

УДК 577.115

Разработка компьютерной программы для изучения связывания радиолиганда в биологических структурах по методу Скетчарда

А.М. Микаелян, А.Г. Геворкян, Г.А. Геворкян

*Институт биохимии им. Г. Бунятына НАН РА
0014, Ереван, ул. П. Севака, 5/1*

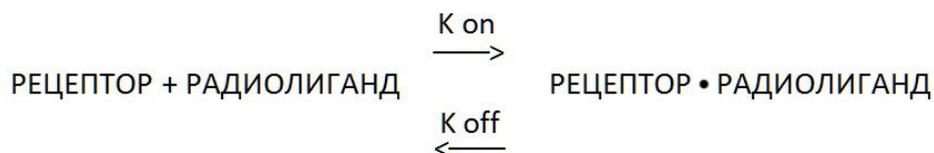
Ключевые слова: радиолиганд, метод Скетчарда, рецептор, компьютерная программа

Радиолигандом является радиоактивно меченный препарат, который можно связать с рецептором, транспортером, ферментами или другими биологическими структурами. Измерение скорости и степени связывания предоставляет информацию о количестве сайтов связывания, их близость и доступность для различных препаратов.

Связывания радиолиганда могут быть использованы для характеристики рецепторов в их естественной среде или трансформироваться в клеточных линиях, для динамического исследования рецепторов и их локализации, идентификации новых химических структур, которые взаимодействуют с рецепторами, а также определить активность лиганда и селективность в нормальных и пораженных тканях.

Рецепторы в тканях существуют в очень малых концентрациях. Наиболее распространенным способом обнаружения рецепторов в мембранных препаратах, срезах тканей в очищенной форме является метод Скетчарда, использующий радиоактивный препарат, который обладает высоким сродством и высокой степенью селективности [5,6]. Для получения достоверных результатов необходимо инкубировать ткани с радиоактивными препаратами при соответствующих условиях эксперимента, когда радиоактивный препарат (РП) будет связываться с рецептором (Р) с образованием лиганд-рецепторного (ЛР) комплекса, сохраняя понятие «закон действия масс» [3].

Закон действия масс



$$\text{Равновесие} \frac{[\text{Лиганд}] \cdot [\text{Рецептор}]}{[\text{Лиганд} \cdot \text{Рецептор}]} = \frac{K_{\text{off}}}{K_{\text{on}}} = K_d ,$$

где

K_{off} — константа скорости диссоциации ,

K_{on} — константа скорости ассоциации ,

K_d — константа диссоциации лиганд-рецепторного комплекса.

В нашем случае для считывания связывания радиолиганда с мембранными белками саркоплазматического ретикулума (СР) использовали сцинтилляционный спектрометр SL-4221 (Roche-Bioelectronique Kontron, France), снабженный встроенным микропроцессором с рабочим «языком» LEM-II, который представляет собой разговорный программный язык. Это означает, что он использует символы из повседневных математических и арифметических функций, а также разговорного языка. Некоторые функции для легкости обозначены в виде аббревиатур. После составления программа хранится в памяти с помощью строчки “Program mode”, которая находится на клавиатуре принтера. Каждая строчка имеет возможность выполнять одну или несколько команд. Как только система запускается (Execution mode), строчки маркируются и их функции начинают выполняться по очереди. Порядковый номер строчки (label) дает возможность системе выполнять функции в любой последовательности. Обычно программа изначально составляется таким образом, чтобы между двумя последующими строчками разница составляла 5 или 10, чтобы при необходимости добавить между строчками новые инструкции, которые в программе не рассматривались, но позже могут понадобиться [1, 4].

В дополнение к выполненным математическим операциям, LEM позволяет пользователю контролировать on-line операции спектрометра, давая полноценный контроль над спектрометром, образцами изменений и стандартными функциями. Эти функции могут быть введены в любом порядке, повторяться любое количество раз и в любых комбинациях.

Методика

Метод Скетчарда состоит в определении специфического связывания радиолиганда, для чего отбираются 6 триплетов, содержащих только радиоактивный лиганд в 6 концентрациях для построения калибровочной кривой. После чего готовят 8 образцов-триплетов, где первые 2 образца содержат нерадиоактивный – «холодный» лиганд, инкубационную среду, радиоактивный лиганд и исследуемый биологический образец, в

данном случае «вывернутый» саркоплазматический ретикулум. Специальная обработка СР и получение «вывернутых» органелл позволяют открыть доступ радиолганда к рецепторам СР по отношению к данному лиганду, в нашем случае к $^{45}\text{CaCl}_2$ [2]. Присутствие в исследуемом образце «холодного» и радиоактивного лиганда определяет неспецифическое связывание, соответствующее 3-й и 6-й точкам на калибровочной (по концентрации) кривой. Остальные 6 триплетов, отдельно по одному триплету на каждую точку, дают суммарный результат по специфическому и неспецифическому связыванию. Программа разработана по принципу выбраковки результатов, отличных на 10%, после чего продолжают считать по среднему значению от дуплета, и дальнейшие расчеты ведутся от средних значений дуплексов. По 0, 3 и 6 концентрациям строится кривая неспецифического значения и рассчитывается коэффициент корреляции кривой. Если это значение составляет менее 92%, то машина распечатывает !!!!! о предупреждении возможной ошибки. Затем продолжается считывание значения неспецифического связывания. Из оставшихся 6 триплетов высчитываются значения неспецифического связывания. Продолжая расчеты, машина автоматически рассчитывает $F=G-SB$, где G – значения калибровки первых шести концентраций, а SB – значения специфического связывания. После этого считывается SB/F и распечатываются 6 пар значений для SB (специфическое связывание) и SB/F , где F – концентрация неспецифического лиганда.

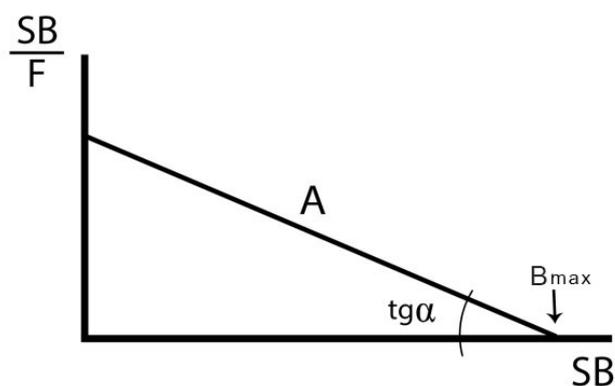


Рисунок. Рабочая кривая Скетчарда, по которой считываются специфическое связывание и коэффициент корреляции

Затем строится прямая (или прямая с разломом, если точки связывания бывают более одной) и по наклону угла $\text{tg}\alpha$ вычисляется специфическое связывание – точка пересечения A (B_M – специфическое связывание) и K_d – константа диссоциации (рис.). Эти две величины, B_M и K_d , являются искомыми величинами эксперимента. После чего поочередно исключаются каждая из 6 точек и снова считываются данные, но без одной

точки. Тем самым, по 5 точкам рассчитывается коэффициент корреляции. Если значение коэффициента корреляции меньше 92%, то результаты эксперимента считаются по двум точкам одинаковой концентрации. Если же результаты эксперимента не соответствуют 92% корреляции, то эксперимент считается статистически недостоверным.

Полученные результаты выдаются в виде таблицы, в которой указаны B_{max} – величина связавшегося лиганда ($nM \text{ ligand} \cdot mg^{-1} \text{ protein}$) в точках с низким сродством (*low affinity*) и в центре с высоким сродством (*high affinity*), величина константы диссоциации лиганд-рецепторного комплекса – K_d ($nmol \text{ ligand} \cdot mg^{-1} \text{ protein}$).

Рабочая программа для расчета величины специфического связывания по графикам Скетчарда составлена для работы с радиолигандами на сцинтилляционных спектрометрах, в данном случае на жидкостном сцинтилляционном спектрометре SL-4221 (Roche-Bioelectronique, France), и состоит из следующих блоков:

- Main 3397 (название блока и объем)
- Loma 127
- Solv 359
- Prog 464
- Tapе 154
- Scet 1834
- Inpu 83
- Hist 602

Считывание результатов уровня радиоактивности протекает в следующей последовательности: сначала считывается относительная радиоактивность (импульс/мин), затем эти результаты пересчитываются в абсолютную радиоактивность (распад/мин), необходимую для достоверного сопоставления одних результатов с другими. Только после начальной обработки результатов данные проходят по остальным блокам и окончательно распечатываются в следующем виде:

Experimental groups	B max $nmol \text{ ligand} \cdot mg^{-1} \text{ protein}$		Kd $nM \text{ ligand} \cdot mg^{-1} \text{ protein}$	
	Center of low affinity	Center of high affinity	Center of low affinity	Center of high affinity

Создание программы машинной обработки результатов специфического и неспецифического связывания лиганда с рецептором, а также определение константы диссоциации лиганд-рецепторного комплекса дают возможность для широкого изучения процессов действия медицин-

ских препаратов, изучения свойств новых препаратов, экспериментального исследования развития патологий различных этиологий, а также выбора наиболее эффективных методов лечения.

Поступила 08.04.16

Սկետչարդի մեթոդով կենսաբանական կառուցվածքներում ռադիոլիգանդի խնամակցության ուսումնասիրման համակարգչային ծրագրի մշակումը

Հ.Մ. Միքայելյան, Ա.Գ. Գևորգյան, Գ.Ա. Գևորգյան

Ռադիոլիգանդի խնամակցությունը կարող է օգտագործվել ռեցեպտորների բնական միջավայրում բնութագրման կամ բջջային գծերում տրանսֆորմացման համար:

Հյուսվածքներում ռեցեպտորները /ընկալիչները/ գոյություն ունեն շատ փոքր խտությամբ: Թաղանթներում, հյուսվածքների կտրվածքներում մաքուր ռեցեպտորների հայտնաբերման և բնութագրման համար առավել տարածված մեթոդը Սկետչարդի մեթոդն է, որն օժտված է ռադիոակտիվ պրեպարատի նկատմամբ մեծ խնամակցությամբ և ընտրողականության բարձր աստիճանով:

Ներկա աշխատանքում ներկայացված մեքենայական մշակմամբ ծրագիրը և Սկետչարդի մեթոդով ռադիոլիգանդի ռեցեպտորների հետ կապը հնարավորություն էն ընձեռում ստանալ մեծ հավաստիությամբ արդյունքներ:

Development of computer program for study of radioligand binding in biological structures by the Scatchard's method

H.M. Mikaelyan, A.G. Guevorgyan, G.A Kevorkian

Radioligand binding can be used for receptors' characterization in their natural environment or transformation in cell lines. Receptors in cells exist in very small concentrations. The most common method for the detection of receptors in the membrane preparations, the tissue sections in a purified form is with the help of a radioactive substance, which has a high affinity and high selectivity (Scatchard's method).

The computer program developed and suggested by the authors gives highly reliable and accurate results of the characteristics of radioligand binding to receptors using Scatchard's method.

Литература

1. *Симоне К. Л., Пелерен С.А.* Руководство по сцинтилляционным спектрометрам. 1979, Internechnique Publ. (France).
2. *Guevorgyan A. G.* Alterations in Calcium-Binding Properties of Sarcoplasmic Reticulum Membrane Proteins Following Cardiac Injury. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 2014, 4(6), p. 574-583.
3. *Katsumata M., Baker M.K., Goldman A.S.* A method of curve fitting analysis for cooperative-type Scatchard plots. *J. Biochem.*, 1979, 86(4):963-70.
4. LEM-II. Computer language, users manual. Ref. 1-75-501. 2nd Edition. Internechnique Publ. (France), 1977.
5. *Scatchard G.* The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1949; 51: 660- 672.
6. *Voet D.* Scatchard equation. *Biochemistry*. 3rd Ed., John Wiley & Sons, Inc.,1995.