецепторных» этапов, в области

$$t \gg 1/k'_i, 1/\beta_i \quad (3.1.2)$$

зависимость $\rho(C, t)$ примет вид:

$$\rho(C, t) = R[Z^{\text{равн}}(C), \rho(\tau)], \quad (3.1.3)$$

или в пренебрежении эффектами начального этапа

$$t \sim 1/p_i \quad (3.1.4)$$

$$\rho(C, t) = f[Z^{\text{равн}}(C), t]. \quad (3.1.5)$$

Иными словами, равновесный уровень $Z^{\text{равн}}$ устанавливается в этом случае практически мгновенно по сравнению со скоростью развития биологического ответа, и кинетика формирования комплексов агонист — рецептор не влияет на форму зависимости $\rho(t)$ (рис. 3.2).

Случай противоположный — пострецепторные этапы развиваются намного быстрее, чем процесс формирования комплексов; в области

$$t \gg 1/p_j \quad (3.1.6)$$

можно рассматривать $\rho(C, t)$ в виде функционала:

$$\rho(C, t) = R[Z(C, t), \rho(\tau)], \quad (3.1.7)$$

зачастую возможно приближение

$$\rho(C, t) = f[Z(C, t)]. \quad (3.1.8)$$

Такое представление зависимости $\rho(C, t)$ может быть оправдано, например, в случае весьма малых концентраций агониста; в самом деле, если константы β_i имеют форму

$$\beta = k + kC \quad (3.1.9)$$

или (2.3.4), в силу $K_i \gg K'_i$ они определяются главным образом величиной концентрации агониста C . С другой стороны, при низких концентрациях агониста и соответ-

ственно малых величинах ρ в меньшей мере выражена зависимость текущего ответа $\rho(C, t)$ от «предыстории» развития реакции.

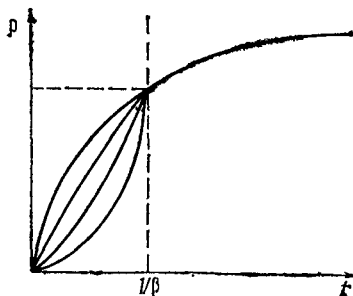


Рис. 3.2. Развитие реакции в области $t \gg 1/\beta_i$, не зависящее от течения начальной фазы

В равновесии функцию $\rho(C)$ можно представлять в виде:

$$\rho(C) = f[Z^{\text{равн}}(C)]. \quad (3.1.10)$$

Рассмотренные предельные случаи служат иллюстрацией условий применимости одного из основных положений «оккупационной» теории в существующем ныне виде — гипотезы о том, что биологическая реакция является функцией числа образовавшихся комплексов:

$$\rho(C, t) = f[Z(C, t)]. \quad (3.1.11)$$

Такое представление функции ρ более или менее оправдано в случаях, определяемых условиями (3.1.2) и (3.1.6); при близких значениях характерных времен процесса образования комплексов и совокупности пострецепторных процессов его использование связано с большим риском. Запись равновесной зависимости в форме

$$\rho(C) = f[Z(C)] \quad (3.1.12)$$

представляется обоснованной в гораздо большей степени, чем представление в виде (3.1.11) кинетических кривых.

Простейшие модели предполагают линейную зависимость ρ от Z . Согласно Кларку [83], биологическая реакция считалась пропорциональной числу занятых рецепторов:

$$\rho(C) = mZ(C). \quad (3.1.13)$$

Ариенс [41] указал на то обстоятельство, что в ряду аналогов некоторого физиологически активного агента коэффициент пропорциональности m может варьировать от одного препарата к другому; отношение величин m_i данного аналога и m_0 «стандартного» агента (например, соответствующего природного биорегулятора)

$$\alpha = m_i/m_0 \quad (3.1.14)$$

было названо им внутренней активностью аналога. В случае $0 < \alpha \leq 1$ о соответствующих препаратах говорят как о полных ($\alpha = 1$) или частичных ($\alpha < 1$) агонистах [217], при $\alpha = 0$ — как об антагонистах¹.

¹ Выдвинутая в работе [93] гипотеза о том, что молекула биорегулятора может связываться рецептором в двух конформациях — «конформация агониста» и «конформация антагониста», а величина α определяется долей «активного» конформера, выглядит маловероятной. Зачастую различия между молекулами агонистов и анта-

Стефенсон [217], а впоследствии Фурхголт [124] обобщили эти представления, предложив рассматривать величину биологической реакции ρ как функцию произвольной формы от числа занятых рецепторов Z , причем характеристикой агониста является величина e , названная «внутренней эффективностью», — коэффициент пропорциональности между количеством занятых агонистом рецепторов и так называемым стимулом:

$$S = eZ. \quad (3.1.15)$$

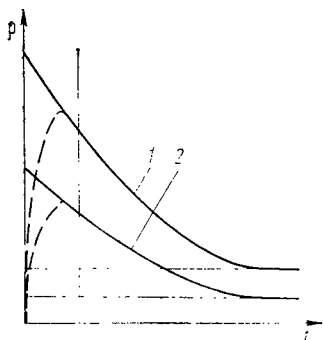


Рис. 3.3. Модель Пейтона. Зависимость $\rho(t)$: 1 — $K=1$ моль $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$; 2 — $K=0,5$ моль $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$

Форма зависимости $\rho(S)$ одинакова для всех соединений рассматриваемого ряда, все различия между ними определяются колебаниями внутренней эффективности.

Наконец, в качестве курьеза должна быть рассмотрена так называемая «кинетическая теория» Пейтона [199]. Согласно Пейтону, фактором, стимулирующим развитие биологической реакции, является не количество комплексов агонист — рецептор, а скорость их образования V , т. е.

$$\rho = \rho(V) = \rho [k_1 C (Q - Z)]. \quad (3.1.16)$$

Если в состоянии равновесия $Z^{\text{равн}}(C)$ подчиняется зависимости (2.1.3), то

$$V = \frac{k_1 C Q K}{K + C}, \quad (3.1.17)$$

т. е. величины V и Z совпадают с точностью до постоянной.

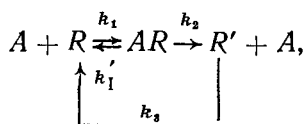
гонистов таковы, что они почти не влияют на конформационную подвижность молекулы; с другой стороны, существуют экспериментальные данные, позволяющие полагать, что конформации молекул агониста и антагониста в составе комплекса с рецептором одинаковы [2].

Кинетика развития реакции опишется в этом случае уравнением

$$\rho(t) = \frac{k_1 C Q}{K + C} [K - C e^{-(k_1' + k_1 C)t}], \quad (3.1.18)$$

т. е. реакция должна быть максимальной в момент применения эффектора и затем падать до равновесного уровня. Имея в виду, однако, что существует определенная инерция развития реакции с характерным временем τ , можно представить, что кривые $\rho(t)$ имеют переходную форму (рис. 3.3). Именно для объяснения фактов наличия кривых такой формы и была создана «кинетическая теория» Пейтона [199]. Никаких экспериментальных доводов в поддержку положенной в ее основу гипотезы (3.1.16) получено не было.

Элемент сходства с моделью Пейтона содержит модель, предложенная в работе [132]: она предполагает два состояния рецептора — активное R и неактивное R' ; в последнем состоянии рецептор не способен взаимодействовать с агонистом:



а реакция считается пропорциональной скорости образования R' .

3.2. МОДЕЛИ, ПРЕДПОЛАГАЮЩИЕ РЕАКЦИЮ ФУНКЦИЕЙ ТОЛЬКО КОЛИЧЕСТВА ЗАНЯТЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Простейшее и наиболее популярное приближение

$$\rho = mZ(C, t) \quad (3.2.1)$$

позволяет, очевидно, использовать для анализа зависимостей $\rho(C, t)$ все рассмотренные выше типы кривых $Z(C, t)$, причем лишь величина масштабного множителя приобретает иной содержательный смысл. Раздельная оценка параметров m и Q на основании только результатов биологического тестирования в этом случае невозможна.

В силу того что при $C=0$ величины Z и ρ также равны нулю, гипотеза (3.2.1) всегда должна выполняться тем

точнее, чем ниже примененные концентрации C ; для малых Z при любой форме зависимости $f(Z)$

$$\rho \simeq \left. \frac{df}{dZ} \right|_{z=0} Z; \quad (3.2.2)$$

таким образом, представление биологической реакции в виде (3.2.1) для анализа кинетических зависимостей $\rho(C, t)$ оправдано в тех случаях, когда применяются весьма низкие концентрации агониста, вызывающие реакцию, значительно меньшую максимальной.

Если зависимость $\rho(Z)$ полагается существенно нелинейной, то форма кривых $\rho(C, t)$, естественно, определяется характером этой зависимости и анализ их свойств в каких-либо общих терминах невозможен. Укажем лишь на один из наиболее интересных и, по-видимому, наиболее правдоподобных случаев, когда $\rho(Z)$ имеет выпуклый вид и выходит к максимальному уровню при $Z < Q$. С этим случаем связано понятие «рецепторного резерва» [188, 217] — разности между количеством доступных агонисту рецепторов и величиной Z , при которой достигается максимальная реакция. Величина рецепторного резерва у различных агонистов одного ряда может определяться внутренней эффективностью e (чем меньше e , тем меньше рецепторный резерв).

Разумеется, сделать априорное предположение о форме зависимости $\rho(Z)$ возможно далеко не всегда; чаще при обработке экспериментальных данных ставится обратная задача — установление характера $\rho(Z)$ на основании экспериментальных кривых $\rho(C)$ и $Z(C)$ [64, 141, 145]. Подобные задачи будут обсуждаться в параграфе 5.7.

От формы функции $\rho(Z)$ существенным образом зависит содержательный смысл общепринятой количественной характеристики биологического эффекта агониста — величины EC_{50} , т. е. концентрации, вызывающей реакцию, равную половине максимальной реакции на данный агонист (чаще используется отрицательный десятичный логарифм EC_{50} , обозначаемый pD_2).

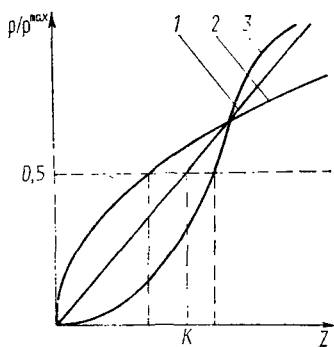
В случае, если связывание агониста рецепторами подчиняется зависимости вида (2.1.3) и выполняется условие (3.2.1), величины EC_{50} и константы диссоциации комплекса агонист — рецептор K , очевидно, совпадают. Если хотя бы одно из этих условий не соблюдается, EC_{50} окажется отличной от K ; в частности, если функция $\rho(Z)$

окажется выпуклой, справедливо $EC_{50} < K$, а при выраженной сигмоидной форме $\rho(Z)$ получим $EC_{50} > K$ (рис. 3.4).

Важный и интересный частный случай зависимости $\rho(Z)$ был рассмотрен Фурхготтом [124]. Пусть при образовании комплекса агонист — рецептор внутри клетки высвобождается некоторый медиатор, концентрация которого пропорциональна количеству образовавшихся комплексов:

$$Z_1 = \frac{Q_1 C}{K_1 + C}.$$

Рис. 3.4. Связь величин K и EC_{50} в случае линейной (1), выпуклой (2) и сигмоидной (3) форм зависимости $\rho(Z)$



Он взаимодействует с некоторыми внутриклеточными рецепторами (их концентрация равна Q_2 , а константа диссоциации нового комплекса — K_2), в результате чего развивается биологическая реакция, пропорциональная числу этих комплексов Z_2 *).

Очевидно, что в этом случае

$$\begin{aligned} \rho(C) &= m_2 Z_2 = \frac{m_2 Q_2 m_1 Z_1}{K_2 + m_1 Z_1} = \\ &= m_2 Q_2 \frac{\frac{m_1 Q C}{K_1 + C}}{K_2 + \frac{m_1 Q_1 C}{K_1 + C}}. \end{aligned}$$

После несложных преобразований получаем

$$\rho(C) = \frac{\left(\frac{m_1 m_2 Q_1 Q_2}{K_2 + m_1 Q_1} \right) C}{\frac{K_1 K_2}{K_1 + m_1 Q_1} + C} = \frac{\bar{Q} C}{\bar{K} + C}. \quad (3.2.3)$$

* Совершенно аналогичная модель рассматривалась в работе [223] (ссылка на статью Фурхготта отсутствует).

Несмотря на то что связь между стимулом и реакцией здесь не линейная, а гиперболическая, функция $\rho(C)$ сохраняет форму (2.1.3), причем кажущееся значение константы диссоциации

$$\bar{K} = \frac{K_1 K_2}{K_1 + m_1 Q_1} \quad (3.2.4)$$

оказывается меньше K_1 .

Отметим, что модельные представления подобного рода использовались, в частности, для описания механизмов действия некоторых биорегуляторов, эффект которых связан с модификацией электродиффузионных характеристик клеточной мембраны [173]. Очевидно, при наличии нескольких промежуточных звеньев рассмотренного типа зависимость $\rho(C)$ также сохранит форму прямоугольной гиперболы [131].

Можно заметить также далеко идущее сходство между только что рассмотренной моделью и описанной в параграфе 2.4 «двухшаговой моделью», в которой биологическая реакция предполагается пропорциональной количеству тройных комплексов $R_1 A R_2$. Отличие состоит в том, что количество второго компонента R_2 ограничено (т. е. зависимость $Z_2(Z_1)$ должна иметь форму (2.1.7) вместо (2.1.3)), а также в упоминавшейся особенности «двухшаговой модели» — невозможности диссоциации лиганда из тройного комплекса. Благодаря этому зависимость $\rho(C)$ в данном случае уклоняется от гиперболической, приобретая вид

$$\rho(C) = \frac{m}{2} [(Q_2 + Z_1 + K_2) - \sqrt{(Q_2 + Z_1 + K_2)^2 - 4Z_1 K_2}].$$

В родственной (2.4.35), (2.4.36) модели (2.4.44) биологический эффект также полагается пропорциональным количеству тройных комплексов $R_2 A$, а в модели (2.4.41) — пропорциональным суммарному количеству комплексов $R_1 R_2$ и $R_1 A R_2$ (существует фоновый эффект и отсутствие агониста).

3.3. БИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ, РЕЗУЛЬТИРУЮЩАЯ НЕСКОЛЬКО ЭФФЕКТОВ, ВЫЗЫВАЕМЫХ АГОНИСТОМ

Можно представить себе ситуацию, когда действие агониста на тест-объект, влияющее на развитие регистрируемой реакции, распространяется по нескольким каналам (см. рис. 3.1), причем вклад отдельных сигналов S_i может быть как положительным (стимулирующим реакцию), так и отрицательным (угнетающим ее). В принципе здесь можно различить две возможности:

а) агонист взаимодействует с рецепторами одного типа, «расщепление» характера действия происходит на каких-то пострецепторных стадиях;

б) агонист взаимодействует с рецепторами разных типов, каждый из которых инициирует процесс, различающийся по конечному эффекту на регистрируемую реакцию.

В первом случае по-прежнему справедливо (3.1.1) и, следовательно, при выполнении условия (3.1.11) возможно представление реакции в виде

$$\rho = \rho(Z).$$

Рассмотрение более общего случая требует введения каких-то предположений о форме зависимости результирующей реакции от каждого из сигналов S_i :

$$\rho = \rho(S_1, S_2, \dots, S_n), \quad (3.3.1)$$

что, очевидно, сделать крайне трудно; отметим, однако, что и в этом случае при малых концентрациях агониста ситуация упрощается — оказывается справедливым приближение

$$\rho(t) = \sum_i a_i S_i(Z, t). \quad (3.3.2)$$

Но даже и в таком приближении остаются открытыми вопросы о форме функции $S_i(Z, t)$ и об оценке весовых параметров a_i .

Второй случай — взаимодействие агониста с несколькими типами рецепторов — представляет интерес в связи с тем обстоятельством, что в рассмотрение могут входить не только специфические рецепторы данного агониста, но и другие центры его связывания с поверхностью клеточных мембран. Известно, например, что некоторые биологически активные пептиды уже в довольно низких кон-

центрациях способны, действуя неспецифически, т. е. помимо рецепторов, модифицировать электродиффузионные и другие характеристики клеточных мембран [8]. Это, несомненно, должно отразиться и на развитии регистрируемой реакции.

Некоторые интересные иллюстрации кинетических особенностей подобного рода моделей рассмотрены В. М. Юриным [37] для случая

$$\rho(C, t) = \sum_i a_i Z_i(C, t), \quad (3.3.3)$$

что соответствует предположению (3.2.1), т. е. малости примененных концентраций.

Рассматривая два различных типа рецепторов (повторяем, здесь этот термин используется условно; речь может идти и о центрах связывания, не несущих специфической регуляторной функции) и полагая, что зависимости $Z_i(C, t)$ имеют форму (2.1.4), (2.1.5), т. е.

$$\rho(C, t) = a_1 \frac{Q_1 C}{C + K_1} [1 - e^{-(k'_1 + k_1 C)t}] + a_2 \frac{Q_2 C}{C + K_2} [1 - e^{-(k'_2 + k_2 C)t}], \quad (3.3.4)$$

$$\rho(t) = a_1 Z_1^0 e^{-k'_1 t} + a_2 Z_2^0 e^{-k'_2 t}, \quad (3.3.5)$$

В. М. Юрин отмечает, что уже в этом простейшем во многих отношениях случае возможно большое разнообразие форм кинетических кривых биологической реакции $\rho(C, t)$ (табл. 3.1). Интересно, что в рамках этой простой модели объясняется парадоксальный случай, вовсе, впрочем, не редкий в практике испытаний биологической активности: когда применение препарата не вызывает никакой реакции, однако она наблюдается при последующем отмыве (рис. 3.5). Нетрудно убедиться, что это возможно при

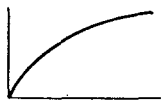
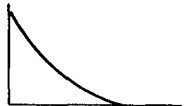


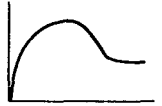
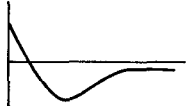
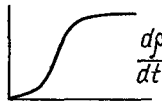
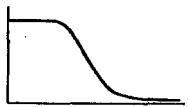
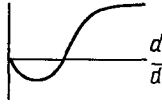
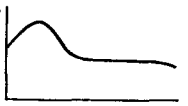
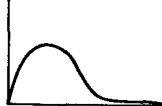

$$\frac{a_1 Q_1}{C + K_1} = - \frac{a_2 Q_2}{C + K_2}, \quad k'_1 + k_1 C = k'_2 + k_2 C,$$

т. е. $a_1 Q_1 k_1 = -a_2 Q_2 k_2$ и $k'_1 \neq k'_2$.

Более сложная модель из этого же класса рассмотрена ван Каутером и Дюмоном [235]. Здесь агонист также взаимодействует с рецепторами двух типов, причем сти-

Типы временного развития реакции и отмыва для случая аддитивных вкладов независимых центров связывании эффектора [37]

($\bar{A} = A_1 + A_2 \geq 0$, индекс 1 относится к более быстрой компоненте ($\beta_1 > \beta_2, k'_1 > k'_2$))

Тип реакции	Знак параметров		Развитие реакции	Отмыв
	A_1	A_2		
1	+	0		
	0	+		
2	+	+		
3	+	-		
4	-	$+\left.\frac{d\rho}{dt}\right _{t=0} > 0$	 $\left.\frac{d\rho}{dt}\right _{t=0} < 0$	
5	-	$+\left.\frac{d\rho}{dt}\right _{t=0} < 0$	 $\left.\frac{d\rho}{dt}\right _{t=0} > 0$	
6	+	- $\bar{A} = 0$		

Примечание. К типу 1 относятся также случаи $\beta_1 = \beta_2, k'_1 = k'_2$.

мулируется образование внутри клетки двух типов медиаторов, взаимно ингибирующих накопление друг друга в клетке (рис. 3.6). Регистрируемая биологическая реакция стимулируется одним из медиаторов. Предполагается также, что существует фоновый, не зависящий от наличия на рецепторах агониста приток каждого медиатора.

В работе [235] рассмотрены два механизма инактивации одного медиатора другим. Согласно первому, наличие одного из медиаторов стимулирует деградацию другого и наоборот. Кинетика каждого из медиаторов описывается уравнением вида

$$\frac{dC_i}{dt} = k_3^i Q_i - m_i Z_i - (k_4^i + k_5^i C_j) C_i, \quad (3.3.6)$$

где k_3^i — константа скорости «фонового» притока i -го медиатора, стимулируемого свободными рецепторами i -го ти-

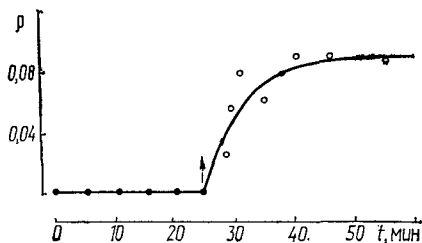


Рис. 3.5. Реакция, наступающая лишь при отмыве эффектора. Линеаризованная по коэффициентам ионных проницаемостей биоэлектрическая реакция клетки *Nitella flexilis* на торфот, 10^{-6} г/л [37]

па; k_4^i — константа скорости деградации i -го медиатора в отсутствие j -го; $k_5^i C_j$ — инкремент константы скорости деградации i -го медиатора, зависящий от концентрации j -го медиатора C_j .

Если взаимное ингибирование уровня двух медиаторов осуществляется за счет угнетения синтеза одного из них другим, имеем

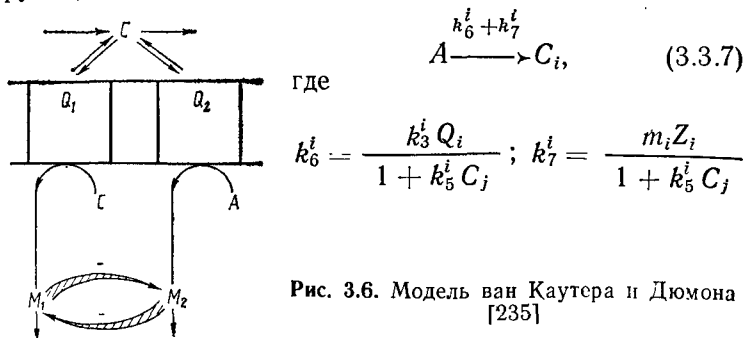


Рис. 3.6. Модель ван Каутера и Дюмона [235]

Коэффициенты уравнения (3.3.9)

Коэффициент	
Обозначение	Величина
G_i	$-\frac{Z_1 (k_3^i + mZ_1^{\text{равн}} K_1)}{k_4^i (1 + K_1 Z_1^{\text{равн}})} +$ $+ \frac{Z_2 k_5^i (k_3^i + mZ_2^{\text{равн}} K_2)}{k_4^i k_5^i (1 + K_2 Z_2^{\text{равн}})} + \frac{k_4^j}{k_5^i}$
G_j	$-\frac{Z_2 (k_4^j + mZ_2^{\text{равн}} K_2)}{k_4^i (1 + K_2 Z_2^{\text{равн}})} +$ $+ \frac{Z_1 k_5^j (k_3^i + mZ_1^{\text{равн}} K_1)}{k_4^j k_5^i (1 + K_1 Z_1^{\text{равн}})} + \frac{k_4^i}{k_5^i}$
H_i	$-\frac{k_4^j Z_1^{\text{равн}} (k_3^i + mZ_1^{\text{равн}} K_1)}{k_4^i Z_2^{\text{равн}} (1 + K_1 Z_1^{\text{равн}})}$
H_j	$-\frac{k_4^i Z_2^{\text{равн}} (k_3^j + mZ_2^{\text{равн}} K_2)}{k_4^j Z_1^{\text{равн}} (1 + K_2 Z_2^{\text{равн}})}$

и соответствующая кинетика опишется системой уравнений

$$\frac{dC_i}{dt} = \frac{k_3^i (Q_i - Z_i)}{1 + k_5^i C_j} + \frac{m_i Z_i}{1 + k_5^i C_j} - k_4^i C_i. \quad (3.3.8)$$

В предположении, что взаимодействие агониста с рецепторами подчиняется зависимостям вида (2.1.3) — (2.1.5), можно получить выражения для равновесных зависимостей $C_i(C)$ для обеих моделей в виде корней квадратного уравнения

$$C_i^2 + G_i C_i + H_i = 0. \quad (3.3.9)$$

Коэффициенты G_i и H_i уравнения (3.3.9) приведены в табл. 3.2. Выражения $C_i(C, t)$ не могут быть получены в аналитической форме.

Наконец, рассматривались модели, в которых результирующий эффект взаимодействия агониста с двумя типами рецепторов, инициирующими противоположные

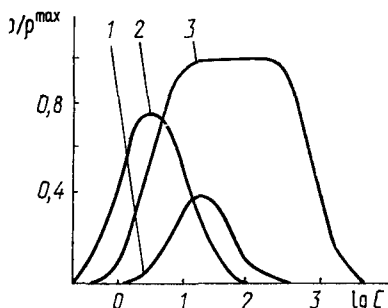


Рис. 3.7. Автоантагонизм (3.3.12). Концентрационная зависимость развития биологической реакции (равновесие): 1 — $K_1/K_2=10/43$; 2 — $1/14$; 3 — $3/1000$ [241]

тенденции развития регистрируемой реакции, представляется в мультипликативной форме:

$$\rho(C) = mZ(C, K_1)D(C, K_2), \quad (3.3.10)$$

где $D(C, K_2)$ — некий депрессирующий фактор. В так называемой модели автоингибирования [46, 241] полагается

$$D = 1 - \frac{C}{K_2 + C}. \quad (3.3.11)$$

Так что с учетом (3.3.10)

$$\rho(C) = \frac{mQCK_2}{(C + K_1)(C + K_2)}. \quad (3.3.12)$$

Семейство кривых вида (3.3.12) представлено на рис. 3.7; чем больше различаются константы равновесия

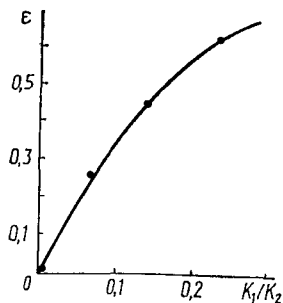


Рис. 3.8. Автоантагонизм. Зависимость амплитуды биологической реакции от отношения констант диссоциации K_1/K_2

K_1 и K_2 , тем более выраженным окажется участок плато и тем меньше разность

$$\varepsilon = mQ - \rho^{\max}. \quad (3.3.13)$$

Зависимость последней величины от отношения констант изображена на рис. 3.8.

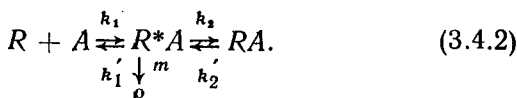
3.4. МОДЕЛИ, УЧИТЫВАЮЩИЕ РЕЛАКСАЦИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ

В свое время Фурхголт [123, 124] предложил рассматривать сократительную реакцию мышцы как стационарный уровень динамического равновесия в системе



причем M_R и M_C суть сокращенные и покоящиеся элементы системы соответственно. Всякое стимулирующее взаимодействие вызывает в конечном счете увеличение константы K_1 , сдвигая равновесие вправо. Эти представления можно обобщить на состояния любых других элементарных единиц тест-объекта — рецепторов, клеток и т. п. Одна из таких попыток была предпринята Уилбэром с сотр. [253]; совершенно идентичная модель через пять лет независимо была предложена группой японских авторов [147].

По Уилбэру, комплекс агонист — рецептор может пребывать в двух состояниях — активном и неактивном; вновь образующиеся комплексы находятся в активном состоянии, обратимо превращаясь в неактивные:



Биологическая реакция пропорциональна количеству активных комплексов.

Если Z_1 и Z_2 — количество активных и неактивных комплексов соответственно, то

$$\frac{dZ_1}{dt} = k_1(Q - Z_1 - Z_2)C + k_2'Z_2 - k_2Z_1 - k_1'Z_1, \quad (3.4.3)$$

$$\frac{dZ_2}{dt} = k_2Z_1 - k_2'Z_2. \quad (3.4.4)$$

Равновесный уровень

$$Z_1 = \frac{QC}{K_1 + (1 + K_2)C} \quad (3.4.5)$$

и $\rho(C) = mZ_1$, и при начальных условиях $Z_1|_{t=0} = 0$ и $Z_2|_{t=0} = 0$ получаем

$$Z_1 = Ee^{-\beta_1 t} + Fe^{-\beta_2 t} + \frac{QC}{K_1 + (1 + K_2)C}, \quad (3.4.6)$$

где

$$\beta_{1,2} = \frac{1}{2} [k_1 C + k'_1 + k_2 + k'_2 \pm \sqrt{(k_1 C + k'_1 + k_2 + k'_2)^2 + 4k'_1 k'_2}], \quad \beta_1 < \beta_2;$$

$$E = \frac{(\beta_1 - k'_2) k_1 C Q}{\beta_1 (\beta_2 - \beta_1)}; \quad F = \frac{(k'_2 - \beta_2) k_1 C Q}{\beta_2 (\beta_2 - \beta_1)}.$$

Для отмыва после достижения равновесия при концентрации C

$$Z_1 = Ge^{-\delta_1 t} + He^{-\delta_2 t}, \quad (3.4.7)$$

где

$$\delta_{1,2} = \frac{1}{2} [k'_1 + k_2 + k'_2 \pm \sqrt{(k'_1 + k_2 + k'_2)^2 + 4k'_1 k'_2}],$$

$$\delta_1 < \delta_2; \quad G = \frac{k_1 k'_2 C (k'_2 + k_2 - \delta_1) Q}{\beta_1 \beta_2 (\delta_2 - \delta_1)};$$

$$H = \frac{k_1 k'_2 C (k'_2 + k_2 - \delta_2) Q}{\beta_1 \beta_2 (\delta_2 - \delta_1)}.$$

Семейство кривых вида (3.4.6) представлено на рис. 3.9.

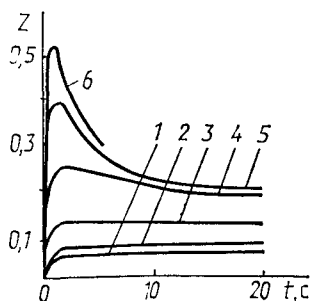
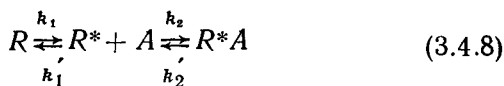


Рис. 3.9. Модель Уилбэра (3.4.2). Кинетика развития биологической реакции ($k'_1 = 1 \text{ с}^{-1}$, $k_2 = 0,4 \text{ моль}^{-1}$, $k'_2 = 0,1$): 1 — $k_1 C = 0,07 \text{ с}^{-1}$; 2 — 0,1; 3 — 0,2; 4 — 0,5; 5 — 1; 6 — $k_1 C = 2 \text{ с}^{-1}$

Модель «двух состояний», предложенная в работах [113, 172, 203, 204], также предполагает равновесие между «активированной» R^* и «неактивированной» R формами рецептора, причем агонист может связываться лишь активированной формой



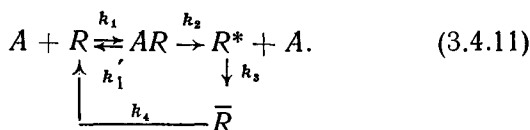
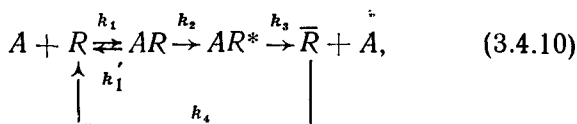
и сигнал пропорционален суммарной концентрации активированных рецепторов. В равновесии

$$Q^* = \frac{k_1 Q}{1 + k_1(1 + k_2 C)}. \quad (3.4.9)$$

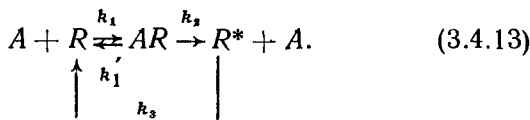
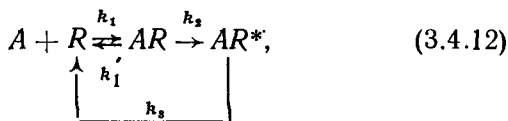
В отсутствие агониста равновесие между двумя формами рецептора сильно сдвинуто влево, так что вкладом величины R^* в сигнал можно пренебречь; процесс образования комплексов R^*A в точности подчиняется соотношениям, полученным в параграфе 2.5 для случая «модели биофазы»: формально обе модели эквивалентны. Модель «двух состояний» приобретает более сложную форму в случае одновременного действия агониста и антагониста (параграф 4.1).

Модели, аналогичные (3.4.8), но дополненные «эффектом биофазы» (рецепторы расположены в компартменте, отделенном от наружного раствора мембраной), рассматривались в работах [172, 190]. Оказалось, что при низкой проницаемости мембраны для агониста кривая $\rho(C)$ имеет сигмоидную форму (признак «положительной кооперативности»), при высокой, наоборот, обнаруживает признаки «отрицательной кооперативности».

Семейство сходных моделей предложено Ариенсом с соотр. [41, 44]:



Здесь стимул S пропорционален количеству «активированных» рецепторов AR^* или R^* ; \bar{R} — рецепторы, не способные связывать агонист. Рассматриваются также редуцированные формы моделей (3.4.10), (3.4.11), в которых последний эффект — временная потеря свободным рецептором способности связывать агонист — исключается:



Для первого случая — модели (3.4.10)

$$\frac{dZ_1}{dt} = k_1(Q - Z_1 - Z_2)C - k_1'Z_1 - k_2Z_1, \quad (3.4.14)$$

$$\frac{dZ_2}{dt} = k_2Z_1 - k_3Z_2,$$

где Z_1 и Z_2 — концентрации неактивированных и активированных комплексов. При начальных условиях $Z_1|_{t=0} = Z_2|_{t=0} = 0$

$$Z_1^{\text{равн}} = \frac{QC}{C(1 + k_2/k_3) + k_2/k_1 + k_1}, \quad (3.4.15)$$

$$Z_2^{\text{равн}} = \frac{QC}{C(1 + k_3/k_2) + k_3/k_1 + \frac{k_3}{k_2}K_1}, \quad (3.4.16)$$

$$Z_1 = Z_1^{\text{равн}} + Ee^{-\beta_1 t} + Fe^{-\beta_2 t}, \quad (3.4.17)$$

$$\beta_{1,2} = \frac{1}{2} [k_1C + k_1' + k_2 + k_3 \pm$$

$$\pm \sqrt{(k_1C + k_1' + k_2 + k_3)^2 - 4k_1k_2C}],$$

$$E = \frac{k_1CQ + \beta_2 Z_1^{\text{равн}}}{\beta_1 - \beta_2}, \quad F = \frac{k_1CQ - \beta_1 Z_1^{\text{равн}}}{\beta_2 - \beta_1}.$$

Модель (3.4.11) описывается системой

$$\frac{dZ_1}{dt} = k_1(Q - Z_1 - Z_2)C - k_1'Z_1 - k_2Z_1, \quad (3.4.18)$$

$$\frac{dZ_2}{dt} = k_2Z_1 - k_3Q,$$

где Q — концентрация активированных рецепторов R^* . Интегрирование (3.4.18) при начальных условиях $Z_1|_{t=0} = Z_2|_{t=0} = 0$ дает

$$Z_2 = Z_2^{\text{равн}} + E^*e^{-\delta_1 t} + F^*e^{-\delta_2 t}, \quad (3.4.19)$$

$$Z_2^{\text{равн}} = \frac{QC}{C(1 + k_3/k_2) + k_3/k_1 + \frac{k_3}{k_2}K_1}, \quad (3.4.20)$$

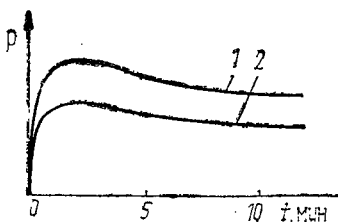
$$E^* = \frac{Z_2^{\text{равн}}\delta_2}{\delta_1 - \delta_2}, \quad F^* = -\frac{Z_2^{\text{равн}}\delta_1}{\delta_1 - \delta_2},$$

$$\delta_{1,2} = \frac{1}{2} [k_1C + k_1' + k_2 \pm$$

$$\pm \sqrt{(k_1C + k_1' + k_2)^2 - 4(k_3k_1C + k_1'k_3 + k_2k_3)}].$$

Обе модели, как легко заметить, содержат элементы, с трудом поддающиеся пониманию в терминах рациональных физико-химических представлений; так, активированный комплекс в модели (3.4.10) должен неизбежно распасться, обратное превращение в неактивированный невозможно (в отличие от (3.4.2)); трудно представить, почему активированными в модели (3.4.11) оказываются рецепторы, освободившиеся из только что распавшихся комплексов. Кстати, последнее обстоятельство сближает

Рис. 3.10. Обобщенная модель Фурхготта (3.4.21). Кинетика развития биологической реакции: 1 — $C=10^{-8}$ моль; 2 — $C=10^{-9}$ моль. Константы в обоих случаях одинаковы [6]



эту модель с упоминавшейся кинетической теорией Пейтона.

Возвращаясь к идее Фурхготта, отметим, что в ней, так же как и в модели (3.4.2), не учитывается то обстоятельство, что всякий релаксировавший элемент нуждается в определенном периоде покоя, прежде чем он опять окажется способным к активированию. Это означает, что общий пул элементов, находящихся в состоянии покоя, может быть разделен на две части — готовых и неготовых к активации с концентрациями M_f и M_R соответственно. В результате схема процесса развития биологической реакции под действием некоторого агониста (по-прежнему, как и в (3.4.1), сдвигающего равновесие $M_f \rightleftharpoons M_C$ в сторону M_C) может быть представлена в виде [6]



Константа скорости $q(C, t)$ в простейшем случае может приниматься пропорциональной количеству образовавшихся комплексов агонист — рецептор Z :

$$q = mZ(C, t) \quad (3.4.22)$$

и поведение системы (3.4.21) опишется дифференциальными уравнениями

$$\frac{dM_C}{dt} = mZ(C, t) M_f - k_R M_C, \quad (3.4.23)$$

$$\frac{dM_f}{dt} = k_f(M_0 - M_f - M_C) - mZ(C, t) M_f,$$

где M_0 — общее количество реагирующих элементов.

Решение системы (3.4.23) в общем случае не может быть получено в квадратурах; полагая, что коэффициент q может рассматриваться как асимптотически постоянный $q = q^{\max}$, можно получить решение в виде

$$M_C = M_C^{\text{равн}} + Ee^{-\beta_1 t} + Fe^{-\beta_2 t}, \quad (3.4.24)$$

где

$$\beta_{1,2} = \frac{1}{2} [q + k_R + k_f \pm \sqrt{(q + k_R + k_f)^2 - 4k_R k_f}];$$

$$M_C^{\text{равн}} = \frac{qk_f M_0}{qk_R + qk_f + k_R k_f};$$

$$E = \frac{\beta_2 M_C^{\text{равн}} - qM_0}{\beta_1 - \beta_2}; \quad F = \frac{qM_0 - \beta_1 M_C^{\text{равн}}}{\beta_1 - \beta_2}$$

(рис. 3.10), и для отмыва

$$M_C = M_C^0 e^{-hRt}, \quad (3.4.25)$$

где M_C^0 — количество элементов M_C в момент начала отмыва.

3.5. МОДЕЛИ, ПРЕДПОЛАГАЮЩИЕ АКТИВАЦИЮ РЕЦЕПТОРА НЕСКОЛЬКИМИ МОЛЕКУЛАМИ ЭФФЕКТОРА

Для интерпретации зависимостей концентрация—эффект весьма часто привлекаются представления, согласно которым комплекс агонист—рецептор имеет стехиометрию, отличную от 1 : 1, причем активный комплекс, инициирующий биологическую реакцию, имеет структуру RA_i при i , большем или равном заданному числу n .

Рассмотрение этого семейства моделей в наиболее общей форме принадлежит Г. В. Калеру [13], вслед за которым мы охарактеризуем некоторые их свойства.

Пусть каждый рецептор способен связывать N молекул агониста с константой диссоциации K , причем при связывании каждой последующей молекулы эта величина не зависит от текущей стехиометрии комплекса RA_i , $i \leq N$. Существует пороговое число n , такое, что при связывании с рецептором R n или более молекул агониста происходит активация рецептора. Если биологическая реакция ρ пропорциональна общей концентрации активных комплексов, имеем

$$\rho = m \sum_{i=n}^N Z_i, \quad (3.5.1)$$

где Z_i — концентрация комплексов RA_i .

Вероятность P_i реализации комплекса RA_i подчиняется биномиальному распределению:

$$\begin{aligned} P_i &= \frac{N!}{i!(N-i)!} \left(\frac{C}{C+K} \right)^i \left(\frac{K}{K+C} \right)^{N-i} = \\ &= \frac{N!}{\left(1 + \frac{C}{K} \right)^N} \cdot \frac{\left(\frac{C}{K} \right)^i}{i!(N-i)!}. \end{aligned} \quad (3.5.2)$$

Действительно,

$$q = \frac{C}{K + C} \quad (3.5.3)$$

есть вероятность занятия молекулой агониста одного центра связывания рецептора;

$$\frac{K}{K + C} = 1 - q$$

— дополнительная ей вероятность.

С учетом (3.5.1)

$$\rho(C) = \frac{mN!Q}{\left(1 + \frac{C}{K}\right)^N} \sum_{i=n}^N \frac{\left(\frac{C}{K}\right)^i}{i!(N-i)!} \quad (3.5.4)$$

В отсутствие (не рассматриваемых здесь) эффектов положительной или отрицательной кооперативности (связывание рецептором каждой последующей молекулы эффектора не сопровождается уменьшением или увеличением константы диссоциации K) соотношение (3.5.4) дает наиболее общее описание свойств моделей, предполагающих возможность поэтапного формирования комплексов агонист—рецептор со стехиометрией, отличной от 1 : 1: $RA, RA_2, \dots, RA_n, \dots, RA_N$. Ее частный случай — ранее предложенная модель [1], в которой порог активации рецептора n полагается равным его валентности

$$\rho = \frac{mQC^N}{(K + C)^N} \quad (3.5.5)$$

Кинетика развития реакции опишется в этом случае соотношением

$$\rho = \left[\frac{m^{1/N} Q^{1/N} C}{K + C} (1 - e^{-(k' + kC)t}) \right]^N \quad (3.5.6)$$

Кинетика отмыва

$$\rho = \rho^0 e^{-k't} \quad (3.5.7)$$

Уравнение Хилла

$$\rho = \frac{mQC^N}{K + C^N} \quad (3.5.8)$$

наиболее часто используемое для анализа зависимостей $\rho(C)$, обладающих признаками кооперативности, как отмечалось в параграфе 2.4, базируется на предположении, не допускающем формирования промежуточных комплексов с более низким стехиометрическим отношением, чем $1 : N$; возможна лишь реакция рецептора с N молекулами лиганда сразу. Естественно, оно не следует из (3.5.4).

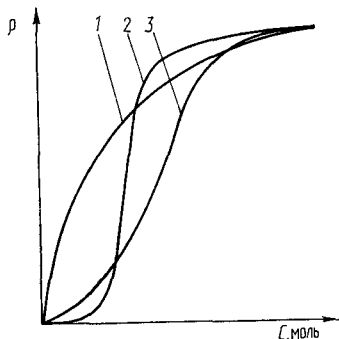


Рис. 3.11. Сравнение зависимостей $\rho(C)$, предполагающих активацию рецептора несколькими молекулами эффектора: 1 — (3.5.4); 2 — (3.5.5.); 3 — (3.5.10) (во всех случаях $K=1$ моль; $r=2$; $N=4$)

Модель, предполагающая кооперативную реакцию кластера мновалентных рецепторов, предложена в работе [168]. Здесь рассматривается случай кластера из N рецепторов валентностью r , причем максимальный сигнал генерируется кластером при полном насыщении лигандом хотя бы одного из рецепторов.

Доля полностью насыщенных рецепторов

$$P(C) = \frac{Z}{Q} \quad (3.5.9)$$

задается выражением (3.5.3); вероятность того, что все N рецепторов данного кластера окажутся ненасыщенными, есть $(1 - q^r)^N$, так что выражение для сигнала принимает форму

$$S = 1 - (1 - q^r)^N = 1 - \left[1 - \left(\frac{C}{C + K} \right)^r \right]^N. \quad (3.5.10)$$

Авторами [168] рассматривается и более сложный вариант этой модели, предполагающий эффекты отрицательной или положительной кооперативности процесса связывания (см. также [13]).

Сравнение зависимостей (3.5.4), (3.5.5) и (3.5.10) показано на рис. 3.11.

АНТАГОНИСТЫ

Рассмотрение механизмов развития биологической реакции под действием двух или нескольких различных эффекторов представляет интерес главным образом в связи с исследованиями антагонистов природных биорегуляторов. В настоящее время этим термином опреде-



Рис. 4.1. Схема различных типов проявления антагонизма

ляют соединения, способные ослаблять или полностью подавлять вызываемую некоторым агонистом биологическую реакцию, причем механизмы, лежащие в основе этого эффекта, могут быть самыми разнообразными.

По месту воздействия на цепь событий, начинающуюся с применения агониста и заканчивающуюся наблюдаемым биологическим эффектом, антагонисты могут быть разделены на несколько классов; схема такой таксономии ясна из рис. 4.1.

4.1. КОНКУРЕНТНЫЙ АНТАГОНИЗМ

Конкурентный антагонизм проявляется обычно в тех случаях, когда антагонист взаимодействует с теми же рецепторами, что и агонист, но в отличие от последнего не вызывает биологической реакции.

Количественное описание процесса взаимодействия двух лигандов с рецепторами одного типа дано в параграфе 2.3. Выражение для концентрации агонист-рецепторных комплексов в условиях равновесия впервые получено Гаддумом [127]:

$$Z_A = \frac{QC_A}{C_A + (1 + C_B/K_B)K_A}. \quad (4.1.1)$$

Здесь C_A и C_B — концентрации, а K_A и K_B — константы диссоциации комплексов агониста и антагониста соответственно. Таким образом, гиперболическая форма зависимости $Z(C_A)$ сохраняется, присутствие антагониста сказывается лишь на изменении кажущейся константы диссоциации агонист-рецепторного комплекса, уменьшая долю рецепторов, оккупированных молекулами агониста при заданной их концентрации. Поэтому определение средства конкурентного антагониста к рецепторам не требует задания конкретного вида зависимости $\rho(Z)$, а лишь предполагает взаимную однозначность этой зависимости.

Пусть C'_A и C_A — концентрации агониста, вызывающие равную биологическую реакцию в присутствии и в отсутствие конкурентного антагониста. В предположении $\rho = \rho(Z)$ одинаковые реакции вызываются равными величинами Z (упомянутая только что однозначность). Комбинация выражений (4.1.1) и (2.1.3) приводит к соотношению

$$C'_A/C_A = 1 + C_B/K_B \quad (4.1.2)$$

или

$$\lg(C'_A/C_A - 1) = \lg C_B - \lg K_B. \quad (4.1.3)$$

Отношение C'_A/C_A в выражениях (4.1.2) и (4.1.3) называют дозовым отношением [47].

По аналогии с введенной ранее величиной pD_2 может быть получена характеристика средства агониста к рецептору pA_2 , равная отрицательному десятичному логарифму концентрации антагониста, соответствующей дозовому отношению $C'_A/C_A=2$. Действительно, в соответствии с уравнением (4.1.3) для конкурентного антагонизма

$$pA_2 = -\lg K_B. \quad (4.1.4)$$

Отметим, однако, что в реальных экспериментах с применением конкурентных антагонистов в силу ряда причин, подробнее рассмотренных в параграфе 6.6, могут наблюдаться линейные зависимости типа (4.1.3), но с наклоном, существенно отличным от единицы. В подобных случаях оценка K_B из соотношения (4.1.4) неправомерна и величину pA_2 следует рассматривать лишь как эмпирический параметр. Следует тем не менее еще раз подчеркнуть, что в отличие от pD_2 оценка pA_2 не зависит от конкретной формы функции $\rho(Z)$, если она взаимно однозначна.

Важным частным случаем рассмотренного в параграфе 2.3 взаимодействия двух лигандов с одним типом рецепторов являются конкурентные отношения между частичным и полным агонистами. Пусть лиганд B , так же как и агонист A , способен вызывать определенную биологическую реакцию, но обладает более низкой внутренней активностью, т. е., иными словами, равные концентрации лиганд-рецепторных комплексов Z_A и Z_B вызывают неравные реакции: $\rho(Z_A) > \rho(Z_B)$. Очевидно, что образование дополнительных комплексов Z_B , концентрация которых определяется соотношением типа (2.3.3), усиливает реакцию при относительно низких концентрациях агониста A . Однако при высоких концентрациях полного агониста A реакция снижается вследствие вытеснения A с части рецепторов менее эффективным частичным агонистом B . Таким образом, частичный агонист проявляет во взаимодействии с полным агонистом конкурентный дуализм — усиливает действие низких концентраций полного агониста, а действие высоких концентраций ослабляет.

Кинетика образования активных комплексов агонист—рецептор при совместном действии агониста и конкурент-

ного антагониста определяется рассмотренными выше уравнениями (2.3.2)—(2.3.10); здесь особый интерес представляет случай $K_B \ll K_A$ или $k'_1 \ll k'_2$ — так называемое «необратимое» ингибирование [125].

Если тест-объект подвергнуть обработке таким антагонистом до применения агониста, процесс замещения молекул антагониста, связанных с рецептором, будет про-

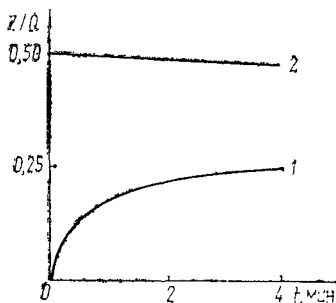
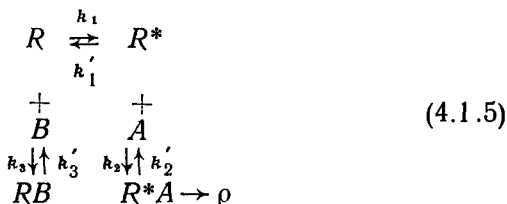


Рис. 4.2. Изменение во времени количества связанных с рецепторами молекул агониста (1) и «необратимого» антагониста (2): $K = 10^{-8}$ моль; $K_B = 10^{-9}$ моль [6]

текать весьма медленно сравнительно с ходом установления равновесия в системе агонист — свободные рецепторы. При начальных условиях (2.3.6) кинетика процесса опишется уравнениями вида (2.3.3) с коэффициентами (2.3.9), (2.3.10); ход обоих процессов иллюстрирует рис. 4.2. Из него видно, что за время достижения квазистационарного уровня Z_A величина Z_B практически не успевает измениться, так что в первом приближении ее можно считать не зависящей от примененной концентрации агониста C_A . Это предположение позволяет получить не зависящие от формы функции $\rho(Z)$ оценки константы K_A (см. параграф 6.7).

Несколько усложненная схема конкурентных отношений агониста и антагониста рассматривается в рамках описанной выше модели «двух состояний» рецептора (3.4.8). Предполагается, что взаимодействие с агонистом стабилизирует активированное состояние рецептора R^* , а образование комплекса с антагонистом стабилизирует неактивное состояние R . Частичные агонисты могут взаимодействовать с различными константами равновесия K_A и K_A^* как с одной, так и с другой формой рецептора, стабилизируя то состояние, которое было у рецептора в момент образования комплекса. Внутренняя активность определяется, таким образом, отношением констант K_A и K_A^* .

Совместное действие агониста A и антагониста B , образующего комплексы с инактивированной формой рецепторов (константа диссоциации K_B), в соответствии со схемой



описывается системой уравнений

$$\frac{dQ^*}{dt} = k_1(Q - Q^* - Z_A - Z_B) - k_1'Q^* - k_2QC_A + k_2'Z_A, \quad (4.1.6)$$

$$\frac{dZ_A}{dt} = k_2Q^*C_A - k_2'Z_A,$$

$$\frac{dZ_B}{dt} = k_3(Q - Q^* - Z_A - Z_B) - k_3'Z_B,$$

где Q^* — концентрация рецепторов, находящихся в активированном состоянии; Q — суммарная концентрация рецепторов; Z_A и Z_B — концентрация комплексов агониста и антагониста с рецепторами.

В равновесии

$$Q^* = \frac{QK_A}{C_A + [1 + K_1(1 + C_B/K_B)]K_A}, \quad (4.1.7)$$

$$Z_A = \frac{QC_A}{C_A + [1 + K_1(1 + C_B/K_B)]K_A},$$

$$Z_B = \frac{QC_B}{C_B + \left[1 + \frac{k_1}{k_1'}(1 + C_A/K_A)\right]K_B},$$

причем

$$K_A = k_2'/k_2, \quad K_B = k_3'/k_3, \quad K_1 = k_1'/k_1.$$

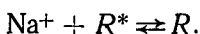
Кажущиеся константы диссоциации каждого из лигандов в отсутствие другого имеют вид

$$K'_A = \frac{k_1 + k'_1}{k_1} K_A, \quad (4.1.8)$$

$$K'_B = \frac{k_1 + k'_1}{k_1} K_B.$$

Подстановка K'_A и K'_B вместо K_A и K_B в соотношения (4.1.7) для Z_A и Z_B приводит к выражениям, совершенно неотличимым от соответствующих уравнений в классической модели конкурентных взаимодействий (см. параграф 2.3).

Равновесие между двумя формами рецепторов может регулироваться третьим агентом; таковым, например, в случае опиатных рецепторов предполагается ион натрия:



Этот вариант модели был успешно применен для анализа концентрационных зависимостей связывания опиоидных агонистов и антагонистов [78].

4.2. ХИМИЧЕСКИЙ АНТАГОНИЗМ

Химический антагонизм, или антагонизм через нейтрализацию, проявляется при непосредственном взаимодействии антагониста с агонистом, приводящем к инактивации последнего. Помимо низкомолекулярных инактивирующих агентов, к этому классу формально могут быть отнесены расщепляющие ферменты и адсорбенты агониста. Подобные взаимодействия можно представить в простейшем случае в виде обратимой бимолекулярной реакции образования неактивного комплекса P



с константой диссоциации

$$K_B = C_A C_B / C_P,$$

где C_A , C_B и C_P — концентрации агониста, антагониста и продукта реакции.

В предположении значительного избытка агониста сравнительно с концентрацией специфических рецепторов концентрация агониста, способного взаимодействовать с рецепторами, $C_A = C_A^0 - C_P$ или в условиях равновесия реакции (4.2.1)

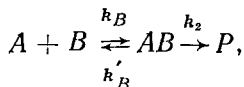
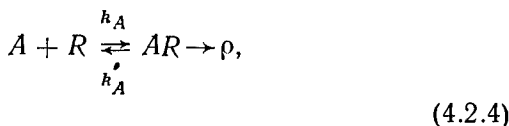
$$C_A = \frac{C_A^0}{1 + C_B/K_B}, \quad (4.2.2)$$

где C_A^0 — начальная концентрация агониста. Полагая, что концентрация агонист-рецепторных комплексов описывается уравнением Лэнгмюра, имеем

$$Z_A = \frac{QC_A^0}{C_A^0 + (1 + C_B/K_B)K_A}. \quad (4.2.3)$$

Соотношение (4.2.3) полностью совпадает с аналогичным выражением (4.1.1) для конкурентного антагонизма. Такой результат не является неожиданным, если учесть, что химический антагонизм также является конкурентным взаимодействием, снижающим кажущуюся константу диссоциации агонист-рецепторного комплекса вследствие «конкуренции» между антагонистом и рецепторами за связывание с агонистом.

Реакция «нейтрализации» агониста может оказаться необратимой. Так, зачастую следует считаться с тем обстоятельством, что испытуемые препараты содержат ферменты B , осуществляющие деградацию агониста; такая ситуация вполне вероятна, например, во многих экспериментах по связыванию пептидных биорегуляторов. Если процессы связывания молекул лиганда рецепторами и их деградации под действием фермента независимы, т. е.



концентрация фермента есть Q_B и $C \gg Z$, процесс деградации опишется уравнением Михаэлиса:

$$\frac{dC_A}{dt} = -\frac{k_2 Q_B C_A}{K_B + C_A}, \quad K_B = \frac{k_B'}{k_B}, \quad (4.2.5)$$

$$C_A^0 - C_A + K_B \ln \frac{C_A^0}{C_A} = k_2 Q_B t, \quad (4.2.6)$$

где C_A^0 — начальная концентрация агониста.

Если выполняется условие $C_A^0 - C_A \ll K_B$ и скорость деградации лиганда мала по сравнению со скоростью образования лиганд-рецепторных комплексов, то

$$C_A(t) = C_A^0 e^{-\beta t}, \quad \beta = k_2 Q_B / K_B. \quad (4.2.7)$$

В этом случае уравнение кинетики образования агонист-рецепторных комплексов имеет вид

$$\frac{dZ}{dt} = k(Q - Z)C_A^0 e^{-\beta t} - k'Z \quad (4.2.8)$$

и

$$Z = kQC_A^0 \exp \left[\left(\frac{kC_A^0}{\beta} e^{-\beta t} - k' \right) t \right] \times \quad (4.2.9)$$

$$\times \int_0^t \exp \left[- \left(\frac{kC_A^0}{\beta} e^{-\beta \tau} + \beta - k' \right) \tau \right] d\tau.$$

Уравнение (4.2.9) громоздко и ненаглядно; некоторое представление о характере зависимости формы кривой $Z(t)$ от параметров k, k', β дает рис. 4.3.

Выражение (4.2.8) получено в предположении, что количество лиганда, связанного с рецепторами, мало по сравнению с общим его количеством в тестовой системе; в противном случае следует рассматривать более сложную систему нелинейных уравнений, не интегрирующуюся в квадратурах.

Иногда рассматриваются модели, предполагающие распад лиганда только в составе комплекса с рецептором.

В общем случае соответствующие системы уравнений также не интегрируются; если же процесс деградации

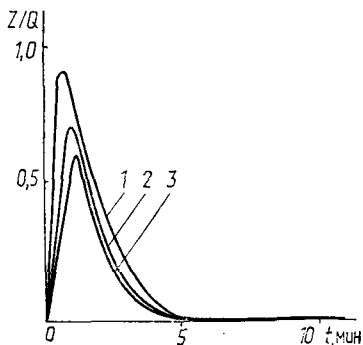
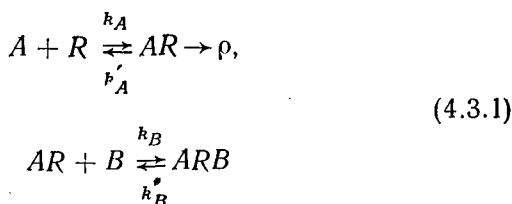


Рис. 4.3. Деградация лиганда в инкубационной среде (4.2.8). Кинетика ассоциации: 1 — $\beta = 1 \text{ с}^{-1}$; 2 — 2; 3 — 4 (все другие константы одинаковы)

является медленным по сравнению со скоростью образования комплексов и $Z \gg K$, временное изменение концентрации лиганда будет приближенно описываться уравнением вида (4.2.5).

4.3. БЕСКОНКУРЕНТНЫЙ АНТАГОНИЗМ

Бесконкурентный антагонизм предполагает инактивацию продуктивного комплекса агонист — рецептор лигандом, не способным образовать комплекс с рецептором, не занятым агонистом. Бесконкурентный антагонизм, таким образом, предполагает наличие двух процессов:



с константами диссоциации

$$K_A = \frac{C_A Q'}{Z_A}, \quad K_B = \frac{C_B Z_A}{Z_{AB}} = \frac{C_A C_B Q'}{K_A Z_{AB}}, \quad (4.3.2)$$

где Q' — концентрация свободных рецепторов; Z_A и Z_{AB} — концентрация комплексов AR и ARB . С учетом сохранения числа рецепторов $Q = Q' + Z_A + Z_{AB}$ получаем выражение для концентрации продуктивных комплексов:

$$Z_A = \frac{QC_A}{(1 + C_B/K_B)C_A + K_A}. \quad (4.3.3)$$

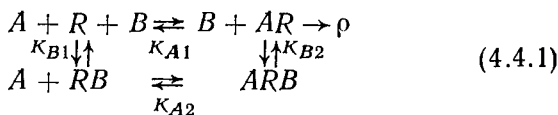
Таким образом, бесконкурентный антагонист в равной мере снижает количество рецепторов, способных образовывать эффективный комплекс с агонистом (т. е. в отсутствие резерва рецепторов уменьшает максимальную достижимую реакцию), и константу диссоциации этого комплекса (т. е. увеличивает сродство агониста к рецепторам, оказывая действие, противоположное конкурентному антагонизму). Взаимодействие бесконкурентного антагониста с агонист-рецепторным комплексом представляется возможным лишь в том случае, когда агонист и антагонист обладают сродством к различным функциональным группам рецептора. Процесс, при котором свя-

зывание агониста с рецептором делает доступным центр связывания антагониста, а связывание антагониста приводит к инактивации агонист-рецепторного комплекса, более всего соответствует механизму индуцированного соответствия лигандов с рецептором [159].

Убедительных доводов в пользу существования этого типа антагонизма получено не было.

4.4. СМЕШАННЫЙ АНТАГОНИЗМ

Рассмотрим более общую схему взаимодействия агониста A и антагониста B с рецепторами, допускающую комплексообразование рецепторов с обоими лигандами, а также образование тройного комплекса ARB :



Подобные циклические системы неоднократно рассматривались в энзимологии и молекулярной фармакологии [70, 148, 172, 201]. В равновесии

$$K_{A1} = \frac{C_A R}{Z_A}, \quad K_{B1} = \frac{C_B Q'}{Z_B}, \quad (4.4.2)$$

$$K_{A2} = \frac{C_A Z_B}{Z_{AB}}, \quad K_{B2} = \frac{C_B Z_A}{Z_{AB}}$$

и

$$Q = Q' + Z_A + Z_B + Z_{AB}, \quad (4.4.3)$$

где Q' — концентрация свободных рецепторов. Комбинируя уравнения (4.4.2) и (4.4.3), получаем выражение для концентрации комплексов:

$$Z_A = \frac{QC_A}{(1 + C_B/K_{B2})C_A + (1 + C_B/K_{B1})K_{A1}}. \quad (4.4.4)$$

Схема (4.4.1) формально эквивалентна действию смеси конкурентного и бесконкурентного антагонистов в равных концентрациях. Уравнение смешанного антагонизма (4.4.4) описывает в качестве предельных случаев основные типы антагонизма, проявляющиеся на уровне одной эффекторной системы. Так, в случае низкого относительного сродства антагониста к активному комплексу

($K_{B2} \gg K_{B1}$) преобладают признаки конкурентного антагонизма, а низкое сродство антагониста к свободным рецепторам ($K_{B2} \ll K_{B1}$) соответствует случаю бесконкурентного механизма.

Рассмотренные в параграфах 4.1—4.4 типы антагонизма иногда называют линейными, поскольку снижение максимального уровня связывания агониста и (или) увеличение кажущейся константы диссоциации агонист-рецепторного комплекса определяется в соответствующих уравнениях $Z_A = f(C_A, C_B)$ фактором $1 + C_B/K_B$, линейным относительно концентрации антагониста.

4.5. НЕКОНКУРЕНТНЫЙ АНТАГОНИЗМ

Неконкурентный антагонизм реализуется по механизму, аналогичному аллостерическим эффектам при ферментативном катализе. Взаимодействие неконкурентного антагониста с собственными рецепторами не приводит к независимому биологическому эффекту, а снижает эффект, вызванный взаимодействием агонист—рецептор. Обычно рассматривают неконкурентный антагонизм, уменьшающий стимул, инициированный образованием агонист-рецепторных комплексов, или снижающий способность эффекторной системы реагировать на данный стимул. Такой антагонизм, приводящий к уменьшению внутренней активности агониста или обобщенно к изменению формы зависимости $\rho(Z)$, называют также метакоидным. Возможен, однако, и другой тип неконкурентных отношений, при котором занятие антагонистом неконкурентного центра вызывает некоторые изменения рецептора агониста, приводящие к снижению его сродства к агонисту. Такой антагонизм называют метаффиноидным. Очевидно, формальное описание механизмов метакоидного антагонизма целиком зависит от того, каким предполагается влияние связывания антагониста соответствующими рецепторами на форму функции $\rho(Z)$ для вызываемой агонистом реакции.

Пусть ρ_A и ρ_{AB} —эффекты, вызываемые данной концентрацией агониста в отсутствие и в присутствии антагониста. Предположим, что относительное снижение эффекта при любой концентрации агониста пропорционально доле рецепторов Z_B , связанных с антагонистом:

$$\frac{\rho_A - \rho_{AB}}{\rho_A} = \beta \frac{Z_B}{Q_B} = \beta \frac{C_B}{C_B + K_B}. \quad (4.5.1)$$

Здесь Q_B — полная концентрация рецепторов антагониста. В предположении, что реакция пропорциональна концентрации комплексов агонист—рецептор, т. е. справедливо соотношение

$$\rho_A = \frac{\rho_A^{\max} C_A}{C_A + K_A},$$

где ρ_A^{\max} — максимальный эффект данного агониста, достижимый в отсутствие антагониста, получаем с учетом (4.5.1)

$$\rho_{AB} = \left(1 - \beta \frac{C_B}{C_B + K_B} \right) \frac{\rho_A^{\max} C_A}{C_A + K_A}. \quad (4.5.2)$$

Таким образом, метакоидный антагонизм приводит к снижению максимальной реакции, не изменяя кажущуюся константу диссоциации агонист-рецепторного комплекса. Подобная картина возможна также в специальных случаях смешанного антагонизма ($K_{A1} \approx K_{A2}$), проявляющегося при взаимодействии агониста и антагониста с общими рецепторами (см. параграф 4.4). Если применяемый антагонист допускает полное подавление реакции, метакоидный антагонизм является линейным.

Параметр β в уравнениях (4.5.1) и (4.5.2), равный максимальному относительному снижению эффекта агониста:

$$\beta = \frac{\rho_A^{\max} - \rho_{AB}^{\max}}{\rho_A^{\max}}, \quad (4.5.3)$$

является по существу внутренней активностью антагониста в его рецептор-эффекторной системе.

Ван ден Бринк предложил [237] отделить внутреннюю активность метакоидного антагониста β (отношение максимального стимула S_B^{\max} данного антагониста в собственной рецептор-эффекторной системе к максимальному достижимому в этой системе стимулу S^{\max}) от способности максимального стимула изменять эффект агониста. Модифицированное уравнение (4.5.2) в этом случае имеет вид

$$\rho_{AB} = \left[1 + (p - 1) \beta \frac{C_B}{C_B + K_B} \right] \frac{\rho_A^{\max} C_A}{C_A + K_A}, \quad (4.5.4)$$

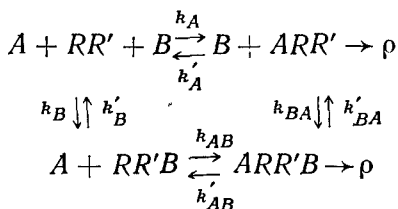
где $\beta = S_B^{\max} / S^{\max}$; $p = \rho_{AB} S^{\max} / \rho_A$.

Уравнение (4.5.4) формально позволяет различить частичный метакоидный антагонизм ($\beta < 1$) от неполной реакции эффекторной системы агониста на действие метакоидного антагониста ($0 < \rho < 1$), а также учитывает возможность метакоидного синергизма ($\rho > 1$). Отметим, однако, что раздельное определение параметров β и ρ из кривых доза—эффект невозможно. С другой стороны, для описания метакоидного синергизма достаточно допустить отрицательные значения β в уравнениях (4.5.1), (4.5.2).

Вид уравнения связывания агониста в присутствии метаффиноидного антагониста существенно зависит от предположений о степени связанности и взаимного влияния рецепторов агониста и антагониста. В модели Ариенса с соавт. [45, 46] предполагалось наличие спаренной системы рецепторов RR' с равным относительным изменением сродства каждого из лигандов при связывании другого лиганда, т. е.

$$K_A/K_{AB} = K_B/K_{BA} = \kappa, \quad (4.5.5)$$

где K_{AB} и K_{BA} — константы диссоциации комплекса $ARR'B$. Лиганд-рецепторные взаимодействия в этой модели описываются циклической схемой



Биологическая реакция вызывается образованием комплексов ARR' или $ARR'B$, концентрации которых обозначим Z_A и Z_{AB} . Концентрация активных комплексов $Z = Z_A + Z_{AB}$. С учетом обычных концентрационных зависимостей Z_A и Z_{AB} эта модель приводит к уравнению

$$Z^{\text{равн}}(C_A, C_B) = \frac{QC_A}{C_A + \frac{1 + C_B/K_B}{1 + \kappa C_B/K_B} K_A}. \quad (4.5.6)$$

Таким образом, в модели сильно связанных рецепторов действие метаффиноидного антагониста вызывает лишь снижение кажущейся константы диссоциации агониста.

Альтернативная модель, описанная в обзоре [236], предполагает, что рецепторы агониста и антагониста неспарены (соответственно их концентрации могут быть не равны), а влияние агониста на сродство антагониста к рецепторам R' отсутствует. Образование комплексов $R'B$ вызывает конформационные изменения части рецепторов агониста, увеличивающие константу диссоциации комплексов AR . Равновесная зависимость $Z(C_A, C_B)$ определяется уравнением

$$Z = \frac{C_B}{C_B + K_B} \frac{QC_A}{C_A + K_{AB}} + \frac{K_B}{C_B + K_B} \frac{QC_A}{C_A + K_A} = \frac{Q_1 C_A}{C_A + K_{AB}} + \frac{Q_2 C_A}{C_A + K_A}, \quad (4.5.7)$$

отражающим наличие двух типов связывающих центров для агониста с константами диссоциации K_A и K_{AB} , относительное содержание которых определяется концентрацией антагониста

$$Q_1/Q_2 = K_B/C_B.$$

При условии существенного различия в сродстве ($K_{AB} \gg \gg K_A$) зависимость $Z(C_A, C_B)$ имеет выраженное плато.

В работе [236] рассматривается также обобщенная модель метаффиноидного антагонизма, включающая как частные случаи уравнения (4.5.6) и (4.5.7).

Укажем на принципиальную ошибку, допущенную при формулировке модели, приводящей к уравнению (4.5.7). Именно предположение о том, что лишь образование комплексов типа $R'B$ влияет на сродство агониста к рецептору, а обратное влияние отсутствует (K_B не зависит от количества образовавшихся комплексов типа AR), **противоречит закону сохранения энергии**. В самом деле, суммарная энергия образования некоторого количества комплексов типа AR и $R'B$ — ΔF **не должна зависеть от порядка их образования**. Между тем при формировании, например, сначала только комплексов типа AR , а затем типа $R'B$

$$\Delta F = - \mathcal{R}T [Z_A \ln K_A + Z_B \ln K_B],$$

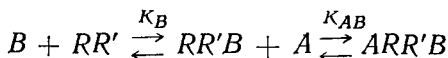
а при обратной последовательности (сначала образуются только комплексы типа $R'B$, потом AR)

$$\Delta F = - \mathcal{R}T [Z_A \ln K_{AB} + Z_B \ln K_B].$$

Рассмотренный пример — удобный случай напомнить читателю, что при построении моделей, содержащих циклические схемы, следует обращать внимание на соблюдение правила Гесса — энергия образования конечного продукта не должна зависеть от пути проведения реакции. Это обстоятельство учтено, например, в модели сильно связанных рецепторов в виде условия (4.5.5). Действительно, энергия образования тройного комплекса $ARR'B$ по механизмам



или



есть соответственно — $\mathcal{R}T \ln K_A K_{BA}$ и $-\mathcal{R}T \ln K_B K_{AB}$; в силу же (4.5.5) $K_B K_{AB} = K_A K_{BA}$.

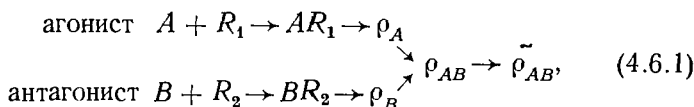
4.6. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ И ФИЗИЧЕСКИЙ АНТАГОНИЗМ

Функциональный антагонизм — случай взаимодействия двух агентов с независимыми рецепторными системами, причем вызывается противоположное действие в одной и той же эффекторной системе. Классическим примером функционального антагонизма является антагонизм между действием ацетилхолина и норадреналина на гладкую мускулатуру кишечника. Совершенно сходным образом определяется и понятие физического антагонизма, который вызывается противоположным физиологическим действием лекарств, активирующих полностью независимые рецептор-эффекторные системы. Примером физического антагонизма может служить противоположное влияние на кровяное давление вазодилататоров и лекарств, стимулирующих деятельность сердца. Между физическим и функциональным антагонизмом, таким образом, не существует принципиальных различий. Отнесение антагонизма двух агентов, стимулирующих различные рецепторные системы, к одному из этих механизмов во многом зависит от уровня детализации исследуемой эффекторной системы. Так, если в приведенном выше примере сердечно-сосудистая система рассматривается как единая эффекторная система, антагонизм между действием вазодилататоров и сердечных стимуляторов на кровяное давление следует считать функциональным.

Условное разграничение функционального и физиче-

ского антагонизмов может также основываться на изменении знака наблюдаемого эффекта с увеличением концентрации агониста. Например, при различных сочетаниях концентраций вазодиллятора и сердечного стимулятора может быть в принципе достигнуто как понижение, так и повышение давления крови. Подобная способность антагониста изменять знак наблюдаемого эффекта, указывающая на относительную независимость двух рецептор-эффекторных систем, более характерна для физического антагонизма. С другой стороны, в случае функционального антагонизма обычно считают, что эффект, противоположный наблюдаемому (например, сокращение предварительно полностью расслабленной мышцы), невозможен. Вместо отрицательного участка кривой доза—эффект при функциональном антагонизме должны наблюдаться пороговые явления — отсутствие эффекта при относительно низких концентрациях агониста и высокой концентрации антагониста. В дальнейшем преимущественно используется термин «функциональный антагонизм», однако с учетом отмеченных выше различий большая часть изложенного справедлива также для физического антагонизма.

Функциональный антагонизм может быть представлен в виде следующей общей схемы [237]:



где R_1 и R_2 — рецепторы агониста и антагониста; ρ_A и ρ_B — результирующие субэффекты в рецептор-эффекторных цепях A и B ; ρ_{AB} — первый субэффект, величина которого зависит от стимула в обеих цепях; $\tilde{\rho}_{AB}$ — наблюдаемый эффект.

Величины субэффектов ρ_A , ρ_B , ρ_{AB} и конечного эффекта $\tilde{\rho}_{AB}$ в значительной мере определяются формой зависимостей стимул—эффект на каждом этапе схемы (4.6.1). Для качественного анализа кривых концентрация—эффект можно, однако, ограничиться простейшими допущениями [237].

1. Субэффекты ρ_A и ρ_B пропорциональны концентрациям эффектор-рецепторных комплексов:

$$\rho_A/\rho_A^{\max} = \frac{C_A}{C_A + K_A},$$

$$\rho_B/\rho_B^{\max} = \frac{C_B}{C_B + K_B},$$
(4.6.2)

где ρ_A^{\max} и ρ_B^{\max} — максимальные субэффекты, достижимые в обеих эффекторных системах при применении данных эффекторов A и B .

2. Субэффект ρ_{AB} есть линейная комбинация субэффектов ρ_A и ρ_B :

$$\frac{\rho_{AB}}{\rho_{AB}^{\max}} = \frac{aC_A}{C_A + K_A} - \frac{bC_B}{C_B + K_B},$$
(4.6.3)

где ρ_{AB}^{\max} — предельное значение ρ_{AB} , а параметры a и b учитывают как внутреннюю активность эффектов A и B , так и эффективность передачи вызванных их действием сигналов в общий участок эффекторной цепи. Рассматривая семейство кривых концентрация — эффект для одного агониста, можно положить $\rho_{AB}^{\max} = \rho_A^{\max}$ и переписать уравнение (4.6.3) в виде

$$\frac{\rho_{AB}}{\rho_A^{\max}} = \frac{C_A}{C_A + K_A} - \gamma \frac{C_B}{C_B + K_B}.$$
(4.6.4)

Рассмотрим вначале семейство кривых концентрация—эффект, соответствующих уравнению (4.6.4), в предположении, что конечный эффект пропорционален величине ρ_{AB} во всей области ее изменения (т. е. на последнем этапе схемы (4.6.1) ограничения в передаче стимула отсутствуют).

Следует отметить несколько характерных особенностей модели функционального антагонизма, описываемой уравнением (4.6.4). Во-первых, присутствие антагониста снижает максимальный эффект агониста. В рамках сделанного выше предположения о пропорциональности ρ_{AB} и ρ_{AB} максимальная реакция описывается соотношением

$$\frac{\tilde{\rho}_{AB}^{\max}}{\tilde{\rho}_A^{\max}} = 1 - \gamma \frac{C_B}{C_B + K_B},$$
(4.6.5)

где $\tilde{\rho}_A^{\max}$ и $\tilde{\rho}_{AB}^{\max}$ — максимальные результирующие эффекты в отсутствие и в присутствии антагониста. Полное подав-

ление антагонистом реакции на любые концентрации агониста $\bar{\rho}_{AB} = 0$ возможно при условии

$$\gamma > 1, \quad \frac{C_B}{K_B} \gg \frac{1}{\gamma - 1}. \quad (4.6.6)$$

Если $\gamma < 1$, полное подавление реакции невозможно и справедливо неравенство

$$\bar{\rho}_{AB}^{\max} \geq (1 - \gamma) \bar{\rho}_A^{\max}. \quad (4.6.7)$$

В работе [238] предложена классификация полных и частичных функциональных антагонистов в зависимости от наличия или отсутствия у них способности к полному подавлению реакции, вызванной агонистом. Условием полного функционального антагонизма является первое из неравенств (4.6.6). Подобная классификация является, однако, «агонист-зависимой», поскольку параметр γ в соотношениях (4.6.4) — (4.6.6) определяется свойствами обеих рецептор-эффекторных систем.

Второй особенностью (4.6.4), (4.6.5) является наличие для каждой концентрации антагониста пороговой концентрации агониста C_n , ниже которой эффект отсутствует. Полагая, что субэффект ρ_{AB} в уравнении (4.6.4) не может быть отрицательным, получаем условие возникновения эффекта

$$C_A \geq C_n = \frac{\gamma K_A}{1 - \gamma + K_B/C_B}. \quad (4.6.8)$$

Неравенство (4.6.8) имеет смысл лишь при положительных значениях знаменателя правой части, т. е. в предположении, что по крайней мере одно из неравенств (4.6.6) не выполняется. При $\gamma > 1$ может быть найдена концентрация антагониста, обеспечивающая полное подавление эффекта. В случае $\gamma < 1$ существует максимальное значение пороговой концентрации агониста C_n :

$$C_n^{\max} = \frac{\gamma}{1 - \gamma} K_A. \quad (4.6.9)$$

Соотношения (4.6.7) и (4.6.9) определяют третью особенность рассматриваемой модели функционального антагонизма — наличие предела для сдвига кривых концентрация агониста — эффект, вызываемого частичным (по определению [238]) функциональным антагонистом.

Анализ экспериментальных зависимостей концентрация—эффект (см. также параграф 6.8) показал, что во многих случаях снижение максимального эффекта в присутствии функционального антагониста не наблюдается. Для объяснения этого несоответствия экспериментальных данных теоретическим моделям типа (4.6.4) Ван ден Бриик [237] предположил наличие рецепторного резерва на конечном этапе схемы (4.6.1). Согласно этому предположению, наблюдаемый эффект ρ_{AB} может возрасти с увеличением субэффекта ρ_{AB} лишь до определенного уровня: $\rho_{AB} = q\rho_A^{\text{man}}$, $q < 1$; превышение этого уровня не отражается в изменении эффекта. Представленные на рис. 6.3 кривые концентрация—эффект в данном случае быстро переходят к насыщению вблизи уровня, определяемого параметром q . Очевидно, что максимальный эффект в присутствии антагониста при этом остается неизменным или снижается лишь в случае достаточно высоких концентраций антагониста.

Отметим, что наличие рецепторных резервов при формировании субэффектов ρ_A , ρ_B , ρ_{AB} учитывается в рассмотренной модели через параметры a и b уравнения (4.6.3) или параметр γ уравнения (4.6.4) и не вызывает качественного изменения структуры семейств концентрационных зависимостей, описываемых этими уравнениями. Характерные особенности семейств кривых концентрация агониста—эффект в модели [237], учитывающей наличие резерва при формировании наблюдаемого эффекта, более подробно рассматриваются в параграфах 6.1 и 6.8. Укажем здесь лишь на удовлетворительное согласие предсказаний этой модели с экспериментальными семействами кривых концентрация—эффект [193, 238].

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Располагая набором экспериментально установленных зависимостей $\tilde{Z}(C, t)$ или $\tilde{\rho}(C, t)$, можно ставить задачу выбора модели, наиболее адекватно их описывающей, и оценки входящих в нее параметров. Уже с помощью визуального сравнения соответствующих семейств кривых удается обычно отбросить значительную часть потенциально возможных механизмов, так что окончательный выбор приходится осуществлять среди сравнительно ограниченного круга моделей, характеризующихся более или менее выраженным сходством формы теоретических зависимостей $Z(C, t)$, $\rho(C, t)$ с экспериментальными кривыми.

Во многих ситуациях, впрочем, проблема выбора модели отсутствует — механизм исследуемого процесса известен, и нужно лишь оценить параметры модели. В том и другом случае наиболее общий подход связан с использованием метода наименьших квадратов.

5.1. МЕТОД НАИМЕНЬШИХ КВАДРАТОВ

Пусть экспериментальным путем получено некоторое семейство зависимостей $\tilde{Z}(C, t)$ или $\tilde{\rho}(C, t)$; предполагается, что они описываются уравнениями $Z = Z(C, t, K_1, \dots, K_m)$, $\rho = \rho(C, t, K_1, \dots, K_m)$, содержащими неизвестные параметры K_1, K_2, \dots, K_m , значения которых необходимо оценить.

Одним из наиболее интересных результатов математической статистики является обоснование того факта, что в задачах подобного рода наилучшие оценки параметров дает метод наименьших квадратов. Важнейшие теоремы получены для случая аппроксимации экспери-

ментальных кривых уравнениями, линейными по искомым параметрам:

$$y(x) = \sum_{j=1}^m K_j g_j(x), \quad (5.1.1)$$

причем функции $g_j(x)$, не содержащие подлежащих определению параметров K_j , могут быть произвольными. В случае нелинейной зависимости y от искоемых параметров K_j эти результаты сохраняют силу, хотя и с определенными некоторыми ограничениями, о которых пойдет речь дальше.

Подробное изложение метода наименьших квадратов и различных аспектов его использования в задачах обсуждаемого класса можно найти в [29, 32, 33, 86]; мы здесь ограничимся лишь указанием на некоторые особенности этого метода, существенные с точки зрения интересующих нас приложений.

Пусть \tilde{y}_i — найденные опытным путем значения функции $y(x)$ вида (5.1.1), соответствующие значениям аргумента x_i . Последние полагаются заданными точно, в то время как величины \tilde{y}_i измерены с определенной погрешностью; соответствующие дисперсии суть σ_i^2 . Обычно полагают, что ошибки величин \tilde{y}_i некоррелированы. Это связано, однако, не с какими-либо принципиальными ограничениями метода, а с тем обстоятельством, что оценить такую корреляцию в огромном большинстве задач невозможно. Если это все же удастся каким-либо образом сделать, соответствующие поправки легко вводятся в вычислительные процедуры метода наименьших квадратов.

Оценки K_j , находимые в виде решения задачи

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^n \frac{1}{\sigma_i^2} [\tilde{y}_i - y(X_i, K_1, K_2, \dots, K_j, \dots, K_m)]^2 \rightarrow \\ \rightarrow \min_{K_j}, \quad j = 1, 2, \dots, m, \end{aligned} \quad (5.1.2)$$

являются, согласно теореме Гаусса—Маркова [33], наиболее точными среди всех несмещенных оценок K_j . Последнее следует понимать в том смысле, что всякий другой способ получения несмещенных оценок тех же параметров характеризуется большей дисперсией оценки каждого из K_j .

В случае, если ошибки \tilde{y}_i распределены нормально оценки, получаемые с помощью метода наименьших квад-

ратов, являются наилучшими также согласно критерию наибольшего правдоподобия. Записав для отдельных ошибок

$$\Delta y_i = \tilde{y}_i - y(x_i), \quad (5.1.3)$$

$$q_i = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_i} \exp \left[-\frac{(\Delta y_i)^2}{2\sigma_i^2} \right], \quad (5.1.4)$$

получим функцию правдоподобия в виде

$$S = \prod_{i=1}^n q_i. \quad (5.1.5)$$

Ее максимум, или, что то же самое, максимум ее логарифма

$$L = - \sum_{i=1}^n \left[\frac{(\Delta y_i)^2}{2\sigma_i^2} - \ln \sigma_i \right] + \frac{n}{2} \ln(2\pi) \quad (5.1.6)$$

совпадает с решением (5.1.2).

Последнее служит зачастую источником недоразумения, заключающегося в утверждении, что непрременным условием правомочности использования метода наименьших квадратов является гипотеза о том, что ошибки величин \tilde{y}_i подчиняются нормальному распределению. На самом деле, по утверждению авторов наиболее авторитетных руководств по математической статистике, результаты, получаемые методом наименьших квадратов, «не требуют специальных ограничений на распределение ошибок величин \tilde{y}_i . Необходима конечность вторых моментов, хотя часто неверно считают, что метод наименьших квадратов основан на предположении о нормальном законе распределения ошибок. Возможно, это заблуждение обусловлено тем, что лишь при нормальном законе распределения ошибок принцип максимального правдоподобия приводит к такому же решению, что и метод наименьших квадратов» [9]. Подробнее этот вопрос обсуждается в [15].

Входящие в (5.1.2) дисперсии σ_i^2 до сих пор полагались известными, однако чаще всего дело обстоит иначе, и для определения весов отдельных измерений $w_i = 1/\sigma_i^2$ приходится привлекать некоторые гипотетические условия или сведения, характеризующие точность измерительных процедур и полученные вне обсуждаемого эксперимента. Чаще всего используются гипотезы о равенстве

всех σ_i^2 (так называемое равенство простых ошибок $\omega_i = \omega$) или равенстве величин $\sigma_i/y_i = \delta$ (равенство относительных ошибок), т. е.

$$\omega_i = 1/(\delta y_i)^2.$$

Если

$$S^2 = \sum_i \omega_i (\tilde{y}_i - \hat{y}_i)^2, \quad (5.1.7)$$

где \hat{y}_i определяются из (5.1.1) после подстановки оценок K_j , полученных методом наименьших квадратов, — взвешенная остаточная сумма квадратов отклонений, то ковариационная матрица оценок параметров имеет вид

$$\langle R \rangle = \frac{S^2}{n - m} \langle Q \rangle^{-1}, \quad (5.1.8)$$

причем элементы матрицы $\langle Q \rangle$ суть

$$q_{kl} = \sum_{i=1}^n \omega_i \partial g_h / \partial x|_{x=x_i} \partial g_l / \partial x|_{x=x_i}. \quad (5.1.9)$$

Повторяем, все приведенные результаты получены в предположении, что функция $y(x)$ линейна по параметрам K_j . Допустим, однако, что $\bar{K}_1, \dots, \bar{K}_i, \dots, \bar{K}_m$ — значения параметров, минимизирующие квадратичную невязку

$$S^2 = \sum_i \omega_i [\tilde{y}_i - y(x_i, K_1, \dots, K_m)]^2, \quad (5.1.10)$$

причем функция y уже нелинейна по K_j . В окрестности минимума S^2 справедливо приближение

$$y(x, K_1, \dots, K_m) \approx y(x, \bar{K}_1, \dots, \bar{K}_m) + \sum_k \frac{dy(x, \bar{K}_1, \dots, \bar{K}_m)}{dK_k} (\bar{K}_k - K_k), \quad (5.1.11)$$

и, следовательно, сохраняют силу перечисленные результаты. Именно оценки \bar{K}_j продолжают оставаться наиболее точными несмещенными оценками среди всех прочих, принадлежащих этой окрестности; поскольку оценки, получаемые другими «конкурентоспособными» методами

[18], чаще всего незначительно разнятся от \bar{K}_j , их почти всегда можно считать принадлежащими окрестности, определяемой соотношением (5.1.11). Несколько иначе обстоит дело с оценками ошибок.

Если область значений каждого K_j , в которой выполняется (5.1.11), достаточно велика (превосходит по каждому параметру K_j соответствующую σ_j в несколько раз), справедлива оценка ковариационной матрицы в виде (5.1.9); в противном случае следует принимать определенные меры предосторожности [33].

Разумеется, все сказанное относится к окрестности глобального минимума функции $S^2(K_1, \dots, K_m)$, могущей иметь в принципе несколько локальных минимумов. Это усложняет процедуру нахождения \bar{K}_j ; в [9] рассматриваются некоторые вычислительные аспекты подобных процедур.

Метод наименьших квадратов является основой также для многих процедур оценки адекватности избранного аппроксимирующего уравнения данной экспериментальной зависимости или сравнения с этой точки зрения разных уравнений. Также и в этом случае основные результаты получены для функций, линейных по оцениваемым параметрам, и их перенесение на случай нелинейных зависимостей требует по-прежнему соблюдения некоторых предосторожностей, связанных с представлением аппроксимирующей функции в линеаризованной форме (5.1.1) [33].

Впрочем, даже и для линейных задач не существует общего подхода к проблеме выбора «наилучшего аппроксимирующего уравнения» или «наилучшего подмножества регрессоров». «...Термин «наилучший» здесь, конечно, субъективен,— пишет по этому поводу Дж. Себер.— Нет никакой единой статистической процедуры для выбора соответствующего подмножества, и во всех статистических методах... предполагается, что необходимо субъективное решение» [29].

Таким образом, рассматриваемые ниже показатели качества аппроксимации следует трактовать скорее как вспомогательные, хотя и важные критерии дискриминации моделей.

Характеристика качества аппроксимации функцией $y(x, \bar{K})$ экспериментальной зависимости, определяемой совокупностью значений $\{\hat{y}_i, x_i\}$, может быть получена в виде так называемого выборочного множественного коэффициента корреляции:

$$\Omega = \frac{\sum_i (\tilde{y}_i - \langle \tilde{y} \rangle) [y(x_i, K_1, \dots, K_m) - \langle y \rangle (K_1, \dots, K_m)]}{\left\{ \sum_i (\tilde{y}_i - \langle \tilde{y} \rangle)^2 \sum_i [y(x_i, K_1, \dots, K_m) - \langle y \rangle (K_1, \dots, K_m)]^2 \right\}^{1/2}} \rightarrow \quad (5.1.12)$$

т. е. коэффициента корреляции между экспериментальными и расчетными значениями y_i при заданных оценках параметров K_j . Здесь $\langle \tilde{y} \rangle$, $\langle y \rangle (K_1, \dots, K_m)$ — средние соответственно экспериментальных и оценочных величин.

Квадрат коэффициента Ω называется коэффициентом детерминации; можно показать [29, с. 109], что если оценки K_j получены с помощью метода наименьших квадратов, то

$$\Omega^2 = 1 - \frac{S^2}{\sum_i (\tilde{y}_i - \langle y \rangle)^2}, \quad (5.1.13)$$

где S^2 — остаточная сумма квадратов уклонений.

Использование для оценки качества аппроксимации непосредственного коэффициента детерминации Ω^2 имеет тот недостаток, что его величина не зависит от числа «подгоночных» параметров, варьированием которых выполнена аппроксимация. Например, модель, содержащая два параметра, может столь же хорошо (с точки зрения величины Ω^2) описывать экспериментальные зависимости, что и модель, содержащая пять параметров; ясно, однако, что во втором случае аппроксимирующая кривая «гибче» и имеет возможность более точно следовать заданной зависимости.

Так называемый скорректированный коэффициент детерминации [29, с. 110] лишен недостатков подобного рода:

$$\bar{\Omega}^2 = 1 - (1 - \Omega^2) \frac{n}{n - m}. \quad (5.1.14)$$

Здесь n — число экспериментальных точек \tilde{y}_i ; m — число параметров аппроксимирующего уравнения. Им можно пользоваться при выборе уравнения, «наилучшим» образом описывающего некоторую экспериментально найденную зависимость. Поскольку для всех сравниваемых уравнений знаменатель в (5.1.13) одинаков, задача отыс-

кания «наилучшей» модели сводится просто к сопоставлению величин $\frac{S^2}{n-m}$.

Следует еще раз подчеркнуть, что этот критерий — всего один из ряда возможных (их подробное рассмотрение можно найти в [29]); главное его преимущество — простота и наглядность. Поэтому для дискриминации моделей, помимо скорректированного коэффициента детерминации, желательно привлекать возможно большее число содержательно обусловленных критериев, оценки, полученные в независимых экспериментах, и т. п.

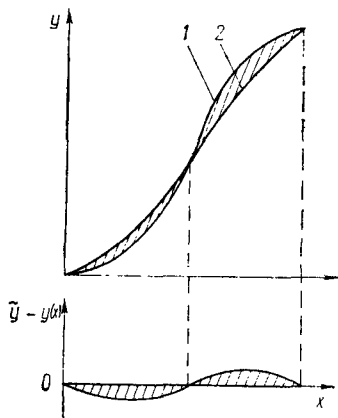


Рис. 5.1. Отклонение аппроксимирующей кривой (1) от экспериментальной (2), обнаруживающее выраженную зависимость от x

Целесообразно также визуально сравнить результаты аппроксимации экспериментальной зависимости различными уравнениями, нанеся их на один график. При этом могут выявиться различные особенности распределения остаточной невязки S^2 , указывающие на характер несоответствия избранной модели экспериментальной кривой. Если отклонения между экспериментальными и расчетными значениями обнаруживают выраженную зависимость от x (рис. 5.1), следует усомниться в адекватности использованного аппроксимирующего уравнения, даже если соответствующее значение $\bar{\Omega}^2$ довольно велико.

5.2. ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ УРАВНЕНИЯ (2.1.3)

Нехитрая в общем задача оценки параметров немудреного уравнения

$$y(x) = \frac{Qx}{x + K} \quad (5.2.1)$$

на основании экспериментальных зависимостей $\tilde{y}_i(x_i)$ особого внимания как будто бы не заслуживает и углуб-

ленного анализа не требует. Сложилось, однако, так, что этому вопросу посвящены многочисленные публикации в серьезных научных изданиях; создана почти автономная отрасль внутривидисциплинарных исследований—вспомогательный раздел энзимологии (уравнение Михаэлиса имеет тот же вид (5.2.1)), фармакологии и—что, возможно, удивительнее всего — молекулярной биофизики.

Сначала было предложено несколько упрощенных способов получения оценок параметров (5.2.1), каждый из них приобрел некоторую популярность в кругах исследователей, после чего, естественно, настала пора дискуссий о том, который из этих методов лучше [149]. Резюмировать результат можно весьма кратко: все плохо, поэтому воспроизводить здесь ход этих дискуссий во всех тонкостях не имеет смысла. Ограничимся немногими замечаниями по существу.

Прежде всего укажем на одну особенность функции (5.2.1): оценки параметров Q и K оказываются обычно очень сильно коррелированными. На рис. 5.2 приведены зависимости среднеквадратичной невязки

$$\frac{s^2}{p} = \frac{1}{p} \int_0^p \left[\frac{x}{x+1} - \frac{Q'x}{x+K'} \right]^2 dx \quad (5.2.2)$$

от принятых значений параметров функции Q' , K' , аппроксимирующей кривую того же вида (5.2.1) с параметрами $Q=1$, $K=1$. Здесь p — максимальная концентрация эффектора, примененная в данном эксперименте. Соответствующие значения функции y (биологическая реакция, связывание и т. п.) не превышают $y^{\max}/(1+1/p)$.

На всех трех «картах» рис. 5.2, *a* имеется четко выраженный «желоб», направленный примерно вдоль диагонали. Линии равного уровня значений $s^2/p=0,01$, $0,03$ и т. д. охватывают область значений оценок K' , Q' , которые могут быть получены с помощью метода наименьших квадратов, если величины \tilde{y}_i измеряются с относительными погрешностями того же порядка. Можно убедиться, что, например, на начальном участке кривой (изменение x от 0 до 1) зависимости, построенные в предположении

$$K' = 1,5, Q' = 1,35 \text{ и } K' = 0,5, Q' = 0,7,$$

будут практически совпадать с исходной кривой $Q=1$, $K=1$ (рис. 5.2, *б*) — все эти точки находятся внутри ли-

нии равного уровня ошибки 0,01. По мере увеличения рассматриваемого участка кривой эта область сокращается, однако описываемая корреляция оценок параметров K' , Q' достаточно четко выражена еще и при $p=4$, что соответствует 80% y^{\max} . Заметим, что очень часто по

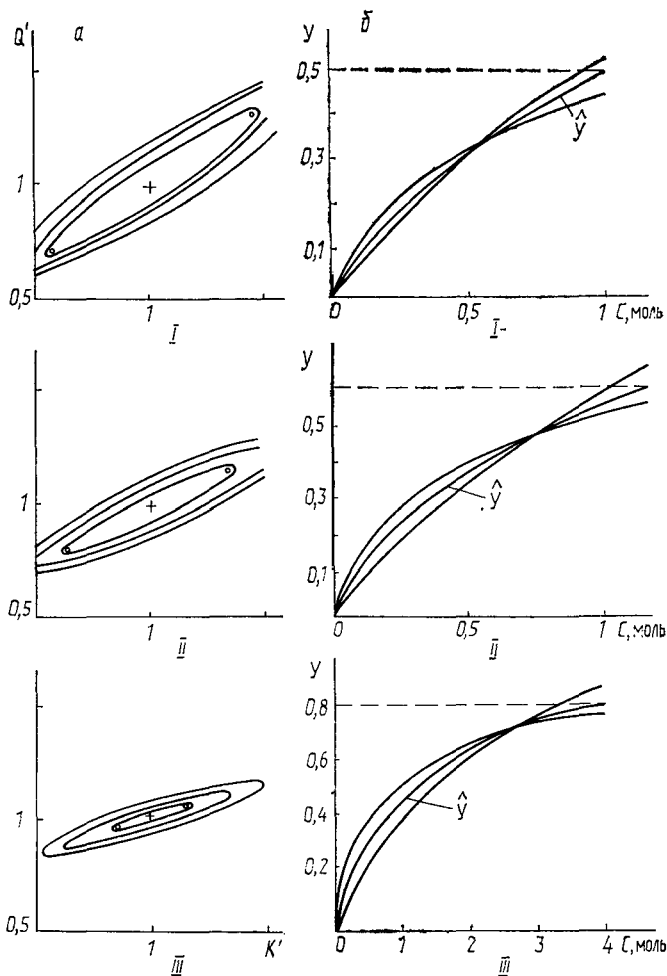


Рис. 5.2. Взаимное среднеквадратичное отклонение s^2/p пары зависимостей $\hat{y}(C)$ вида (5.2.1) с параметрами $K=Q=1$ и K', Q' как функций K', Q' (а); сравнение кривых $\hat{y}(x)$ с параметрами $K=Q=1$ и кривых, соответствующих крайним точкам внутри области $s^2/p=0,01$ (на соответствующих картах помечены кружками) (б): I — $P=1,0$; II — 2,33; III — 4,0

условиям эксперимента невозможно осуществить измерения в области, близкой к насыщению; в частности, так почти всегда обстоит дело при регистрации биологической реакции клеток или органов на различные биорегуляторы.

Приведенные примеры показывают, что оценки, получаемые при обработке кривых, на которых отсутствуют более или менее продолжительные участки, соответствующие уровню насыщения, справедливы с точностью до отношения Q/K . При небольших концентрациях ($C \ll K$)

$$y \simeq \frac{Q}{K} C, \quad (5.2.3)$$

так что разделенная оценка констант K , Q вообще невозможна; рис. 5.2 убеждает, что и в области существенно более высоких концентраций дело обстоит не намного лучше. Поэтому, как уже отмечалось в параграфе 1.2, с большой осторожностью следует относиться к результатам следующего рода: под действием некоторого фактора наступило изменение константы равновесия K при примерно пропорциональном изменении величины Q . Можно не сомневаться, что почти всегда мы имеем дело с расчетным артефактом, причем его появление, вообще говоря, в малой степени зависит от совершенства процедуры получения оценок, а следует из самой формы функции (5.2.1).

Рассмотрим теперь наиболее распространенные способы получения оценок K , Q . Применение для этой цели метода наименьших квадратов базируется зачастую на так называемом методе Уилкинсона [254]. В сущности, речь не должна была бы идти о каком-то новом методе, поскольку Уилкинсон просто применил для минимизации суммы квадратов уклонений известную в методе наименьших квадратов итерационную процедуру, базирующуюся на линеаризации аппроксимирующей функции по искомым параметрам в окрестности некоторых приближенных их значений [33]:

$$y(x, K_1, \dots, K_m) = y(x, K_1^0, \dots, K_m^0) + \sum_j \frac{\partial y(x, K_1, \dots, K_m)}{\partial K_j} \Big|_{K_j=K_j^0} K_j^0 - K_j.$$

Поскольку в случае (5.2.1) функция нелинейна лишь по

K , можно записать

$$y(x, Q, K) \approx \frac{Qx}{x + K^0} - (K - K^0) \frac{Qx}{(K^0 + x)^2}. \quad (5.2.4)$$

Метод наименьших квадратов дает приближенные оценки параметров Q и $Q(K - K^0)$. Повторяя эту процедуру несколько раз, можно добиться требуемой точности оценок Q, K^* . Оценки дисперсий K, Q и ковариаций $\text{cov}(K, Q)$ получаются, как обычно, в форме (5.1.9). Заметим, что по окончательным величинам оценок K, Q метод Уилкинсона дает — в границах любой наперед заданной точности — те же результаты, что и применение для минимизации суммы квадратов уклонений любого другого алгоритма минимизаций функций многих переменных.

Корниш-Боуден и Эйзенталь [18, 87, 109] реализовали процедуру оценки констант уравнения (5.2.1), использующую идеи непараметрической статистики. Ценой сознательного огрубления некоторых исходных построений непараметрическая статистика избавляется от необходимости привлечения многих гипотетических, зачастую трудно проверяемых элементов, в частности предположения о характере распределения тех или иных величин. Характерной особенностью этого подхода является использование вместо среднеарифметического понятия медианы — величины, соответствующей тому члену вариационного ряда, который занимает по исследуемому признаку срединное положение в этом ряду (если в ряду четное число медиана принимается равным величине, промежуточной между значениями, соответствующими $n/2$ -му и $(n/2) + 1$ -му членами). Иными словами, медиана — такое значение параметра x , отклонение от которого в большую и меньшую стороны равновероятно.

Идея метода, развитого в работах [18, 87, 109], заключается в следующем. Если среди результатов n измерений $y_i(C_i)$ выбрать любую пару величин y_i, y_j и подставить в левую часть (2.1.3), полученная система уравнений разрешима относительно K, Q :

$$K_{ij} = \frac{\tilde{y}_j - \tilde{y}_i}{\tilde{y}_i/C_i - \tilde{y}_j/C_j}, \quad (5.2.5)$$

*) Разумеется, здесь имеется в виду точность процедуры, т. е. близость получаемых оценок значениям K, Q , минимизирующим сумму квадратов отклонений.

$$Q_{ij} = \frac{C_i - C_j}{C_i/\bar{y}_i - C_j/\bar{y}_j}. \quad (5.2.6)$$

Всего можно получать $n(n-1)/2$ таких решений, которые из-за уклонений экспериментальной зависимости от формы (5.2.1) будут в той или иной мере различаться. В качестве наиболее вероятных оценок принимаются медианы K и Q . Возможны также различные оценки дове-

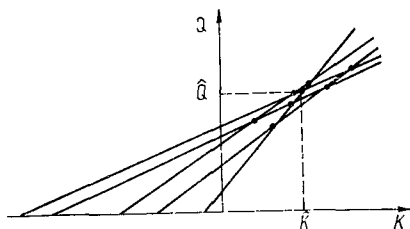


Рис. 5.3. «Прямой линейный график»

рительных областей K и Q . Сходные методы получения оценок констант уравнения (5.2.1), но с другим способом усреднения по парам экспериментальных точек были предложены в работах [110, 111, 149].

Наглядное представление о сути метода дает использование так называемого прямого линейного графика (иногда и сам обсуждаемый подход носит название метода прямого линейного графика). Уравнение (5.2.1) представляется в виде линейной зависимости Q от K :

$$Q = \bar{y}_i + \frac{\bar{y}_i}{C_i} K. \quad (5.2.7)$$

На плоскости (Q, K) каждой экспериментально найденной точке (\bar{y}_i, C_i) будет соответствовать прямая. В случае точного выполнения соотношения (5.2.1) все прямые такого рода должны пересекаться в одной точке; из-за погрешностей определения величин \bar{y}_i и (или) C_i будет иметь место разброс точек пересечения разных пар прямых в некоторой области (рис. 5.3); следует обратить внимание на корреляцию значений Q_{ij} , K_{ij} , соответствующих различным парам экспериментальных точек.

Несколько замечаний по поводу попыток авторов [87, 109] обосновать метод «прямого линейного графика» в качестве лучшего из существующих ныне способов оцен-

ки параметров уравнения (5.2.1). Комментируя возможности метода наименьших квадратов в задачах подобного рода, Корниш-Боуден пишет [18]: «Метод наименьших квадратов в приложении к решению задач регрессионного анализа представлен как самый удобный метод, а не как наилучший. Дело здесь в следующем: чтобы показать, что решение задачи, полученное методом наименьших квадратов, является «оптимальным», мы должны допустить, что а) распределение случайных ошибок является нормальным; б) экспериментальная ошибка определяется ошибкой только одной переменной; в) соответствующие веса измерений известны и г) возможными систематическими ошибками можно пренебречь. К сожалению, в какой мере каждое из этих допущений выполняется на практике, известно очень мало.

В отличие от этого метод «прямого линейного графика» не нуждается в первых трех допущениях, если же говорить о последнем допущении, то трудно представить себе такие систематические ошибки, которые невозможно было бы обнаружить, и его обычно выражают в более простой форме: если соответствующая информация отсутствует, то принимают, что ошибка любого измерения с равной вероятностью может быть как положительной, так и отрицательной величиной».

Из трех первых «допущений» на самом деле существенную проблему для метода наименьших квадратов представляет лишь одно — введение весов измерений (всегда определяемых с известной долей произвола) [222]; во многих приложениях, однако, эту проблему удается более или менее успешно обойти [176]. Но, как отмечалось выше (см. параграф 5.1), метод наименьших квадратов вовсе не требует предположения о нормальном распределении ошибки.

Второе допущение — об отсутствии ошибки абсциссы, в данном случае концентрации, — справедливо для подавляющего большинства задач рассматриваемого типа; обычно концентрация агониста в системе задается с точностью, на порядки превышающей точность определения величины \bar{y}_i .

В результате попытка обоснования преимуществ «прямого линейного графика» перед методом наименьших квадратов с общих позиций не представляется убедительной. Однако авторами метода «прямого линейного графика» для подтверждения подобного заключения был проделан численный эксперимент, заключающийся в

следующем. Точки кривой вида (5.2.1) с параметрами $Q=K=1$ задавались со случайными ошибками по абсциссе или ординате; ошибки были распределены по закону

$$P(\Delta y) = pN(\Delta y, \sigma_1^2) + (1 - p)N(\Delta y, \sigma_2^2). \quad (5.2.8)$$

Здесь $N(\Delta y, \sigma_1^2)$, $N(\Delta y, \sigma_2^2)$ — нормальные распределения с дисперсиями σ_1^2 , σ_2^2 соответственно; p — относительный вес одного из них. Лишь в случае $P(\Delta y) = N(\Delta y, \sigma)^2$, т. е. $p = 1$ или $p = 0$, оценки, получаемые методом наименьших квадратов, чаще давали результат, более близкий единичным значениям обоих параметров, чем оценки с помощью метода «прямого линейного графика»¹, который и объявлен авторами более подходящей для этих целей процедурой. Укажем на одну из причин несостоятельности этого вывода. Как отмечалось, оценки K и Q очень сильно коррелированы, особенно если обработке подвергалась начальная часть кривой (а большинство численных экспериментов работы [87] выполнено в интервале концентраций 0—2,0). В этих условиях сколько-нибудь надежная раздельная оценка констант невозможна в принципе; их варьирование в довольно широком пределе при условии

$$Q/K = \text{const} \quad (5.2.9)$$

обеспечивает достаточно хорошее качество аппроксимации экспериментальной зависимости (см. рис. 5.2). Совершенно очевидно, что, согласно любому критерию наилучшей аппроксимации, все оценки K , Q , удовлетворяющие условию (5.2.9), примерно эквивалентны. Между тем в зависимости от особенностей используемого алгоритма, выбора точек при численной аппроксимации и т. п. дисперсии каждого из этих параметров в численных экспериментах рассмотренного выше типа могут различаться весьма значительно. Очевидно, это не может служить основанием для предпочтения какого-либо из сравниваемых алгоритмов.

Исключительно широкое распространение получили графическое представление экспериментальных данных и оценка параметров зависимостей вида (5.2.1) с помощью линеаризованных форм уравнения. Наиболее распространенные линейные зависимости, получаемые простыми преобразованиями координат (y , C) уравне-

¹ Сходный результат получен в работе [51].

Наиболее распространенные способы линеаризации
прямоугольной гиперболы

$$y = \frac{y^{\max} x}{x + K}$$

Линеаризованная форма	Наклон	Точки пересечения графика с осями координат	
		абсцисса	ордината
$\frac{1}{y} = \frac{1}{y^{\max}} + \frac{K}{y^{\max}} \frac{1}{x}$ (5.2.10)	$\frac{K}{y^{\max}}$	$-\frac{1}{K}$	$\frac{1}{y^{\max}}$
$\frac{x}{y} = \frac{K}{y^{\max}} + \frac{1}{y^{\max}} x$ (5.2.11)	$\frac{1}{y^{\max}}$	$-K$	$\frac{K}{y^{\max}}$
$y = y^{\max} - K \frac{y}{x}$ (5.2.12)	$-K$	$\frac{y^{\max}}{K}$	y^{\max}
$\frac{y}{x} = \frac{y^{\max}}{K} - \frac{1}{K} y$ (5.2.13)	$-\frac{1}{K}$	y^{\max}	$\frac{y^{\max}}{K}$

ния (5.2.1), приведены в табл. 5.1; здесь же указаны некоторые характеристики, используемые обычно для оценки параметров y^{\max} и K (наклон, координаты пересечения осей).

График зависимости $1/y$ от $1/x$, называемый также графиком Лайнуивера — Бэрка или графиком двойных обратных координат, длительное время являлся наиболее популярной формой графического представления данных по кинетике ферментативных реакций [73]. Координаты $(x, x/y)$ (график Хейнса — Вульфа) и $(y/x, y)$ (график Эди — Хофсти) используются для представления экспериментальных данных значительно реже¹.

¹ Распространенные названия графиков зависимостей (5.2.10) и (5.2.12) связаны с именами авторов, работы которых [107, 137, 171] ознакомили с идеей линеаризации уравнения Михаэлиса—Ментен широкий круг экспериментаторов. Известный биолог-теоретик Холдейн, пытаясь заметкой в журнале «Нейчур» [133] восстановить историческую справедливость, утверждает, что с уравнениями (5.2.10)—(5.2.12) и соответствующими графиками он впервые ознакомился из неопубликованной рукописи Вульфа и привел их с указанием автора в немецком издании своей монографии «Энзимология» (1932 г.). Пожалуй, лишь авторство уравнения (5.2.11) может быть еще раз оспорено: сходное уравнение введено еще Лэнгмюром [166], а в ферментативной кинетике впервые использовано, по-видимому, Хэйном [135].

Зависимость ($y, y/x$) — график Скэтчарда [212] — широко применяется при анализе данных по связыванию радиоактивных лигандов. Графики Эди—Хофсти и Скэтчарда различаются лишь перестановкой осей координат.

Преобразование экспериментальных данных к координатам, определяемым уравнениями (5.2.10)—(5.2.13), связано с различными способами трансформации ошибок эксперимента. Именно это обстоятельство делает оценки параметров уравнения (2.1.3) зависящими от избранного способа линеаризации. Статистический анализ характера погрешностей оценок, получаемых с помощью зависимостей (5.2.10)—(5.2.12), приведен в работах [52, 105, 254]. Обычно подобный анализ предполагает точное задание независимой переменной x (концентрация) и различные законы распределения ошибок измерения зависимой переменной. Так, в наиболее детальном исследовании Доуда и Риггса [105] генерировались «экспериментальные» величины y , подчиняющиеся нормальному распределению со средним значением, точно соответствующим уравнению (5.2.1). Дисперсия распределения y определялась одним из трех предположений: а) малая постоянная ошибка ($\sigma=0,2$); б) большая постоянная ошибка ($\sigma=1,0$); в) большая ошибка, возрастающая с ростом y ($\sigma=1,0$ при минимальной концентрации и $\sigma^2 \sim y$). Компьютерный эксперимент заключался в генерировании случайных значений y , соответствующих пяти стандартным концентрациям; для каждого распределения ошибок было проведено 500 «экспериментов».

Результаты работ [52, 105, 254] показали, что получение параметров (5.2.1) с помощью линейной невзвешенной регрессии с использованием уравнения (5.2.10) в большинстве случаев приводит к существенно худшим оценкам по сравнению с аналогичной процедурой, использующей формы (5.2.11) и (5.2.12); исключение составляют лишь некоторые специальные предположения о распределении ошибок y [52]. В случае больших ошибок (зависящих или независимых от величины y) уравнение (5.2.10) зачастую приводит к бессмысленным оценкам — соответствующие прямые пересекают ось ординат вблизи или ниже начала координат. Это связано с существенно неравномерным влиянием на величину наклона прямой экспериментальных точек в областях высокой и низкой концентрации. Как показано, например, в рабо-

те [254], правильные веса экспериментальных точек в уравнении (5.2.10) должны быть пропорциональны $1/y^4$ в случае постоянных ошибок и $1/y^2$ при ошибках, пропорциональных y . Так как средние значения переменной y и характер распределения ошибок, как правило, неизвестны, в первом приближении практически используются веса, пропорциональные $1/y^4$, с последующим итерационным уточнением. Взвешенная линейная регрессия с использованием уравнений вида (5.2.10) и (5.2.11) приводит к близким оценкам средних значений и стандартных отклонений параметров [105]. Однако высокая чувствительность весов к точности измерения лишает эту процедуру оценки параметров простоты и общедоступности, являющихся по существу единственным преимуществом линеаризаций (5.2.10) — (5.2.13) по сравнению с аппроксимацией нелинейной зависимостью (5.2.1).

Результаты сопоставления графика (5.2.11) с графиками (5.2.12) или (5.2.13) менее однозначны; при малых ошибках измерения все они дают достаточно хорошие оценки y^{\max} и K с несколько меньшими стандартными отклонениями в случае графика (5.2.11) [105, 254]. С ростом ошибки (особенно, если она зависит от величины y) оценки, получаемые с помощью линейной невзвешенной регрессии с использованием уравнения вида (5.2.12), оказываются существенно более надежными [105]. Более того, если ошибки велики и приблизительно пропорциональны измеряемым значениям y , даже взвешенная регрессия с помощью (5.2.11) дает, согласно [105], большие стандартные отклонения оценок параметров, чем невзвешенная регрессия с использованием (5.2.12).

Существенным недостатком графиков Эди — Хофсти и Скэтчарда обычно считается наличие ошибки в обеих координатах y и y/x . Этот случай требует, вообще говоря, методов аппроксимации более сложных, чем стандартная линейная регрессия (см., например, [207]). Однако в случае, когда переменная x задается точно, а ошибки по y приблизительно пропорциональны измеряемым величинам, разброс данных по обеим координатам постоянен на всем протяжении графиков Эди — Хофсти или Скэтчарда и необходимость применения нетривиальных процедур оценки параметров отпадает. В работе [257] введены численные критерии пригодности экспериментальных данных для линейной невзвешенной регрессии в координатах y/x , y и поправочные множители, учитывающие смещение оценок параметров, связанное с

коррелированностью ошибок по обским координатам. С точки зрения надежности определения параметров уравнения (5.2.1) графики Скэтчарда и Эди — Хофсти равнозначны; последний, однако, более удобен для быстрой оценки K и y^{\max} , так как эти параметры являются соответственно коэффициентом и свободным членом уравнения (5.2.12) и их средние значения и стандартные отклонения непосредственно определяются в регрессионном анализе.

Следует отметить, что в экспериментах по связыванию радиоактивных лигандов, данные которых обычно обрабатываются с помощью графиков Скэтчарда, зачастую не соблюдается условие избытка свободного лиганда. Концентрация свободного лиганда определяется независимым измерением или вычисляется как разность приложенной концентрации и концентрации связанного лиганда, так что обе координаты определяются с погрешностью, в связи с чем перенос ошибок затрудняется. На основании обработки подобных экспериментальных данных в работах [88, 149] делается вывод о предпочтительности координат $(x, x/y)$ по сравнению с графиком Скэтчарда для оценки максимальной концентрации центров специфического связывания лиганда.

Реальные наборы данных нередко содержат величины, ошибка измерения которых значительно превышает стандартные отклонения, характерные для рассматриваемой группы экспериментов в целом. Подобные отклонения (выбросы) оказывают влияние на форму графиков (5.2.10) — (5.2.13), полученных линейной невзвешенной регрессией, и, следовательно, на надежность оценок параметров y^{\max} и K [52, 88, 105, 149].

На рис. 5.4 представлены в координатах (5.2.10) — (5.2.12) результаты линейной невзвешенной регрессии модельного набора данных [105], в котором минимальное из пяти идеально соответствующих уравнению (5.2.1) значений y занижено на 80%. Легко заметить, что из трех зависимостей рис. 5.4 график Лайнуивера — Берка наименее отклоняется от исходных точек. Интуитивный учет этого обстоятельства — экспериментальные данные в координатах $(1/x, 1/y)$ почти всегда хорошо «укладываются» на прямую — является, по-видимому, одной из причин неоправданной популярности графика (5.2.10) среди энзимологов. С другой стороны, ошибки измерения величины y отражаются в обеих координатах y и y/x , делая графики (5.2.12) и (5.2.13) наиболее чув-

ствительными к выбросам экспериментальных точек. Поэтому координаты Эди — Хофсти и Скэтчарда наиболее пригодны для диагностики отклонений экспериментальных данных от уравнения (5.2.1). Оценки параметров y^{\max} и K проявляют, согласно [105], противоположную тенденцию (табл. 5.2): смещение оценок параметров под влиянием выброса минимально для графика (5.2.12) и максимально для графика (5.2.10).

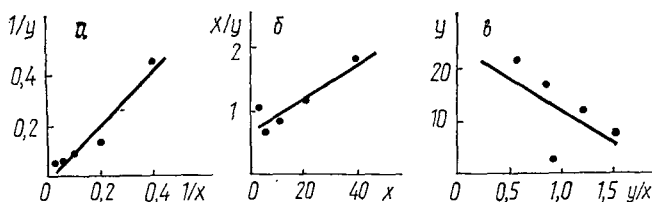


Рис. 5.4. Влияние большой ошибки измерения в одной точке на результаты линейной регрессии с помощью уравнений (5.2.10)—(5.2.12) [105]. Модельный набор данных содержал четыре «идеальные» точки $\{x_n = x_0 + n\Delta x, y_n = 30 x_n / (x_n + 15)\}$ и один выброс $\{x_0, y = 0,2 y_0\}$: а — координаты Лайнуивера — Берка; б — Хейнса — Вульфа; в — Скэтчарда

Таким образом, из четырех линейных зависимостей, представленных в табл. 5.1, график двойных обратных координат наименее пригоден для оценки параметров уравнения (5.2.1). Выбор между остальными методами линеаризации не может быть сделан однозначно, хотя линейная невзвешенная регрессия в координатах Эди — Хофсти и Скэтчарда представляется более оправданной [105, 257]. Кроме того, эти графики чувствительны к отклонениям экспериментальных данных от гиперболической зависимости (5.2.1). График Скэтчарда наиболее распространен в молекулярной фармакологии; в после-

Таблица 5.2

Влияние способа линеаризации на оценки параметров уравнения (2.1.3), полученные линейной невзвешенной регрессией из данных рис. 5.4 [105]

Метод линеаризации	Оценки параметров	
	y^{\max}	K
(5.2.10)	-110	-114
(5.2.11)	38.2	27.2
(5.2.12)	24.85	12.65

дующих параграфах в основном именно этот график используется для иллюстрации особенностей тех или иных моделей лиганд-рецепторного взаимодействия.

Доказательства неадекватности оценок параметров стационарных зависимостей типа (5.2.1) с помощью графика Лайнуивера—Бэрка стимулировали более интенсивное применение в области молекулярной энзимологии и фармакологии итерационных процедур нелинейной аппроксимации [48—50, 86, 115, 254]¹. Как неоднократно отмечалось [52, 177, 254], оценки параметров моделей, получаемые с помощью таких процедур, характеризуются более низкими величинами стандартных отклонений и меньшими смещениями средних значений по сравнению с оценками, получаемыми с помощью линеаризованных форм. С учетом современного уровня распространения миникомпьютеров и программируемых калькуляторов традиционная аргументация об относительной сложности нелинейных методов аппроксимации не является убедительной, а указанные выше достоинства этих методов вполне оправдывают разовые усилия по программированию или адаптации уже опубликованных программ [48, 49].

Ряд особенностей итерационных процедур нелинейной аппроксимации позволяет, однако, рекомендовать в качестве начального этапа обработки представление экспериментальных данных в виде одного из графиков (5.2.10)—(5.2.13) или линейной трансформации графика Хилла, рассматриваемого ниже. Во-первых, любая итерационная процедура предусматривает задание начальных значений параметров аппроксимации. Соответствующие оценки могут быть получены линейной регрессией, часто включаемой в итерационные процедуры в качестве нулевого шага [48, 254]. Во-первых, неадекватность избранной модели легче выявляется при попытке линеаризации экспериментальной зависимости, чем из сопоставления нелинейных зависимостей. Более того, сам характер нелинейностей, проявляющихся, например, в координатах Скэтчарда или Хилла, может служить подсказкой при выборе модельных уравнений.

Более подробное сравнение преимуществ и недо-

¹ Параллельно предлагались и новые линейные графики [112, 179], не нашедшие, впрочем, широкого применения и не обладающие серьезными достоинствами по сравнению с графиками (5.2.10)—(5.2.13).

статков отдельных методов оценки констант уравнения (5.2.1) в лаконичной и исключительно удобной для восприятия форме проведено в работе [177].

5.3. ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ КИНЕТИЧЕСКИХ УРАВНЕНИЙ (2.1.4), (2.1.5)

Аппроксимация отдельной кинетической кривой связывания или развития биологической реакции уравнением вида (2.1.4)

$$y(t) = \frac{aCk}{k' + kC} [1 - e^{-(k' + kC)t}] \quad (5.3.1)$$

не позволяет получить отдельные оценки входящих в (5.3.1) констант; можно оценить лишь зависящую от C эффективную константу скорости

$$\beta = k' + kC \quad (5.3.2)$$

и также зависящий от C амплитудный множитель

$$A = \frac{QC_h}{\beta} = Z^{\text{равн}}, \quad A = \frac{mQC_h}{\beta} = \rho^{\text{max}}. \quad (5.3.3)$$

Однако оценка величины k' может быть получена независимо обработкой соответствующей кривой отмыва с использованием уравнения (2.1.5)

$$y(t) = y^0 e^{-k't}. \quad (5.3.4)$$

Иногда величины Q измеряются в независимых экспериментах; тогда обе константы скорости k , k' могут быть оценены для каждой кривой (5.3.1):

$$k = \frac{A\beta}{QC}, \quad (5.3.5)$$

$$k' = \beta(1 - A/Q). \quad (5.3.6)$$

Сопоставление величин k , k' , оцененных этими двумя способами, позволяет, в частности, судить о том, в какой мере модель (5.3.1) соответствует анализируемым кривым (см. параграф 5.4). Наконец, очень часто для оценки параметров A , β , k' используются линеаризованные формы уравнений (5.3.1), (5.3.4)

$$\ln \frac{Z^{\text{равн}}}{Z^{\text{равн}} - Z} = (kC + k')t, \quad (5.3.7)$$

$$\ln Z^0/Z = k't. \quad (5.3.8)$$

Примеры линеаризованных зависимостей этого вида представлены на рис. 5.5. Недостатком линеаризованной формы (5.3.7) является необходимость предварительной оценки равновесного уровня $Z_{равн}$, что не всегда возможно сделать с достаточной точностью. Этого можно избежать, применяя подходы, основанные на использовании функций пар экспериментальных точек $[y(t_i)$,

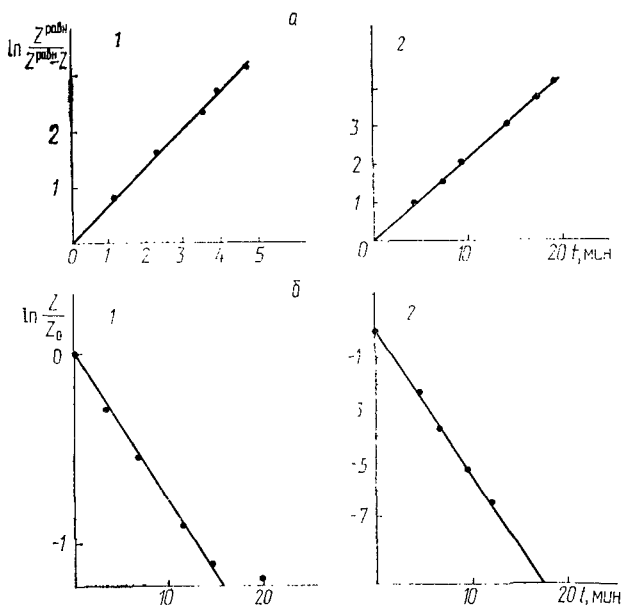


Рис. 5.5. Кинетические кривые ассоциации (а) и диссоциации (б) меченого ангиотензина в «спрямляющих» координатах: 1 — клетки гладких мышц матки крысы [211]; 2 — клетки надпочечников крысы [202]

$y(t_i + \tau)$] с постоянным фазовым сдвигом τ [18]. В первом случае (метод Гуггенгейма) линеаризуется разность

$$y(t) - y(t + \tau) = \frac{Qk}{\beta} (1 - e^{-\beta\tau}) e^{-\beta t}, \quad (5.3.9)$$

$$\begin{aligned} \ln [y(t) - y(t + \tau)] &= \ln \left(\frac{Qk}{\beta} \right) + \ln(1 - e^{-\beta\tau}) - \\ &- \beta t = a - \beta t. \end{aligned} \quad (5.3.10)$$

Вычислив наклон β , можно легко получить оценку

$$\frac{Qk}{\beta} = \frac{e^a}{1 - e^{-\beta\tau}}. \quad (5.3.11)$$

Другой способ (Кезди—Свинборна) основан на оценке параметров линейной зависимости между $y(t)$, $y(t+\tau)$:

$$y(t+\tau) = \frac{Qk}{\beta} [1 - e^{-\beta(t+\tau)}] = \frac{Qk}{\beta} (1 - e^{-\beta\tau}) + y(t)e^{-\beta\tau} = a + by(t),$$

откуда

$$\beta = -\ln b/a^\tau, \quad (5.3.12)$$

$$\frac{Qk}{\beta} = \frac{a}{1-b}. \quad (5.3.13)$$

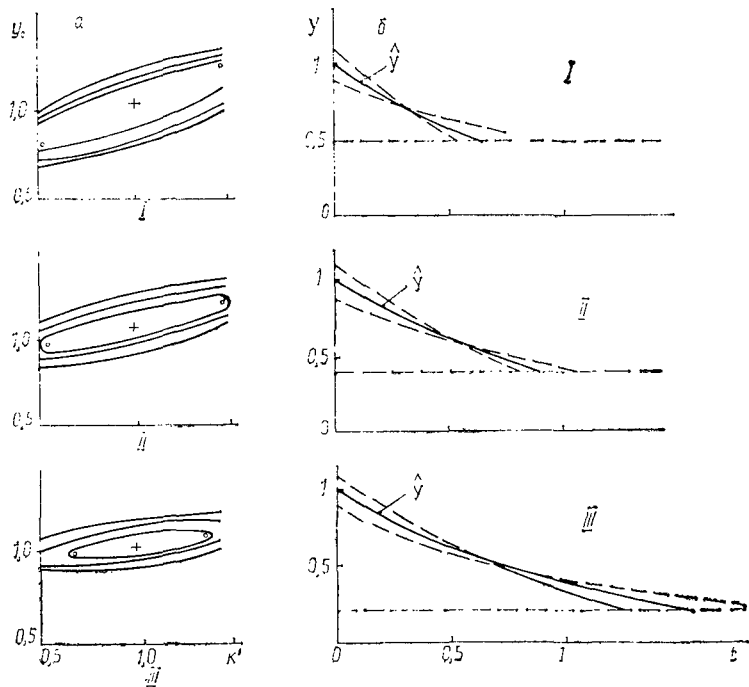


Рис. 5.6. Взаимное среднееквадратичное отклонение s^2/p пары зависимостей $\hat{y}(t)$ вида (5.3.4) с параметрами K , $y_0=1$ и K' , y_0' как функция K' , y_0' (а); сравнение кривых $\hat{y}(x)$ с параметрами $k'=y_0'=1$ и кривых, соответствующих крайним точкам внутри области $s^2/p=0,01$ (на соответствующих картах помечены кружками) (б): I — $\rho=0,7$; II — $0,9$; III — $1,6$

Очевидно, оба метода предъявляют определенные требования к расположению экспериментальных точек на кривой $y(t)$, например, через равные промежутки времени. Подставляя значение k' в (5.3.1) — (5.3.3), можно найти также величины k и Q . Оценить все три константы порознь можно также, аппроксимируя выражением (5.3.1) семейство кривых, соответствующих различным концентрациям лиганда; еще лучшие результаты дает совместная обработка двух семейств кривых — развития реакции и отмыва с использованием соответственно уравнений (5.3.1) и (5.3.4). Однако обработка семейств кривых методом наименьших квадратов часто сопряжена с дополнительными трудностями вследствие наличия многих локальных минимумов квадратичной невязки, особенно если модель (5.3.1), (5.3.4) не вполне точно описывает наблюдаемые на опыте зависимости. Следует также и в этом случае считаться с корреляцией оценок констант скоростей и амплитуд в (5.3.1), (5.3.4). На рис. 5.6 представлены среднеквадратичные невязки

$$s^2/p = \int_0^p [e^{-t} - Ae^{-\beta t}]^2 dt. \quad (5.3.14)$$

Можно убедиться (см. рис. 5.2), что существует корреляция оценок величин A , β , хотя и менее выраженная, чем в случае параметров уравнения (5.2.1).

Методы непараметрической статистики использовались и для оценки констант уравнения вида (5.3.4). Совершенно аналогично рассмотренному в предыдущем параграфе подходу для каждой пары экспериментальных точек $[\tilde{y}_i, t_i]$, $[\tilde{y}_j, t_j]$ решалась система уравнений

$$\beta = \frac{\ln y_j - \ln y_i}{t_j - t_i},$$

$$\ln y^0 = \frac{t_j \ln y_i - t_i \ln y_j}{t_j - t_i} \quad (5.3.15)$$

и находились медианы этих величин [189].

5.4. ПРИЗНАКИ ПРИЛОЖИМОСТИ СТАЦИОНАРНОЙ МОДЕЛИ (2.1.3)—(2.1.5). ЛИНЕЙНОСТЬ ЗАВИСИМОСТИ $\rho(Z)$

Как уже упоминалось, создание чисто формальных процедур, которые относили бы полученные в эксперименте зависимости $Z(C, t)$, $\rho(C, t)$ к одной из предложенных моделей,— задача достаточно сложная. На практике чаще всего потребность в дискриминации моделей возникает после того, когда становится ясно, что найденные на опыте зависимости заметным образом уклоняются от простого механизма, определяемого соотношениями (2.1.3)—(2.1.5), и появляется необходимость объяснить причины такого уклонения. Мы будем стараться строить материал настоящего параграфа соответствующим образом.

Именно для целей дискриминации моделей чрезвычайно полезными оказываются кинетические кривые; стационарные зависимости $Z(C)$, $\rho(C)$ менее информативны, а зачастую, как отмечалось выше, в различных моделях описываются уравнениями одного и того же вида. Особенно велика неоднозначность, связанная с анализом зависимостей $\rho(C)$.

«Многие пытались объяснить форму кривой «доза—эффект»,— писал в своем обзоре Во [244].— Однако, поскольку характер функции $\rho(Z)$ в уравнении (3.1.11), вообще говоря, неизвестен, форме кривой «доза—эффект» нельзя достоверно приписать какой-либо фундаментальный смысл. Объяснение формы кривой «доза—эффект», которое я нахожу наиболее удовлетворительным, дал мне в несколько иронической форме П. Б. Дьюс: если вы не дадите нисколько эффектора, вы не получите никакой реакции, если вы дадите достаточно много эффектора, вы достигнете максимальной реакции (реакция ткани не может быть бесконечной). Проведите линию между этими двумя точками. Скруглите угол (соображения эстетики). Наконец, используйте логарифмическую шкалу (вспомним закон Вебера — Фехнера или природу химического потенциала). Вы получите сигмоидную кривую «доза—эффект». Как видим, получить сигмоидную кривую очень легко. Не придавайте этому слишком большого значения до тех пор, пока у вас есть данные лишь о форме».

Возможно, это не совсем так; в некоторых случаях на основании формы кривых $\rho(C)$ все же можно сде-

вать заключение о каких-то особенностях механизма биологической реакции; тем не менее надо признать, что один лишь факт уклонения кривой $\rho(C)$ от гиперболы (2.1.3) нередко служит предлогом для появления на свет очередного варианта молекулярных основ действия какого-то гормона или медиатора — в лучших традициях «фармакологического романтизма». Картина обычно получается феерически красочной, насыщенной многими подробностями, которые никак не могут быть получены чистой дедукцией из формы кривой $\rho(C)$.

Начнем рассмотрение со случая, когда экспериментальная зависимость $y(C)$ хорошо описывается уравнением (5.2.1) и сомневаться в его приложимости как будто бы нет оснований; в координатах Скэтчарда, Эди—Хофсти, Лайнуивера — Бэрка ей соответствуют прямые линии. Возникает желание предположить, что мы имеем дело с простейшим механизмом, рассмотренным в параграфе 5.2, если это кривая связывания лиганда $Z(C)$, а если анализируемая кривая описывает концентрационную зависимость некоторой биологической реакции, то дополнить это предположением о линейности зависимости $\rho(Z)$. На самом деле это, очевидно, не так. Форму прямоугольной гиперболы имеют, например, зависимости (2.5.2) или (3.2.3); форма зависимости $Z(C)$ в ряде других моделей при определенных значениях параметров трудно отличима от (5.2.1).

Тем более необоснованно из факта соответствия опытной кривой форме (5.2.1) делать заключение о том, что зависимость между биологической реакцией и количеством занятых рецепторов имеет линейную форму, хотя подобного рода выводы можно встретить в литературе [208].

Как отмечалось в параграфе 3.2, в том случае, если зависимость $\rho(Z)$ также является прямоугольной гиперболой, вид функции $\rho(C)$ в точности сохранит форму (5.2.1), хотя содержательный смысл входящих в это уравнение констант окажется совершенно иным. Более того, форму $\rho(C)$ очень трудно отличить от гиперболической и в тех случаях, когда зависимость $\rho(Z)$ имеет вид какой-нибудь другой выпуклой функции. Так, оказалось, что, представляя $\beta(Z)$ в форме одной из следующих функций:

$$\rho(Z) = A(1 - e^{-\nu Z}), \quad (5.4.1)$$

Аппроксимация соотношений (5.4.1)—(5.4.3)
гиперболами (5.2.1) [6]

C , моль	(5.4.1)	(5.2.1)	(5.4.2)	(5.2.1)	(5.4.3)	(5.2.1)
$5,00 \cdot 10^{-10}$	0,074	0,076	0,067	0,066	0,218	0,141
$2,00 \cdot 10^{-9}$	0,245	0,248	0,222	0,220	0,408	0,393
$8,00 \cdot 10^{-9}$	0,574	0,572	0,530	0,530	0,666	0,710
$3,20 \cdot 10^{-8}$	0,853	0,849	0,817	0,818	0,872	0,888
$1,28 \cdot 10^{-7}$	0,967	0,966	0,946	0,946	0,963	0,968
$5,12 \cdot 10^{-7}$	1,000	1,001	0,986	0,985	0,990	0,964

$$\rho(Z) = A \sqrt{Z}, \quad (5.4.2)$$

$$\rho(Z) = A \ln(1 + \gamma Z) \quad (5.4.3)$$

и полагая, что $Z(C)$ имеет вид (5.2.1), можно получить очень хорошую аппроксимацию зависимостей $\rho(C)$ уравнением (5.2.1); в случае первых двух уравнений различия обнаруживаются лишь в третьем знаке (табл. 5.3).

Таким образом, даже если нет сомнений в том, что кривые $y(C)$ на самом деле имеют вид (5.2.1), сделать сколько-нибудь определенные суждения о деталях механизмов, лежащих в основе соответствующих процессов, нельзя.

Существенно расширяет возможности для такого рода суждений привлечение к анализу данных о кинетике связывания лиганда или развития биологической реакции. Но даже и в этом случае на основании того факта, что уравнение вида

$$y(t) = A(1 - e^{-\beta t}) \quad (5.4.4)$$

хорошо описывает отдельную экспериментальную кривую, еще нельзя утверждать, что речь идет именно о модели (2.1.3)—(2.1.5). Однако рассмотрение семейства кривых $y(C_i, t)$, соответствующих разным концентрациям эффектора, уже дает возможность сделать заключение о приемлемости такой гипотезы. В самом деле, если аппроксимация пары кривых $Z(C_1, t)$, $Z(C_2, t)$ уравнением вида (5.4.4) дала оценки констант A_1 , A_2 , β_1 , β_2 и в рассматриваемом случае действительно имеет место механизм типа (2.1.2), справедливо

Константы диссоциации лиганд-рецепторных комплексов некоторых пептидных биорегуляторов, полученные на основании стационарных зависимостей (K) и рассчитанные на основании полученных кинетических констант ($K^* = k'/k$)

Лиганд	Препарат	$K \cdot 10^{10}$, моль	$K^* \cdot 10^{10}$, моль	Источ- ник
^{125}I — [D — Ala ² , D — Leu ⁵]- энкефалин	Клетки нейробластомы	7,0	12,0	[77]
3H -брадикинин	Плазматические мембраны клеток миоэпителия крысы	27,0	66,0	[26]
^{125}I -ангиотензин	Клетки клубочковой зоны надпочечников собаки	0,7	2,6	[104]
^{125}I -[Sar ¹]-ангиотензин	То же	3,0	21,0	[104]
3H -ангиотензин	Микросомы коры надпочечников крысы	52,0	33,0	[202]
3H -дез-[Asp ¹]-ангиотензин	То же	1,5	1,0	[102]
3H -энкефалин	Нервная ткань моллюска	12,0	10,0	[162]
3H -тиролиберин	Клетки гипоталамуса овцы	200—400	230—700	[74]

$$\beta_1 = k'_1 + k_1 C_1, \quad \beta_2 = k'_1 + k_1 C_2,$$

$$A_1 = QC_1 k_1 / \beta_1, \quad A_2 = QC_2 k_1 / \beta_2, \quad (5.4.5)$$

следовательно, оценки констант должны удовлетворять условию

$$\frac{A_1 \beta_1}{A_2 \beta_2} = \frac{C_1}{C_2}. \quad (5.4.6)$$

Другая возможность проверки гипотезы о реализации механизма (2.1.2) связана со сравнением полученных различными способами констант уравнений (2.1.3)—(2.1.5). Например, величины констант диссоциации, полученные на основании обработки равновесных зависимостей $Z(C)$, можно сопоставить со значениями, полу-

Константы скорости распада комплексов ангиотензина и дез- [Asp¹]-ангиотензина с рецепторами клеток коры надпочечников

Лиганд	Препарат	$k' \cdot 10^{-3}, \text{с}^{-1}$, оцененное по кинети- ческим кривым		Источник
		связыва- ние	отмыв	
¹²⁵ I-ангиотензин	Клетки клубочко- вой зоны коры над- почечников собаки	0,8	0,9	[104]
³ H-ангиотензин	Микросомы коры надпочечников крысы	2,2	2,8	[202]
³ H-дез-[Asp ¹]- ангиотензин	То же	0,8	0,4	[202]

ченными через оценки кинетических констант в виде

$$K = k'_1 / k_1.$$

Пример подобного рода сопоставления приведен в табл. 5.4. Как видно, нередко двух-трехкратные различия между обеими оценками, а в случае ¹²⁵I—[Sar¹]-ангиотензина — даже семикратное. Однако с учетом масштаба погрешностей, характерных для экспериментов по специфическому связыванию меченых лигандов, можно полагать, что лишь в этом последнем случае имеется заслуживающее внимания указание на возможное отклонение механизма лиганд-рецепторного взаимодействия от схемы (2.1.2).

Оценки констант k' могут также быть получены двумя способами: из кривых отмыва с помощью уравнения (5.3.4) и для пары или семейства кривых вида (5.3.1), соответствующих различным концентрациям лиганда C_i . Сопоставление таких оценок для некоторых производных ангиотензина приведено в табл. 5.5; и в этом случае можно, по-видимому, говорить об их удовлетворительном взаимном соответствии.

Наконец, оценивая константы k, k' на основании пары кривых связывание—отмыв, соответствующих различным концентрациям лиганда C_i , можно сравнить получаемые таким образом пары значений между собой (табл. 5.6). В приведенном примере оценки константы

скорости прямой реакции k варьируют в тех же пределах (различие в 2—3 раза), не обнаруживая какой-либо выраженной тенденции изменения с ростом концентрации лиганда C . Напротив, константы скорости обратной реакции k' такую тенденцию обнаруживают (в случае ^{125}I -ангиотензина) довольно четко — здесь наблюдается их рост с увеличением C . Возможное объяснение такой зависимости приведено в конце этого параграфа.

Аналогичным образом могут обрабатываться не только кривые связывания $Z(C, t)$, но и кривые развития биологической реакции $\rho(Z, t)$, однако в том лишь случае, если доказана линейная зависимость между ρ и Z .

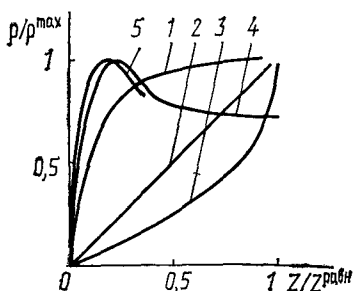
Вообще говоря, эта зависимость всегда приблизительно линейна при малых Z (и соответственно малых C); вопрос исключительно в том, какова протяженность линейного участка (верхняя граница «малости» примененной концентрации). Экспериментальное исследование формы функции $\rho(Z)$ показало, что она может быть весьма разнообразной (рис. 5.7). Например, секреция цГМФ клетками гипофиза крысы под действием люлиберина зависит линейно от Z на всем протяжении вплоть до максимального значения Z (отметим, впрочем, что это — единственный известный нам пример такого рода); наряду с этим наблюдаются кривые выпуклой (секреция лютеинизирующего гормона под действием люлиберина) или сигмоидной (миотропная реакция рога матки крысы на брадикинин) формы. Кривые, характеризующие зависимость от Z миотропной реакции

Таблица 5.6

Константы скоростей прямой и обратной реакций образования комплекса ангиотензина и $[\text{Sar}^1]$ -ангиотензина с рецепторами клеток клубочковой зоны надпочечников собаки [104]

Лиганд	Концентрация $C \cdot 10^{11}$, моль	$k \cdot 10^3$, моль $^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	$k' \cdot 10^{-4}$, с $^{-1}$
^{125}I -ангиотензин	4,0	4,0	3,7
	8,0	5,5	5,7
	34,6	1,7	9,3
	40,0	3,7	10,1
^{125}I - $[\text{Sar}^1]$ -ангиотензин	6,8	21,7	8,7
	10,7	10,0	5,2
	13,0	31,7	—

Рис. 5.7. Зависимость биологической реакции, развивающейся под действием некоторых пептидных биорегуляторов, от количества комплексов агонист — рецептор [25]: 1 — секреция лютеинизирующего гормона культурой клеток гипофиза крысы под действием люлиберина; 2 — продукция цГМФ клетками гипофиза крысы под действием люлиберина; 3 — миотропная реакция рога матки крысы на брадикинин; 4 — продукция альдостерона клетками коры надпочечников собаки под действием ангиотензина; 5 — миотропная реакция матки крысы на ангиотензин



рога матки крысы или секреции альдостерона клетками коры надпочечников собаки (в обоих случаях под действием ангиотензина), носят переходный характер. Протяженность приближенно линейного участка начальной части у всех этих кривых различается довольно заметно. Чаще других, по-видимому, имеет место выпуклая форма зависимости $\rho(Z)$, выходящая на плато при значениях Z , далеких от полного насыщения. В тех случаях, когда удается выявить достоверные различия между величинами EC_{50} и K (или ρD_2 и $\rho K = \lg K$), как правило, вторая величина оказывается больше [75, 126, 128, 157, 169, 178], что, как упоминалось (см. параграф 3.2), является признаком выпуклой формы $\rho(Z)$.

В качестве критерия линейности зависимости $\rho(Z)$ можно использовать соотношение (5.4.6).

Отметим, что полученные в результате обработки отдельных кривых семейства $\rho(C_i, t)$ оценки констант A_i, β_i уравнения (5.4.4) могут быть использованы для оценки формы зависимости $\rho(Z)$ при условии, очевидно, что процесс связывания лиганда подчиняется уравнению (2.1.3). Именно, если функция $\rho(Z)$ на исследуемом участке является выпуклой, справедливо неравенство

$$\rho(\gamma Z) / \rho(Z) < \gamma; \quad (5.4.7)$$

в случае, если форма функции вогнутая:

$$\rho(\gamma Z) / \rho(Z) > \gamma. \quad (5.4.8)$$

Нетрудно убедиться, что при $C_1 > C_2$ отсюда следует

$$\frac{A_1 \beta_1}{A_2 \beta_2} < \frac{C_1}{C_2}$$

как признак выпуклости функции $\rho(Z)$ и

$$\frac{A_1\beta_1}{A_2\beta_2} > \frac{C_1}{C_2}$$

как признак вогнутости $\rho(Z)$.

Пример использования подобного подхода содержится в работе [6], в которой рассматривалось развитие сократительной реакции гладкой мускулатуры на ангиотензин. Вычисление отношения

$$\varepsilon = \frac{A_1\beta_1}{A_2\beta_2} \quad (5.4.9)$$

для разных пар кривых показало, что в случае развития под действием ангиотензина сократительной реакции ободочной кишки крысы протяженность линейного участка $\rho(Z)$ крайне незначительна. Так, значение ε , соответствующее паре примененных концентраций $5 \cdot 10^{-11}$ и $5 \cdot 10^{-10}$ моль, оказалось равным 1,8 вместо 10, т. е. уже в области концентраций лиганда, существенно меньших EC_{50} (10^{-8} — 10^{-9} моль), зависимость $\rho(Z)$ отклоняется от линейной, проявляя выраженные признаки выпуклости. В интервале концентраций $(1-5) \cdot 10^{-11}$ моль соотношение (5.4.4) выполнялось достаточно хорошо, благодаря чему оказалось возможным получение оценок констант k , k' , K . Интересно, что в случае сократительной реакции аорты кролика на ангиотензин линейность $\rho(Z)$ сохраняется вплоть до концентраций агониста $4,5 \cdot 10^{-9}$ моль (табл. 5.7, рис. 5.8).

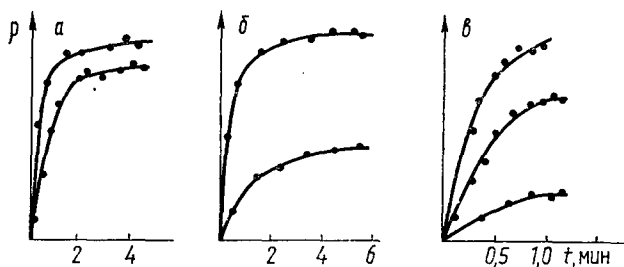


Рис. 5.8. Развитие сократительной реакции гладкой мускулатуры на низкие концентрации ангиотензина [6]: а — восходящая ободочная кишка крысы ($C=5 \cdot 10^{-11}$ и $5 \cdot 10^{-10}$ моль); б — восходящая ободочная кишка крысы ($C=10^{-11}$ и $5 \cdot 10^{-11}$ моль); в — аорта кролика ($C=4,5 \cdot 10^{-10}$, $2,25 \cdot 10^{-9}$ моль)

Таблица 5.7

Константы k , k' и K_d , определенные с помощью уравнения (5.4.4) [6]

Препарат	Концентрация ангиотензина		ν	$k \cdot 10^3$, МОЛЬ ⁻¹ ·С ⁻¹	k' , с ⁻¹	pK_d ^{***)}
	C_1	C_2				
Аорта кролика*)	$2,25 \cdot 10^{-9}$	$0,45 \cdot 10^{-9}$	4,7	0,56	0,14	8,6
	$4,5 \cdot 10^{-9}$	$0,45 \cdot 10^{-9}$	8,7	0,61	0,14	8,6
Восходящая ободочная кишка крысы**)	$5 \cdot 10^{-11}$	$1 \cdot 10^{-11}$	$5,4 \pm 1,1$	$7,50 \pm 1,53$	$0,013 \pm 0,002$	$10,7 \pm 0,7$

*) Рассчитано на основании кинетических кривых работы [218].

**) Приводятся средние значения и среднеквадратические ошибки четырех независимых измерений.

***) $pK_d = -\lg K_d$.

Рассмотренные способы проверки приложимости модели (2.1.1) и гипотезы о линейности $\rho(Z)$ базируются только на использовании опытных концентрационных и кинетических зависимостей $Z(C_i, t)$, $\rho(C_i, t)$; разумеется, возможности подобного рода могут быть существенно расширены за счет привлечения других экспериментальных подходов.

Сопоставления оценок констант k , k' , K , полученных различными способами, могут оказаться полезными не только в тех случаях, когда использование обсуждаемых модельных представлений правомочно, но и при наличии некоторых отклонений от них. Например, упоминаясь тенденция к росту с увеличением концентрации лиганда оценок констант скорости диссоциации k' ангиотензина с препаратами клеток клубочковой зоны надпочечников собаки (см. табл. 5.5) может указывать на гетерогенность связывающих центров. С увеличением C доля лиганда, связанная центрами с низким сродством (и соответственно высокими значениями константы k'), возрастает; увеличивается также оценка эффективной константы скорости k' . Именно эффекты, обусловленные гетерогенностью центров связывания, должны в первую очередь приниматься во внимание при несоответствии рассматриваемого семейства кривых требованиям модели (2.1.2).

5.5. СРАВНИМЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СВОБОДНОГО И СВЯЗАННОГО ЛИГАНДА

Во многих экспериментах количество лиганда, связанного с рецепторами, оказывается сравнимым с его общим количеством в инкубационной среде; в этом случае, как уже упоминалось, вместо уравнений (2.1.2)–(2.1.4) следует использовать (2.1.6)–(2.1.8). Перепишем (2.1.7) в виде

$$\begin{aligned} Z^{\text{равн}}(C) &= \frac{1}{2} [Q + C + K - \sqrt{(Q + C + K)^2 - 4QC}] = \\ &= \frac{Q + C + K}{2} \left[1 - \sqrt{1 - \frac{4QC}{(Q + C + K)^2}} \right]. \end{aligned} \quad (5.5.1)$$

При

$$\frac{4QC}{(Q + C + K)^2} \ll 1 \quad (5.5.2)$$

квадратный корень в (5.5.1) можно разложить в ряд

$$Z^{\text{равн}}(C) = \frac{Q + C + K}{2} \left\{ 1 - \left[1 - \frac{1}{2} \frac{4QC}{(Q + C + K)^2} + \frac{1}{4} \left[\frac{4QC}{(Q + C + K)^2} \right]^2 + \dots \right] \right\}. \quad (5.5.3)$$

Ограничиваясь первым членом разложения, имеем

$$Z^{\text{равн}}(C) = \frac{QC}{Q + C + K}. \quad (5.5.4)$$

Очевидно, что при очень больших и очень малых концентрациях лиганда разложение (5.5.4) справедливо всегда независимо от значений Q и K ; если

$$Q \ll K, \quad (5.5.5)$$

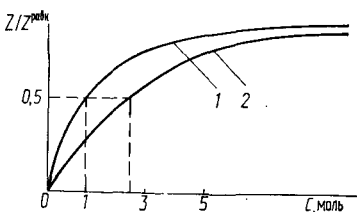
такое разложение справедливо при всех значениях концентраций, а (5.5.1) переходит в (2.1.3). Именно условие (5.5.5) является критерием применимости уравнения (2.1.3).

Если Q сравнимо с константой диссоциации K или превосходит ее, форма $Z(C)$, $Z(C, t)$ существенно отличается от (2.1.3), (2.1.4). Рассмотрим подробнее отличие равновесной зависимости $Z(C)$ от прямоугольной гиперболы. Начальный и конечный участок такой кривой совпадает с формой (5.5.4), имеющей кажущуюся константу диссоциации

$$\tilde{K} = K + Q. \quad (5.5.6)$$

Кривая, рассчитанная согласно (5.5.1), достигает уровня полунасыщения $Q/2$ при более низких концентрациях лиганда (рис. 5.9). Будучи представленной в координа-

Рис. 5.9. Стандартная модель (5.5.1), концентрации свободного и связанного лиганда сравнимы. Концентрационная зависимость в равновесии $Q=3$, $K=1$ (1) в сопоставлении с кривой, определяемой уравнением (2.1.3) с теми же параметрами (2)



тах Скэтчарда, зависимость (5.5.1) оказывается линейной:

$$k(Q - Z)(C - Z) - k'Z = 0,$$

$$\frac{Z}{C - Z} = \frac{Q - Z}{K}. \quad (5.5.7)$$

В этом, в частности, заключается преимущество координат Скэтчарда перед другими вариантами линеаризации уравнения (5.5.1). При

обработке результатов экспериментов, в которых $C \gg Z$, обычно по ординате откладывается величина Z/C ; если и зависимость (5.5.1) представить

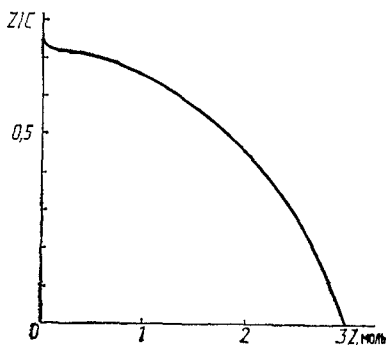


Рис. 5.10. Зависимость (5.5.1), представленная в координатах Скэтчарда

в таких координатах (что иногда делается по инерции), она будет существенно отклоняться от прямой, имея выпуклую форму (рис. 5.10). Такие кривые неоднократно наблюдались в эксперименте, возможно, именно в связи с использованием для расчета неверной концентрации свободного лиганда [226]. Для оценки константы диссоциации в этих случаях принято использовать наиболее крутой участок; такая оценка, как следует из (5.5.7), является завышенной. В связи с возможными искажениями линейности зависимости

$\frac{Z}{C - Z}$ (Z) необходимо предостеречь от еще одного обыч-

ного заблуждения: увеличение с ростом Z отрицательного наклона кривой в координатах Скэтчарда вовсе не является однозначным признаком «положительной кооперативности» процесса связывания лиганда; таким признаком служит наличие максимума на этой кривой (см. параграф 5.7). Располагая лишь ее центральным участком, некоторые авторы изображают такой максимум в результате глазомерной экстраполяции.

Некоторым отличием от (2.1.4) обладает кинетическая кривая (2.1.8) (рис. 5.11). В ранее рассмотренных «спрямленных» координатах $\ln \frac{Z^{\text{равн}}}{Z^{\text{равн}} - Z}$ от t форма соответствующих зависимостей уклоняется от прямой.

Спрявление уравнения (2.1.8) возможно в том случае, если из независимого эксперимента известны величины Q

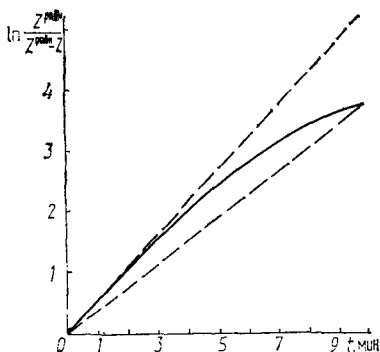


Рис. 5.11. Стандартная модель (2.1.8), концентрации свободного и связанного лиганда сравнимы. Кинетическая кривая ассоциации, представленная в «спрямляющих» координатах

$$\ln \frac{Z^{\text{равн}}}{Z^{\text{равн}} - Z} - t$$

или K . Поскольку в равновесии

$$k(C - Z^{\text{равн}})(Q - Z^{\text{равн}}) - k'Z^{\text{равн}} = 0, \quad (5.5.8)$$

то Q можно выразить через k , k' (или константу диссоциации K)

$$Q = \frac{k'Z^{\text{равн}}}{k(C - Z^{\text{равн}})} + Z^{\text{равн}} = \frac{Z^{\text{равн}}(K + C - Z^{\text{равн}})}{C - Z^{\text{равн}}}, \quad (5.5.9)$$

а k' — через k , Q

$$k' = k \frac{(C - Z^{\text{равн}})(C - Z^{\text{равн}})}{Z^{\text{равн}}}. \quad (5.5.10)$$

Соответствующие линеаризованные формы имеют вид

$$\begin{aligned} \ln \frac{Z^{\text{равн}} \left[C - \frac{Z(K + C - Z^{\text{равн}})}{C - Z^{\text{равн}}} \right]}{C(Z^{\text{равн}} - Z)} &= \\ &= kt \left[\frac{C(K + C - Z^{\text{равн}})}{C - Z^{\text{равн}}} - Z^{\text{равн}} \right] \end{aligned} \quad (5.5.11)$$

или [251]

$$\ln \frac{Z^{\text{равн}} \left[C - Z \left(\frac{Z^{\text{равн}}}{Q} \right) \right]}{C(Z^{\text{равн}} - Z)} = kt \left(\frac{CQ}{Z^{\text{равн}}} - Z^{\text{равн}} \right). \quad (5.5.12)$$

Более грубым приближением является линеаризация лишь начальной части кривой, полученная в пренебрежении членом $k'Z$ в (2.1.6); его использование оправдано лишь при высоких концентрациях лиганда. Здесь тоже необходима независимая оценка величины Q :

$$\ln \frac{C(Q - Z)}{Q(C - Z)} = kt(Q - C). \quad (5.5.13)$$

С ростом t по мере приближения к равновесию зависимость (5.5.13) все более отклоняется от (5.5.11) (рис. 5.12). Недостатки подобного приема обсуждались в [28].

Предложена также зависимость, использующая обе оценки Q, K [23]:

$$\ln \frac{Z' - Z}{Z^{\text{равн}} - Z} = kt(Z' - Z^{\text{равн}}) + \ln \frac{Z'}{Z^{\text{равн}}}, \quad (5.5.14)$$

где $Z' = Q + C + K - Z^{\text{равн}}$.

Отметим еще, что, располагая значениями обеих ве-

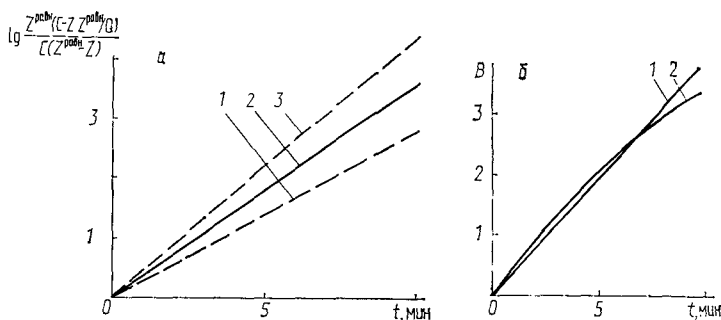


Рис. 5.12. Возможные погрешности оценки константы K с помощью линеаризованных форм уравнения (5.5.11): *а* — линеаризация вида (5.5.11), источник ошибки — неточная оценка Q ($1 - \Delta Q = -0,2 Q$; $2 - 0$; $3 - 0,2 Q$); *б* — сопоставление зависимостей: $1 - (5.5.11)$; $2 - (5.5.13)$ ($Q=K=C=1$; $B -$ левая часть уравнений)

личин Q , K , можно получить линеаризованную зависимость

$$\ln \frac{Q[C(C+K) - ZC]}{QC - Z(C+K)} = kt \left[\frac{(K+C)^2 - QC}{K+C} \right], \quad (5.5.15)$$

в которой не используется $Z^{\text{равн}}$ (оцениваемая, как упоминалось, зачастую весьма неточно).

5.6. ПРИЗНАКИ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ЦЕНТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ

Во всех экспериментах по связыванию меченого лиганда препаратами, содержащими специфические клеточные рецепторы, происходит также сорбция лиганда на других центрах связывания. Одним из критериев существования специфических рецепторов считается как раз наличие центров связывания с высоким сродством ($K \sim 10^{-7}$ моль и более) к данному лиганду. Именно это обстоятельство — наличие одного типа центров связывания, имеющих сродство к лиганду на несколько порядков большее, чем остальные, — и позволяет в конечном счете получить оценки констант равновесия; если другие центры связывания характеризуются сравнимым сродством, отдельные оценки часто невозможны.

Распространенный прием выявления гетерогенности центров связывания — представление кривых $Z(C)$ в координатах Скэтчарда [210]. Почти во всех работах по изучению связывания меченого лиганда препаратами органов-мишеней можно увидеть характерный график с изломом, который всегда трактуется как наличие «двух центров связывания: с высоким и низким сродством», причем зачастую вычисляются константы равновесия не только комплексов лиганда с центром первого типа (специфическими рецепторами, по предположению), но и с «центром связывания с низким сродством»¹.

Последнее определено лишено смысла, так как излом кривой в координатах Скэтчарда вовсе не свидетельствует о том, что имеются именно *два* типа центров связывания. На рис. 5.13 приведены «скэтчардовские» кривые, соответствующие случаям двух, трех и четырех типов центров связывания; все они, очевидно, имеют вогнутую форму. Если крутой, начальный участок кри-

¹ См. по этому поводу также с. 128.

вой может быть отнесен к центрам связывания с наиболее высоким сродством (упоминавшееся различие величин K в один-два порядка), то обнаружить нелинейность пологого участка (признак нескольких центров связывания с низким сродством) практически невозможно: величины Z/C имеют порядок соответствующих им дисперсий.

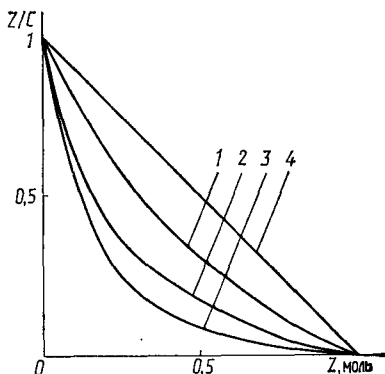


Рис. 5.13. Скэтчардовские графики связывания лиганда несколькими различными центрами: 1 — два центра; 2 — три; 3 — четыре; 4 — один центр. Концентрации центров связывания всех типов равны, константы диссоциации различаются на порядок

Иллюстрацией может служить предельный случай, рассмотренный в параграфе 2.2. Именно если имеется много центров связывания с равными величинами Q и константами диссоциации, равномерно распределенными в интервале $K_1—K_2$, зависимость $Z(C)$ описывается уравнением:

$$Z(C) = \frac{QC}{K_2 - K_1} \ln \frac{C + K_2}{C + K_1}. \quad (5.6.1)$$

Центральная часть такой зависимости, будучи представленной в скэтчардовских координатах, в некоторых случаях мало отличается от прямой.

Таким образом, излом на кривой в координатах Скэтчарда свидетельствует лишь о том, что среди различных типов центров связывания лиганда имеется по крайней мере один, резко выделяющийся (в меньшую сторону) величиной K . Сколько всего таких типов центров связывания существует, оценить обычно нельзя, и тем более не имеют никакого физического смысла оценки констант диссоциации комплексов лиганда с «центрами связывания с низким сродством».

В экспериментах по определению «специфического связывания» радиолиганда с помощью вытеснения его в

присутствии избытка немеченого лиганда удается в значительной мере избавиться от эффектов связывания «центрами с низким сродством» [69, 76], однако, как отмечалось в [116, 182], при этом результат в значительной мере зависит от правильного выбора концентрации немеченого лиганда; при применении слишком высоких концентраций вытесняется часть «неспецифически

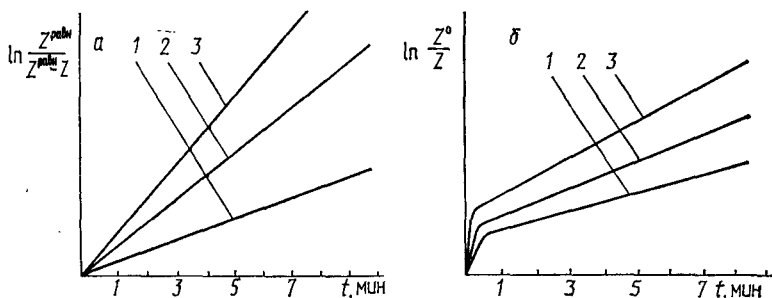


Рис. 5.14. Кинетика ассоциации (а) и диссоциации (б) лиганда с несколькими типами центров связывания, представленная в «спрямляющих» координатах: 1 — два центра; 2 — три; 3 — четыре

связанного» лиганда и скэтчардовский график по-прежнему имеет вогнутую форму. Подобный эффект дают и некоторые другие погрешности экспериментальной процедуры [91, 252].

Привлечение к анализу данных о кинетике связывания и диссоциации лиганда в этом случае не позволяет внести дополнительную ясность. Проблема оценки на основании экспериментальных кривых параметров уравнения, представляющего собой сумму двух экспонент, рассматривалась применительно к задачам биологической кинетики в работе [194]; такие оценки практически возможны лишь при очень большом различии констант скоростей β_1 и β_2 . На линеаризованных графиках

$$\ln \frac{Z^{\text{равн}}}{Z^{\text{равн}} - Z} - t$$

соответствующие зависимости очень близки к прямой, экстраполирующейся в начало координат (рис. 5.14). Кривые диссоциации, представленные в координатах

$$\ln Z^0/Z - t,$$

при значительных различиях констант k_1' и k_2'' не экстраполируются в начало координат, сохраняя линейную форму на большом протяжении; однако и в этом случае невозможно сделать заключение о количестве различных типов центров связывания лиганда.

Отличить механизм рассматриваемого типа от других моделей, для которых характерны полиномы связывания $P_n(C)$, имеющие лишь вещественные корни (вогнутый график Скэтчарда), можно в принципе только на основании формы зависимости кинетических констант β_i от концентрации лиганда; эта зависимость должна быть линейной в случае модели нескольких центров связывания. Однако на практике установить форму зависимости $\beta_i(C)$ оказывается очень трудно.

В случае любой линейной модели кинетические зависимости имеют вид

$$Z(C, t) = \sum_{i=1}^m A_i(C) e^{-\beta_i(C)t} + D(C). \quad (5.6.2)$$

В модели гетерогенных центров связывания все $A_i > 0$, так же как и в моделях, предполагающих эффекты отрицательной кооперативности, и некоторых других. Коэффициенты $\beta_i(C)$ во всех случаях монотонно возрастают с увеличением C . Можно ли осуществить сколь-нибудь надежную дискриминацию в этой группе моделей, в частности отличить модель гетерогенных центров от остальных?

Заместим прежде всего, что обычно число различных типов центров связывания m неизвестно заранее; строго говоря, его следует определить с помощью обработки семейств кинетических кривых, соответствующих разным концентрациям лиганда. По многим причинам (большое количество подлежащих определению констант, неопределенность критериев выбора критического значения m и т. п.) получить корректную оценку величины m в большинстве случаев не удастся.

Более того, полагая $m=3-4$ и более, почти всегда можно аппроксимировать с разумной точностью выражением вида

$$Z(C, t) = \sum_i \frac{Q_i C}{K_i + C} \{1 - \exp[-(k_i' + k_i C) t]\}$$

семейства кривых, соответствующих другим моделям обсуждаемого класса. С другой стороны, если оценочное

значение m занижено (количество различных типов центров связывания на самом деле больше, чем предполагается аппроксимирующей зависимостью (5.6.2)), оценки β_i , получаемые на основании обработки семейств кинетических кривых, соответствующих различным значениям C , обнаруживают нелинейную зависимость от концентрации.

Таким образом, только на основании данных о кинетике и равновесии связывания лигандов практически нельзя отличить систему с гетерогенными центрами связывания от системы, характеризующейся отрицательной кооперативностью.

5.7. КООПЕРАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ

Термин «кооперативность» используется в фармакологической и энзимологической литературе несколько произвольно. Именно всякий раз, когда кривые $Z(C)$ или $\rho(C)$ отклоняются от формы (2.1.3), это отклонение можно трактовать как существование некоторой зависимости константы диссоциации K от C . Является общепринятым [255] говорить о «положительной кооперативности», если K уменьшается с ростом C , «отрицательной» — если увеличивается. Физические механизмы, лежащие в основе той или иной формы зависимости кажущегося значения K от C , могут быть самыми различными и вовсе не обязательно иметь что-либо общее с кооперативными эффектами в строгом значении этого термина (так, как он понимается, например, в статистической механике [3]). Ясно, далее, что в общем случае следует говорить о степени выраженности той или иной формы понимаемой таким образом кооперативности в каждой точке кривой $Z(C)$, причем возможны случаи, когда на различных участках кривой «кооперативность» меняет знак.

Часто в качестве меры кооперативности используют «коэффициент Хилла» — параметр n из уравнения (2.4.31). В координатах Хилла

$$\ln \frac{Z^{\text{равн}}}{Z^{\text{равн}} - Z} - \ln C$$

зависимость (2.4.27) имеет форму прямой с наклоном n^*). Если $n > 1$, имеет место «положительная коопера-

*) Получение численных оценок параметров уравнения Хилла обсуждается в работе [48].

тивность», при $n < 1$ — «отрицательная». Для зависимости произвольной формы значение в каждой точке кривой, вообще говоря, различно и равно

$$n = \frac{d}{d \ln C} \ln \left(\frac{Z}{Z^{\text{равн}} - Z} \right) = \frac{Z^{\text{равн}} C}{Z (Z^{\text{равн}} - Z)} \frac{dZ}{dC}, \quad (5.7.1)$$

так что параметр n уже не может использоваться в качестве характеристики вида и меры кооперативности $Z(C)$. Для этой цели более пригоден эмпирический индекс Такеты—Погелла R_x [224], представляющий собой отношение концентраций лиганда, которым соответствуют значения $Z = 0,9Z^{\text{равн}}$ и $Z = 0,1Z^{\text{равн}}$. Для изотермы Лэнгмюра $R_x = 81$; в случае уравнения Хилла его связь с коэффициентом n определяется соотношением

$$\ln R_x = 4,39n. \quad (5.7.2)$$

Признаки формального сходства между кривыми $Z(C)$, соответствующими моделям с различными центрами связывания и моделям с «отрицательной кооперативностью» в более узком смысле, обсуждались выше; рассмотрим теперь модели с признаками «положительной кооперативности».

В параграфах 2.4 и 3.5 описаны модели, для которых характерна сигмоидная форма зависимостей $Z(C)$ или $\rho(C)$. В случае уравнений (2.4.6), (2.4.22), (2.4.28) это связано с положительными кооперативными эффектами на уровне лиганд-рецепторного взаимодействия: «посадка» на рецептор одной молекулы лиганда облегчает «посадку» последующих или, как в случае уравнения Хилла (2.4.31), вообще возможно связывание рецептором лишь n молекул одновременно. В (3.5.4), (3.5.5), (3.5.10) сигмоидность функции $\rho(C)$ определяется гипотетической особенностью механизма развития биологической реакции — сигнал считается пропорциональным количеству рецепторов стехиометрии RA_k , $k \geq n$. Кооперативность процесса связывания лиганда рецептором не предполагается. Заметим еще, что сигмоидная форма кривой $\rho(C)$ может быть обусловлена также сигмоидной зависимостью $\rho(Z)$. Такая форма функции $\rho(Z)$ характерна, например, для миотропной реакции рога матки крысы на брадикинин [26] (см. рис. 5. 7).

На графиках Скэтчарда все рассмотренные выше

сигмоидные зависимости имеют характерную переходную форму, причем начальный участок зависимости имеет положительный наклон (рис. 5.15).

Иногда установить наличие максимума на кривой $Z/C(Z)$ оказывается довольно трудно из-за неудачного расположения точек, значительных погрешностей измерения и т. п. В таких случаях может оказаться полезным сравнение кривой $Z(C)$ или $\rho(C)$ с кривой в скэт-

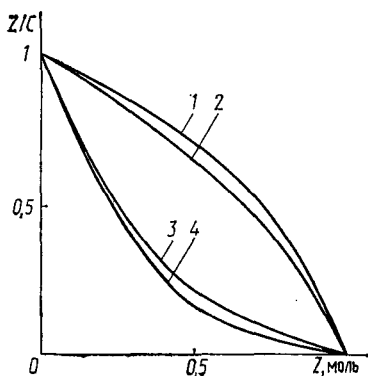


Рис. 5.15. Влияние «отрицательной» (1, 2) и «положительной» (3, 4) «кооперативности» на форму скэтчардовских графиков: 1, 2, 3, 4 — K_1/K_2 равно соответственно 0,1; 0,5; 5 и 10

чардовских координатах. Положение максимума в последнем случае определяется условием

$$\frac{d}{dZ} \left(\frac{Z}{C} \right) = \frac{1}{C} - \frac{Z}{C^2} \frac{dC}{dZ} = 0, \quad (5.7.3)$$

т. е. соответствующая точка на кривой $Z(C)$ должна удовлетворять требованию

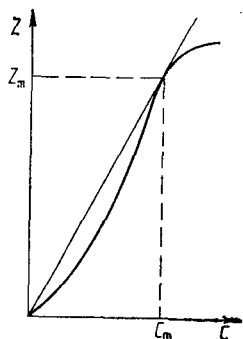
$$\frac{dZ}{dC} = \frac{Z}{C}. \quad (5.7.4)$$

Определяемая этим требованием величина Z_m (рис. 5.16) не должна существенно отличаться от предполагаемого положения максимума на скэтчардовском графике. Из рис. 5.16 следует, кстати, и наглядное объяснение того факта, что максимум на таком графике появляется именно в случае сигмоидных кривых.

Подробное рассмотрение поведения на скэтчардовском графике зависимостей, соответствующих различным моделям с теми или иными проявлениями кооперативности, предпринято в работах [228, 229]. В координатах

натах Хилла зависимость (3.5.5) асимптотически стремится к прямой с единичным наклоном; для $n=2-4$ отклонение от линейности в области $C > K$ едва заметно (рис. 5.17, а); по мере уменьшения C наклон кривых на этом графике приближается к n .

Кривые, описываемые уравнением (3.5.4), в координатах Хилла обычно имеют перегиб (рис. 5.17, б).



Рассмотрим примеры, иллюстрирующие случаи, когда сигмоидность кривых $\rho(C)$ обусловлена вогнутой или сигмоидной формой зависимостей $\rho(Z)$. Частный случай вогнутой формы — функция

$$\rho = Z^n$$

Рис. 5.16. К определению положения максимума на скэтчардовских графиках концентрационных зависимостей, имеющих сигмоидную форму

— при лэнгмюровском характере зависимости $Z(C)$ дает выражение для $\rho(C)$, в точности совпадающее с (3.5.5).

Предположим теперь, что зависимость $\rho(Z)$ носит сигмоидный характер, определяемый зависимостью

$$\rho = \left(\frac{\alpha Z}{K + Z} \right)^n. \quad (5.7.5)$$

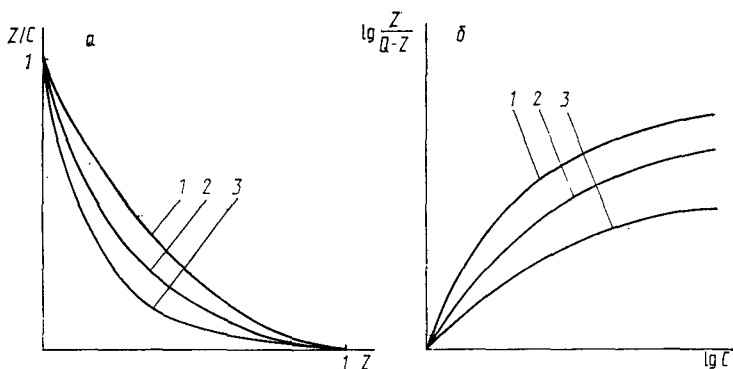
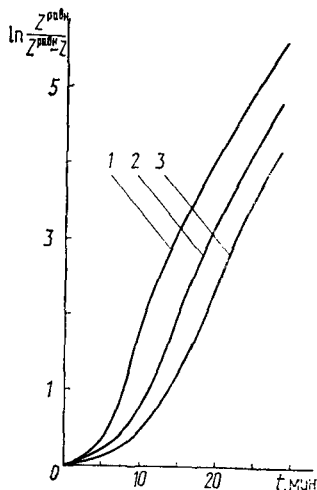


Рис. 5.17. Соответствующие различным моделям сигмоидные зависимости $\rho(C)$, представленные в координатах Скэтчарда (а) и Хилла (б): 1 — уравнение (3.5.4), $i=2$, $N=4$; 2 — уравнение (3.5.5), $N=4$; 3 — уравнение (3.5.10), $r=2$, $N=4$

Если $Z(C)$ по-прежнему имеет форму (2.1.3), то, как отмечалось в параграфе 3.2 (соотношения (3.2.3), (3.2.4)) выражение в скобках (5.7.5) примет вид $\frac{\bar{\alpha}C}{\bar{K} + C}$ и зависимость $\rho(C)$ опять сведется к форме (3.5.5).

Кинетические кривые, соответствующие модели (3.5.6), также имеют сигмоидную форму; в координатах $\ln \frac{Z^{\text{равн}}}{Z^{\text{равн}} - Z}$ от t это проявляется в характерном изломе (рис. 5.18). Аналогичную форму имеет и кривая $\rho(t)$ с сигмоидной или вогнутой зависимостью $\rho(Z)$ и лэнгмюровской формой функции $Z(t)$.

Рис. 5.18. Кинетические зависимости (2.5.6), представленные в координатах $\ln \frac{Z^{\text{равн}}}{Z^{\text{равн}} - Z}$ — t : 1 — $N=2$; 2 — 4; 3 — 8



К сожалению, использование кинетических кривых также не облегчает дискриминацию моделей внутри этой группы.

Уравнения, описывающие кинетику развития биологической реакции в случае модели (3.5.4), слишком громоздки для того, чтобы имело смысл приводить их здесь полностью; качественное рассмотрение показывает, однако, что и в этом случае кривые $\rho(t)$ будут иметь сигмоидную форму. Установить различия между семействами таких кривых на практике вряд ли возможно.

5.8. ХАРАКТЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ МОДЕЛЕЙ

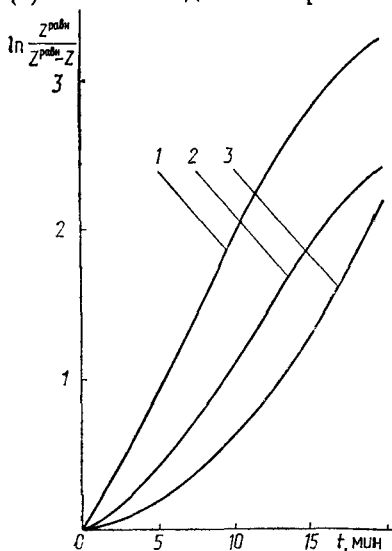
Сигмоидные кривые, помимо механизмов, рассмотренных в параграфах 5.6, 5.7, характерны для «модели биофазы» (2.5.1) и формально идентичной ей «модели

двух состояний» (3.4.8); в обоих случаях, однако, концентрационная зависимость в равновесии описывается гиперболой. Это можно рассматривать как один из признаков «эффекта биофазы»; приемы выявления эффектов подобного рода и анализа кинетики связывания лиганда многокомпартментными системами рассмотрены подробно в работах [232, 233]. Сигмоидность кривых $\rho(t)$ в этих моделях выражена довольно слабо; для них

характерны лаг-периоды, малые по сравнению с полным временем развития реакции. Максимальное положение ординаты точки перегиба $Z(Z_{\pi})$ определяется неравенством [7]

$$\rho(t_{\pi}) \leq \rho^{\max}/e. \quad (5.8.1)$$

Рис. 5.19. «Модель биофазы». Кинетические кривые ассоциации 1, 2, 3 (рис. 2.7), представленные в «спрямляющих» координатах $\ln \frac{Z_{\text{равн}}}{Z_{\text{равн}} - Z} - t$



Таким образом, в случае сильно выраженного лаг-периода на кривых $\rho(t)$ «модель биофазы» не может входить в рассмотрение, так же как «модель двух состояний».

В координатах $\ln \frac{\rho^{\max}}{\rho^{\max} - \rho}$ от t и $\ln \frac{\rho^{\max}}{\rho}$ от t зависимости, соответствующие «модели биофазы», имеют вид, представленный на рис. 5.19.

Численная оценка значений шести констант, входящих в систему уравнений (2.5.1) на основании семейства кривых $\rho(C, t)$, возможна, по-видимому, лишь в исключительных случаях; с учетом же неминуемой произвольности допущений, касающихся, например, формы зависимости $\rho(Z)$, получение таких оценок вообще вряд ли имеет смысл. При малых концентрациях агониста, когда

сохраняется линейная зависимость между примененными концентрациями и реакцией $\rho^{\max}(C)$, можно использовать для получения оценок уравнение (2.5.3), в которое входят только три параметра, подлежащих независимой оценке. Одним из критериев адекватности модели может быть совпадение оценок констант β_1, β_2 , полученных на основании кривых, соответствующих развитию реакции и отмыву. Более того, эти величины

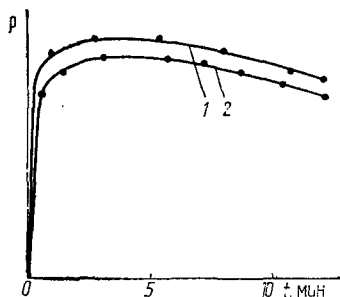


Рис. 5.20. Сократительная реакция восходящей ободочной кишки крысы на различные концентрации ангиотензина: 1 — $C = 10^{-8}$ моль/л; 2 — 10^{-9} моль/л

не зависят от примененной концентрации агониста, очевидно, при выполнении условия $Q \gg Z, B \gg b$.

Таким образом, на основании только данных о кинетике развития биологической реакции довольно трудно распознать признаки механизма, соответствующего «модели биофазы» или «модели двух состояний».

Многие модели механизмов биологического действия различных биорегуляторов были предложены в связи с существованием ряда тест-систем, в которых стабильно воспроизводятся кривые $\rho(t)$ переходной формы (рис. 5.20). По-видимому, первая попытка объяснения этого факта была предпринята Пейтоном — автором упоминавшейся (см. параграф 3.1) «кинетической теории» действия физиологически активных соединений.

Описанные в параграфе 3.4 модели (3.4.2) и (3.4.21) также появились в связи с необходимостью объяснения этого феномена. Несмотря на различие в механизмах, положенных в основу этих моделей, обе приводят к результатам, формально весьма близким: равновесная зависимость $\rho(C)$ имеет форму гиперболы, а кинетика развития биологической реакции в обоих случаях описывается уравнением

$$\rho(C, t) = D + Ee^{-\beta_1 t} + Fe^{-\beta_2 t}. \quad (5.8.2)$$

Хотя константы $D-F$, β_1 , β_2 имеют разный содержательный смысл, различить две модели только на основании набора кривых $\rho(C_i, t)$ практически невозможно. Правда, характер зависимости величины констант скорости β_1 , β_2 от примененной концентрации агониста различен, особенно в области высоких значений C , однако вряд ли это обстоятельство можно использовать для надежной дискриминации моделей — слишком много

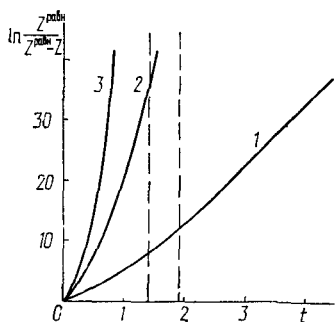


Рис. 5.21. Модель Уилбэра. Кинетические кривые развития реакции, представленные в «спрямляющих» координатах $\ln \frac{Z_{равн}}{Z_{равн} - Z} - t$: 1 — $k_1 C = 0,07 \text{ с}^{-1}$; 2 — 1; 3 — 2 (для всех случаев $k_1' = 1 \text{ с}^{-1}$, $k_2 = 0,4 \text{ с}^{-1}$, $k_2' = 0,1 \text{ с}^{-1}$). В случаях 2, 3 нанесены лишь восходящие участки кривых ($Z < Z_{равн}$)

упрощающих предположений сделано при выводе уравнений (3.4.5)—(3.4.7), (3.4.24)—(3.4.25): линейная зависимость реакции от числа «активированных комплексов», изменение константы q в (3.4.22) пропорционально числу комплексов агонист—рецептор и т. п.

Кинетические зависимости $\rho(C, t)$ переходного типа не могут быть, очевидно, представлены в координатах $\ln \frac{Z_{равн}}{Z_{равн} - Z}$ от t , поскольку на некотором участке кривой выражение, находящееся под знаком логарифма, оказывается отрицательным, однако переходная форма кривых $\rho(t)$ в обеих моделях характерна лишь в случае высоких концентраций агониста; при не очень больших концентрациях максимум на кривой $\rho(t)$ отсутствует. На рис. 5.21 представлено семейство соответствующих зависимостей в спрямляющих координатах. Следует обратить внимание на сходство формы этих зависимостей с аналогичными кривыми, приведенными на рис. 5.14 (случай связывания лиганда двумя различными центрами).

Наконец, модели класса (3.2.1), описывающие реакцию, результирующую эффект взаимодействия агониста с двумя различными типами рецепторов, в случае бли-

зости констант диссоциации K_1, K_2 (но не соответствующих констант скоростей k_1, k_2, k'_1, k'_2) также характеризуются зависимостью $\rho(C)$ вида (3.2.3), причем в этом случае возможны самые различные формы кинетических кривых $\rho(t)$ (см. табл. 3.1), в том числе сигмоидные и переходные, а описывающее их уравнение по-прежнему имеет вид (5.8.2).

Итак, разнообразие кинетических уравнений, соответствующих рассмотренным выше моделям, крайне невелико. За немногими исключениями, они имеют вид (5.8.2), отличаясь друг от друга лишь комбинациями знаков параметров E, F (полагается всегда $\beta_1 > \beta_2$ и $\rho^{\max} > 0$) и различной формой зависимости параметров от примененной концентрации агониста C . Так, в линейном приближении «модели биофазы» зависимость констант β_1, β_2 от C вообще отсутствует, в уравнении (2.2.2) она линейна, в уравнениях (2.3.4), (2.4.11), (3.4.6) при малых значениях C у одной из констант близка к линейной, у другой — приближается к гиперболической. Критериями дискриминации моделей могут быть лишь форма зависимости от C параметров E, F , а также характер связи между эффективными константами скорости отмыва δ_1, δ_2 и величинами β_1, β_2 . Как уже отмечалось, осуществить на этом основании надежную дискриминацию моделей довольно трудно.

5.9. К АНАЛИЗУ РАВНОВЕСНЫХ ЗАВИСИМОСТЕЙ $\rho(C)$

Вернемся к некоторым результатам параграфа 2.7. В силу того что в случае любой модели, линейной по всем возможным типам комплексов Z_i , справедливо

$$Z(C) = QC \frac{d \ln P_n(C)}{dC}, \quad (5.9.1)$$

всякой зависимости $Z(C)$ может быть сопоставлена эквивалентная модель с гетерогенными центрами связывания

$$Z(C) = \sum_i \frac{Q_i C}{K_i + C}, \quad (5.9.2)$$

причем константы диссоциации K_i могут быть, вообще говоря, комплексными. В свою очередь сумма членов (5.9.2), соответствующих каждой паре комплексно-со-

пряженных K_i есть вещественное выражение, эквивалентное зависимости $Z(C)$ для модели двухвалентного рецептора с положительной кооперативностью.

Рассмотрим в терминах этой модели условия появления комплексных корней полинома $P_n(C)$. В случае уравнения (2.4.22)

$$P_2(C) = K_1 K_3 + CK_3(1 + K_1/K_2) + C^2, \quad (5.9.3)$$

так что

$$\begin{aligned} \Phi_{1,2} = & - \frac{K_3(1 + K_1/K_2)}{2} \pm \\ & \pm \sqrt{\left[\frac{K_3(1 + K_1/K_2)}{2} \right]^2 - K_1 K_3}. \end{aligned} \quad (5.9.4)$$

Выразив (5.9.4) через величины

$$J = K_2/K_3 \quad (5.9.5)$$

— фактор кооперативности и

$$I = K_1/K_2 \quad (5.9.6)$$

— показатель гетерогенности, получим

$$\Phi_{1,2} = - \frac{K_2}{2J} [1 + I \pm \sqrt{(1 + I)^2 - 4IJ}]. \quad (5.9.7)$$

Таким образом, условие появления комплексных корней имеет вид

$$(1 + I)^2 < 4IJ. \quad (5.9.8)$$

Если оба взаимодействующих сайта рецептора эквивалентны (случай, предполагаемый моделью (2.4.43), (2.4.44)), $I = 1$ и условие (5.9.8) сводится к

$$J > 1. \quad (5.9.9)$$

Тем самым в предположении отсутствия гетерогенности центров связывания существование комплексных корней полинома $P_n(C)$ есть необходимый и достаточный признак наличия положительной кооперативности. В общем случае, однако, дело обстоит иначе. Именно, существование комплексных корней по-прежнему возможно

только в случае $J > 1$ («положительная кооперативность»); в самом деле, при $J \leq 1$ условие (5.9.8) не выполняется ни при каких значениях I . Напротив, если полином $P_n(C)$ имеет вещественные корни, это вовсе не означает отсутствие «положительной кооперативности»: при любом значении $J > 1$ можно подобрать достаточно большое I , так что условие (5.9.8) не будет выполняться. Таким образом, модель, предполагающая наличие «положительной кооперативности» и сильно выраженной гетерогенности центров связывания, оказывается формально эквивалентной модели, предполагающей существование двух невзаимодействующих сайтов с различными константами диссоциации K_1, K_2 .

Более того, при

$$(1 + I)^2 = 4IJ \quad (5.9.10)$$

корни $P_n(C)$ равны, и кривая $Z(C)$ приобретает форму прямоугольной гиперболы (2.1.3), несмотря на наличие и гетерогенности центров связывания, и положительной кооперативности.

Анализ изотерм $Z(C)$ в терминах моделей рассматриваемого класса можно свести к оценке коэффициентов полинома $P_n(C)$ и исследованию различных его свойств [61, 215]. В связи с этим нужно иметь в виду все перечисленные элементы неоднозначности, существенные в процессе дискриминации моделей.

Следует, впрочем, отметить, что подобного рода анализ гораздо чаще используется для интерпретации экспериментов по связыванию белками низкомолекулярных лигандов или в задачах ферментативной кинетики, чем в исследованиях взаимодействия биорегуляторов со специфическими рецепторами.

Обсуждавшиеся выше особенности кривых вида (5.9.2) можно наглядно продемонстрировать с помощью графиков Скэтчарда. Именно моделям, предполагающим существование гетерогенных центров связывания и (или) «отрицательной кооперативности», соответствуют на этих графиках вогнутые кривые; наличие механизмов «положительной кооперативности» может привести к тому, что кривая в скэтчардовских координатах окажется выпуклой и будет обладать максимумом. При наличии обоих элементов — гетерогенности центров связывания и положительной кооперативности — преобла-

дание той или иной тенденции зависит от соотношения соответствующих констант равновесия. В случае модели (2.4.20) это величины I и J ; неравенство (5.9.8) определяет критерий выпуклости кривой в скэтчардовских координатах, т. е. «преобладания» тенденции, определяемой элементами «положительной кооперативности». При больших I , однако, может сильнее проявиться противоположная тенденция, обусловленная гетерогенностью центров связывания, и скэтчардовская кривая окажется вогнутой. Наконец, в случае равенства обеих частей (5.9.10) эти две тенденции взаимно уравниваются и скэтчардовский график оказывается линейным.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭКСПЕРИМЕНТОВ С АНТАГОНИСТАМИ

В присутствии дополнительного эффектора, тем или иным способом модифицирующего биологическое действие агониста, биологическая реакция является функцией концентраций обоих лигандов:

$$\rho = f(C_A, C_B). \quad (6.1.1)$$

Поскольку в большинстве случаев полагается, что антагонист не способен вызывать собственный биологический эффект, зависимости (6.1.1) удобно изображать в координатах $\rho-C_A$ или $\rho-\lg C_A$ в виде семейства кривых $\rho=f(C_A, C_B=\text{const})$. Анализ семейства кривых, соответствующих разным концентрациям антагониста, позволяет дифференцировать большинство рассмотренных в гл. 4 типов антагонизма; в частности, некоторые заключения удастся сделать уже на основании сопоставления одной или нескольких кривых семейства с реперной зависимостью $\rho(C_A, C_B=0)$.

6.1. ДИСКРИМИНАЦИЯ ТИПОВ АНТАГОНИЗМА С ПОМОЩЬЮ СЕМЕЙСТВА КРИВЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯ — ЭФФЕКТ

Сопоставим вначале особенности семейств кривых, соответствующих важнейшим типам антагонизма, рассмотренным в гл. 4, в предположении пропорциональности эффекта концентрации агонист-рецепторных комплексов. Для смешанного антагонизма кривые концентрация—эффект описываются уравнением

$$\rho = \frac{\rho^{\max}}{1 + C_B/K_{B2}} \frac{C_A}{C_A + \left(\frac{1 + C_B/K_{B1}}{1 + C_B/K_{B2}} \right) K_A}. \quad (6.1.2)$$

Как отмечалось в параграфе 4.4, уравнение (6.1.2) содержит в качестве предельных случаев все основные виды линейного антагонизма. Так, очень высокие значения констант диссоциации K_{B2} указывают на конкурентный механизм взаимодействия агониста и антагониста. Кривые $\rho(\lg C_A, C_B)$ достигают при этом максимального уровня реакции и имеют наклон, характерный для реперной кривой $\rho(\lg C_A, C_B=0)$, отличаясь от последней лишь сдвигом в направлении более высоких концентраций агониста (рис. 6.1, а). В случае весьма низкого сродства антагониста к свободному рецептору уравнение (6.1.2) соответствует механизму бесконкурентного антагонизма; тогда имеют место пропорциональное снижение уровня максимального эффекта и сдвиг EC_{50} (концентрация агониста, вызывающая половину максимального в данных условиях эффекта) в область низких концентраций. Кривые $\rho(C_A, C_B)$ весьма близки к реперной кривой $\rho(C_A, C_B=0)$ в области относительно низких концентраций агониста (рис. 6.1, б). Наконец, подставляя в уравнение (6.1.2) $K_{B1}=K_{B2}=K_B$, получаем выражение

$$\rho = \frac{\rho^{\max}}{1 + C_B/K_B} \frac{C_A}{C_A + K_A}, \quad (6.1.3)$$

описывающее воздействие гипотетического эффектора, инактивирующего продуктивный комплекс агонист—рецептор, причем его собственное сродство к рецептору не изменяется при связывании агониста: условие $K_{B1}=K_{B2}$ эквивалентно в схеме (4.4.1) условию $K_{A1}=K_{A2}$. Естественно предположить, что подобный эффектор связывается со структурами, отличными от рецепторных центров агониста, т. е. является метакоидным антагонистом. Действительно, уравнение (4.5.2) отличается от уравнения (6.1.3) лишь присутствием фактора β , учитывающего возможный предел метакоидного воздействия. Этот вид антагонизма представлен семейством кривых на рис. 6.1, в; для него характерно снижение уровня максимального эффекта и неизменная величина EC_{50} при любых концентрациях антагониста. Частичный метакоидный антагонист ($\beta < 1$) не способен полностью подавить реакцию, вызываемую антагонистом. В этом случае существует предельная кривая

$$\rho(C_A, C_B \rightarrow \infty) = \frac{(1 - \beta) \rho^{\max} C_A}{C_A + K_A}. \quad (6.1.4)$$

На рис. 6.2 представлены семейства кривых $\rho(C_A, C_B)$ для двух моделей метаффиноидного антагонизма, рассмотренных в параграфе 4.5. При относительно невысоких концентрациях антагониста кривые концентрация — эффект для модели сильно связанных рецепторов (рис. 6.2, а) сходны с кривыми для конкурентного антагонизма (параллельный сдвиг кривых). Действительно, уравнения (4.1.1) и (4.5.6), описывающие оба механизма, различаются фактором $\kappa C_B/K_B$, где $\kappa = K_A/K_{AB}$ — относительное снижение сродства рецептора к агонисту

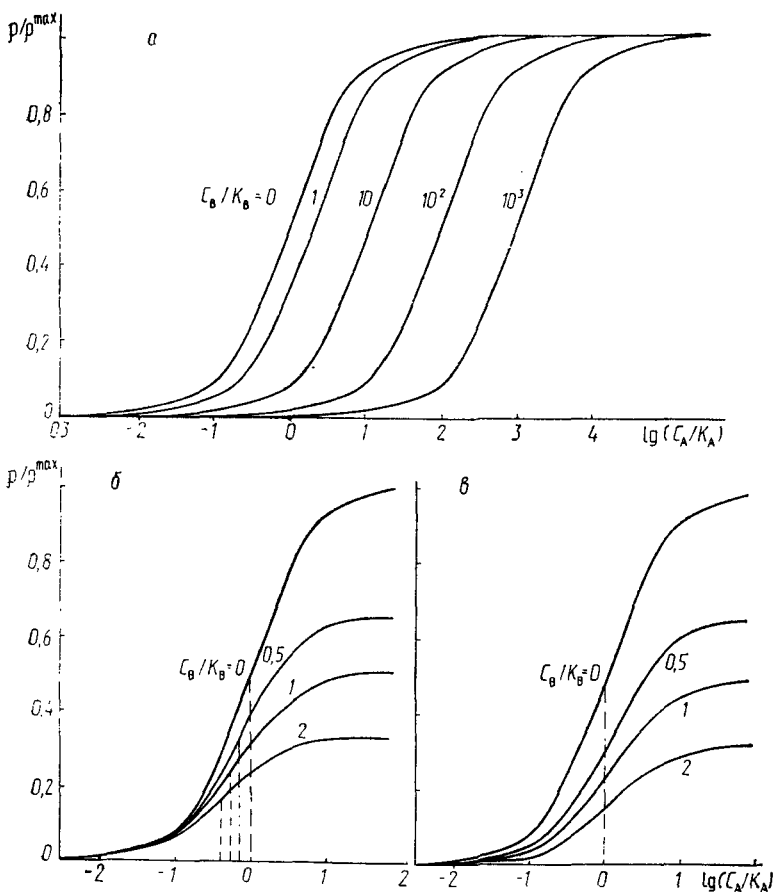


Рис. 6.1. Зависимость концентрация агониста — эффект в присутствии различных концентраций конкурентного (а), бесконкурентного (б) и метаффиноидного (в) антагониста

под действием метаффиноидного антагониста. При малых и метаффиноидные отношения трудно отличимы от чисто конкурентных. Иными словами, «конкурентный» характер кривых доза—эффект не является достаточным признаком совпадения центров связывания агониста и антагониста. Однако если K_A и K_{AB} сравнимы при высоких концентрациях антагониста, проявляются раз-

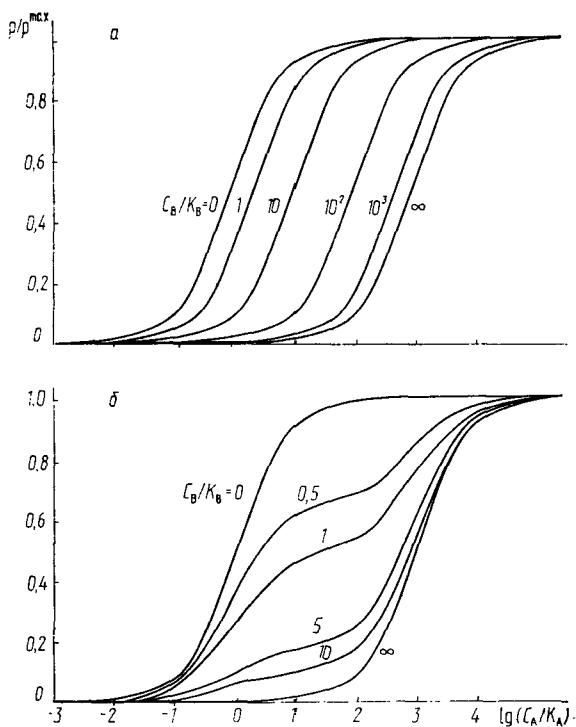


Рис. 6.2. Зависимость концентрация агониста — эффект в присутствии различных концентраций метаффиноидного антагониста. Предполагается, что сродство рецепторов к агонисту уменьшается под действием антагониста в 1000 раз ($K_{AB} = 1000 K_A$): а — модель сильно связанных рецепторов; б — модель слабо связанных рецепторов

личия между конкурентным и метаффиноидным антагонизмом. Увеличением концентрации конкурентного антагониста может быть достигнут сколь угодно большой сдвиг кривой $p(C_A, C_B)$. Для метаффиноидного антагонизма существует предельное положение, дальше кото-

рого при любых значениях C_B сдвиг кривых не происходит:

$$\rho(C_A, C_B \rightarrow \infty) = \frac{\rho^{\max} C_A}{C_A + K_A/\kappa} = \frac{\rho^{\max} C_A}{C_A + K_{AB}}. \quad (6.1.5)$$

Метаффиноидный антагонизм в модели слабо связанных рецепторов на основании семейства кривых $\rho(C_A, C_B)$, построенных при относительно низких концентрациях C_A и C_B , может быть принят за метакоидный антагонизм. Двухфазный характер связывания агониста при $K_{AB} \gg K_A$ проявляется с ростом его концентрации, а с увеличением концентрации антагониста сдвиг кривых $\rho(C_A, C_B)$ достигает предельного значения, также определяемого соотношением (6.1.5). Впрочем, как отмечалось (см. параграф 4.5), механизмы, описываемые этой моделью, в природе встречаться не могут.

Функциональный и физический антагонизмы, являющиеся результатом активации двух относительно независимых эффекторных систем, в общем случае описываются выражением

$$\rho(C_A, C_B) = f_A \left(\frac{C_A}{C_A + K_A} \right) - f_B \left(\frac{C_B}{C_B + K_B} \right). \quad (6.1.6)$$

Уравнение (6.1.6) в зависимости от вида функций f_A и f_B приводит к весьма разнообразным семействам кривых $\rho(C_A, C_B)$.

Семейства кривых концентрация агониста—эффект, описываемые уравнением (4.6.4) (в предположении пропорциональности между эффектами и стимулами, вызываемыми агонистом и функциональным антагонистом), представлены на рис. 6.3. Они сходны с кривыми концентрация—эффект для метакоидного антагонизма. Некоторые особенности функционального антагонизма позволяют в принципе дифференцировать его от метакоидного антагонизма при более тщательном анализе концентрационных зависимостей. Так, в отличие от метакоидного антагонизма значение EC_{50} должно возрастать с ростом концентрации функционального антагониста.

При относительно высоких концентрациях антагониста в некоторой области концентраций агониста выполняется условие $f_B(C_B) \geq f_A(C_A)$, т. е. для каждой концентрации функционального антагониста существует по-

роговая концентрация агониста C_{II} , ниже которой ожидаемое действие агониста не проявляется. Если справедливы предположения, приводящие к уравнению (4.6.4), т. е. функции $f_B(C_B)$ и $f_A(C_A)$ являются изотермами Лэнгмюра, зависимость между концентрацией антагониста и пороговой концентрацией агониста может быть представлена в виде:

$$\frac{K_A}{C_{II}} = \frac{1 - \gamma}{\gamma} + \frac{1}{\gamma} \frac{K_B}{C_B}. \quad (6.1.7)$$

С учетом (6.1.7) уравнение (4.6.4) преобразуется:

$$\rho = \frac{\rho^{\max} C_A}{C_A + K_A} - \frac{\rho^{\max} C_{II}}{C_{II} + K_A}. \quad (6.1.8)$$

Аппроксимация экспериментальных концентрационных зависимостей системой уравнений типа (6.1.8) должна приводить к существенно ненулевым значениям параметров C_{II} при $C_B \neq 0$. (Начальные значения C_{II} и общих для всей системы параметров ρ^{\max} и K_A легко оцениваются графически.) Более того, полученные в результате аппроксимации значения C_{II} могут быть использованы для оценки справедливости предположений,

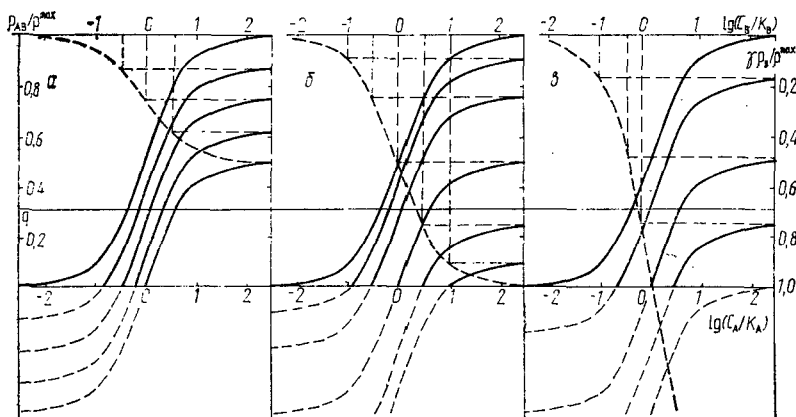


Рис. 6.3. Зависимость концентрация агониста — эффект в присутствии функционального (физического) антагониста, описываемая уравнением (4.6.4). Субэффект антагониста представлен штриховыми линиями. Горизонтальная линия $\rho_{AB}/\rho^{\max} = q$ ограничивает величину эффектов, достижимых при наличии «резерва» на общем участке рецептор-эффекторной цепи в схеме (4.6.1): а — $\gamma < 1$; б — $\gamma = 1$; в — $\gamma > 1$

приводящих к уравнению (4.6.4): соотношение (6.1.7) предсказывает в этом случае близкую к линейной зависимость между обратными концентрациями $1/C_B$ и $1/C_A$.

Существенным элементом дискриминации различных моделей антагонизма является сопоставление величин максимальных эффектов, достижимых в присутствии и при отсутствии антагониста. В приведенных выше рассуждениях предполагалось, однако, что максимальный эффект соответствует полной оккупации рецепторов агониста. В противном случае, т. е. при наличии рецепторного резерва, величина максимального эффекта в присутствии относительно низких концентраций метакоидного и функционального антагониста остается неизменной. Увеличение концентрации таких антагонистов может привести к исчерпанию резерва и снижению максимальной реакции. В экспериментах с применением частичных антагонистов низкой внутренней активности (метакоидных или функциональных) максимальный уровень реакции может оставаться постоянным даже для весьма высоких концентраций антагониста. Единственным надежным признаком конкурентного антагонизма служит при этом факт параллельного смещения кривых концентрация—эффект в полулогарифмических координатах; наклон кривых в случае метакоидного или функционального антагонизма зависит от концентрации антагониста. Параллельность переноса кривых концентрация—эффект может быть оценена с помощью критериев, рассмотренных в параграфе 6.2, или сопоставлением дозовых отношений при разных уровнях эффекта (см. параграф 6.3).

6.2. КРИТЕРИЙ «ПАРАЛЛЕЛЬНОСТИ ПЕРЕНОСА» КРИВЫХ

Говоря о «параллельном переносе» кривых вдоль оси абсцисс (в полулогарифмической шкале) как о признаке конкурентного антагонизма (правильнее было бы говорить о сохранении формы кривой), часто определяют эту «параллельность» просто на глаз. Иногда применяют более точные критерии — совпадение максимальных значений p (C_A , C_B) и среднего наклона линейных участков сравнимых кривых (см., например [164]). Однако в силу ряда причин (см. параграфы 4.2 и 6.6) кривые p (C) могут не совпадать точно с формой (2.1.3), так что для сравнения формы двух кривых необходимо вводить в

(2.1.3) некоторые поправки. Характер этих поправок сам по себе может быть критерием совпадения формы анализируемых кривых с изотермой Лэнгмюра. Паркер и Во [198, 245] предложили для подобных целей использовать трехпараметрические зависимости логистического типа:

$$\rho(C) = \frac{aC^n}{C^n + K^n}, \quad (6.2.1)$$

позволяющие варьировать максимальную реакцию, EC_{50} и наклон кривых.

Уравнение (6.2.1) сходно с уравнением Хилла (2.4.31). Отметим, однако, что введение параметра n в данном случае — чисто эмпирический прием, облегчающий сравнение формы пары кривых $\rho(C)$; для этой же цели предлагались и другие виды эмпирических зависимостей [175, 221]. Разлагая (6.2.1) в ряд Тейлора и удерживая лишь члены первого порядка, получаем [198, 246]:

$$\rho(C) = a \left[\frac{C^{n_0}}{C^{n_0} + K_0^{n_0}} + \Delta n \frac{C^{n_0} K_0^{n_0} \ln(C/K_0)}{(C^{n_0} + K_0^{n_0})^2} - \Delta K \frac{n_0 C^{n_0} K_0^{n_0-1}}{(C^{n_0} + K_0^{n_0})^2} \right], \quad (6.2.2)$$

где Δn , ΔK — искомые поправки к начальным значениям параметров n и K соответственно. Таким образом семейство кривых концентрация — эффект при различных концентрациях антагониста, различающихся в общем случае значениями максимального эффекта, EC_{50} и наклоном, сводится к системе уравнений, линейных по a , Δn , ΔK ; оптимальные значения параметров a , n и K для каждой кривой могут быть получены с помощью итерационной процедуры, использующей оценки последовательно уточненных значений этих параметров методом наименьших квадратов (см. параграф 5.1). В работе [198] указано, что лучшая сходимость итерационной процедуры достигается при некотором занижении начальных значений K_0 . В качестве начальных рекомендуется использовать значения K_0 , близкие к EC_{50} .

В случае конкурентного антагонизма семейство кривых доза — эффект должно различаться лишь величинами K при равном наклоне и максимальном эффекте. Проверка «параллельности» кривых доза — эффект может быть осуществлена с помощью двух тестов [246].

Первый тест заключается по существу в проверке гипотезы о совпадении значений n_i , которая может быть достигнута оценкой уровня значимости отношения

$$\frac{R^{\text{общ}} - R^{\text{нез}}}{R^{\text{нез}}} \left(\frac{m}{N-1} - 1 \right),$$

подчиняющегося распределению Фишера $F_{N-1, m-N-1}$. Здесь $R^{\text{общ}}$ и $R^{\text{нез}}$ — остаточные суммы квадратов соответственно при аппроксимации кривых доза — эффект в предположении $n_1 = n_2 = \dots = n_i = n$ и независимых n_i для кривых, соответствующих различным концентрациям антагониста; N — число кривых; m — общее число экспериментальных точек. Менее строгую оценку степени «параллельности» сравниваемого семейства кривых можно произвести с помощью подчиняющегося тому же распределению Фишера отношения

$$\frac{n^{\text{max}} - n^{\text{min}}}{n^{\text{общ}}},$$

где $n^{\text{общ}}$ — значение параметра n , полученное в предположении $n_1 = n_2 = \dots = n_i = n$; n^{max} и n^{min} — максимальное и минимальное значения этого параметра, найденные при независимой аппроксимации отдельных кривых.

6.3. ДИСКРИМИНАЦИЯ ТИПОВ АНТАГОНИЗМА С ПОМОЩЬЮ НУЛЕВЫХ УРАВНЕНИЙ И АНАЛИЗА ДОЗОВЫХ ОТНОШЕНИЙ

Существенным элементом процедуры идентификации типа антагонизма является сопоставление максимальных реакций, достижимых для различных сочетаний эффектов. Факторы, описанные в гл. 4, могут, однако, существенно снижать максимальную реакцию, измеряемую в конкретной тест-системе. В этой связи полезными оказываются методы, позволяющие идентифицировать некоторые типы антагонизма на основании данных, соответствующих начальным участкам кривых $p(C_A, C_B)$.

Пусть C_A и C'_A — концентрации агониста, вызывающие равные, относительно невысокие реакции в отсутствие и в присутствии антагониста, а $D = C'_A / C_A$ — отношение концентраций агониста, необходимое для сохранения данного эффекта (так называемое дозовое отношение [47]). Уравнения, которые связывают concentra-

ции агониста, вызывающие равную реакцию в отсутствие и в присутствии дополнительного эффектора, иногда называют нулевыми уравнениями [174]. В предположении о том, что равные концентрации агонист-рецепторных комплексов приводят к равным биологическим эффектам, вид нулевых уравнений не зависит от конкретной формы функции $\rho(Z)$, а определяется характером зависимости $Z/(C_A, C_B)$. Так, для смешанного антагонизма

$$D - 1 = \frac{C_B}{K_{B1}} + \frac{C_B}{K_{B2}} \frac{C'_A}{K_A}. \quad (6.3.1)$$

Отметим, что величина $D - 1 = (C'_A - C_A)/C_A$ характеризует относительный сдвиг кривых $\rho(C_A, C_B)$ по сравнению с реперной кривой $\rho(C_A, C_B = 0)$ при выбранном уровне эффекта. Важным свойством зависимости (6.3.1) является ее линейность при фиксированной концентрации антагониста. В случае конкурентного антагонизма уравнение (6.3.1) упрощается:

$$D - 1 = C_B/K_B, \quad (6.3.2)$$

т. е. относительный сдвиг кривой $\rho(C_A, C_B)$ при заданном C_B не зависит от величины C_A . Зависимость (6.3.2), широко используемая для оценки сродства конкурентных антагонистов к рецепторам, подробно обсуждается в параграфе 6.6.

Для бесконкурентного антагонизма имеем

$$D - 1 = \frac{C_B}{K_B} \frac{C'_A}{K_A}. \quad (6.3.3)$$

При заданной концентрации бесконкурентного антагониста зависимость величины $(D-1)$ от концентрации агониста, обеспечивающей в присутствии антагониста заданный уровень эффекта, является прямой, проходящей через начало координат. Это свойство, присущее исключительно бесконкурентному антагонизму, может служить основой для его идентификации.

Для полного метакоидного антагониста

$$D - 1 = \frac{C_B}{K_B} \left(1 + \frac{C'_A}{K_A} \right). \quad (6.3.4)$$

Прямые, определяющие зависимость $(D-1)$ от C'_A при разных фиксированных значениях C_B , в этом случае па-

раллельны. По этому признаку может быть идентифицирован метакоидный антагонизм.

Концентрационные зависимости дозовых отношений позволяют отличить конкурентный антагонизм от метаффиноидного в модели сильно связанных рецепторов, для которой нулевое уравнение имеет вид

$$D - 1 = \frac{1 - \kappa}{\kappa + K_B/C_B}. \quad (6.3.5)$$

В этом случае дозовое отношение достигает с ростом концентрации антагониста равновесного уровня

$$D^{\max} = 1/\kappa. \quad (6.3.6)$$

Зависимость (6.3.5) удобно использовать в логарифмической форме:

$$\lg(D - 1) = \lg(D^{\max} - 1) - \lg(1 + D^{\max} K_B/C_B). \quad (6.3.7)$$

Графики теоретических зависимостей (6.3.7) сопоставляются с линейной зависимостью $\lg(D-1)$ от $\lg(C_B/K_B)$ для конкурентного антагонизма (рис. 6.4). Отметим, что и этот метод дифференциации конкурентного и метаффиноидного антагонизмов требует применения достаточно высоких концентраций антагониста. Экспериментально найденные зависимости дозовых отношений от концентрации метаффиноидного антагониста приведены на рис. 6.9, б.

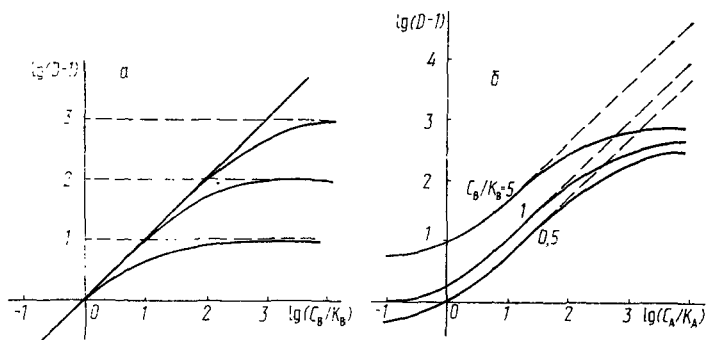


Рис. 6.4. Концентрационные зависимости дозовых отношений для некоторых случаев метаффиноидного антагонизма: а — влияние концентраций антагониста в модели сильно связанных рецепторов; б — влияние концентраций агониста в модели слабо связанных рецепторов ($K_{AB} = 1000 K_A$). Штриховыми линиями указаны те же зависимости для метакоидного антагонизма

Кривые концентрация агониста — эффект в присутствии функционального антагониста параллельно смещают вдоль оси ординат в направлении более низких эффектов. В полулогарифмических координатах участки кривых, соответствующие положительным эффектам, оказываются, однако, непараллельными. Действительно, полагая справедливыми соотношения (4.6.4), (6.1.8) и предполагая, что равные по величине субэффекты ρ_{AB} (см. параграф 4.6) вызывают равный эффект $\tilde{\rho}_{AB}$ в отсутствие и в присутствии функционального антагониста, получаем уравнение для дозовых отношений в виде

$$D - 1 = \frac{(1 + C'_A/K_A)^2}{C'_A/C_{II} - 1}, \quad (6.3.8)$$

где C_{II} — пороговая концентрация агониста, связанная с концентрацией антагониста соотношением (6.1.7). Правая часть уравнения (6.3.8) убывает с ростом C'_A , достигая минимума при условии

$$C'_A/K_A = 2C_{II}/K_A + 1. \quad (6.3.9)$$

Дальнейшее увеличение C'_A ведет к росту дозовых отношений.

Таким образом, наклон начальных участков кривых доза — эффект в случае функционального антагонизма превышает наклон реперной кривой ρ ($C_A, C_B = 0$). Снижение наклона кривых с ростом концентрации агониста, т. е. минимум и возрастающий участок зависимости (6.3.8), может не наблюдаться в условиях значительного рецепторного резерва при формировании эффекта $\tilde{\rho}_{AB}$ (см. параграф 4.6). Однако убывающий характер зависимости $D - 1$ от C'_A в области относительно низких концентраций агониста — свойство, присущее исключительно функциональному антагонизму, — не зависит от допущений, сделанных при выводе уравнения (6.3.8).

6.4. ДИСКРИМИНАЦИЯ МОДЕЛЕЙ АНТАГОНИЗМА С ПОМОЩЬЮ ЛИНЕАРИЗОВАННЫХ ЗАВИСИМОСТЕЙ ДОЗА — ЭФФЕКТ

Большая часть рассмотренных типов антагонизма может быть описана (в предположении, что зависимость $\rho(Z)$ является линейной) уравнением

$$\rho(C_A) = \frac{\rho_{\text{каж}}^{\text{max}} C_A}{K_{\text{Акаж}} + C_A}. \quad (6.4.1)$$

Подобные зависимости с помощью преобразований, приведенных в параграфе 5.2, могут быть представлены в линейной форме:

$$y = a + bx, \quad (6.4.2)$$

где y и x — выражения, содержащие ρ и (или) C_A , а коэффициенты a и b являются функциями концентрации антагониста и параметров уравнения (6.4.1). В табл. 6.1 представлены выражения для a и b и некоторые характерные параметры (точка пересечения с осью x , координаты точки пересечения семейства прямых), описывающие разные типы антагонизма в координатах Лайнуивера — Бэрка, Эди — Хофсти и Скэтчарда. Отметим, что удобным признаком для дискриминации бесконкурентного и метакоидного антагонизмов является параллельность семейств прямых, полученных в одном из рассматриваемых графиков при варьировании концентрации антагониста. Лишь в случае существенно смешанного антагонизма ни на одном из трех указанных графиков различным концентрациям антагониста не будут соответствовать параллельные прямые.

Метаффиноидный антагонизм в модели слабо связанных рецепторов (а в некоторых случаях и функциональный антагонизм) в координатах Лайнуивера — Бэрка и Скэтчарда имеет два линейных участка.

Пожалуй, более наглядно различия между разными типами антагонизма проявляются на графиках Диксона [103], представляющих собой зависимости величин $1/\rho$ или C_A/ρ от концентрации антагониста при заданной концентрации агониста (табл. 6.2). Для смешанного антагонизма соответствующая зависимость определяется уравнением

$$\frac{1}{\rho} = \frac{C_A + K_A}{\rho^{\max} C_A} + \frac{C_A/K_{B2} + K_A/K_{B1}}{\rho^{\max} C_A} C_B. \quad (6.4.3)$$

Конкурентный антагонизм дает семейство параллельных прямых в координатах $(C_B, C_A/\rho)$, бесконкурентный — в координатах $(C_B, 1/\rho)$. В случае метакоидного антагонизма оба графика Диксона пересекаются на оси абсцисс, отсекая от нее отрезок, равный $-K_B$.

Линейная зависимость $1/\rho$ или C_A/ρ от C_B характерна, вообще говоря, лишь для линейных типов антагонизма. Однако графики Диксона строятся обычно в небольшом интервале концентраций C_B , в котором нелиней-

Параметры графиков Лайнуэра—Берка и Скетгарда для различных видов антагонизма

Координаты	$x = 1/C,$		$y = 1/\rho$		x_{II}^{***}	y_{II}^{***}
Вид антагонизма	b^*	x_0^{**}	y_0^{**}	x_{II}^{***}	y_{II}^{***}	y_{II}^{***}
Конкурентный	$\frac{K_C}{\rho^{\max}} \left(1 + \frac{C_B}{K_B} \right)$	$-\frac{K_B}{K_C(C_B + K_B)}$	$\frac{1}{\rho^{\max}}$	0	$\frac{1}{\rho^{\max}}$	
Бескоинкурентный	$\frac{K_C}{\rho^{\max}}$	$-\frac{1}{K_C} \left(1 + \frac{C_B}{K_B} \right)$	$\frac{1}{\rho^{\max}} \left(1 + \frac{C_B}{K_B} \right)$	Прямые параллельны	0	
Метакоидный	$\frac{K_C}{\rho^{\max}} \left(1 + \frac{C_B}{K_C} \right)$	$-\frac{1}{K_C}$	$\frac{1}{\rho^{\max}} \left(1 + \frac{C_B}{K_B} \right)$	$-\frac{1}{K_C}$	0	
Смешанный	$\frac{K_C}{\rho^{\max}} \left(1 + \frac{C_B}{K_{B2}} \right)$	$-\frac{1 + C_B/K_{B1}}{1 + C_B/K_{B2}}$	$\frac{1}{\rho^{\max}} \left(1 + \frac{C_B}{K_{B1}} \right)$	$-\frac{1}{K_C} \frac{K_2}{K_1}$	$\frac{1}{\rho^{\max}}$	
Метаффиноидный, модель (4.5.6)	$\frac{K_C}{\rho^{\max}} \frac{(1 + C_B/K_B) C_B}{1 + x \frac{C_B}{K_B}}$	$-\frac{1}{K_C} \frac{1 + x \frac{C_B}{K_B}}{1 + C_B/K_B}$	$\frac{1}{\rho^{\max}}$	0	$\frac{1}{\rho^{\max}}$	
Метаффиноидный, модель (4.5.7)		$y = \frac{K_C K_{CB} x^2 + (K_C + K_{CB}) x + 1}{\left(1 - \frac{K_{CB} - K_C}{1 + K_B/C} \right) x + 1}$				$\frac{1}{\rho^{\max}}$

Координаты Вид антагонизма	$x = C$, $y = C/\rho$	x_{II}	y_{II}
Конкурентный	b $\frac{1}{\rho^{\max}}$	Прямые параллельны	
Бесконкурентный	$\frac{1}{\rho^{\max}} \left(1 + \frac{C_B}{K_B} \right)$	0	$\frac{K_C}{\rho^{\max}}$
Метакоидный	$\frac{1}{\rho^{\max}} \left(1 + \frac{C_B}{K_B} \right)$	0	$-K_C$
Смешанный	$\frac{1}{\rho^{\max}} \left(1 + \frac{C_B}{K_{B1}} \right)$	$-K_C \frac{K_1}{K_2}$	$\frac{K_C}{\rho^{\max}}$
Метафяноидный, модель (4.5.6)	$\frac{1}{\rho^{\max}}$	Прямые параллельны	
Метафяноидный****, модель (4.5.7)	$y = \frac{x^2 + (K_C + K_{CB})x + 1}{x + K_C - \frac{K_{CB} - K_C}{K_B} + \frac{K_B}{C_B}}$		
Координаты Вид антагонизма	b	x_{II}	y_{II}
	$x = \rho$, $y = \rho/C$		
	x_0		y_0

Конкурентный	$-\frac{K_B}{K_C(C_B + K_B)}$	ρ^{\max}	$\frac{\rho^{\max} K_B}{K_C(C_B + K_B)}$	ρ^{\max}	0
Бесконкурентный	$-\frac{1}{K_C} \left(1 + \frac{C_B}{K_B} \right)$	$\frac{K_B \rho^{\max}}{C_B + K_B}$	$\frac{\rho^{\max}}{K_C}$	0	ρ^{\max}
Метакоидный	$-\frac{1}{K_C}$	$\frac{\rho^{\max} K_B}{C_B + K_B}$	$\frac{\rho^{\max} K_B}{K_C(C_B + K_B)}$	Прямые параллельны	Прямые параллельны
Смешанный	$-\frac{1}{K_C} \left(\frac{1 + \frac{C_B}{K_{B1}}}{1 + \frac{C_B}{K_{B2}}} \right)$	$\frac{\rho^{\max} K_{B1}}{C + K_{B1}}$	$\frac{\rho^{\max} K_{B2}}{K_C(C + K_{B2})}$	$\frac{\rho^{\max} K_{B1}}{K_{B1} - K_{B2}}$	$\frac{\rho^{\max} K_{B2}}{K_C(K_{B1} - K_{B2})}$
Метафиноидный, модель (4.5.6)	$-\frac{1}{K_C} \frac{1 + \frac{C_B}{K_B}}{1 + \frac{C_B}{K_B}}$	ρ^{\max}	$\frac{\rho^{\max}}{K_C} \frac{1 + \frac{C_B}{K_B}}{1 + \frac{C_B}{K_B}}$	ρ^{\max}	0
Метафиноидный****, модель (4.5.7)	$-\frac{1}{K_C}$	$\frac{\rho^{\max}}{1 + C_B/K_B}$	$\frac{\rho^{\max}}{K_C(1 + C_B/K_B)}$	Прямые параллельны	Прямые параллельны
	$-\frac{1}{K_{CB}}$	$\frac{\rho^{\max}}{1 + C_B/K_B}$	$\frac{\rho^{\max}}{K_{CB}(1 + C_B/K_B)}$		

*) b —наклон прямых $y = y_0 + bx$. **) X_0 , Y_0 —координаты точек пересечения с осями (для двух графиков Лайнуивера—Берка—взаимобратные величины). ***) $X_{п}$, $Y_{п}$ —координаты точек пересечения семейства прямых. ****) В этой модели графики Лайнуивера—Берка нелинейны, а график Скетчарда—сумма двух прямых, параметры которых приводятся.

Некоторые параметры линейных графиков Диксона

	$x = C_B, \quad y = 1/\rho$				
Координаты	$b^*)$	$x_0^{**})$	$y_0^{**})$	$x_{II}^{***})$	$y_{II}^{***})$
Вид антагонизма					
Конкурентный	$\frac{K_C}{\rho^{\max} K_B C}$	$-K_B \left(1 + \frac{C}{K_C}\right)$	$\frac{1}{\rho^{\max}} \left(1 + \frac{K_C}{C}\right)$	$-K_B$	$\frac{1}{\rho^{\max}}$
Бесконкурентный	$\frac{1}{\rho^{\max} K_B}$	$-K_B \left(1 + \frac{K_C}{C}\right)$	«	Прямые параллельны	
Метакоидный	$1 + \frac{K_C}{\rho^{\max} K_B C}$	$-K_B$	«	0	0
Смешанный	$\frac{1}{\frac{K_{B1}}{K_{B1}} + \frac{1}{K_{B2}} + \frac{K_C}{\rho^{\max} C}}$	$-\frac{C + K_C}{\frac{C}{K_{B1}} + \frac{K_C}{K_{B2}}}$	«	$-K_{B2}$	$\frac{1}{\rho^{\max}} \left(1 - \frac{K_{B2}}{K_{B1}}\right)$

Координаты	$x = C_B,$	$y = C/\rho$	x_{II}^{***}	y_{II}^{***}
Вид антагонизма	b^{**}			
Конкурентный	$\frac{1}{\rho^{\max}} \frac{K_C}{K_B}$	$-K_B \left(1 + \frac{C}{K_C}\right)$	$\frac{C + K_C}{\rho^{\max}}$	Прямые параллельны
Бесконкурентный	$\frac{1}{\rho^{\max}} \frac{C}{K_B}$	$-K_B \left(1 + \frac{K_C}{C}\right)$	«	$\frac{K_C}{\rho^{\max}}$
Метакоидный	$\frac{C + K_C}{\rho^{\max} K_B}$	$-K_B$	«	0
Смешанный	$\frac{C}{K_{B1}} + \frac{K_C}{K_{B2} \rho^{\max}}$	$-\frac{C + K_C}{\frac{C}{K_{B1}} + \frac{K_C}{K_{B2}}}$	«	$\frac{K_C}{\rho^{\max}} \left(1 - \frac{K_{B1}}{K_{B2}}\right)$

*) b — наклон прямых $y = y_0 + bx$.

**) x_0, y_0 — координаты точек пересечения осей.

***) x_{II}, y_{II} — координаты точки пересечения семейства прямых.

ность может оставаться незамеченной. Так, для метаффиноидного антагонизма (модель сильно связанных рецепторов) имеем зависимость

$$\frac{1}{\rho} = \frac{1}{\rho^{\max}} + \frac{K_A}{\rho^{\max} C_A} \frac{C_B + K_B}{\kappa C_B + K_B}, \quad (6.4.4)$$

существенно нелинейную в области высоких концентраций антагониста, но в области концентраций $C_B \ll K_B/\kappa$ практически неотличимую от линейной зависимости, характерной для конкурентного антагонизма.

В работе [120] исследовано влияние на характер оценок, получаемых с помощью перечисленных линеаризованных зависимостей, степени завершенности выхода процесса к равновесному уровню. Оказалось, что неверное определение времени достижения равновесия (преждевременное прекращение процесса) может привести не только к значительным погрешностям расчета констант K_A , K_B , но даже к ошибке в установлении типа антагонизма. Примечательно, что при этом на всех графиках сохраняется почти линейная форма соответствующих зависимостей.

6.5. ДИСКРИМИНАЦИЯ МОДЕЛЕЙ АНТАГОНИЗМА С ПОМОЩЬЮ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ЭФФЕКТОРА

В предыдущих параграфах этой главы показано, что процедуры различия некоторых типов антагонизма (конкурентный — метаффиноидный, конкурентный — метакоидный, метаффиноидный — функциональный и др.) требуют применения весьма высоких концентраций агониста и антагониста, что не всегда выполнимо в условиях реального эксперимента. В условиях же значительного рецепторного резерва дискриминация часто оказывается невозможной даже при использовании высоких концентраций эффекторов. В этой связи весьма полезен метод дискриминации моделей антагонизма, основанный на совместном применении исследуемого антагониста B_2 и вещества B_1 , действие которого на данную рецептор-эффекторную систему хорошо изучено. Результаты таких экспериментов легко интерпретируемы, если дополнительный эффектор является в рассматриваемой системе необратимым ингибитором или конкурентным антагонистом. Обработка препарата необратимым блокатором рецепторов исследуемого типа снижает или совершенно

устраняет рецепторный резерв. Последнее может быть установлено по заметному снижению максимальной реакции, вызываемой агонистом. В отсутствие рецепторного резерва интерпретация результатов эксперимента с исследуемым антагонистом в значительной мере упрощается.

Еще более эффективным для дискриминации моделей антагонизма является метод, основанный на совместном применении исследуемого агента и стандартного конкурентного антагониста [38, 200] (например, атропина в холинергической системе). Концентрация агонист-рецепторных комплексов в присутствии двух конкурентных антагонистов описывается уравнением

$$Z_A = \frac{QC_A}{C_A + \left(1 + \frac{C_{B1}}{K_{B1}} + \frac{C_{B2}}{K_{B2}}\right) K_A}. \quad (6.5.1)$$

Дозовое отношение при одновременном действии двух конкурентных антагонистов

$$D_{12} = 1 + \frac{C_{B1}}{K_{B1}} + \frac{C_{B2}}{K_{B2}} = D_1 + D_2 - 1, \quad (6.5.2)$$

где D_1 и D_2 — дозовые отношения, получаемые при раздельном применении обоих антагонистов в тех же концентрациях. Уравнение (6.5.2) — простое тестовое соотношение для проверки гипотезы о конкурентном характере исследуемого антагонизма.

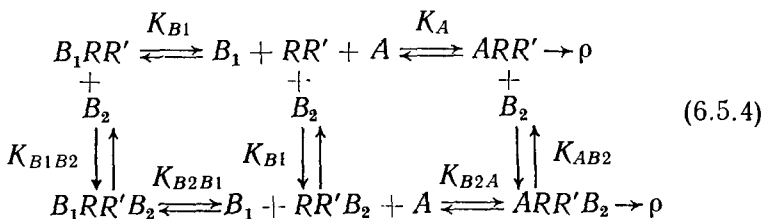
Легко показать, что в случае, если испытуемый антагонист является неконкурентным (метакоидным), дозовое отношение для его совместного действия со стандартным конкурентным антагонистом задается выражением

$$D_{12} = D_1 D_2. \quad (6.5.3)$$

Если концентрации обоих антагонистов подобраны так, что $D_1 \gg D_2$, конкурентный и метакоидный механизмы взаимодействия агониста и антагониста B_2 легко дифференцируются по величине отношения D_{12}/D_1 , которое в первом случае должно быть близко к единице, а во втором — существенно выше. Описанный тест особенно удобен тем, что не требует достижения высоких дозовых отношений для исследуемого антагониста.

Взаимодействие агониста A , конкурентного антагониста B_1 и метаффиноидного антагониста B_2 с системой

сильно связанных рецепторных центров RR' описывается схемой



Концентрация связанных с агонистом рецепторных центров задается выражением

$$Z_A = \frac{QC_A}{C_A + K_A \frac{1 + (1 + \kappa')C_{B1}/K_{B1} + C_{B2}/K_{B2}}{1 + \kappa C_{B2}/K_{B2}}}, \quad (6.5.5)$$

где

$$\kappa = \frac{K_A}{K_{AB2}} = \frac{K_{B2}}{K_{B2A}}; \quad \kappa' = \frac{K_{B1}}{K_{B1B2}} = \frac{K_{B2}}{K_{B2B1}}.$$

Соотношения между дозовыми отношениями, получаемые при совместном и раздельном применении антагонистов, имеют вид

$$D_{12} = \gamma(D_1 - 1) + D_2, \quad (6.5.6)$$

где

$$\gamma = \frac{1 + \kappa'}{1 + \kappa C_{B2}/K_{B2}}.$$

В области достаточно высоких концентраций метаффиноидного антагониста ($\gamma < 1$) справедливо неравенство

$$D_{12} < D_1 + D_2 - 1,$$

т. е. получаемые в этом случае дозовые отношения ниже ожидаемых для совместного действия двух конкурентных антагонистов. При высоких концентрациях конкурентного антагониста B_1 , соответствующих дозовому отношению

$$D_1 > D_2/(1 - \gamma), \quad (6.5.7)$$

можно добиться парадоксального эффекта: $D_{12} < D_1$ — присутствие дополнительного метаффиноидного антагониста сдвигает кривую доза — эффект для конкурентного антагонизма в области низших концентраций агониста. Подобный эффект невозможен, если испытываемый ан-

тагонист является конкурентным или метакоидным, и достигается лишь в условиях, когда связывание метаффиноидного антагониста близко к насыщению $D_2 \approx D_2^{\max}$, $D_1 > D_2^{\max}$.

6.6. ОЦЕНКА КОНСТАНТ ДИССОЦИАЦИИ КОНКУРЕНТНЫХ АНТАГОНИСТОВ. ГРАФИК ШИЛДА

Линейная зависимость (6.3.2) дозовых отношений от концентрации конкурентного антагониста широко используется для оценки констант диссоциации антагонист-рецепторных комплексов. Для графического представления экспериментальных данных, относящихся к широкой области концентраций антагониста, удобнее использовать эту же зависимость в логарифмической форме:

$$\lg(D - 1) = \lg C_B - \lg K_B. \quad (6.6.1)$$

График зависимости $\lg(D-1)$ от $\lg C_B$ впервые введен в работе [47] и называется графиком Шилда.

В параграфе 4.2 показано, что при единичном наклоне графика Шилда его пересечение с осью абсцисс дает величину $pA_2 = -\lg K_B$. Графический способ оценки pA_2 проиллюстрирован на рис. 6.5 на основании данных классической работы Арунлакшана и Шилда [47]. Разумеется, и в этом случае сохраняют силу высказанные в параграфе 5.2 предостережения относительно возрастания ошибок при линеаризации зависимостей концентрация — эффект; отметим, однако, что предварительная аппроксимация семейства кривых концентрация — эффект (см. параграф 6.2) делает ошибки считывания концентраций, дающих равный эффект, а следовательно, погрешности определения дозовых отношений минимальными.

Реальные эксперименты нередко приводят к графикам Шилда с наклоном, существенно отличным от единицы. Величина pA_2 , полученная из таких графиков, не равна отрицательному логарифму K_B . Однако в тех случаях, когда наклон графиков Шилда для разных антагонистов или в разных рецептор-эффекторных системах приблизительно одинаков, можно, по-видимому, предполагать пропорциональность pA_2 и $\lg K_B$ и оценивать отношения констант диссоциации по разности величин pA_2 .

Примером ошибок, связанных с совместной интерпретацией графиков Шилда существенно разного наклона,

является вывод о высокой селективности взаимодействия антагониста IPS 339 с адренорецепторами β_1 и β_2 [139]. Величины pA_2 , полученные из линейных графиков Шилда на тканях предсердия и трахеи морской свинки (наклон 1,32 и 0,66 соответственно), дают отношение констант диссоциации для двух типов адренорецепторов, равное 155. Аналогичные эксперименты в условиях, приводящих к незначительному различию наклона графиков

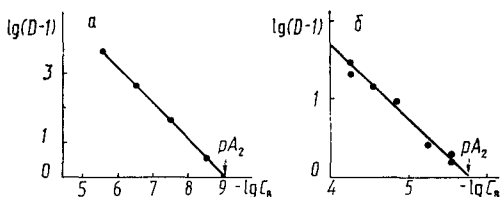


Рис. 6.5. Оценка величины pA_2 с помощью графика Шилда в случае конкурентного антагонизма. Миотропная реакция подвздошной кишки морской свинки на ацетилхолин (а) и гистамин (б) в присутствии атропина [47]

Шилда [192], дали для того же антагониста отношение констант диссоциации, близкое к трем, что согласуется с данными по специфическому связыванию [180].

Причины, приводящие к аномальному виду графиков Шилда для конкурентного антагонизма, связаны главным образом с различием концентраций агониста в рецепторном компартменте (действующая концентрация) и окружающем растворе (применяемая концентрация), а также с неравновесными условиями эксперимента [47, 121, 128, 150, 151, 164, 234]. Указанные факторы, как правило, приводят к нелинейности графиков Шилда, однако общепринятая практика использования линейной регрессии, особенно в ограниченной области изменения C_B , приводит к линейным графикам с наклоном, отличным от единицы.

Существенное снижение концентрации агониста в биофазе, из-за чего возникают ошибки в оценках дозовых отношений, может быть связано с процессами поглощения или деградации. Подобные механизмы, как правило, структурно специфичны и могут быть выявлены при использовании нескольких агонистов.

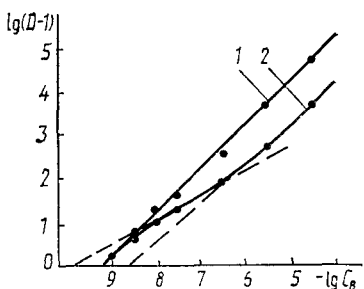
Влияние процессов поглощения на форму графиков Шилда хорошо изучено в случае адренергических рецепторов. Так, при совместном действии не поглощаемого

нейронами агониста изопреналина и β -адренорецепторного антагониста пропранолола на предсердия морской свинки получается график Шилда единичного наклона, а применение в тех же экспериментах агониста норадреналина приводит к графику Шилда с наклоном, существенно отличным от единицы [151]. Нелинейный график Шилда получен при совместном воздействии норадреналина и β -адренорецепторного антагониста фентоламина на ткань, интенсивно поглощающую норадреналин [164]. Применение непоглощаемого нервными окончаниями агониста метоксамина [234] приводит к линейному графику с наклоном, близким к единице.

Поглощение и деградация агониста обычно являются насыщаемыми процессами и характеризуются собственной константой равновесия. Если используемые концентрации агониста недостаточны для насыщения процесса поглощения, определенная, зависящая от концентрации доля агониста не попадает в рецепторный компартмент. Влияние антагониста в этих условиях может проявиться посредством двух механизмов, дающих сходные результаты. Во-первых, присутствие антагониста может сдвинуть кривую концентрация — эффект в область концентраций агониста, достаточных для насыщения процесса поглощения; во-вторых, сам антагонист может обладать сродством к центрам поглощения, блокируя поглощение агониста. После достижения насыщения скорость поглощения агониста не зависит от его концентрации и график Шилда имеет единичный наклон. Однако в области концентраций, соответствующих переходу к насыщению, график Шилда существенно нелинеен. Количественное описание изменения концентрации агониста в рецепторном компартменте в условиях насыщаемого поглощения агониста приведено в работах [121, 125]. В зависимости от соотношения скоростей процессов диффузии и поглощения агониста, а также области рассматриваемых концентраций антагониста могут быть получены нелинейные графики Шилда, линейные графики Шилда с наклоном меньше единицы, линейные графики Шилда с единичным наклоном и $pA_2 < -\lg K_B$ (рис. 6.6).

Влияние процесса поглощения агониста на форму графика Шилда и оценку величины K_B может быть в принципе установлено применением агентов, блокирующих поглощение [71, 125, 164] (рис. 6.6). В этом случае существует, однако, возможность одновременного блокирования рецепторов агониста, приводящая к сдвигу гра-

Рис. 6.6. Концентрационные зависимости дозовых отношений для миотропной реакции трахеи морской свинки на изопреналин в присутствии конкурентного антагониста пропранолола [125]: 1 — ткань обработана «необратимым ингибитором» дибенамином; 2 — предварительная обработка дибенамином не проводилась. Штриховыми линиями показаны возможные экстраполяции с помощью линейной регрессии различных участков кривой 2 в ограниченной области концентраций антагониста



фика Шилда в область низких значений pA_2 [152]. Это нежелательное при оценке K_B явление может быть обнаружено по снижению pA_2 при дальнейшем увеличении концентрации блокатора поглощения.

Снижение наклона графика Шилда при действии конкурентного антагониста может быть обусловлено побочными действиями высоких концентраций агониста: изменением pH раствора, вызывающим непосредственное рецепторами усиление реакции [134], высвобождением вторичных эндогенных агонистов, активацией рецепторов другого типа и т. п.

Если концентрация антагониста в биофазе лимитируется процессом диффузии, уравнение Шилда приобретает вид [180]:

$$\lg [D(t) - 1] = \lg C_B - \lg K_B + \lg [1 - \exp(-kt)], \quad (6.6.2)$$

где $D(t)$ — дозовое отношение в момент времени t ; k — константа скорости диффузии антагониста.

При времени инкубации ткани с антагонистом, недостаточном для достижения равновесия процесса диффузии, график Шилда сдвигается в область более низких значений pA_2 , сохраняя единичный наклон. С другой стороны, если не достигнуто равновесие образования антагонист-рецепторных комплексов, то

$$\lg [D(t) - 1] = \lg C_B - \lg K_B + \lg [f(C_B, t)], \quad (6.6.3)$$

где функция $f(C_B, t)$ возрастает от 0 до 1 с ростом времени инкубации и концентрации антагониста [150]. При малых временах инкубации зависимость $\lg(D-1)$ от $\lg C_B$ нелинейна; при аппроксимации ее линейной функ-

цией оценочные величины наклона превышают единицу.

Сочетание нескольких факторов, изменяющих наклон графика Шилда, может привести к взаимной компенсации. Интересный случай подобной компенсации описан в работе [150].

В экспериментах, выполнявшихся на трахее морской свинки, зависимость дозового отношения от концентрации антагониста пропранолола (агонист — норадреналин) в координатах Шилда оказалась линейной; если время инкубации составляло 30 мин, прямая имела единичный наклон при $pA_2=7,9$. Увеличение времени инкубации до 120 мин и добавление кокаина (блокатор поглощения норадреналина) вызвали изменение наклона — 0,9 и $pA_2=9,0$. Очевидно, что в первом эксперименте снижение наклона графика Шилда вследствие поглощения агониста компенсировалось его увеличением, связанным с недостаточным для достижения равновесия временем действия антагониста.

Таким образом, оценки констант диссоциации K_B , полученные с помощью графика Шилда, могут быть признаны надежными, если они не изменяются при увеличении времени инкубации препарата с антагонистом, при введении в систему дополнительных эффекторов или в зависимости от вида применяемого агониста.

6.7. ОЦЕНКА КОНСТАНТ ДИССОЦИАЦИИ АГОНИСТ-РЕЦЕПТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ С ПОМОЩЬЮ НЕОБРАТИМЫХ ИНГИБИТОРОВ И ЧАСТИЧНЫХ АГОНИСТОВ

В тех случаях, когда концентрации агониста C_A и C'_A , дающие равный эффект в отсутствие и в присутствии дополнительного лиганда, связаны простыми соотношениями, содержащими параметр K_A , метод нулевых уравнений может быть использован для оценки констант диссоциации агонист-рецепторных комплексов. Очевидно, что дополнительным лигандом, применяемым для этой цели, не может быть конкурентный антагонист: дозовые отношения в этом случае не зависят от сродства агониста к рецепторам. Нежелательно также применение соединений со сложным механизмом действия (например, неконкурентных или функциональных антагонистов). Наиболее удобным классом тестовых соединений для оценки констант K_A являются так называемые необра-

тимые ингибиторы — вещества, образующие с рассматриваемым типом рецепторов прочные медленно диссоциирующие комплексы.

Если исследуемый тест-объект предварительно обработан «необратимым ингибитором», то за время достижения равновесия в системе агонист — рецептор количество комплексов антагонист — рецептор Z_B^0 , имевшееся в момент времени $t=0$, практически не успевает измениться (см. рис. 4.2) и концентрация доступных агонисту рецепторов $Q' = Q - Z_B^0$. Концентрационная зависимость дозовых отношений задается в этом случае уравнением

$$D - 1 = \frac{Z_B^0/Q}{1 - Z_B^0/Q} \left(1 + \frac{C'_A}{K_A} \right). \quad (6.7.1)$$

Если Z_B^0 — равновесное значение, достигнутое при обработке препарата рецепторов антагонистом концентрации C_B , то для доли инактивированных рецепторов справедливо соотношение

$$Z_B^0/Q = \frac{C_B}{K_B + C_B}, \quad (6.7.2)$$

с учетом которого уравнение (6.7.1) превращается в уравнение (6.3.4), характерное для метакоидного антагонизма. Пример использования зависимости (6.7.1) для оценки параметров K_A , Z_B^0 приведен на рис. 6.7.

Другой способ графической оценки параметров K_A и Z_B^0/Q — представление зависимости (6.7.1) в координатах $1/C_A$, $1/C'_A$ [65]:

$$\frac{1}{C_A} = \frac{Z_B^0/Q}{(1 - Z_B^0/Q) K_A} + \frac{1}{(1 - Z_B^0/Q) C'_A}. \quad (6.7.3)$$

Соответствующий пример приведен на рис. 6.8.

Все рассмотренные выше уравнения для дозовых отношений получены в предположении, что речь идет о полных антагонистах, не способных генерировать сигнал ($\alpha=0$ или $e=0$). Однако дозовые отношения могут применяться также и для совместной оценки величин констант диссоциации частичных и полных агонистов. Если C_A , C_p — концентрации полного и частичного агониста, вызывающие равную реакцию, нулевое уравнение имеет вид

$$\frac{1}{C_A} = \frac{e_A}{K_A e_p} + \frac{K_p e_A}{K_A e_p C_p}. \quad (6.7.4)$$

Константа диссоциации для полного агониста при этом оценивается с точностью до отношения внутренних эффективностей e_A/e_p ; использование соотношения (6.7.4) целесообразно в тех случаях, когда имеется значительный рецепторный резерв [122, 243].

Отметим одну важную особенность оценок констант диссоциации комплекса агонист — рецептор, получаемых

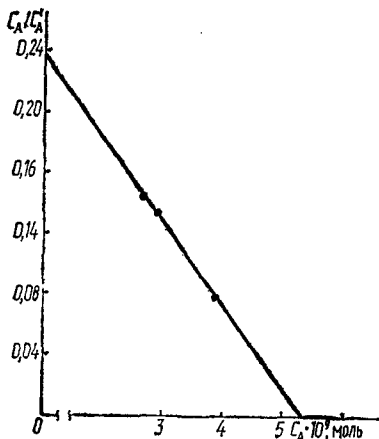


Рис. 6.7. Оценка константы диссоциации агониста и доли «инактивированных рецепторов» с помощью графика в координатах $\{C_A, C_A/C'_A\}$. Миотропная реакция полоски желудка крысы на ангиотензин в присутствии «необратимого ингибитора» $[\text{Sar}^1, \text{Leu}^8]$ -ангиотензина [205]

с помощью дозовых отношений: они не зависят от формы кривой $\rho(Z)$ [6]. Единственная гипотеза, касающаяся свойств этой функции, существенная при выводе нулевых уравнений — «равным величинам Z соответствует равная реакция», — представляется в большинстве случаев вполне правдоподобной¹.

Действительно, оценки констант K_A ряда агонистов мускариновых рецепторов, полученные на основании результатов экспериментов с использованием необратимого ингибитора дибенамина, а также оценки доли свободных рецепторов $1 - Z_B^0/Q$ довольно близко совпадают с данными прямых измерений с помощью радиоактивных лигандов (табл. 6.3 [122]).

¹ Как упоминалось выше, существуют кривые $\rho(Z)$, имеющие переходную форму, так что, вообще говоря, в приведенную формулировку следовало бы внести соответствующую оговорку. Однако, поскольку для анализа используются концентрационные зависимости дозовых отношений, возможность каких-либо недоразумений здесь исключена.

Таблица 6.3

Сопоставление оценок величин K , некоторых агонистов мускариновых рецепторов, а также доли свободных рецепторов $1 - Z_B^0/Q$, полученных различными способами в экспериментах с использованием необратимого ингибитора дибенамина [122].

Препарат	Оценки, полученные в экспериментах по связыванию радиоактивного лиганда		Оценки, полученные на основании фармакологических тестов с помощью уравнения (6.7.1)	
	K	$1 - Z_B^0/Q$	K	$1 - Z_B^0/Q$
Метахолин	5	—	1,7	0,40
Оксотреморин	0,5	—	0,5	0,45
Бетахенол	50	—	16,4	0,36
Пилокарпин	4	0,55	7,8	0,15

Таблица 6.4

Сравнение величин K_B и AC_{50} для некоторых антагонистов мускариновых и α -адренергических рецепторов [122]

Группа рецепторов	Антагонист	K_B ; оцененное по связыванию радиоактивного лиганда, моль	AC_{50} , оцененное на основании фармакологических тестов, моль
Мускариновые	Скополамин	$(2-3) \cdot 10^{-13}$	$3 \cdot 10^{-10}$
	Атропин	$(2-4) \cdot 10^{-10}$	$1 \cdot 10^{-10}$
α -Адренергические	Фентоламин	$15 \cdot 10^{-8}$	$1,5 \cdot 10^{-8}$
	Дигидроэрготамин	$1,5 \cdot 10^{-8}$	$0,5 \cdot 10^{-8}$
	Пропранолол	$2,7 \cdot 10^{-5}$	$6,8 \cdot 10^{-6}$

В работе [122] производится сопоставление оценок EC_{50} , полученных с помощью фармакологических тестов и соответствующих констант диссоциации, найденных в экспериментах по связыванию радиоактивного лиганда для антагонистов мускариновых и β -адренергических рецепторов; различия между этими оценками следует признать небольшими (табл. 6.4). Аналогичное сравнение осуществлено и для некоторых агонистов обеих групп; в большинстве случаев оценки, получаемые двумя способами, также оказались близкими (линейная форма $\rho(Z)$, или отсутствие «рецепторного резерва»), хотя в некоторых случаях различия достигали одного — двух поряд-

ков (выпуклая форма $\rho(Z)$, или наличие «рецепторного резерва»).

Упомянутая оценка константы диссоциации ангиотензина, оцененная с помощью дозовых отношений при использовании «необратимого ингибитора» оказалась примерно вдвое меньше соответствующей величины EC_{50} [205]; в другом обсуждающемся выше примере

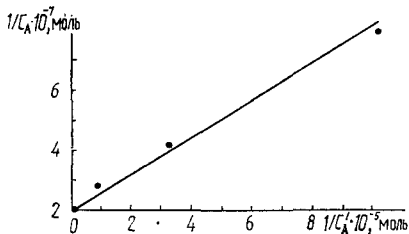


Рис. 6.8. Оценка константы диссоциации агониста и доли «ин- активированных рецепторов» с помощью графика в координа- тах $\{1/C_A', 1/C_A\}$. Реакция по- лоски желудка кролика на кар- бахола в присутствии «необра- тимого ингибитора» дибенами- на [65]

(рис. 6.8) величина константы диссоциации карбахола с мускариновыми рецепторами превысила EC_{50} в 75 раз, что также указывает на выпуклую форму функции $\rho(Z)$.

6.8. ПРИМЕРЫ КОМПЛЕКСНОГО ПОДХОДА К ИДЕНТИФИКАЦИИ СЛОЖНЫХ МОДЕЛЕЙ АНТАГОНИЗМА

Рассмотрим в заключение два очень удачных приме- ра однозначной идентификации типа антагонизма на ос- новании результатов хорошо спланированной серии экс- периментов. Первый из этих примеров относится к метаффиноидному антагонизму—механизму взаимодей- ствия двух эффекторов, представлявшемуся скорее гипоте- тическим до обсуждаемых ниже работ Кларка и Мит- челсона [85] и Стоктона с соавт. [219]. Второй пример базируется на серии работ Ван ден Бринка [193, 237, 238], предложившего и экспериментально обосновавшего модель функционального антагонизма с рецепторным резервом (см. также параграф 4.6).

Галламин — соединение, обычно используемое в ка- честве нейромускулярного блокатора,— проявляет не- стандартные свойства при взаимодействии с агонистами мускариновых рецепторов. Подавляя отрицательный инотропный эффект ацетилхолина и карбахола [85], гал- ламин вызывает параллельный сдвиг кривых концент- рация агониста — эффект (рис. 6.9, а) без снижения

максимальной реакции. С ростом концентрации галламина сдвиг кривых доза — эффект достигает предельного значения, что соответствует стационарному уровню дозовых отношений на графиках Шилда (рис. 6.9, б).

Исследование совместного влияния галламина и конкурентного мускаринового антагониста атропина на отрицательный инотропный эффект ацетилхолина [85] убедительно подтверждает неконкурентный характер рассматриваемого взаимодействия. Полученные при совместном действии обоих антагонистов дозовые отношения оказались достоверно более низкими, чем ожидаемые дозовые отношения для двух конкурентных антагонистов (см. параграф 6.5). В концентрациях, превышающих 10^{-7} моль, атропин, применяемый отдельно, дает

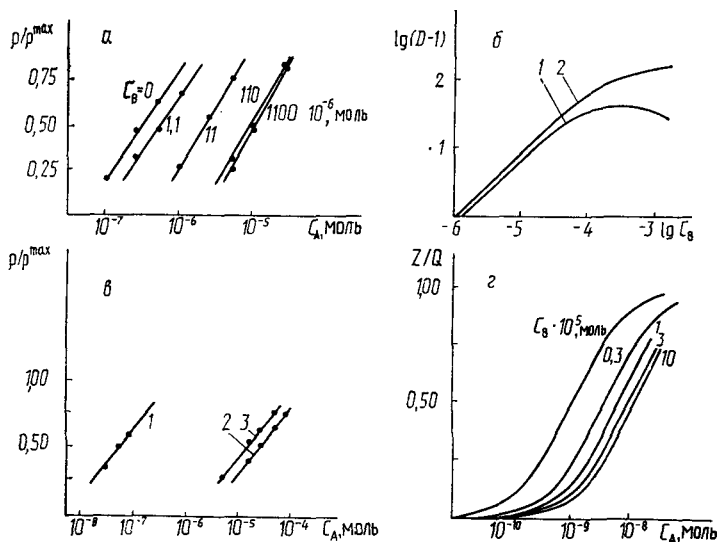


Рис. 6.9. Взаимодействие галламина с агонистами и антагонистами мускариновых рецепторов: а — концентрационные зависимости отрицательного инотропного эффекта ацетилхолина на изолированном предсердии морской свинки в присутствии галламина [85]; б — зависимость дозовых отношений ацетилхолина (1) и карбохола (2) от концентрации галламина [85]; в — влияние атропина и галламина на отрицательный инотропный эффект ацетилхолина на изолированном предсердии морской свинки [85] (1 — контроль; 2 — ацетилхолин в присутствии $4 \cdot 10^{-5}$ моль атропина; 3 — ацетилхолин в присутствии $4 \cdot 10^{-5}$ моль атропина и $1,1 \cdot 10^{-6}$ моль галламина); з — концентрационные зависимости специфического связывания $[^3\text{H}]\text{N}$ -метилскополамина гомогенатом тканей сердца крысы в присутствии галламина [219]

более высокие дозовые отношения, чем в комбинации с $1,1 \cdot 10^{-4}$ моль галламина (рис. 6.9, в). Интересно, что в аналогичных экспериментах с агонистом карбахолом отличия дозовых отношений от величин, ожидаемых для пары конкурентных антагонистов, недостоверны.

Таким образом, полученные в работе [85] результаты не могут быть объяснены в рамках моделей конкурентного антагонизма. Сохранение величины максимального эффекта при высоких концентрациях галламина исключает также предположение о метакоидном или смешанном характере антагонизма. Семейства кривых концентрация—эффект, полученные при взаимодействии галламина с мускариновыми агонистами, и форма графика Шилда (рис. 6.9, а и б) весьма характерны для метаффиноидного антагонизма в модели сильно связанных рецепторных центров агониста и антагониста (см. параграф 4.5). В рамках этой же модели могут быть объяснены результаты совместного применения галламина и атропина. Действительно, как показано в параграфе 6.5, при добавлении метаффиноидного антагониста в систему, содержащую агонист и конкурентный антагонист, кривые доза — эффект могут смещаться в область более низких концентраций агониста. Необходимые для проявления этого эффекта концентрации конкурентного антагониста B_1 и метаффиноидного антагониста B_2 должны соответствовать дозовым отношениям $D_1 > D_2$ при величинах D_2 , близких к предельному значению D^{\max} . Оценочные значения D^{\max} , полученные из графиков Шилда (рис. 6.9, б), составляют ~ 40 для ацетилхолина и ~ 200 для карбахола. В случае агониста ацетилхолина применяемые концентрации атропина ($D_1 \simeq \simeq 100$) и галламина вполне удовлетворяют указанным условиям, что обеспечивает наблюдаемое соотношение величин $D_{12} < D_1$. Напротив, если реакция вызвана действием карбахола, концентрация галламина ($1,1 \cdot 10^{-4}$ моль), применяемого совместно с атропином, соответствует дозовым отношениям $D_2 \simeq 60$, недостаточным для достоверного различия величин D_{12} и $(D_1 + D_2 - 1)$, определяемых со значительными погрешностями.

Некоторые особенности взаимодействия галламина с мускариновыми агонистами (ограниченный параллельный сдвиг кривых концентрация — эффект) могут быть в принципе получены в рамках модели функционального антагонизма (см. параграф 4.6). Эта модель, однако, не объясняет характера сдвигов концентрационных зависи-

мостей эффекта ацетилхолина в присутствии атропина и галламина; как будет показано ниже, влияние функционального антагониста и влияние конкурентного антагониста, селективно взаимодействующего с рецепторами агониста, должны быть независимыми. Кроме того, результаты экспериментов по связыванию радиоактивных лигандов мускариновых рецепторов гомогенатом тканей сердца крысы в присутствии галламина [219] вполне согласуются с данными измерения биологической реакции *in vitro*. Галламин вызывает ограниченный параллельный сдвиг концентрационных зависимостей специфического связывания меченного тритием мускаринового антагониста метилскополамина (рис. 6.9, з).

Кажущиеся константы диссоциации \bar{K}_A для метилскополамина, определенные из кривых $Z(C_A, C_B)$, хорошо аппроксимируются уравнением

$$\bar{K}_A = K_A \frac{1 + C_B/K_B}{1 + C_B/K_{BA}}, \quad (6.8.1)$$

а полученные в результате аппроксимации значения константы диссоциации для галламина (K_B и K_{BA}) подчиняются соотношению (4.5.5) с $1/\kappa \approx 13$.

Предполагая, что связывание радиоактивного лиганда в присутствии галламина и третьего эффектора описывается схемой (6.5.4), авторы работы [219] оценивают величины $D^{\max} = 1/\kappa$ для ряда мускариновых агонистов и антагонистов. Значения D^{\max} , полученные для ацетилхолина (100) и карбахола (78), не совпадают с оценками, сделанными по результатам экспериментов *in vitro*. Независимо от причин указанного расхождения (нелинейная зависимость эффекта от оккупации, погрешности многопараметрической аппроксимации и т. п.) данные работы [219] подтверждают предположение о метаффиноидном механизме взаимодействия между галламином и мускариновыми лигандами.

Наиболее полно исследованными примерами функционального антагонизма являются взаимодействия эффекторов, сокращающих и расслабляющих гладкую мускулатуру. К первым относятся, в частности, агонисты ацетилхолинового ряда и гистаминподобные соединения, ко вторым — активаторы β -адренергических рецепторов.

На рис. 6.10, а, б представлены концентрационные зависимости сократительной реакции трахеи теленка на метахолин и гистамин в присутствии β -адренергического

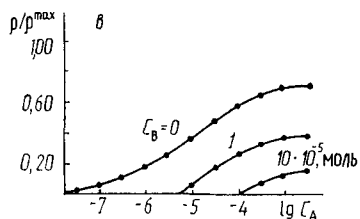
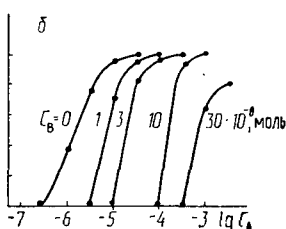
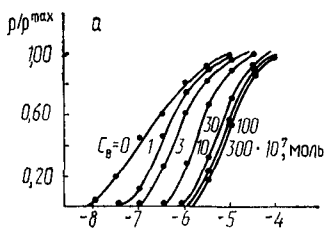


Рис. 6.10. Зависимости концентрации агониста — эффект в присутствии функционального антагониста: *а, б* — миотропная реакция трахеи теленка соответственно на метахолин и гистамин в присутствии *l*-изопrenalина [237, 238]; *в* — миотропная реакция трахеи морской свинки на метахолин в присутствии 1-(3,5-диоксифенил)-2-мет-

тиламиноэтанола. Ткань предварительно обработана «необратимым ингибитором» феноксибензамином [193]

агониста *l*-изопrenalина [237, 238]. Оба семейства кривых доза — эффект качественно согласуются с моделью функционального антагонизма [237], учитывающей рецепторный резерв в общей эффекторной системе агониста и антагониста (см. параграф 4.6). Любопытно, что один и тот же функциональный антагонист проявляет частичный антагонизм в отношении эффекта, вызванного холиномиметиком метахолином (сдвиг кривых на рис. 6.10, *а* достигает предельного значения при концентрациях *l*-изопrenalина порядка 10^{-4} моль, а величина максимальной реакции остается неизменной), и полный антагонизм к реакции на гистамин (снижение максимального эффекта и отсутствие признаков ограничения сдвига кривых на рис. 6.10, *б* при высоких концентрациях антагониста).

Типичные кривые доза—эффект для функционального антагонизма в отсутствие резерва представлены на рис. 6.10, *в*. В этом случае рецепторный резерв устранен предварительной обработкой ткани «необратимым ингибитором» феноксибензамином [193]. Заметим, что эта обработка сказалась также на относительной эффективности холинергической и β -адренергической эффекторных систем (увеличение параметра γ в уравнении (4.6.4)), поскольку на рис. 6.10, *в* очевидна тенденция к полному подавлению реакции функциональным антагонистом.

Концентрационные зависимости, подобные представ-

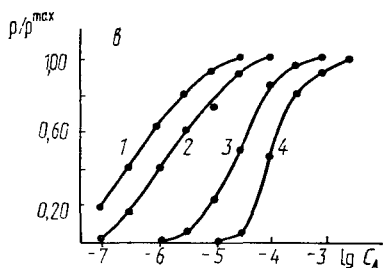
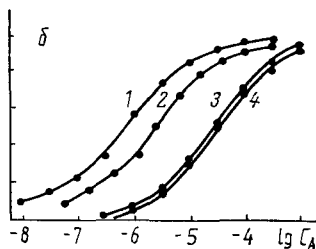
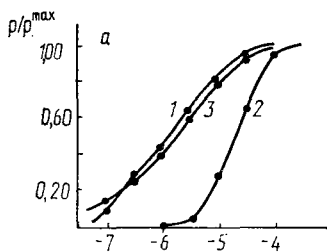


Рис. 6.11. Многоступенчатая реакция трахеи морской свинки на метахолин в присутствии β -адренергического агониста *l*-изопреналина, конкурентного β -адренергического антагониста атропина [193]: *a* — 1 — контроль; 2 — 10^{-6} моль изопреналина; 3 — 10^{-6} моль изопреналина + 10^{-6} моль пропранолола; *б* — 1 — контроль; 2 — $3 \cdot 10^{-9}$ моль атропина; 3 — 10^{-6} моль изопреналина; 4 — $3 \cdot 10^{-9}$ моль атропина + 10^{-5} моль изопреналина; *в* — 1 — контроль; 2 — $3 \cdot 10^{-9}$ моль атропина; 3 — 10^{-5} моль изопреналина; 4 — $3 \cdot 10^{-9}$ моль атропина + 10^{-5} моль изопреналина

ленным на рис. 6.10, *a*, сходны с семействами кривых концентрация—эффект в случае конкурентного или метаффиноидного антагонизма. Дискриминация этих типов антагонизма может проводиться путем анализа дозовых отношений (см. параграф 6.3) или введением дополнительного эффектора (см. параграф 6.4). Выше уже обсуждалось изменение характера кривых концентрация—эффект при действии «необратимого ингибитора». Антагонизм, характеризующийся семейством кривых, представленных на рис. 6.10, *в*, уже не может быть ошибочно принят за конкурентный или метаффиноидный. С другой стороны, признаки, отличающие функциональный антагонизм от метакоидного,— рост EC_{50} с ростом концентрации антагониста и наличие пороговых концентраций агониста — также выражены вполне отчетливо (рис. 6.10, *в*).

Убедительные доказательства функционального механизма взаимодействия метахолина и *l*-изопреналина получены в экспериментах с применением стандартных конкурентных антагонистов. Для холинергической системы таковым является атропин, для β -адренергической — пропранолол. Влияние возможных попарных сочетаний

Признаки различных типов антагонизма

Тип, модель антагонизма	Изменение кривых концентрация — эффект с ростом C_B				
	Сдвиг		EC_{50}/EC_{50}^0	$\rho^{\max}/\rho_0^{\max}$	
	параллельный	ограниченный			
Конкурентный или химический Бесконкурентный		+	—	$1+C_B/K_B$	1
		—	—	1	1
Смешанный		—	—	$1+C_B/K_B$	$1+C_B/K_B$
		—	—	$1+C_B/K_{AB}$	$1+C_B/K_{AB}$
Метакоидный	Полный	—	—	1	$\frac{1}{1+C_B/K_B}$
		—	+		$\frac{\beta}{1+K_B/C_B}$
Метаффиноидный, модель слабо связанных рецепторов агониста и антагониста	Частичный	+	+	$1+C_B/K_{AB}$	1
		—	+	$1+C_B/K_B$	1
Метаффиноидный, модель сильно связанных рецепторов агониста и антагониста		—	+	Двуступенчатые кривые концентрация—эффект	1
Функциональный (физический) антагонизм; классическая модель	Полный	—	—	Увеличение EC_{50} с ростом C_B	$1 - \frac{\gamma}{1+K_B/C_B}$; $\gamma \geq 1$
		—	+	Существует предельное значение EC_{50}	То же соотношение при $\gamma < 1$; $\rho^{\max}/\rho_0^{\max} \geq 1 - \gamma$
Функциональный (физический) антагонизм; модель, учитывающая рецепторный резерв	Полный	—	—	Увеличение IC_{50} с ростом	1 при низких C_B ; снижение ρ^{\max} при высоких C_B
		—	+	Существует предельное значение EC_{50}	Возможно сниженное ρ^{\max} при высоких C_B

Тип, модель антагонизма		Концентрационные зависимости дозовых отношений		
		$f(C_A, C_B)$ в уравнении $D-1=f(C_A, C_B)$	Особенности графиков зависимости $D-1$ от	
			C_B	C_A
Конкурентный или химический		C_B / K_B	Прямая с наклоном $1/K_B$. В логарифмическом масштабе: наклон = -1 , пересекает ось абсцисс в точке $pA_2 = -\lg K_B$	Не зависит
Бесконкурентный		$\frac{C_B}{K_B} \quad \frac{C_A}{K_A}$	Прямая, проходящая через начало координат, наклон $\sim C_A$	Прямая, проходящая через начало координат, наклон $\sim C_B$
Смешанный		$\frac{C_B}{K_B} + \frac{C_B}{K_{AB}} \frac{C_A}{K_A}$	Прямая, проходящая через начало координат	Прямая, пересекающая ось ординат в точке C_B / K_B ; наклон $\sim C_B$
Метакоидный	Полный Частичный	$\frac{C_B}{K_B} \left(1 + \frac{C_A}{K_A} \right)$	Прямая, проходящая через начало координат	Прямая, пересекающая ось ординат в точке C_B / K_B ; наклон $\sim C_B$
Метаффиноидный, модель слабо связанных рецепторов агониста и антагониста		$\frac{D^{\max} - 1}{1 + D^{\max} K_B / C_B}$	Нелинейная зависимость, достигающая с ростом C_B равновесного уровня $D^{\max} - 1 = \frac{K_{AB} - K_B}{K_B}$	Не зависит

Тип, модель антагонизма		Концентрационные зависимости дозовых отношений		
		$f(C'_A, C_B)$ в уравнении $D-1 = f(C'_A, C_B)$	Особенности графиков зависимости $D-1$ от	
			C_B	C'_A
Метаффиноидный, модель сильно связанных рецепторов агониста и антагониста		$D^{\max}_{-1} / 1 + \frac{K_B}{C_B} + \frac{D^{\max}_{-1}}{1 + C'_A/K_A} \times \frac{K_B}{C_B}$	Нелинейные зависимости, достигающие с ростом C_B равновесного уровня $D^{\max}_{-1} = \frac{K_{AB} - K_A}{K_A}$	
Функциональный (физический) антагонизм; классическая модель	Полный Частичный	$\frac{(1 + C'_A/K_A)^2}{C'_A/C_{II} - 1}$	Сложная нелинейная зависимость	Параболическая зависимость с минимумом при $C'_A = K_A + 2C_{II}$
Функциональный (физический) антагонизм; модель, учитывающая рецепторный резерв	Полный Частичный		С ростом C_B достигается равновесный уровень дозовых отношений	Снижение D с ростом C'_A ; минимум и последующее увеличение D могут отсутствовать
Тип, модель антагонизма		Дозовые отношения в присутствии дополнительного конкурентного антагониста B_1	Другие особенности, примечания	
Конкурентный или химический		$D_{12} = D_1 + D_2 - 1$	Возможные причины нестандартных зависимостей D от C_B рассмотрены в параграфе 6.6	
Бесконкурентный		$D_{12} = D_1 D_2$	Слабо проявляется при низких концентрациях агониста $C_A \ll K_A$	

Тип, модель антагонизма	Дозовые отношения в присутствии дополнительного конкурентного антагониста B_1	Другие особенности, примечания
Смешанный	$D_{12} = \gamma D_1 D_2$, где γ зависит от соотношения величин C_{B1} / K_{B1} , C_{B1} / K_{B2B1} и C_{B2} / K_{B2} ; обычно $0 < \gamma \leq 1$	При $K_{AB} \gg K_B$ близок к конкурентному антагонизму, при $K_{AB} \ll K_B$ — к бесконкурентному, при $K_{AB} \approx K_B$ — к полному метакоидному антагонизму
Метакоидный	$D_{12} = D_1 D_2$	
Метаффиноидный, модель слабо связанных рецепторов агониста и антагониста	$D_{12} = \gamma (D_1 - 1) + D_2$; возможно соотношение $D_{12} < D_1$	Условия, при которых выполняется соотношение $D_{12} < D_1$ и уравнение для γ , см. в параграфе 6.5
Метаффиноидный, модель сильно связанных рецепторов агониста и антагониста	Сложное многопараметрическое соотношение между D_{12} , D_1 и D_2	При промежуточных концентрациях агониста $C_B \approx K_B$ фактически происходит образование двух типов агонист-рецепторных комплексов с константами диссоциации K_A и K_{AB}
Функциональный (физический) антагонизм; классическая модель	$D_{12} = D_1 + D_2$	При функциональном антагонизме существуют пороговые концентрации агониста C_{II} , ниже которых эффект не наблюдается. При физическом антагонизме концентрации агониста $C_B < C_{II}$ вызывают эффект противоположного знака
Функциональный (физический) антагонизм; модель, учитывающая рецепторный резерв		

перечисленных антагонистов на сократительную реакцию трахеи морской свинки под действием метахолина иллюстрируется рис. 6.11. Пропранолол снимает антагонистическое действие изопrenalина (рис. 6.11, *a*), не оказывая влияния на конкурентный антагонизм атропин — метахолин (рис. 6.11, *б*). Это доказывает, что пары эффекторов изопrenalин—пропранолол и метахолин—атропин воздействуют на разные типы рецепторов. В таком случае антагонистические эффекты изопrenalина и атропина должны быть независимыми и аддитивными, что подтверждается семейством кривых на рис. 6.11, *в*.

Итак, анализ зависимостей концентрация—эффект, дозовых отношений, а также результатов экспериментов с применением стандартных дополнительных эффекторов позволяет вполне однозначно идентифицировать механизмы сложных антагонистических взаимодействий (табл. 6.5). В гл. 4 и 6 не рассматривались временные зависимости развития реакции для различных моделей антагонизма. Кинетические уравнения для случая конкурентного взаимодействия двух лигандов с одним типом рецепторов получены в параграфе 2.3. Эти уравнения могут в принципе использоваться для интерпретации результатов относительно простых экспериментов по кинетике связывания меченых лигандов. Анализ кинетических зависимостей биологической реакции в присутствии антагониста требует введения дополнительных, по большей части произвольных допущений о форме функции $\rho(C_A, C_B, t)$, приводящих к громоздким многопараметрическим уравнениям, интерпретационная ценность которых относительно невелика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей книге, разумеется, далеко не полностью охвачен материал, относящийся к исследованиям в области теории рецепторов, даже в принятой нами узкой ее трактовке — кинетика и равновесие связывания эффектора и развития индуцируемой им реакции. Надеемся, во всяком случае, что нам удалось избежать крупных пробелов. Некоторые читатели отметят, однако, что в книге полностью обойден вопрос об анализе температурных зависимостей констант диссоциации лиганд-рецепторного комплекса и различных кинетических констант.

Анализ такого рода предпринимался в ряде работ [249, 250]. Как утверждается в работе [251]: «Термодинамический анализ позволяет осуществить полезный подход к оценке энергетики лиганд-рецепторных взаимодействий... Особенно интересны взаимодействия агонистов и антагонистов с β -адренорецепторами, поскольку было показано, что взаимодействия антагонистов с рецепторами обусловлены энтропийным выигрышем, в то время как связывание даже близких в структурном отношении агонистов обусловлено снижением энтальпии, компенсирующим термодинамически невыгодное снижение энтропии... Невыгодное снижение энтропии, наблюдавшееся в опытах по связыванию агонистов β -адренорецепторами, как предполагается, отражает индуцированные агонистом конформационные изменения рецептора».

Во многих статьях можно встретить такое вот многозначительное заключение о конформационных перестройках, сделанное на основании немудреных феноменологических оценок. Впрочем, в рассмотренном случае действительно скорее всего не обошлось без таких перестроек, хотя и не вполне в том смысле, как это полагают авторы [251].

Описанный выше результат — один из многочисленных примеров так называемого компенсационного эффекта, заключающегося в следующем: некие весьма сходные процессы характеризуются близкими значениями K и соответственно свободной энергии связывания ΔF_c (или констант скоростей k_i и свободной энергии активации ΔF_a), однако доля вкладов энтропийного и энтальпийного членов в ΔF различается очень сильно. Например, оценки энергии активации диффузии через клеточную мембрану дают для ионов калия и натрия сравнимые величины (50,2 и 53,2 кДж/моль соответственно), однако вклад энтальпийного члена ΔH различается вдвое — 97,0 и 46,9 кДж/моль. Это различие «компенсируется» за счет энтропийного члена, причем, как и в цитированной выше работе, энтропийные эффекты ΔS различаются даже по знаку, составляя 157 и $-20,9$ Дж/моль·град [138]. «Компенсационный эффект» наблюдался во многих сходных ситуациях, причем не только в опытах с биологическим материалом. Критическое рассмотрение подобного рода результатов предпринято в работе [4]. Здесь отмечается то обстоятельство, что анализ температурных зависимостей констант диссоциации или кинетических констант с помощью уравнений Аррениуса и Вант-Гоффа имеет смысл лишь в том случае, если соответствующие величины ΔH , ΔS от температуры не зависят. Однако в биологическом эксперименте дело чаще всего обстоит как раз наоборот: основные молекулярные и надмолекулярные структуры, взаимодействие с которыми определяет прежде всего величину ΔH , очень чувствительны к изменению температуры [21]. Соответственно ΔH оказывается зависимой от температуры; эту зависимость в некоторой окрестности T_0 можно представить в виде

$$\Delta H(T) \simeq \Delta H(T_0) + b(T - T_0), \quad (3.1.1)$$

тогда

$$K = A e^{\left(\frac{\Delta S + b}{R}\right)} e^{-\left(\frac{\Delta H + bT_0}{RT}\right)} \quad (3.1.2)$$

или

$$k_i = \frac{kT}{h} e^{\left(\frac{\Delta S_i - b}{R}\right)} e^{-\left(\frac{\Delta H + bT_0}{RT}\right)} \quad (3.1.3)$$

Здесь ΔS полагается не зависящей от температуры; разумеется, это тоже может оказаться не так, и тогда неопределенность оценок ΔH , ΔS еще более возрастает.

Температурные зависимости констант K , k_i , определяемых уравнениями (3.1.2), (3.1.3), будучи представленными в координатах Аррениуса или Вант-Гоффа, дадут прямые линии, однако оценки

$$\Delta\tilde{S} = \Delta S - b, \quad (3.1.4)$$

$$\Delta\tilde{H} = \Delta H(T_0) + bT_0 \quad (3.1.5)$$

не будут иметь большой ценности; как свидетельствуют некоторые данные [36], добавочные члены b , bT_0 в (3.1.4), (3.1.5) имеют порядок самих величин ΔS , $\Delta H(T_0)$. Действительно, пусть $\Delta H(T_0) = 30$ кДж/моль, $\Delta S = -40$ Дж/моль·град. Эксперимент проводится в интервале температур 290—310 К; $T_0 = 300$ К, так что $\Delta F(T_0) = 42$ кДж/моль. Если в этом интервале величина ΔH меняется на 2 кДж/моль ($b = 0,025$), оценки в форме (3.1.4), (3.1.5) дадут величины $\Delta\tilde{H} = 60$ кДж/моль и $\Delta\tilde{S} = -140$ Дж/моль·град. Даже если изменение ΔH в тех же пределах составит лишь 0,4 кДж/моль ($b = 0,005$), получаем $\Delta\tilde{H} = 36$ кДж/моль и $\Delta\tilde{S} = -60$ Дж/моль·град.

Столь значительные искажения оценок появляются уже при так слабо выраженной зависимости ΔH от температуры; между тем в опытах по связыванию меченых лигандов рецепторами неоднократно отмечалась гораздо более сильная зависимость $\Delta H(T)$ вплоть до нелинейности аррениусовских графиков [108, 195, 216, 242]. Поэтому различия в оценках ΔH , ΔS для антагонистов и агонистов β -адренорецепторов, о которых шла речь в цитированной выше работе [251], скорее всего просто отражают разницу в одну-две сотые в величине параметра b уравнения (3.1.3).

Приведенный пример свидетельствует о том, что получение отдельных оценок ΔH , ΔS имеет смысл лишь в том случае, если гарантируется, что в исследуемом интервале температур изменение величины ΔH составляет менее 0,5% на 10°. Естественно, чаще всего таких гарантий никто дать не может.

* *
*

В книге не нашел отражения и еще один аспект, крайне важный для использования теории рецепторов в практике биохимических и фармакологических исследований.

Дело в том, что все рассматривавшиеся здесь модели применимы почти исключительно в тех случаях, когда речь идет о не очень высоких концентрациях агониста и не очень больших временах его действия, так как все они предполагают выход к новому «насыщающему» значению ρ при возрастании концентрации агониста (исключение здесь составляет лишь модель автоингибирования) или к новому равновесному уровню (вообще говоря, отличному от исходного) при больших временах. На самом деле почти всегда при очень больших концентрациях агониста наблюдается угнетение реакции, при очень больших временах наступают адаптационные явления, чаще всего заключающиеся в возвращении величины ρ к исходному значению. Здесь срабатывают механизмы, «внешние» по отношению к применяемым моделям; их включение в явной форме в расширенную модель нецелесообразно и нереально, так как модель получится чересчур громоздкой и неработоспособной.

Поэтому крайне важной задачей является обоснование в каждом конкретном случае «автономности» исследуемых рецепторных механизмов в рамках данного эксперимента, например получение критериев выхода кинетических кривых к квазиравновесному уровню или формальных признаков наличия выраженного участка плато на кривых концентрация—эффект. К сожалению, попытки получения критериев подобного рода до сих пор, по видимому, не предпринимались, хотя их отсутствие является во многих случаях источником недоразумений содержательного характера и значительных погрешностей оценок параметров моделей.

Уместно ли в самых последних строках книги указывать на еще одно ограничение возможностей приложения элементов теории рецепторов? Многие исследователи уже питают в ее отношении изрядный скепсис, правда, мотивированный чаще всего некими интуитивными посылками, но довольно стабильный. Может быть, их позиция вполне оправдана?

Конечно же, строгим ответом должно быть совершенно решительное «нет». И тот факт, что наша книга изобилует описаниями различного рода опасностей, подстерегающих пользователей-прикладников, вовсе этому не противоречит. Как раз наоборот: мы хотим подчеркнуть, что с помощью уравнений теории рецепторов из экспериментальных зависимостей концентрация—эффект и время—эффект можно извлечь массу полезной и совершен-

но неочевидной информации. Высказанные же предостережения лишь напоминают о простой истине, что делать это следует корректно и с полным сознанием возможностей применяемого метода обработки данных. Именно трафаретное и некритичное применение некоторых приемов, произвольная трактовка результатов обработки, попытка извлечь с ее помощью из экспериментального материала информацию о механизмах исследуемых процессов, которая в принципе не может быть из него получена,— все это обусловило в значительной мере упоминавшийся скептицизм части исследователей.

Теория рецепторов продолжает развиваться. С одной стороны, появляются все более сложные модели, с другой, совершенствуются вычислительные методы, повышается культура использования теоретических построений для количественного анализа полученных результатов и целенаправленного планирования схемы экспериментов. Как раз второй аспект развития теории нам представляется в настоящее время более важным, и мы старались привести некоторые аргументы в пользу такой позиции в этой книге.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ахрем А. А., Галактионов С. Г., Голубович В. П.* Исследование стехиометрических условий взаимодействия с рецептором молекул некоторых биогенных аминов и их аналогов // *Биофизика*.— 1980.— Т. 25.— С. 375—378.
2. *Ахрем А. А., Галактионов С. Г., Голубович В. П.* Конформации биогенных аминов.— Мн.: Наука и техника, 1979.— 176 с.
3. *Бирштейн Т. М., Птицын О. Б.* Конформации макромолекул.— М.: Наука, 1964.— 392 с.
4. *Блюменфельд Л. А.* Проблемы биологической физики.— М.: Наука, 1974.— 176 с.
5. *Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В.* Кинетические методы в биохимических исследованиях.— М.: Из-во МГУ, 1982.— 344 с.
6. *Галактионов С. Г., Никифорович Г. В., Чипенс Г. И., Шендерович М. Д.* Ангиотензин. Молекулярные механизмы действия.— Рига: Зинатнс, 1979.— 183 с.
7. *Галактионов О. Г., Юрин В. М.* Мембранотропные эффекты: кинетика и равновесие // Регуляция функций мембран растительных клеток.— Мн.: Наука и техника, 1979.— С. 12—37.
8. *Галактионов С. Г., Цейтин В. М., Леонова В. И., Николайчик В. В., Михнева Л. М.* Пептиды группы «средних молекул» // *Биоорг. химия*.— 1984.— Т. 10.— С. 5—17.
9. *Гамильтон У. К.* Метод наименьших квадратов и проверка линейных гипотез // *Худсон Д.* Статистика для физиков.— М.: Мир, 1970.— С. 206—252.
10. *Дашевский В. Г.* Конформации органических молекул.— М.: Химия, 1974.— 232 с.
11. *Джейкобс С., Куатреказас П.* Рецептор инсулина // *Взаимодействие гормонов с рецепторами*.— М.: Мир, 1979.— С. 40—54.
12. *Ерухимович И. Я., Бондарева А. П., Ландау М. А.* Теоретический анализ кооперативности связывания катионов переходных металлов с сывороточным альбумином и γ -глобулином // *Жури. физ. химии*.— 1981.— Т. 55.— С. 870—873.
13. *Калер Г. В.* Кооперативные перестройки биологических мембран: модель перестроек без изменения сродства рецепторных центров связывания к лиганду // *Биофизика*.— 1984.— Т. 27.— С. 97—104.
14. *Клотц И.* Взаимодействия белков // *Белки / Под ред. Нейрата и Бейли*.— М.: ИЛ., 1956.— Т. 2.— С. 521—601.
15. *Кокс Д., Хинкли Д.* Теоретическая статистика.— М.: Мир, 1978.— 560 с.
16. *Комиссаров И. В.* Элементы теории рецепторов в молекулярной фармакологии.— М.: Медицина, 1969.— 215 с.

17. Кондратьев В. Н. Кинетика химических газовых реакций.— М.: Химия, 1958.— 320 с.
18. Корнш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики.— М.: Мир, 1979.— 280 с.
19. Курганов Б. И., Дорошко А. И., Синельникова Э. М., Каган З. С. Оценка ошибки переменного коэффициента Хилла, использованного для анализа необычного кинетического поведения «биосинтетической» L-треониндегидрадазы // Докл. АН СССР.— 1972.— Т. 203.— С. 1414—1417.
20. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты.— М.: Наука, 1978.— 246 с.
21. Ландау М. А. Молекулярные механизмы действия физиологически активных соединений.— М.: Наука, 1981.— 262 с.
22. Леви Дж. С. Предисловие // Взаимодействие гормонов с рецепторами.— М.: Мир, 1979.— С. 8—9.
23. Матардзе Г. Д., Рукайя М. Х., Смирнов А. Н., Розен В. Б. Многокомпонентная система эстрогенсвязывающих белков печени: характеристика связывающих свойств крупномолекулярного белка печени крыс, сходного с рецепторами эстрадиола матки // Биохимия.— 1979.— Т. 44.— С. 1484—1492.
24. Математическое обеспечение ЕС ЭВМ / Ин-т математики АН БССР.— Мн., 1980.— Вып. 25.— С. 17.
25. Никифорович Г. В., Галактионов С. Г., Чипенс Г. И. Конформации пептидных биорегуляторов.— М.: Медицина, 1983.— 192 с.
26. Попкова Г. А., Астапова М. В., Иванов В. Т. Рецепторное связывание ³H-брадикинина плазматическими мембранами клеток миомерия крыс // Биоорг. химия.— 1979.— Т. 5.— С. 516—525.
27. Программное обеспечение ЭВМ / Ин-т математики АН БССР.— Мн. 1983.— Вып. 44.— С. 35.
28. Розен В. Б., Смирнов А. Н. Рецепторы и стероидные гормоны.— М.: Изд-во МГУ, 1981.— 312 с.
29. Себер Дж. Линейный регрессионный анализ.— М.: Мир, 1980.— 455 с.
30. Силонова Г. В., Ливанова Н. Б., Курганов Б. И. Аллостерическое ингибирование фосфорилазы Б из мышц кролика // Мол. биол.— Т. 3.— С. 768—784.
31. Уолтер Ч. Кинетика ферментативных реакций.— М.: Мир, 1969.— 240 с.
32. Химмельблау М. Д. Анализ процессов статистическими методами.— М.: Мир, 1973.— 697 с.
33. Хуссон Д. Статистика для физиков.— М.: Мир, 1970.— 296 с.
34. Эйринг Г., Эрри Д. У. Термодинамика и химическая кинетика // Теоретическая и математическая биология / Под ред. Т. Г. Уотермана, Г. Дж. Моровица.— М.: Мир. 1968.— С. 69—109.
35. Эрлих П. О современной химиотерапии // Эрлих П. Биологические этюды.— СПб.: Изд. Т-ва «Новое в медицине», 1911.— С. 100—120.
36. Юрин В. М., Гончарик М. Н., Галактионов С. Г. Перенос ионов через мембраны растительных клеток.— Мн.: Наука и техника, 1977.— 160 с.
37. Юрин В. М. Мембранотропные эффекты органических соединений: Диссертация доктора биологических наук.— Мн., 1981.— 420 с.
38. Abramson F. B., Barlow R. B., Mustafa M. G., Stephenson R. P. Relationship between chemical structure and affinity for acetylcholine receptors // Br. J. Pharmac. 1969.— V. 37.— P. 207—233.

39. *Adair G. S.* VI. The oxygen dissociation curves of hemoglobin // *J. Biol. Chem.*, 1925.— V. 63.— P. 529—545.
40. *Aranyi P.* Kinetics of the hormone-receptor interaction. Competition experiments with slowly equilibrating ligand // *Biochem. Biophys. Acta*, 1980.— V. 628.— P. 220—227.
41. *Ariëns E. J.* Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition // *Arch. Int. Pharmacodyn. Therap.*, 1954.— V. 99.— P. 32—49.
42. *Ariëns E. J.* *Molecular Pharmacology.*— New York: Academic Press, 1964.— 164 p.
43. *Ariëns E. J.* Receptor theory and structure-action relationships // *Adv. Drug Res.*, 1966.— V. 3.— P. 235—285.
44. *Ariëns E. J., Simonis A. M.* Beta-adrenoreceptor Blocking Agents / *Saxena P. R., Forsyth R. P.* Eds.— North-Holland. Amsterdam, 1976.— P. 3—27.
45. *Ariëns E. J., Simonis A. M., van Rossum J. M.* Drug receptor interaction: Interaction of one or more drugs with different receptor systems // *Molecular Pharmacology.* Ariëns E. J., ed.— New York—London: Academic Press, 1964.— V. 1.— P. 287—393.
46. *Ariëns E. J., van Rossum J. M., Simonis A. M.* Theoretical basis of molecular pharmacology. I. Interactions of one or two compounds with one receptor system // *Arzneimittel Forsch.*, 1956.— V. 6.— P. 282—293.
47. *Arunlakshana O., Schild H. O.* Some quantitative uses of drug antagonists // *Brit. J. Pharmacol.*, 1959.— V. 14.— P. 48—58.
48. *Atkins G. L.* A simple digital-computer program for estimating the parameters of the Hill equation // *Eur. J. Biochem.*, 1973.— V. 33.— P. 175—180.
49. *Atkins G. L.* A versatile digital computer program for non-linear regression analysis // *Biochim. Biophys. Acta*, 1971.— V. 252.— P. 405—420.
50. *Atkins G. L.* Some applications of a digital computer program to estimate biological parameters by non-linear regression analysis // *Biochim. Biophys. Acta*, 1971.— V. 252.— P. 421—426.
51. *Atkins G. L., Nimmo J. A.* A comparison of seven methods for fitting the Michaelis—Menten equation // *Anal. Biochem.*, 1980.— V. 104.— P. 1—9.
52. *Atkins G. L., Nimmo J. A.* A comparison of seven methods for fitting the Michaelis-Menten equation // *Biochem. J.*, 1975.— V. 149.— P. 775—777.
53. *Baghurst P. A., Nichol L. W., Winzor D. J.* Conditions for the existence of critical points in Scatchard plots of binding results // *J. Theor. Biol.*, 1978.— V. 74.— P. 523—534.
54. *Bardsley W.* The quantitative analysis of ligand binding and initial-rate data for allosteric and other complex enzyme mechanisms // *Biochem. J.*, 1976.— V. 153.— P. 101—117.
55. *Bardsley W. G.* The reduction in degree of allosteric and other complex rate equations using Sylvester's dialytic method of elimination // *J. Theor. Biol.*, 1977.— V. 67.— P. 121—139.
56. *Bardsley W. G.* The relationship between co-operativity coefficients, factorability of the allosteric binding polynomial and curve shape // *J. Mol. Biol.*, 1977.— V. 113.— P. 573—578.
57. *Bardsley W. G., Childs R. E.* Sigmoid curves, non-linear double-reciprocal plot and allostereism // *Biochem. J.*, 1975.— V. 149.— P. 313—328.

58. *Boeynaems J. M., Dumont J. E.* The two-step-model of ligand-receptor interaction // *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1977.— V. 7.— P. 33—47.
59. *Bardsley W. G., Leff P., Kavanagh J., Waight R. D.* Deviations from Michaelis-Menten Kinetics // *Biochem. J.*, 1980.— V. 187.— P. 739—765.
60. *Bardsley W. G., Waight R. D.* Factorability of the Hessian of the binding polynomial. The central issue concerning statistical ratios between binding constants. Hill plot slope and positive and negative cooperativity // *J. Theor. Biol.*, 1978.— V. 72.— P. 321—372.
61. *Bardsley W. G., Wright A. J.* A new approach to the measurement of sigmoid curves with enzyme kinetic and ligand binding data // *J. Mol. Biol.*, 1983.— V. 165.— P. 163—182.
62. *Bardsley W. G., Wyman J.* Concerning the thermodynamic definition and graphical manifestations of positive and negative cooperativity // *J. Theor. Biol.*, 1978.— V. 72.— P. 373—376.
63. *Baulieu E. E.* Steroid receptors and hormone receptivity. New approaches in pharmacology and therapeutics // *Biochem. Pharmacol.*, 1975.— V. 24.— P. 1743—1748.
64. *Bergman R. N., Hechter O.* Neurohypophyseal hormone-responsive renal adenylate cyclase. IV. A random-hit matrix model for coupling in a hormone-sensitive adenylate cyclase system. // *J. Biol. Chem.*, 1978.— V. 253.— P. 3238—3250.
65. *Besse J. C., Furchgoff R. F.* Dissociation constants and relative efficacies of agonists acting on alpha adrenergic receptors in rabbit aorta // *J. Pharmacol. Experiment. Therap.*, 1976.— V. 197.— P. 66—78.
66. *Birnbaumer L., Pohl S. L., Kaumann A. J.* Receptors and acceptors. Necessary distinction in hormone binding studies // *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 1974.— V. 4.— P. 239—281.
67. *Boeynaems J. M., Cantraine F. R. L.* Comparison between the kinetics of heterogeneous and sequentially co-operative binding systems // *J. Theor. Biol.*, 1980.— V. 83.— P. 447—456.
68. *Boeynaems J. M., Dumont J. E.* The two-step model of ligand-receptor interaction // *Molec. Cellular Endocrinol.*, 1977.— V. 7.— P. 33—47.
69. *Blondeau J. P., Pobel P.* Determination of protein-ligand binding constants at equilibrium in biological samples // *Eur. J. Bioch.*, 1975.— V. 55.— P. 375—384.
70. *Botts J., Morales M.* Analytical description of the effects of modifiers and of enzyme multivalency upon the steady-state-catalyzed reaction rate // *Trans. Faraday Soc.*, 1953.— V. 49.— P. 696—707.
71. *Buckner C. K., Birnbaum J., Q'Conner M.* Factors influencing observed β -adrenergic receptor antagonism in guinea-pig trachea // *Eur. J. Pharmacol.* 1974.— V. 26.— P. 198—203.
72. *Burguillo F. J., Wright A. J., Bardsley W. G.* Use of the F test for determining the degree of enzyme-kinetic and ligand-binding data. A Monte Carlo simulation study // *Biochem. J.*, 1983.— V. 211.— P. 21—32.
73. *Burk D.* Enzyme kinetic constants: the double reciprocal plot // *Trends in biochem. sci.*, 1984.— V. 9.— P. 202—204.
74. *Burt D. R., Taylor R. L.* Binding sites for thyrotropin-releasing hormone in sheep nucleus accumbens resemble pituitary receptors // *Endocrinology*, 1980.— V. 106.— P. 1416—1423.
75. *Catt K. J., Dufau M. L.* Interaction of LH and HCG (human cho-

- ronic gonadotropin) with testicular gonadotropin receptor // *Nature*, 1973.— V. 244.— P. 219—221.
76. *Chamness G. C., McGuire W. L.* Scatchard plots: common errors in correction and interpretation // *Steroids*, 1975.— V. 26.— P. 538—542.
 77. *Chang K. J., Miller R. J., Cuatrecasas P.* Interaction of enkephalin with opiate receptors in intact cultured cells // *Molec. Pharmacol.*, 1978.— V. 14.— P. 961—970.
 78. *Cheney B. V., Lahti R. A., Barsuhn C., Gay D. D.* An analysis of binding at the opioid receptor based upon an agonist/antagonist two-state model // *Molecular Pharmacology*, 1982.— V. 22.— P. 349—359.
 79. *Childs R. E., Bardsley W. G.* Allosteric and related phenomena: and analysis of sigmoid and non-hyperbolic functions // *J. Theor. Biol.*, 1975.— V. 50.— P. 45—58.
 80. *Childs R. E., Bardsley W. G.* The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen // *Biochem. J.*, 1975.— V. 145.— P. 93—103.
 81. *Clark A. J.* Concentration-action relations // *Handbuch der experimentellen Pharmakologie* / E. Helffer, Ed.— Berlin: Springer, 1937.— Bd. 4, Erg. IV.— S. 61—90.
 82. *Clark A. J.* Mode of action of drugs on cells // London: Edward Arnold, 1933.
 83. *Clark A. J.* The reaction between acetylcholine and muscle cells // *J. Physiol.*, 1926.— V. 61.— P. 530—546.
 84. *Clark A. J.* The antagonism of acetylcholine by atropine // *J. Physiol.*, 1926.— V. 61.— P. 547—556.
 85. *Clark A. L., Mitchelson F.* The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors // *Br. J. Pharmacol.*, 1976.— V. 58.— P. 323—331.
 86. *Cleland W. W.* The statistical analysis of enzyme kinetic data // *Adv. Enzymol.*, 1967.— V. 29.— P. 1—32.
 87. *Cornish-Bowden A., Eisenthal R.* Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods // *Biochem. J.*, 1974.— V. 139.— P. 721—730.
 88. *Cressie N. A. C., Keightley D. D.* Analysing data from hormone-receptor assays // *Biometrics.*, 1981.— V. 37.— P. 235—249.
 89. *Cuatrecasas P.* Criteria for and pitfalls in the identification of receptors // *Adv. Cyclic Nucl. Res.*, 1975.— V. 5.— P. 79—89.
 90. *Cuatrecasas P., Hollenberg M. D.* Binding of insulin and other hormones to non-receptor materials: saturability, specificity and apparent «negative cooperativity» // *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1975.— V. 62.— P. 31—41.
 91. *Cullen E. I., Medzihradsky F.* An artifactual component of drug-protein binding generated in vitro // *Life Sci.*, 1983.— V. 33.— P. 131—140.
 92. *Darvey I. G., Walker E. J.* A procedure for obtaining initial estimates of parameters appearing in steady-state rate or equilibrium binding equations // *Can. J. Biochem.*, 1978.— V. 56.— P. 697—701.
 93. *Davies R. H., Smith L. H.* Partial agonism of cardiac β -adrenoceptor blocking agents and competitive conformer-receptor occupancy // *International J. Quantum Chem., Quantum Biol. Symp.* 7, 1980.— P. 331—345.
 94. *Delean A., Stadel J., Lefkowitz R. J.* A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate

- cyclase-coupled β -adrenergic receptor // *J. Biol. Chem.*, 1980.— V. 255.— P. 7108—7117.
95. *De Lean A., Rodbard D.* Kinetic analysis of cooperative ligand binding: applications to the insulin receptor // *Fed. Proc.*, 1980.— V. 39.— P. 116—120.
 96. *De Lean A., Rodbard D.* Kinetics of cooperative binding // *The receptors: a comprehensive treatise* / R. D. O'Brien. Ed. New York: Plenum Press, 1979.— V. 1.— P. 143—192.
 97. *Delisi C.* Characterization of receptor affinity heterogeneity by Scatchard Plots // *Biopolymers*, 1978.— V. 17.— P. 1385—1386.
 98. *Delisi C.* The effect of cell size and receptor density on ligand-receptor reaction rate constants // *Mol. Immunol.*, 1981.— V. 18.— P. 507—511.
 99. *Delisi C., Wiegel F. W.* Effect of nonspecific forces and finite receptor number on rate constants of ligand-cell bound-receptor interactions // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1981.— V. 78.— P. 5569—5572.
 100. *De Miguel Merino F.* A new method for determining the Michaelis constant // *Biochem. J.*, 1974.— V. 143.— P. 93—95.
 101. *De Meyts P., Roth J., Neville P. M., Gavin J. R., Lesniak M. A.* Insulin interaction with the receptors: experimental evidence for negative cooperativity // *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, 1973.— V. 55.— P. 154—161.
 102. *Devynck M. A., Meyer P.* Angiotensin receptors // *Biochem. Pharmacol.*, 1978.— V. 27.— P. 1—5.
 103. *Dixon M.* Determination of enzyme inhibitor constants // *Biochem. J.*, 1953.— V. 55.— P. 170—171.
 104. *Douglas J., Saltman S., Fredlund P.* Receptor binding of angiotensin II and antagonists. Correlation with aldosterone production by isolated canine adrenal glomerulosa cells // *Circulat. Res.*, 1976.— V. 38.— P. 108—112.
 105. *Dowd J. E., Riggs D. S.* A Comprison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformations // *J. Biol. Chem.*, 1965.— V. 240.— P. 863—869.
 106. *Dwyer J. D., Bloomfield V. A.* Binding of multivalent ligands to mobile receptors in membranes // *Biopolymers*, 1981.— V. 20.— P. 2323—2336.
 107. *Eadie C. S.* The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine // *J. Biol. Chem.*, 1942.— V. 146.— P. 85—93.
 108. *Edelhoch H., Osborne J. C.* The thermodynamic basis of the stability of proteins, nucleic acids and membranes // *Adv. Prot. Chem.*, 1976.— V. 30.— P. 183—250.
 109. *Eisenthal R., Cornish-Bowden A.* The Direct linear plot: A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters // *Biochem. J.*, 1974.— V. 139.— P. 715—720.
 110. *Ekins R. P., Newman G. B., O'Riordan J. L. H.* Radioisotopes in medicine.— US AEC: Oak Ridge: 1968.— P. 59—101.
 111. *Fajsz Cs., Endrenyi L.* New linear plots for the separate estimation of Michaelis-Menten parameters // *FEBS Lett.*, 1974.— V. 44.— P. 240—246.
 112. *Fajsz Cs., Endrenyi L.* New linear plots for the separate estimation of Michaelis-Menten parameters // *FEBS Lett.*, 1974.— V. 44.— P. 240—246.
 113. *Feinberg A. P., Creese I., Snyder S. H.* The opiate receptor a model explaining structure-activity relationship of opiate agonists

- and antagonists // Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1976.— V. 73.— P. 4215—4219.
114. *Feldman H. A.* Mathematical theory of complex ligand-binding systems at equilibrium: some methods for parameter fitting // *Anal. Biochem.*, 1972.— V. 48.— P. 317—338.
 115. *Fernley H. N.* Statistical estimations in enzyme kinetics. The integrated Michaelis equation // *Eur. J. Biochem.*, 1974.— V. 43.— P. 377—378.
 116. *Fischel S. V., Medzyhradsky F.* Scatchard analysis of opiate receptor binding // *Endogenous and exogenous opiate agonists and antagonists* / E. L. Way, ed. New York: Pergamon Press. 1980.— P. 91—94.
 117. *Fletcher J. E.* A generalized approach to equilibrium models // *J. Phys. Chem.*, 1977.— V. 81.— P. 2374—2378.
 118. *Fletcher J. E., Ashbrook J. D., Spector A. A.* Computer analysis of drug-protein binding data // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1973.— V. 226.— P. 69—81.
 119. *Fletcher J. E., Spector A. A., Ashbrook J. D.* Analysis of macromolecule-ligand binding by determination of stepwise equilibrium constants // *Biochemistry*, 1970.— V. 9.— P. 4580—4587.
 120. *Frere J.-M., Leyh B., Renard A.* Lineweaver-Burk, Hanes, Eadie-Hofstee and Dixon plots in non-steady-state situations // *J. Theor. Biol.*, 1983.— V. 101.— P. 387—400.
 121. *Furchgott R. F.* The classification of adrenoreceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory // *Catecholamines. Handbook of experimental pharmacology*.— Berlin: Springer-Verlag, 1972. V. 33.— P. 283—335.
 122. *Furchgott R. F.* Pharmacological characterization of receptors: its relation to radioligand-binding studies // *Federation Proc.*, 1976.— V. 37.— P. 115—120.
 123. *Furchgott R. F.* The pharmacology of vascular smooth muscle // *Pharmacol. Rev.*, 1955.— V. 7.— P. 183—265.
 124. *Furchgott R. F.* The use of β -haloalkylamines in the differentiation of receptors and in the determination of dissociation constants of receptor-agonist complexes // *Adv. Drug Res.*, 1966.— V. 3.— P. 21—55.
 125. *Furchgott R. F., Jurkiewicz A., Jurkiewicz N. H.* Antagonism of propranolol to isoproterenol in guinea-pig trachea: some cautionary findings // *Frontiers in catecholamine research* / Eds. E. Usdin and S. H. Snyder. — Elmsford N. Y.: Pergamon Press Inc, 1973.— P. 295—300.
 126. *Furukawa H., Bilezikian J. P., Loeb J. H.* Effects of ouabain and isoproterenol on potassium influx in the turkey erythrocyte. Quantitative relation to ligand binding and cyclic AMP generation // *Biochim. Biophys. Acta*, 1980.— V. 598.— P. 345—356.
 127. *Gaddum J. H.* The quantitative effects of antagonistic drugs // *J. Physiol.*, 1937.— V. 89.— P. 7—9P.
 128. *Gammeltoft S., Gliemann J.* Binding and degradation of ^{125}I -labelled insulin by isolated rat fat cells // *Biochim. Biophys. Acta*, 1973.— V. 320.— P. 16—32.
 129. *Gero A.* Use of the biological stimulus in determining parameters of drug action, and its relationship to the drug effect: a contribution to the theory of drug action // *J. Theor. Biol.*, 1977.— V. 69.— P. 265—274.
 130. *Gero A.* Biological stimulus and drug effect // *J. Theor. Biol.*, 1978.— V. 74.— P. 469—473.

131. *Gero A.* Theoretical treatment of events between the drug-receptor association and the effect // *J. Theor. Biol.*, 1983.— V. 104.— P. 249—259.
132. *Gosselin R. E.* Drug receptor inactivation: a new kinetic model. // *Br. J. Pharm.*, 1970.— V. 39.— P. 215P—219P.
133. *Haldane J. B. S.* Graphical methods in enzyme chemistry // *Nature*, 1957.— V. 179.— P. 832.
134. *Hand J. M., Buckner C. K.* Relaxation responses of the isolated guinea pig left pulmonary artery produced by acidic histamine solution // *Eur. J. Pharmacol.*, 1981.— V. 70.— P. 225—230.
135. *Hanes C. S. I.* The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley // *Biochem. J.*, 1932.— V. 26.— P. 1406—1421.
136. *Helmreich E. J. M.* Hormone-receptor interactions // *FEBS Lett.*, 1976.— V. 61.— P. 1—5.
137. *Hofstee G. H. J.* On the evaluation of the constants V_m and K_m in enzyme reactions // *Science*, 1952.— V. 116. P. 329—331.
138. *Hogg J., Williams E. J., Johnston R. J.* The temperature dependence of the membrane potential and resistance in *Nitella Translucens* // *Biochim. Biophys. Acta*, 1968.— V. 150.— P. 640—648.
139. *Imbs J. L., Miesch F., Schwartz J., Velly J., Le Clere G., Mann A., Wermuth C. G.* A potent new β -adrenoreceptor blocking agent // *Br. J. Pharmacol.*, 1977.— V. 60.— P. 357—362.
140. *Jacobs S., Chang K.-J., Cuatrecasas P.* Estimation of hormone-receptor affinity by competitive displacement of labeled ligand: effect of concentration of receptor and of labeled ligand // *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1975.— V. 66.— P. 687—692.
141. *Jacobs S., Cuatrecasas P.* The mobile receptor hypothesis and «cooperativity» of hormone binding. Application to insulin // *Biochim. Biophys. Acta.*, 1976.— V. 433.— P. 482—495.
142. *Jard S., Bockaert J.* Stimulus-response coupling in neurophysiological peptide target cells // *Physiol. Rev.*, 1975.— V. 55.— P. 498—536.
143. *Jarett L., Smith R. M.* Electron microscopic demonstration of insulin receptors on adipocyte plasma membranes utilizing a ferritin—insulin conjugate // *J. Biol. Chem.*, 1974.— V. 249.— P. 7024—7031.
144. *Johnson M. L.* Evaluation and propagation of confidence intervals in nonlinear, asymmetrical variance spaces. Analysis of ligand-binding data // *Biochem. J.*, 1983.— V. 44.— P. 101—106.
145. *Kahn C. R.* Membrane receptors for hormones and neurotransmitters // *J. Cell. Biol.*, 1976.— V. 70.— P. 261—286.
146. *Kahn C. R., De Meyts P., Ginsberg B. H., Branch J. R. D.* Cooperative properties of hormone receptors // *Hormonal receptors in digestive tract physiology* / Ed. Bonfils S., Fromageot P., Rosselein G.— Amsterdam, New York, Oxford: North-Holland Publ. Comp., 1977.— P. 103—111.
147. *Kato N., Kashiwaguzo T., Kurihara K., Kobatake J.* A theory of dynamic and steady responses in chemoreception // *J. Theor. Biol.*, 1980.— V. 83.— P. 111—130.
148. *Katz B., Thesleff S.* A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate // *J. Physiol. (Lond)*, 1957.— V. 138.— P. 63—80.
149. *Keightley D. D., Cressie N. A. C.* The Woolf plot is more reliable than the Scatchard plot in analysing data from hormone receptor assays // *J. Steroid Biochem.*, 1980.— V. 13.— P. 1317—1323.

150. *Kenakin T. P.* Effect of equilibration time on the attainment of equilibrium between antagonists and drug receptors // *Eur. J. Pharmacol.*, 1980.— V. 71.— P. 407—417.
151. *Kenakin T. P.* The Schild regression in the process of receptor classification // *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1982.— V. 60.— P. 249—265.
152. *Kenakin T. P., Beek D.* The measurement of antagonist potency and the importance of agonist uptake processes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1981.— V. 219.— P. 112—120.
153. *Kinetics of Drug Action* / Ed. J. M. Van Rossum.— Berlin: Springer-Verlag, 1977.— 670 p.
154. *Klotz J. M.* The application of the law of mass action to binding by proteins. Interactions with calcium. // *Arch. Biochem.*, 1946.— V. 9.— P. 109—117.
155. *Klotz J. M., Curme H. G.* The thermodynamics of metallo-protein combinations. Copper with bovine serum albumin // *J. Amer. Chem. Soc.*, 1948.— V. 70.— P. 939—943.
156. *Klotz J. M., Hunston D. L.* Properties of graphical representations of multiple classes of binding sites // *Biochemistry*, 1971.— V. 10.— P. 3065—3069.
157. *Kono T., Barham F. W.* The relationship between the insulin-binding capacity of fat cells and cellular response to insulin // *J. Biol. Chem.*, 1971.— V. 246.— P. 6210—6216.
158. *Koren R., Hammes G. G.* A kinetic study of protein-protein interactions // *Biochemistry*, 1976.— V. 15.— P. 1165—1171.
159. *Koshland D. E., Jr.* Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis // *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* 1958.— V. 44.— P. 98—105.
160. *Koshland D. E., Nemethy G., Filmer D.* Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits // *Biochemistry*, 1966.— V. 5.— P. 365—385.
161. *Kragh-Hansen U.* Graphical analysis of competitive binding of comparable concentrations of ligand, inhibitor and protein. Ligand binding to serum albumin // *Biochem. Pharmacol.*, 1983.— V. 32.— P. 2679—2681.
162. *Kream R. M., Lukin R. S., Stefano G. B.* Demonstration of two classes of opiate binding sites in the nervous tissue of the marine mollusc *Mytilus edulis*. Positive homotropic cooperativity of lower affinity binding sites // *J. Biol. Chem.*, 1980.— V. 255.— P. 9218.— 9224.
163. *Kuchel P. W., Dalziel K.* Computer simulations of the kinetics of reversible ligand binding to a multivalent macromolecule. Consequences of negative binding Co-operativity associated with changes of the association and dissociation rate constants // *J. Theor. Biol.*, 1980.— V. 85.— P. 497—505.
164. *Langer S. Z., Trendelenburg U.* The effect of a saturable uptake mechanism on the slopes of dose-response curves for sympathomimetic amines and on the shifts of dose-response curves produced by competitive antagonists // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1969.— V. 167.— P. 117—142.
165. *Langley J. N.* An investigation of the thermal interactions of cellulose and model carbohydrates with selected organophosphorus compounds // *J. Physiol.*, 1878.— V. 1.— P. 339—369.
166. *Langmuir I.* The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum // *J. Am. Chem. Soc.*, 1918.— V. 40.— P. 1361—1403.

167. *Lefkowitz R. J., Caron M. G., Michel T., Ytadel J. M.* Mechanisms of hormone receptor-effector coupling: the β -adrenergic receptor and adenylate cyclase // *Fed. Proc.*, 1982.— V. 41.— P. 2664—2670.
168. *Levitzki A., Segel L. A., Steer M. L.* Co-operative response of oligomeric protein receptors coupled to non-cooperative li-gand binding // *J. Mol. Biol.*, 1975.— V. 91.— P. 125—130.
169. *Lin C. W., Musacchio J. M.* The determination of dissociation constants for substance P and substance P analogues in the guinea pig ileum by pharmacological procedures // *Mol. Pharm.*, 1983.— V. 23.— P. 558—562.
170. *Lin S. Y., Goodfriend T. L.* Angiotensin receptors // *Am. J. Physiol.*, 1970.— V. 218.— P. 1319—1328.
171. *Lineweaver H., Burk D.* The determination of enzyme dissociation constants // *J. Am. Chem. Soc.*, 1934.— V. 56.— P. 658—666.
172. *Lullmann H., Ziegler A.* A transient concept of drug receptor interaction // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1973.— V. 280.— P. 1—21.
173. *Lundström I., Nylander C.* A possible model for receptors in excitable membranes // *J. Theor. Biol.*, 1981.— V. 88.— P. 671—683.
174. *Mackay D.* A critical survey of receptor theories of drug action // *Kinetics of Drug Action*. Ed. J. M. Van Rossum.— Berlin: Springer-Verlag, 1977.— P. 255—321.
175. *Mackay D., Wheeler J.* A useful transformation for comparing doze-response curves // *J. Pharm. Pharmac.*, 1974.— V. 26.— P. 569—581.
176. *Mannervic B., Jakobson I., Warholm M.* A new procedure to derive weighting factors for nonlinear regression analysis applied to enzyme kinetic data // *Biochem. Biophys. Acta*, 1979.— V. 567.— P. 43—48.
177. *Markus M., Hess B., Ottaway J. H., Cornish-Bowden A.* The analysis of kinetic data in biochemistry. A critical evaluation of methods // *FEBS Lett.*, 1976.— V. 63.— P. 225—230.
178. *Mendelson C., Dufau M., Catt K.* Gonadotropin binding and stimulation of adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cells // *J. Biol. Chem.*, 1975.— V. 250.— P. 8818—8823.
179. *Merino F.* A new method for determining the Michaelis constant // *Biochem. J.* 1974.— V. 143.— P. 93—95.
180. *Minneman K. P., Hedberg A., Molinoff P. B.* Comparison of beta adrenergic receptor subtypes in mammalian tissues // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1979.— V. 211.— P. 502—508.
181. *Minton A. P.* The bivalent ligand hypothesis. A quantitative model for hormone action // *Mol. Pharmacol.*, 1981.— V. 19.— P. 1—14.
182. *Molinoff P. B., Wolfe B. B., Weiland G. A.* Quantitative analysis of drug-receptor interactions: II. Determination of the properties of receptor subtypes // *Life Sci.*, 1981.— V. 29.— P. 427—443.
183. *Monod J., Wyman J., Changeux J. P.* On the nature of allosteric transition: a plausible model // *J. Mol. Biol.*, 1965.— V. 12.— P. 88—118.
184. *Motulsky H., Mahan L. C.* The kinetics of competitive radioligand binding predicted by the law of mass action // *Mol. Pharmacol.*, 1984.— V. 25.— P. 1—9.
185. *Naor Z., Clayton R. N., Catt K. J.* Characterization of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured rat pituitary cells // *Endocrinology*, 1980.— V. 107.— P. 1144—1152.

186. *Newsholme E. A.* Reflections on the mechanism of action of hormones // *FEBS Lett.*, 1980.— V. 117.— P. 121—134.
187. *Nichol L. W., Wills P. R.* An examination of the forms of Scatchard plots of binding results outside domains of sigmoidality // *J. Theor. Biol.*, 1979.— V. 80.— P. 39—50.
188. *Nickerson M.* Receptor occupancy and tissue response // *Nature*, 1956.— V. 178.— P. 697—698.
189. *Nimmo I. A., Atkins G. L.* A nonparametric method for fitting a single exponential to biological data // *Analyt. Biochem.*, 1979.— V. 94.— P. 270—273.
190. *Nimmo I. A., Banermeister A.* Co-operativity in the cyclic model for drug-receptor interaction // *Biochem. Pharm.*, 1976.— V. 25.— P. 1903—1905.
191. *Norby J. G., Ottolenghi P., Jensen J.* Scatchard plot: common misinterpretation of binding experiments.— *Analys. Biochem.*, 1980.— V. 102.— P. 318—320.
192. *O'Donnell S. R., Walduck K.* How β_2 -selective is the adrenoreceptor antagonist drug, IPS 339 // *J. Pharm. Pharmacol.*, 1981.— V. 33.— P. 223—225.
193. *Offermeier J., Van den Brink F. G.* The antagonism between cholinomimetic agonist and β -adrenoceptor stimulants. The differentiation between functional and metaaffinoid antagonism // *Eur. J. Pharmacol.*, 1974.— V. 27.— P. 206—213.
194. *Oppaway J. H.* Normalisation in the fitting of data by iterated methods. Application to tracer kinetics and enzyme kinetics // *Biochem. J.*, 1973.— V. 134.— P. 729—736.
195. *O'Reilly R. A.* Binding of sodium warfarin to plasma albumin and its displacement by phenylbutazone // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1973.— V. 226.— P. 293—308.
196. *Orci L., Bataille D. P., Freychet P.* Membrane topology as revealed by the binding of macromolecules // *Clim. Res.*, 1975.— V. 23.— p. 422A.
197. *Parascandola J.* Origins of the receptor theory // *TIPS*, 1980.— V. 2.— P. 189—192.
198. *Parker R. B., Waud D. R.* Pharmacological estimation of drug-receptor dissociation constants. Statistical evaluation. I. Agonists // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1971.— V. 177.— P. 1—12.
199. *Paton W. D. W.* A theory of drug action based on the rate of drug-receptor combination // *Proc. Roy. Soc., Ser. B.* 1961.— V. 154.— P. 21—69.
200. *Paton W. D. M., Rang H. P.* The uptake of atropine and related drugs by intestinal smooth muscle of guinea-pig in relation to acetylcholine receptors // *Proc. Roy. Soc., Ser. B.*, 1965.— V. 163.— P. 1—44.
201. *Pennefather P., Quastel D. M. J.* Modification of dose-response curves by effector blockade and uncompetitive antagonism // *Mol. Pharmacol.*, 1982.— V. 22.— P. 369—380.
202. *Pernollet M. G., Devynck M. A., Matthews P. G., Meger P.* Post-nephrectomy changes in adrenal angiotensin II receptors in the rat; influence of exogenous angiotensin and a competitive inhibitor // *Eur. J. Pharmacol.*, 1977.— V. 43.— P. 361—372.
203. *Pert C. B., Pasternak G. W., Snyder S. H.* Opiate agonist and antagonists discrimination by receptor binding in brain // *Science*, 1973.— V. 182.— P. 1359—1361.
204. *Pert C. B., Snyder S. H.* Opiate receptor binding of agonists and

- antagonists affected differentially by sodium // *Mol. Pharmacol.*, 1974.—V. 10.—P. 868—879.
205. *Regoli D., Rioux F., Park W. K.* Dissociation constant of angiotensin II as determined by the use of an irreversible specific inhibitor (1-Sar-8-Leu-ATII) // *Rev. can. biol.*, 1972.—V. 31.—P. 73—77.
206. *Richardson A.* New techniques for pharmacological data analysis // *TIPS*, 1983.—V. 3.—P. 193—195.
207. *Riggs D. S., Guarnier J. A., Addelman S.* The binding of agonists to brain muccarinic receptors // *Life Sci.*, 1978.—V. 22.—P. 1305—1360.
208. *Rioux F., Park W. K., Regoli D.* Application of drug-receptor theories to angiotensin // *Can. J. Physiol., Pharmacol.*, 1973.—V. 51.—P. 665—672.
209. *Rodbard D., Feldman H. A.* Kinetics of two-site immunoradiometric (sandwich) assays. I. Mathematical models for simulation, optimization and curve fitting // *Methods in Enzymology*, 1975.—V. 36A.—P. 3—16.
210. *Rosenthal H. E.* A graphic method for the determination of binding parameters in a complex system // *Analyt. Biochem.*, 1967.—V. 20.—P. 525—532.
211. *Ronzaire-Dubois B., Devynck E., Chevillotte E., Meyer P.* Angiotensin receptors in rat uterine membranes // *FEBS Lett.*, 1975.—V. 55.—P. 168—172.
212. *Scatchard G.* The attractions of proteins for small molecules and ions // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1949.—V. 51.—P. 660—672.
213. *Silinsky E. M.* Recent approaches to secretion and stimulus-secretion coupling // *Fed. Proc.*, 1982.—V. 41.—P. 2169—2171.
214. *Silinsky E. M.* Properties of calcium receptors that initiate depolarization-secretion coupling // *Fed. Proc.*, 1982.—V. 41.—P. 2172—2180.
215. *Solano-Munoz F., Mc Ginlay P. B., Woolfson R., Bardsley W. G.* Deviations from Michaelis-Menten kinetics // *Biochem. J.*, 1981.—V. 193.—P. 339—352.
216. *Speth R. C., Wastek G. J., Yamamura H. I.* Benzodiazepine receptors: temperature dependence of ^3H -flunitrazepam binding // *Life Sci.*, 1979.—V. 24.—P. 351—357.
217. *Stephenson R. P.* A modification of receptor theory // *Brit. J. Pharmacol. Chemother.*, 1956.—V. 11.—P. 379—393.
218. *St.-Louis J., Regoli D., Barade J., Park W. K.* Myotropic action of angiotensin and noradrenaline in strips of rabbit aortae // *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1977.—V. 55.—P. 1056—1069.
219. *Stockton J. M., Birdsall N. J. M., Burgen A. S. V., Hulme E. C.* Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine // *Mol. Pharmacol.*, 1983.—V. 23.—P. 551—557.
220. *Stone M.* The Clark plot: a semi-historical case study // *J. Pharm. Pharmacol.*, 1980.—V. 32.—P. 81—86.
221. *Stone M., Angus J. A.* Developments of computer-based estimation of pA_2 values and associated analysis // *J. Pharmacol. Exp. Theor.*, 1978.—V. 207.—P. 705—718.
222. *Storer A. C., Darlison M. G., Cornish-Bowden A.* The nature of experimental error in enzyme kinetic measurements // *Biochem. J.*, 1975.—V. 151.—P. 361—367.
223. *Strickland S., Loeb J. N.* Obligatory separation of hormone binding and biological response curves in systems dependent upon

- secondary mediators of hormone action // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981.— V. 78.— P. 1366—1370.
224. *Taketa K., Pogell B. M.* Allosteric inhibition of rat liver fructose 1,6-diphosphatase by adenosine 5'-monophosphate // J. Biol. Chem., 1965.— V. 240.— P. 651—662.
225. *Takeyasu K., Ushida S., Wada A., Maruno M., Lai R. T., Hata F., Yoshida H.* Experimental evidence and dynamic aspects of spare receptor // Life Sci., 1979.— V. 25.— P. 1761—1772.
226. *Taylor S. J.* Binding of hormone to receptors. An alternative explanation of nonlinear Scatchard plots // Biochemistry, 1975.— V. 14.— P. 2357—2361.
227. *Thakur A. K., De Lisi C.* Theory of ligand binding to heterogeneous receptor populations: characterization: of the free energy distribution function // Biopolymers, 1978.— V. 17.— P. 1075—1089.
228. *Thakur A. K., Jaffe M. L., Rodbard D.* Graphical analysis of ligand-binding systems: evaluation by Monte Carlo studies // Analytical Biochem., 1980.— V. 107.— P. 279—295.
229. *Thakur A. K., Rodbard D.* Graphical aids to interpretation of Scatchard plots and dose-response curves // J. Theor. Biol., 1979.— V. 80.— P. 383—403.
230. *Thakur A. K., Rodbard D.* Scatchard plot analysis: a general statistical mechanical model and limited slope technique // Biophys. J., 1979.— V. 25.— P. 213a.
231. *Thron C. D.* Nonlinear kinetics of atropine action on the pacemaker of the isolated quinea-pig atrium // J. Pharm. Exper. Ther., 1972.— V. 181.— P. 529—537.
232. *Thron C. D.* Some remarks on compartmental analysis of uptake and washout data // Life Sci., 1978.— V. 22.— P. 1287—1304.
233. *Thron C. D.* Linearity and superposition in pharmacokinetics // Pharm. Rev., 1974.— V. 26.— P. 3—31.
234. *Trendelenburg U., Maxwell R. A., Pluchino S.* Metoxamine as a tool to assess the importance of intraneuronal uptake of 1-norepinephrine in the cat's nictitating membrane // J. Pharm. Exper. Ther., 1970.— V. 172.— P. 91—99.
235. *Van Cauter E., Dumont J. E.* Cross inhibition models for the transmission of hormonal signals // J. Theor., Biol., 1978.— V. 73.— P. 657—677.
236. *Van der Brink F. G.* General theory of drug-receptor interactions. Drug-receptor interaction models. Calculation of drug parameters // Kinetic of Drug Action, ed J. M. van Rossum. Berlin: Springer-Verlag, 1977.— P. 169—254.
237. *Van den Brink F. G.* The models of functional interaction. I. Development and first check of a new model of functional synergism and antagonism // Eur. J. Pharmacol., 1973.— V. 22.— P. 270—278.
238. *Van den Brink F. G.* The model of functional interaction. II. Experimental verification of a new model: the antagonism of β -adrenoceptor stimulants and other agonists // Eur. J. Pharmacol., 1973.— V. 22.— P. 279—286.
239. *Van den Brink F. G.* The model of metacooid interaction // Histamine and Antihistamines Molecular Pharmacology, Structure-Activity Relations, Gastric Acid Secretion.— Nijmegen: Drukkerij Gebr. Janssen N. Y., 1969.— P. 49—56.
240. *Van Rossum J. M.* Cumulative dose-response curves // Arch. int.

- pharmacodyn., 1963.— V. 218.— P. 1281—1286.
241. *Van Rossum J. M., Hurkmans J. A. Th. M., Wolters C. J. J.* Cumulative dose-response curves // *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1963.— V. 143.— P. 299—330.
 242. *Wadbroeck M., Van Obberghen E., Demeyts P.* Thermodynamics of the interaction of insulin with its receptor // *J. Biol. Chem.*, 1979.— V. 254.— P. 7736—7740.
 243. *Waud D. R.* On the measurement of the affinity of partial agonists for receptors // *J. Pharm. Exp. Theor. Cop.*, 1969.— V. 170.— P. 117—122.
 244. *Waud D. R.* Pharmacological receptors // *Pharmacol. Rev.*, 1968.— V. 20.— P. 49—88.
 245. *Waud D. R., Lee Son S., Waud B. E.* Kinetic and empirical analysis of dose-response curves illustrated with a cardiac example // *Life Sci.*, 1978.— V. 22.— P. 1275—1286.
 246. *Waud D. R., Parker R. B.* Pharmacological estimation of drug-receptor dissociation constants. Statistical evaluation. II Competitive antagonists // *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1971.— V. 177.— P. 13—24.
 247. *Weber G.* Energetics of ligand binding to proteins // *Adv. Prot. Chem.*, 1975.— V. 29.— P. 1—83.
 248. *Weder H. G., Schildknecht J., Lutz R. A., Kessetring P.* Determination of binding parameters from Scatchard plots. Theoretical and practical considerations // *Euv. J. Bioch.*, 1974.— V. 42.— P. 475—481.
 249. *Weiland G. A., Minneman K. P., Molinoff P. B.* Thermodynamics of agonist and antagonist interactions with mammalian β -adrenergic receptors // *Mol. Pharmacol.*, 1980.— V. 18.— P. 341—347.
 250. *Weiland G. A., Minneman K. P., Molinoff P. B.* Classification and quantitation of β -adrenergic receptor subtypes // *Nature*, 1979.— V. 281.— P. 114—117.
 251. *Weiland G. A., Molinoff P. B.* Quantitative analysis of drug-receptor-interactions. I. Determination of kinetic and equilibrium properties // *Life Sci.*, 1981.— V. 29.— P. 313—330.
 252. *Wells J. W., Birdsall N. J. M., Burgen A. S. V., Hulme E. C.* Competitive binding studies with multiple sites. Effects arising from depletion of the free radioligand // *Biochem. Biophys. Acta*, 1980.— V. 632.— P. 464—469.
 253. *Wilbur R., Fernholz E. R., Wilson C. T.* Kinetic models of the drug-receptor interaction // *J. Theor., Biol.*, 1975.— V. 52.— P. 335—341.
 254. *Wilkinson G. N.* Statistical estimations in enzyme kinetics // *Biochem. J.*, 1961.— V. 80.— P. 324—332.
 255. *Whitehead E. P.* Co-operativity and the methods of plotting binding and steady-state kinetic data // *Biochem. J.*, 1978.— V. 171.— P. 501—504.
 256. *Wyman J.* Allosteric linkage // *J. Am. Chem. Soc.*, 1967.— V. 89.— P. 2202—2218.
 257. *Zivin J. A., Waud D. R.* Chronic potassium depletion and sensitivity to tubocurarine // *Life Sci.*, 1982.— V. 30.— P. 1407—1422.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	
Глава 1. Несколько общих замечаний по поводу теории рецепторов	
1.1. Рецепторы	
1.2. О применении теории рецепторов	
1.3. Математические модели в фармакологии	
Глава 2. Лиганд-рецепторные взаимодействия: кинетика и равновесие	
2.1. Простейшая модель лиганд-рецепторного взаимодействия. Уравнение Лэнгмюра	
2.2. Связывание лиганда несколькими типами рецепторов	
2.3. Связывание рецептором нескольких типов лигандов	
2.4. Лиганд-рецепторные комплексы произвольной стехиометрии. Кооперативные эффекты	
2.5. Многокомпарментные модели	
2.6. Равновесие: элементы общей теории	
Глава 3. Развитие биологической реакции	
3.1. Общие соображения	
3.2. Модели, предполагающие реакцию функцией только количества занятых рецепторов	
3.3. Биологическая реакция, результирующая несколько эффектов, вызываемых агонистом	
3.4. Модели, учитывающие релаксационные эффекты	
3.5. Модели, предполагающие активацию рецептора несколькими молекулами эффектора	
Глава 4. Антагонисты	
4.1. Конкурентный антагонизм	
4.2. Химический антагонизм	
4.3. Бесконкурентный антагонизм	
4.4. Смешанный антагонизм	
4.5. Неконкурентный антагонизм	
4.6. Функциональный и физический антагонизм	
Глава 5. Интерпретация экспериментальных результатов	
5.1. Метод наименьших квадратов	
5.2. Оценка параметров уравнения (2.1.3)	

5.3. Оценка параметров кинетических уравнений (2.1.4), (2.1.5)	105
5.4. Признаки приложимости стационарной модели (2.1.3)— (2.1.5). Линейность зависимости $\rho(Z)$	109
5.5. Сравнимые концентрации свободного и связанного лиганда	118
5.6. Признаки гетерогенности центров связывания лигандов	123
5.7. Кооперативные эффекты	127
5.8. Характерные особенности некоторых других моделей	131
5.9. К анализу равновесных зависимостей $\rho(C)$	137

Глава 6. Интерпретация результатов экспериментов с антагонистами

6.1. Дискриминация типов антагонизма с помощью семейства кривых концентрация — эффект	141
6.2. Критерий «параллельности переноса» кривых	145
6.3. Дискриминация типов антагонизма с помощью нулевых уравнений и анализа дозовых отношений	147
6.4. Дискриминация моделей антагонизма с помощью линеаризованных зависимостей доза — эффект	150
6.5. Дискриминация моделей антагонизма с помощью дополнительного эффектора	159
6.6. Оценка констант диссоциации конкурентных антагонистов. График Шилда	160
6.7. Оценка констант диссоциации агонист-рецепторных комплексов с помощью необратимых ингибиторов и частичных агонистов	164
6.8. Примеры комплексного подхода к идентификации сложных моделей антагонизма	168
Заключение	179
Литература	184

Станислав Геннадьевич Галактионов
Владимир Петрович Голубович
Марк Давидович Шендерович
Афанасий Андреевич Ахрем

ВВЕДЕНИЕ В ТЕОРИЮ РЕЦЕПТОРОВ

Заведующая редакцией *Н. Т. Ломако*
Редактор *Г. В. Малахова*
Художник *К. В. Хотяновский*
Художественный редактор *А. А. Кулаженко*
Технический редактор *С. А. Курган*
Корректор *А. А. Баранова*

ИБ № 2652

Печатается по постановлению РИСО АН БССР.
Сдано в набор 08.05.86. Подписано в печать
20.08.86. АТ 13762. Формат 84×108¹/₃₂. Бум. тип.
№ 2. Гарнитура литературная. Высокая печать.
Усл. печ. л. 10,50. Усл. кр.-отт. 10,50. Уч.-изд.
л. 9,8. Тираж 1200 экз. Зак. № 817. Цена 1 р. 90 к.
Издательство «Наука и техннка» Академии наук
БССР и Государственного комитета БССР по де-
лам издательств, полиграфин и книжной торгов-
ли, 220600. Минск, Ленинский проспект, 68. Ти-
пография им. Франциска (Георгия) Скорины из-
дательства «Наука и техннка», 220600. Минск,
Ленинский проспект, 68.