



ПИСЬМА В РЕДАКЦИЮ

УДК 547.95

НЕПРИМЕНИМОСТЬ ХИНУКЛИДИНИЛБЕНЗИЛАТА ДЛЯ
ЭКСПЕРИМЕНТОВ С МУСКАРИНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ В
РАВНОВЕСНЫХ УСЛОВИЯХ

ЭЛЛЕР М. Х., КЫИВ А. Х., ЛАНГЕЛ Ю. А., РИНКЕН А. А.

Тартуский государственный университет

Исследованием равновесного связывания нерадиоактивного и меченного тритием препарата хинуклидинилбензилата с мембранным мускариновым холинорецептором коры больших полушарий мозга крыс (25° , $0,05$ М фосфатный буфер, pH 7,4) показано, что истинная величина K_d рецептор-лигандного комплекса так мала, что не может быть точно определена обыкновенными методами радиолигандного анализа. Получаемые же этим методом зависимости специфического связывания от концентрации лиганда являются, по существу, кривыми титрования рецептора, что объясняет зависимость определяемых по этим данным величин K_d от концентрации рецептора в реакционной системе. Сделан вывод, что [^3H]хинуклидинилбензилат не может быть применен в качестве радиоактивного лиганда при исследовании взаимодействия нерадиоактивных лигандов с мускариновым рецептором в равновесных условиях.

Биохимическое исследование мускаринового холинорецептора центральной и периферической нервной системы стало возможным в связи с появлением специфических радиоактивных лигандов, позволяющих определить низкие концентрации этого белка. Одним из первых среди таких веществ был хинуклидинилбензилат [1], который остался до настоящего времени наиболее широко применимым мускариновым лигандом. Это объясняется высокой эффективностью связывания [^3H]хинуклидинилбензилата с рецептором, что обеспечивает низкий уровень неспецифического связывания [1]. Немаловажное значение имеет также коммерческая доступность меченного тритием до высокой удельной радиоактивности препаратов этого вещества [2].

Обратимость связывания [^3H]хинуклидинилбензилата с мускариновым рецептором подтверждается вытеснением этого радиоактивного лиганда из комплекса избытком других мускариновых лигандов [1, 3, 4]. Кроме того, экспериментальные данные по связыванию [^3H]хинуклидинилбензилата описываются, как правило, уравнением изотермы связывания для одноцентровой модели рецептора. Тем не менее, полученные из этих кривых связывания лиганда значения K_d рецептор-лигандного комплекса оказались неодинаковыми. Так, например, для мускари-

нового рецептора мозга крыс были получены значения K_d в интервале от $9,1 \cdot 10^{-12}$ М [5] до $5,7 \cdot 10^{-10}$ М [6], хотя эксперименты в этих работах проводились в близких условиях. Кроме того, кажущиеся величины K_d в значительной степени зависят от концентрации рецепторного белка в реакционной смеси [7, 8], что невозможно объяснить, исходя из простых равновесных схем связывания. Все это заставляло нас вновь обратиться к вопросу определения «истинной» K_d комплекса хинуклидинилбензилата с мускариновым рецептором. С этой целью нами применены подходы с определением в условиях равновесного комплексобразования как свободного рецептора, так и рецептор-лигандного комплекса.

Материалы и методы

Мембранный препарат мускаринового холинорецептора коры больших полушарий мозга крыс в 0,05 М K^+ -фосфатном буфере (рН 7,4) получен, как описано раньше [9]. В качестве радиолганда использовали препарат L-[3H] хинуклидинилбензилата («Amersham», Англия) с удельной радиоактивностью 38 Ки/ммоль. D, L-хинуклидинилбензилат был синтезирован в лаборатории проф. Н. Н. Годовикова (Институт элементоорганических соединений АН СССР) и любезно был предоставлен для проведения измерений. Концентрацию активного компонента в растворах этого препарата рассчитывали из навески, учитывая, что в условиях изучения его связывания с холинорецептором активным является только один из изомеров в рацемической смеси [10, 11].

Определение рецептора по связыванию радиоактивного лиганда проводили методом фильтрации проб на стекловолокнистых фильтрах GF/B («Whatman», Англия). Используемые реактивы, методика обработки фильтров и измерения связанной с ними радиоактивности описаны раньше [9].

Хинуклидинилбензилат инкубировали с мембранным препаратом рецептора в зависимости от условий опыта от 3 до 24 ч (25°). Отдельно было показано, что этого достаточно для завершения реакции комплексобразования при всех использованных концентрациях рецептора и лиганда. В течение этого времени спонтанной инактивацией рецептора можно пренебречь [9].

Специфическое связывание L-[3H] хинуклидинилбензилата с мембранными препаратами холинорецептора определяли по разнице общего и неспецифического связывания лиганда. Последнюю величину определяли в присутствии 10 мкМ атропинсульфата («Merck», ФРГ); она не превышала 3% от общего связывания в использованном интервале концентрации L-[3H] хинуклидинилбензилата.

Радиохимическую чистоту препарата L-[3H] хинуклидинилбензилата определяли методом ТСХ на пластинках «Силуфол» (ЧССР), используя в качестве элюента смесь хлороформ-метанол-вода (10:7:1). В пике с $R_f=0,33$, соответствующей L-[3H] хинуклидинилбензилату, оказалось $85 \pm 2\%$ радиоактивности (среднее из 3-х определений).

Концентрацию L-[^3H] хиноклидинилбензилата определяли также титрованием мембранным препаратом рецептора. Количество рецепторных участков в мембранных препаратах было определено по специфическому связыванию большого избытка (10 нМ) L-[^3H] хиноклидинилбензилата.

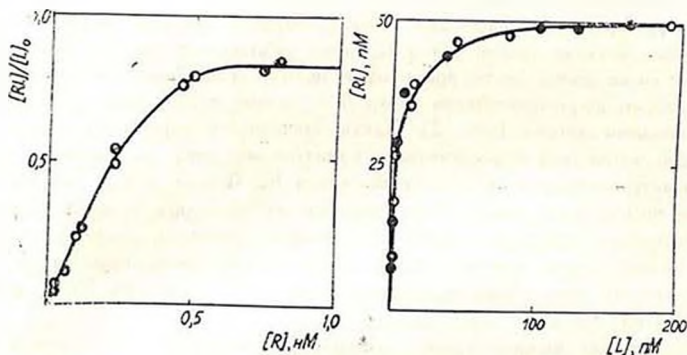


Рис. 1. Титрование препарата L-[^3H] хиноклидинилбензилата мускариновым рецептором в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,4, 25°. Приведены средние значения трех определений

Рис. 2. Специфическое связывание препаратов L-[^3H] хиноклидинилбензилата (○) и D, L-[^3H] хиноклидинилбензилата (●) с мембранами мозга крысы в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4, 25° в зависимости от концентрации L-изомера свободного лиганда. Приведены средние значения трех определений

Проводя затем реакцию комплексообразования при разных концентрациях рецептора и одинаковой концентрации радиолиганда (0,29 нМ), было найдено, что максимальное количество образующегося комплекса соответствует $84 \pm 4\%$ радиоактивного лиганда в реакционной среде (рис. 1). Полученное этим методом содержание активного вещества в препарате L-[^3H] хиноклидинилбензилата хорошо совпадает с данными хроматографического анализа.

Результаты и обсуждение

Зависимости концентрации рецептор-лигандного комплекса от концентрации свободного лиганда для хиноклидинилбензилата были получены двумя разными методами.

В первом случае определяли непосредственно специфическое связывание радиоактивного лиганда с мембранами (рис. 2). При этом была учтена концентрация активного лиганда в препарате, найденная методом ТСХ или титрования рецептором.

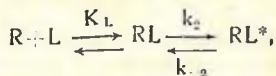
В случае нерадиоактивного лиганда определяли количество свободного рецептора после завершения реакции связывания, используя

10-кратный избыток радиоактивного лиганда (1.5 нМ). Применение такой методики возможно в связи с низкой скоростью диссоциации комплекса хинуклидинилбензилата с мускариновым рецептором [3]. Рассчитанная по результатам этих опытов зависимость концентрации RL-комплекса от концентрации свободного L-изомера лиганда в растворе также показана на рис. 2.

Данные, полученные для обоих препаратов хинуклидинилбензилата, свидетельствуют о том, что в условиях избытка рецептора в реакционной смеси имеет место практически полное связывание лиганда с рецептором до эквивалентной точки и в системе практически отсутствует свободный лиганд (рис. 2). Такая зависимость характерна для случаев, когда рецептор-лигандный комплекс является необратимым или характеризуется очень низким значением K_d . Факты о том, что хинуклидинилбензилат может быть вытеснен из комплекса с мускариновым рецептором избытком других мускариновых лигандов, свидетельствуют в пользу второй возможности. При этом данные, приведенные на рис. 2, позволяют дать только приблизительную оценку величины K_d в пределах 1 пМ или ниже.

Так как нижний предел концентрации рецептора, определяемый в опытах связывания радиоактивных веществ, зависит от удельной радиоактивности этих лигандов, можно заключить, что точную величину K_d невозможно определить коммерчески доступными препаратами L-[3H] хинуклидинилбензилата. Приведенные в то же время в литературе значения K_d не имеют присваиваемого им физического содержания, поскольку вместо кривой равновесного связывания хинуклидинилбензилата, очевидно, получают кривую «титрования» активных центров рецептора. В таком случае обнаруженная в нескольких работах зависимость K_d от концентрации рецепторного белка в реакционной среде [7, 8] приобретает конкретное содержание. Кроме того, можно понять, что тенденция понижения приведенных в литературе значений K_d по мере увеличения У.А. используемого препарата L-[3H] хинуклидинилбензилата определяется возможностью проведения экспериментов при более низкой концентрации рецептора.

Показано, что при низких и умеренных концентрациях хинуклидинилбензилата кинетику реакции образования комплекса с рецептором описывает двухстадийная реакционная схема [12]:



в которой за быстрым наступлением равновесия следует медленная стадия изомеризации комплекса RL в RL^* . Так как экспериментальному определению поддаются значения K_L , k_2 и k_{-2} , по этим величинам можно вычислить константу диссоциации K_d [12]:

$$K_d = K_L \cdot \frac{k_{-2}}{k_2}$$

Используя приведенные в работе Силларда и соавт. [3] результаты кинетического анализа ($K_L=1.3$ нМ, $k_{-2}=2 \cdot 10^{-3}$ с⁻¹, $k_2=1,2 \cdot 10^{-2}$ с⁻¹), получим $K_d=2,1$ нМ. Эта величина значительно ниже всех предложенных до сих пор значений K_d и согласуется с вышеприведенными представлениями об исключительно эффективном связывании хинуклидинилбензилата с мускариновым рецептором.

Таким образом, можно говорить о двух факторах, определяющих кажущуюся необратимость связывания хинуклидинилбензилата с мускариновым рецептором. Во-первых, этот комплекс характеризуется исключительно низкой K_d , вероятно, в пределах 1—2 нМ или ниже. Во-вторых, этот комплекс диссоциирует медленно, с временем полупревращения при 25° до 10 ч [3, 4], что уже сравнимо с временем полупревращения для процесса спонтанной инактивации свободного рецептора [9]. Оба эти фактора делают хинуклидинилбензилат удобным лигандом для определения концентрации рецепторных участков, но практически непригодным для проведения измерений в равновесных условиях. Этот вывод относится прежде всего к результатам определения K_d для нерадиоактивных агонистов и антагонистов методом вытеснения, хотя основная масса обсуждаемых в литературе данных по мускариновым лигандам получена именно таким путем.

QUINUCLIDINYL BENZILATE CAN'T BE USED AS A LIGAND IN EQUILIBRIUM BINDING STUDIES WITH MUSCARINIC RECEPTOR

ELLER M. H., KOIV A. H., LANGE U. L., RINKEN A. A.,
TAHEPOLD L. J., JARV J. L.

State University, Tartu

The binding of tritium-labelled and unlabelled quinuclidinyl benzilate to the muscarinic receptor of rat brain membranes (25°C; 0,05 M Na, K-phosphate buffer, pH 7,4) has been studied. It has been found that the real dissociation constant (K_d) of the receptor-ligand complex is very small and cannot be determined by the usual method of equilibrium radioligand analysis. For this reason the experimentally obtained dependences of the specific binding of the ligand upon its concentration are, in fact, the titration curves of the receptor. Taking them for the equilibrium binding curves one can observe dependences between the artificial K_d -value and the receptor concentration. A conclusion is made that [³H]-quinuclidinyl benzilate cannot be used in equilibrium binding studies to get meaningful binding data for unlabelled ligands.

1. Yamamura H. I., Snyder S. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 71, p. 1725—1729, 1974.
1. Research products 1985/86, Amersham, London: Amersham International plc., p. 159, 1985.
3. Силлард Р. Г., Яра Я. А., Бартфай Т. Биологические мембраны, т. 3, с. 426—432, 1985.
4. Luthin G. R., Wolfe B. B. Mol. Pharmacol., v. 26, p. 164—169, 1984.
5. Hruska R. E., Ludmer L. M., Pert A., Bunney W. E. Jr., J. Neurosci. Res., v. 11, p. 171—177, 1984.
6. Moingeon Ph., Bidart J. M., Alberici G. F., Boudene C., Bohuon C. Toxicology, v. 31, p. 135—142, 1984.
7. Hedlund B., Bartfai T. Mol. Pharmacol., v. 15, p. 531—544, 1979.
8. Ludford J. M., Talamo B. R. J. Biol. Chem., v. 255, p. 4619—4627, 1980.
9. Лангел Ю. А., Ринкен А. А., Тягелыцкая Л. Я., Яра Я. А. Нейрохимия, т. 1, с. 343—351, 1982.
10. Gaginella T. S., Rimele T. J., O'Dorisio T. M., Dorff R. J. Life Sci., v. 26, p. 1599—1608, 1980.
11. Rimele T. J., O'Dorisio M. S., Gaginella T. S. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 218, p. 426—434, 1981.
12. Jarv J., Hedlund B., Bartfai T. J. Biol. Chem., v. 254, p. 5595—5598, 1979.

Поступила 11. VIII 1986

Психофармакология человека. т. Критерии и методы.

Human Psychopharmacology, v. 1. Measures and Methods (Eds. I. Hindmarch, P. D. Stonier), I. Wiley and Sons, Ltd., Baffins Lane, England, 256 p. 1987.

В книге обсуждаются проблемы использования и развития тест-систем, ключевых направлений исследований, практических вопросов экспериментов на человеке, применения экспериментальных достижений в терапии, соотношения между риском и пользой и принятия соответствующих критериев эффективности и безопасности современных психофармацевтических препаратов.

Авторами отдельных глав являются проф. М. Hamilton, A. G. P. Sims, D. M. Warburton (Великобритания), проф. S. R. Wittenborn (США), д-р R. Pinder (Голландия) и др.

Книга предназначена для психофармакологов, психиатров, неврологов, клинических фармакологов, исследователей-психологов.