



УДК 615.375 : 547.964.4

**ЭФФЕКТОР-РЕЦЕПТОРНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ.
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ РЕЦЕПТОРА С ТРЕМЯ АКТИВНЫМИ
ЦЕНТРАМИ И НЕКОТОРЫЕ ЕЕ ПРИЛОЖЕНИЯ**

*Розенблит А. Б., Индулен Ю. И., Силис Я. Я.,
Макарова Н. А., Чиненс Г. И.*

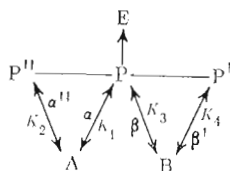
Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Предложена схема рецептора с тремя активными центрами, предусматривающая явления агонизма, неконкурентного автоантагонизма, конкурентного антагонизма и неконкурентного антагонизма, а также любые их сочетания. На базе постулатов «оккупационной» рецепторной теории описано взаимодействие такого рецептора с агонистом (с автоантагонизмом) в присутствии антагониста с дуалистическим (конкурентным и неконкурентным) характером антагонизма. Описана программа на языке ФОРТРАН для аппроксимации экспериментальных данных к теоретическому процессу эффектор-рецепторного взаимодействия. Приводятся примеры приложения этой модели к взаимодействию ангиотензина II и его аналогов и фрагментов с изолированным препаратом гладкой мускулатуры (colon ascendens) крысы.

Классическая «оккупационная» теория Кларка — Ариенса взаимодействия лекарственных и других биологически активных веществ (эффекторов) с клеточными рецепторами [1, 2] продолжает оставаться основным инструментом для определения сродства и внутренней активности соединений, т. е. способности эффекторов соединяться с рецепторами и способности эффекторов активировать рецепторы.

Наряду с различными вариантами эффектор-рецепторного взаимодействия, рассмотренными Ариенсом, Симонис и ван-Россумом, приводится [2, с. 313] схема сложного случая взаимодействия рецепторной системы, состоящей из двух центров, с агонистом со свойствами автоингибирования в присутствии антагониста с дуалистическим характером антагонизма. Из этой схемы следует, что ингибирующее действие обоих эффекторов — автоантагонизм и неконкурентный антагонизм — обуславливается их взаимодействием с одним и тем же центром рецептора.

При исследовании миотропного действия гормона ангиотензина II обращает на себя внимание, с одной стороны, выраженный автоантагонизм действия гормона (например, на colon ascendens крысы [3]), а с другой — наличие неконкурентных антагонистов с существенными различиями в молекулярной структуре [4, 5]. Это говорит в пользу гипотезы о различающихся по структуре и расположению участках рецептора, отвечающих за автоантагонизм и неконкурентный антагонизм. Поэтому мы предположили, что одной из схем рецептора, обеспечивающей такой тип взаимодействия, может быть вариант с тремя активными участками:

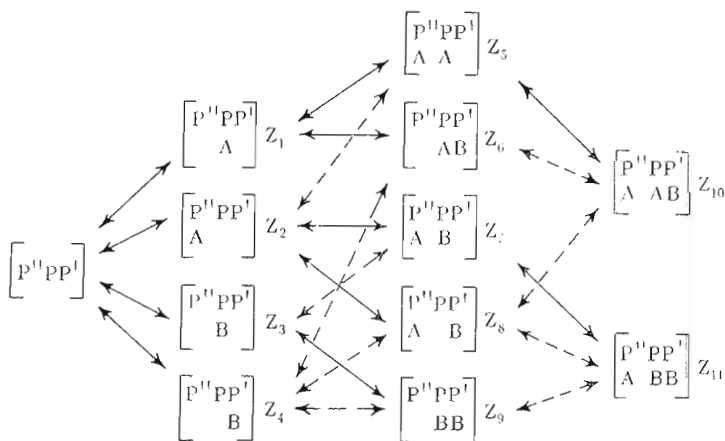


P — активный центр, P' и P'' — центры аллостерической регуляции, A — агонист, B — антагонист, E — биологический эффект, K_1 — K_4 — константы диссоциации, α , α'' , β , β' — внутренние активности.

Основываясь на постулатах «оккупационной» теории [1, 2], мы рассмотрели взаимодействие такого рецептора с агонистом со свойствами автоантагонизма в присутствии антагониста с дуалистическим (конкурентным и неконкурентным) характером антагонизма*.

Итак, ограничим область рассмотрения модели рецепторной системы предположением, что она состоит из трех частей — активного центра P и двух центров аллостерической регуляции P' и P'' , причем агонист A может образовывать комплекс с P и P'' , а антагонист B — с P и P' . Допустим также, что образование комплексов AP'' и BP' действует на биологические эффекты комплекса AP по механизму неконкурентного автоантагонизма и неконкурентного антагонизма соответственно, а образование комплекса BP проявляется в виде конкурентного антагонизма.

Обозначим константы диссоциации комплексов AP , AP'' , BP и BP' и внутренние активности соединений как K_1 , K_2 , K_3 , K_4 , α , α'' , β , β' и допустим, что значения констант диссоциации постоянны и независимы от состояния рецепторной системы, а $\alpha = 1$, $\alpha'' = -1$, $\beta = 0$, $\beta' = -1$, т. е. образование комплексов AP'' и BP' блокирует развитие эффекта, вызванного образованием комплекса AP , а антагонист B , образуя комплекс BP , эффекта не вызывает. Обозначим количество свободных рецепторов $P''PP'$ символом Y , а количество эффектор-рецепторных комплексов — Z . Рассмотрим всевозможные варианты образования эффектор-рецепторных комплексов, допускаемых этой моделью:



$P''PP'$ — рецептор, A — агонист, B — антагонист

Модель полагает существование 11 эффектор-рецепторных комплексов, обозначенных Z_1 — Z_{11} . Стрелки показывают пути образования комплексов, принимаемых к дальнейшему рассмотрению, пунктирные стрелки —

* Отдельные части работы были доложены на конференциях [3, 6, 7].

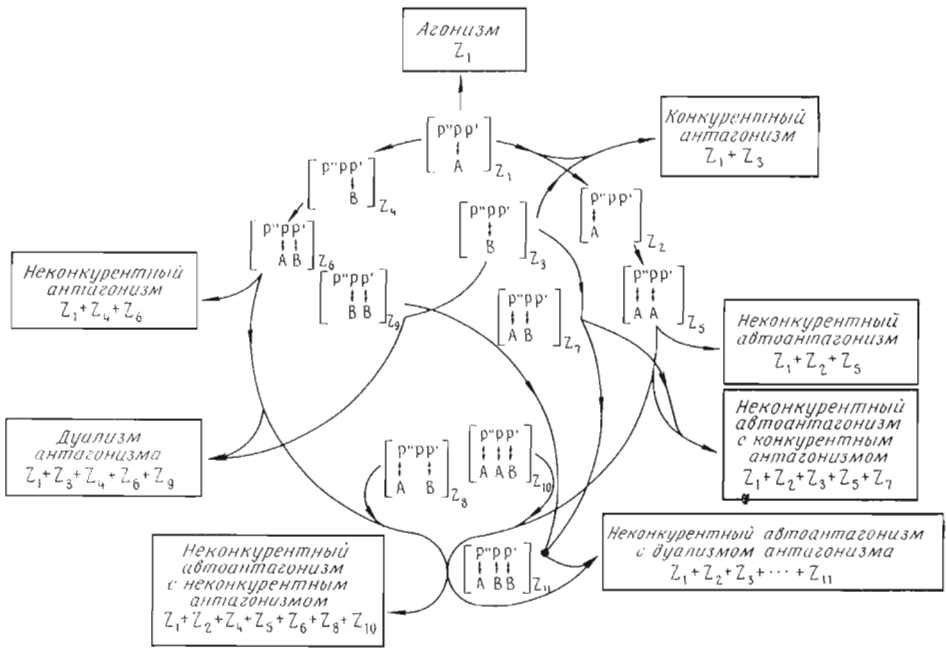


Рис. 1. Кинетические явления, полагаемые моделью, и соответствующие наборы эф-фактор-рецепторных комплексов

Y	$K_1[A]$	$K_2[A]$	$K_3[B]$	$K_4[B]$							
	Z_1				$K_2[A]$	$K_4[B]$					
		Z_2			$(K_1[A])$		$K_3[B]$	$K_4[B]$			
			Z_3				$(K_2[A])$		$K_4[B]$		
				Z_4		$(K_1[A])$		$(K_2[A])$	$(K_3[B])$		
					Z_5					$K_4[B]$	
						Z_6					$(K_2[A])$
							Z_7				$K_3[B]$
								Z_8		$(K_1[A])$	$(K_3[B])$
									Z_9		$(K_2[A])$
										Z_{10}	
											Z_{11}

Рис. 2. Матрица для вывода общего уравнения модели (объяснение в тексте)

параллельно возможные пути образования, далее не рассматриваемые, так как они приводят к тем же результатам из-за независимости констант диссоциации от состояния рецепторной системы. Например, образование комплексов Z_1 и Z_5 идет с одной и той же константой K_1 . В сочетании с «конкурентным» комплексом Z_3 модель допускает существование восьми кинетических явлений: агонизма, конкурентного антагонизма, неконкурентного антагонизма, дуализма антагонизма, неконкурентного автоанта-

гонизма, конкурентного антагонизма с автоантагонизмом, неконкурентного антагонизма с автоантагонизмом и дуализма антагонизма с автоантагонизмом, каждое из которых характеризуется определенным набором эффектор-рецепторных комплексов (рис. 1).

Для облегчения вывода общего уравнения кинетического состояния модели представим рассмотренную схему в виде матрицы (рис. 2) с константами диссоциации эффектор-рецепторных комплексов. Так, комплекс Z_1 получается вследствие присоединения А к Y (с константой диссоциации K_1), а комплекс Z_6 — в результате реакции комплекса Z_1 с В (с константой диссоциации K_4) или из $Z_4 + A$ (с константой диссоциации K_1).

Комплекс Z_1 образуется вследствие равновесного процесса



константа диссоциации которого

$$K_1 = \frac{[A][Y]}{[AY]}. \quad (2)$$

откуда

$$[Z_1] = \frac{1}{K_1} [A][Y]. \quad (3)$$

Аналогично получим выражения и для остальных эффектор-рецепторных комплексов согласно схеме их образования и матрице процесса (рис. 2):

$$[Z_2] = \frac{1}{K_2} [A][Y] = \frac{K_1}{K_2} [Z_1], \quad (4)$$

$$[Z_3] = \frac{1}{K_3} [B][Y] = \frac{K_1 [B]}{K_3 [A]} [Z_1], \quad (5)$$

$$[Z_4] = \frac{1}{K_4} [B][Y] = \frac{K_1 [B]}{K_4 [A]} [Z_1], \quad (6)$$

$$[Z_5] = \frac{1}{K_2} [A][Z_1], \quad (7)$$

$$[Z_6] = \frac{1}{K_4} [B][Z_1], \quad (8)$$

$$[Z_7] = \frac{[B]}{K_3} [Z_2] = \frac{K_1 [B]}{K_3 K_2} [Z_1], \quad (9)$$

$$[Z_8] = \frac{1}{[K_4]} [B][Z_2] = \frac{K_1 [B]}{K_3 K_4 [A]} [Z_1], \quad (10)$$

$$[Z_9] = \frac{1}{K_4} [B][Z_3] = \frac{K_1 [B^2]}{K_3 K_4 [A]} [Z_1], \quad (11)$$

$$[Z_{10}] = \frac{1}{K_4} [B][Z_5] = \frac{[AB]}{K_2 K_4} [Z_1], \quad (12)$$

$$[Z_{11}] = \frac{1}{K_4} [B][Z_7] = \frac{K_1 [B^2]}{K_2 K_3 K_4} [Z_1]. \quad (13)$$

При наличии А и В и констант диссоциации, не равных нулю, количество свободных рецепторов

$$[Y] = 1 - [Z_1] - [Z_2] - [Z_3] - \dots - [Z_{11}] = 1 - \sum_{i=1}^{11} [Z_i], \quad (14)$$

где общее количество рецепторов принято за единицу.

Подставив это выражение в уравнение (3), получим

$$[Z_1] = \frac{[A]}{K_1} \left(1 - \sum_{i=1}^{11} [Z_i] \right).$$

Предполагая, что эффект Е пропорционален количеству занятых агонистом рецепторов

$$E = K_5 [Z_1], \quad (15)$$

с учетом (4) — (13) после преобразований получим

$$E = \frac{K_5}{1 + \frac{K_1}{K_2} + \frac{K_1}{[A]} + \frac{K_1[B]}{K_3[A]} + \frac{K_1[B]}{K_4[A]} + \frac{[A]}{K_2} + \frac{[B]}{K_4} + \frac{K_1[B]}{K_2K_3} + \frac{K_1[B]}{K_2K_4} + \frac{K_1[B^2]}{K_1K_4[A]} + \frac{[AB]}{K_2K_4} + \frac{K_1[B^2]}{K_2K_3K_4}} \quad (16)$$

Здесь K_5 — нормировочный коэффициент, указывающий на тот «идеальный» максимальный эффект, который был бы достигнут при действии агониста в отсутствие антагонистов и автоантагонизма при $[A] \rightarrow \infty$. По-видимому, можно провести некоторую аналогию между K_5 и $\alpha [P_{\text{общ}}]$, где $[P_{\text{общ}}]$ — общее количество рецепторов [8], т. е. максимальным эффектом при замещении агонистом всех рецепторов с образованием эффективных комплексов.

Выражение (16) является общим кинетическим уравнением рассматриваемой схемы эффектор-рецепторного взаимодействия. Преобразуем выражение (16):

$$E = \frac{K_5}{\left(1 + \frac{[B]}{K_4}\right) \left(1 + \frac{K_1}{[A]}\right) \left(1 + \frac{[A]}{K_2}\right) + \frac{K_1[B]}{K_3[A]} \left(1 + \frac{[A]}{K_2} + \frac{[B]}{K_4} + \frac{[AB]}{K_2K_4}\right)} \quad (17)$$

$$= \frac{K_5}{\left(1 + \frac{[B]}{K_4}\right) \left(1 + \frac{K_4}{[A]}\right) \left(1 + \frac{[A]}{K_2}\right) + \frac{K_1[B]}{K_3[A]} \left(1 + \frac{[A]}{K_2}\right) \left(1 + \frac{[B]}{K_4}\right)} \quad (18)$$

$$= \frac{K_5}{\left(1 + \frac{[A]}{K_2}\right) \left(1 + \frac{[B]}{K_4}\right) \left(1 + \frac{K_1}{[A]} + \frac{K_1[B]}{K_3[A]}\right)} \quad (19)$$

$$= \frac{K_5K_2}{K_2 + [A]} \cdot \frac{K_4}{K_4 + [B]} \cdot \frac{K_3[A]}{K_3[A] + K_3K_1 + K_1[B]} \quad (20)$$

Рассмотрим частные случаи (модели), соответствующие восьми возможным кинетическим явлениям (рис. 1). Уравнения, соответствующие этим моделям, получаются из общего уравнения (16) при «выпадении» соответствующих коэффициентов.

1. Агонизм, отсутствуют K_2, K_3, K_4 :

$$\begin{array}{c} E \\ \uparrow \\ P \\ \downarrow \\ A \end{array} \quad E = \frac{K_5}{1 + \frac{K_1}{[A]}} = \frac{[A]K_5}{K_1 + [A]} \quad (21,22)$$

2. Неконкурентный автоантагонизм, отсутствуют K_3, K_4 :

$$\begin{array}{c} E \\ \uparrow \\ P \\ \swarrow \quad \searrow \\ P' \quad A \end{array} \quad E = \frac{K_5}{1 + \frac{K_1}{[A]} + \frac{K_1}{K_2} + \frac{[A]}{K_2}} = \frac{K_5}{\left(1 + \frac{K_1}{[A]}\right) \left(1 + \frac{[A]}{K_2}\right)} \quad (23)$$

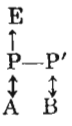
$$= \frac{[A]K_5}{K_1 + [A]} \cdot \frac{1}{1 + \frac{[A]}{K_2}} = \frac{[A]}{K_1 + [A]} \cdot \frac{K_2K_5}{K_2 + [A]} \quad (24)$$

3. Конкурентный антагонизм, отсутствуют K_2, K_4 :

$$\begin{array}{c} E \\ \uparrow \\ P \\ \swarrow \quad \searrow \\ A \quad B \end{array} \quad E = \frac{K_5}{1 + \frac{K_1}{[A]} + \frac{K_1[B]}{K_3[A]}} = \frac{[A]K_5}{[A] + K_1 \left(1 + \frac{[B]}{K_3}\right)} \quad (25)$$

$$= \frac{[A]K_5K_3}{K_1K_3 + K_1[B] + K_3[A]} \quad (26)$$

4. Неконкурентный антагонизм, отсутствуют K_3, K_2 :




$$E = \frac{K_5}{1 + \frac{K_1}{[A]} + \frac{K_1[B]}{K_4[A]} + \frac{[B]}{K_4}} = \frac{K_5}{\left(1 + \frac{K_1}{[A]}\right) + \frac{[B]}{K_4} \left(1 + \frac{K_1}{[A]}\right)} =$$

$$= \frac{K_5}{\left(1 + \frac{K_1}{[A]}\right) \left(1 + \frac{[B]}{K_4}\right)} = \quad (27)$$

$$= \frac{[A] K_5 K_4}{[A] K_4 + K_1 K_4 + K_1 [B] + [AB]} \cdot \quad (28)$$

5. Дуализм антагонизма, отсутствует K_2 :



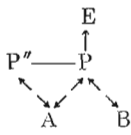
$$E = \frac{K_5}{1 + \frac{K_1}{[A]} + \frac{K_1[B]}{K_3[A]} + \frac{K_1[B]}{K_4[A]} + \frac{[B]}{K_4} + \frac{K_1[B]^2}{K_3 K_4 [A]}} =$$

$$= \frac{K_5}{\left(1 + \frac{K_1}{[A]}\right) \left(1 + \frac{[B]}{K_4}\right) + \frac{K_1[B]}{K_3[A]} \left(1 + \frac{[B]}{K_4}\right)} =$$

$$= \frac{K_5}{\left(1 + \frac{[B]}{K_4}\right) \left(1 + \frac{K_1}{[A]} + \frac{K_1[B]}{K_3[A]}\right)} = \frac{K_4 K_5}{K_4 + [B]} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{K_1}{[A]}\right) + \frac{K_1[B]}{K_3[A]}} = \quad (29)$$

$$= \frac{K_4 K_5}{K_4 + [B]} \cdot \frac{[A]}{[A] + K_1 + \frac{K_1[B]}{K_3}} = \frac{[A]}{K_4 + [B]} \cdot \frac{K_3 K_4 K_5}{K_3 [A] + K_1 K_3 + K_1 [B]} \cdot \quad (30)$$

6. Автоантагонизм с конкурентным антагонизмом, отсутствует K_4 :



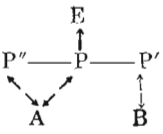
$$E = \frac{K_5}{1 + \frac{K_1}{[A]} + \frac{K_1}{K_2} + \frac{K_1[B]}{K_3[A]} + \frac{[A]}{K_2} + \frac{K_1[B]}{K_2 K_3}} =$$

$$= \frac{K_5}{\left(1 + \frac{K_1}{[A]}\right) \left(1 + \frac{[A]}{K_2}\right) + \frac{K_1[B]}{K_3[A]} \left(1 + \frac{[A]}{K_2}\right)} =$$

$$= \frac{K_5}{\left(1 + \frac{[A]}{K_2}\right) \left(1 + \frac{K_1}{[A]} + \frac{K_1[B]}{K_3[A]}\right)} = \quad (31)$$

$$= \frac{[A]}{K_2 + [A]} \cdot \frac{K_1 K_3 K_5}{K_3 [A] + K_1 K_3 + K_1 [B]} \cdot \quad (32)$$

7. Автоантагонизм с неконкурентным антагонизмом, отсутствует K_3 :



$$E = \frac{K_5}{1 + \frac{K_1}{[A]} + \frac{K_1}{K_2} + \frac{K_1[B]}{K_4[A]} + \frac{[A]}{K_2} + \frac{[B]}{K_4} + \frac{K_1[B]}{K_2 K_4} + \frac{[AB]}{K_2 K_4}} =$$

$$= \frac{K_5}{\left(1 + \frac{K_1}{[A]}\right) \left(1 + \frac{[A]}{K_2}\right) + \frac{[B]}{K_4} \left(\frac{K_1}{[A]} + 1 + \frac{K_1}{K_2} + \frac{[A]}{K_2}\right)} =$$

$$= \frac{K_5}{\left(1 + \frac{K_1}{[A]}\right) \left(1 + \frac{[A]}{K_2}\right) + \frac{[B]}{K_4} \left(1 + \frac{K_1}{[A]}\right) \left(1 + \frac{[A]}{K_2}\right)} =$$

$$= \frac{K_5}{\left(1 + \frac{K_1}{[A]}\right) \left(1 + \frac{[A]}{K_2}\right) \left(1 + \frac{[B]}{K_4}\right)} = \frac{K_4 K_5}{K_4 + [B]} \cdot \frac{[A]}{K_1 + [A]} \cdot \frac{K_2}{K_2 + [A]} = \quad (33)$$

$$= \frac{[A]}{K_4 + [B]} \cdot \frac{K_2 K_4 K_5}{K_1 K_2 + K_1 [A] + K_2 [A] + [A]^2} \cdot \quad (34)$$

8. Автоантагонизм с дуализмом антагонизма. Этот случай соответствует «полной» модели и рассмотрен выше (ур-ния (1) — (20)).

Уравнения всех восьми случаев приведены к двум похожим видам — типа (19) и (20). Оба эти типа выражений можно использовать для анализа, но первый из них ярче выражает сущность рассматриваемых процессов эффектор-рецепторного взаимодействия, хотя он более громоздок, нежели второй тип. Идентичность выражений, полученных для первых четырех случаев, уравнениям, выведенным ранее [2, 8], доказывает соответствие рассматриваемого процесса эффектор-рецепторного взаимодействия постулатам «оккупационной» теории. Это необходимое и достаточное условие для применимости выражений остальных четырех случаев.

Для аппроксимации экспериментальных данных к разработанному теоретическому механизму процесса эффектор-рецепторного взаимодействия был модифицирован разработанный ранее [9] алгоритм разложения спектров, полярограмм и хроматограмм на составляющие и составлена специальная ФОРТРАН-программа.

Поскольку теоретический вид семейства кривых (для разных концентраций [В]) известен (уравнение (16)), в основу алгоритма определения констант $K_1 - K_6$ положен метод наименьших квадратов, по которому требование наилучшего согласования расчетных кривых и экспериментальных точек сводится к тому, чтобы сумма квадратов отклонений экспериментальных точек от теоретически рассчитанных кривых стремилась к минимуму, что в данном случае сводится к минимизации функционала

$$\Delta \sum_{\text{в}} \Sigma (E_{\text{экс}} - E(K_1; K_2; K_3; K_4; K_5; A; B))^2 \rightarrow \min. \quad (35)$$

Вследствие нелинейности уравнения (16) относительно констант использован алгоритм линеаризованных наименьших квадратов в комбинации с методом наискорейшего спуска. Согласно этому алгоритму, искомые параметры представляются в виде $\bar{K} = \bar{K}_0 + \Delta \bar{K}$, где \bar{K}_0 — начальное приближение, $\Delta \bar{K}$ — вектор коррекций. Нелинейная функция E линеаризуется в окрестности точки \bar{K}_0 :

$$E(\bar{K}, A, B) = E(\bar{K}_0, A, B) + \frac{\partial E(\bar{K}_0, A, B)}{\partial K} \Delta K. \quad (36)$$

Значение $\Delta \bar{K}$ находится путем минимизации выражения (35) методом наименьших квадратов. Поскольку разложение уравнения (36) справедливо лишь в окрестности экстремума, для нахождения K необходимо строить итерационный процесс

$$\bar{K}_{n+1} = \bar{K}_n + \delta \overline{\Delta K}_{n+1}, \quad (37)$$

где $0 \leq \delta \leq 1$ — длина шага.

В данном алгоритме величина шага δ выбирается из условия минимизации выражения (35) при движении в направлении $\Delta \bar{K}$. Такой алгоритм обладает высокой скоростью сходимости вблизи экстремума и работоспособен в овражных ситуациях. Однако в ряде случаев система нормальных уравнений оказывается плохо обусловленной и определение направления шага $\Delta \bar{K}$ по методу линеаризованных наименьших квадратов становится невозможным. Обычно после нескольких шагов по методу наискорейшего спуска отмечается переход к методу линеаризованных наименьших квадратов. Движение по градиенту осуществляется также на первой итерации, что ускоряет сходимость при далеких начальных значениях параметров.

В процессе поиска нет необходимости специально вычислять градиент, так как его компоненты представлены столбцом свободных членов системы линеаризованных нормальных уравнений. Для устранения влияния масштаба переменных составляющие градиента умножаются на величину $1 + K_i^2$.

В данном алгоритме предусмотрено вычисление средних квадратичных ошибок параметров. При этом полагается, что в окрестности экстре-

муна линеаризация справедлива и ошибка параметра K равна ошибке величины ΔK_i на последней итерации. Средняя квадратичная ошибка ΔX_i , согласно стандартной процедуре метода наименьших квадратов, определяется выражением

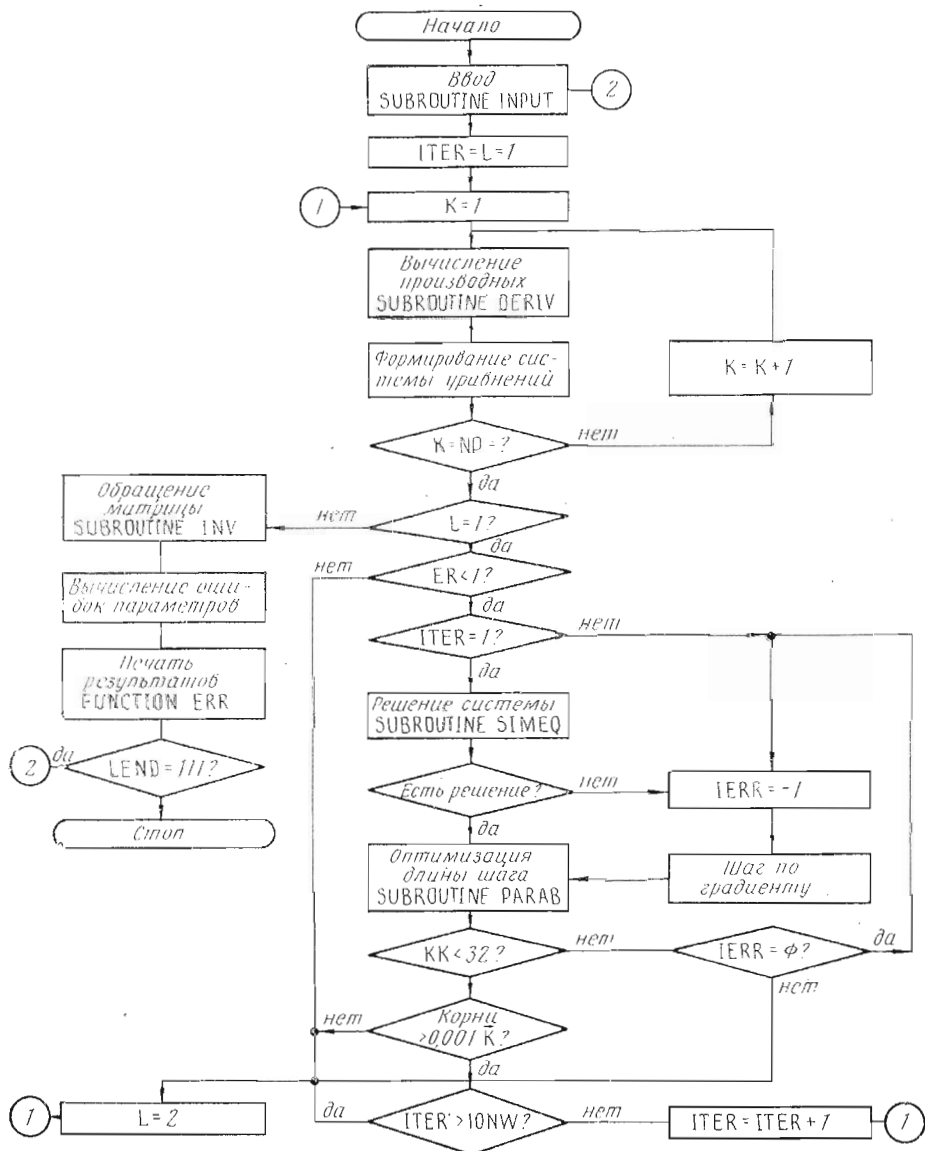
$$\sigma_i = \sigma \sqrt{b_{ii}}, \quad (38)$$

где σ — средняя квадратичная ошибка аппроксимации, b_{ii} — диагональный элемент обратной матрицы системы нормальных уравнений.

В качестве критерия сходимости используется отношение $\Delta K_i/K_i$. Если эта величина становится меньше 0,001 для всех i , то расчет прекращается.

ФОРТРАН-программа рассчитана на последовательную обработку ряда массивов, содержащих до 100 экспериментальных точек с общим числом параметров $NW \leq 6$.

Вычисление проводится согласно блок-схеме:



Блок-схема ФОРТРАН-программы для аппроксимации экспериментальных данных к теоретическому механизму процесса эфektor-рецепторного взаимодействия

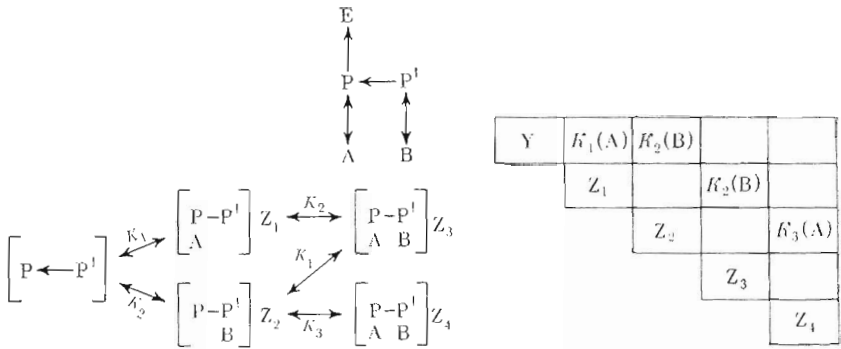


Рис. 3. «Аллостерический» рецептор. Схема рецептора, схема образования эффектор-рецепторных комплексов и матрица для вывода уравнения процесса

Для контроля вычислений на каждой итерации выводятся на экран значения параметров X (I), относительной ошибки ER (средняя квадратичная ошибка аппроксимации, отнесенная к средней ординате массива), длины шага $DELTA$, признака $IERR$ и номера итерации $ITER$.

При выполнении вышеописанного условия сходимости или при числе итераций, достигающем 10 NW, происходит переход к вычислению среднеквадратичных ошибок параметров, печати результатов и вводу нового массива или остановке. Такой переход возможен и в случае, если $ER > 1$ (грубые ошибки в экспериментальных данных) или число последовательных делений на 2 начальной величины шага при спуске по градиенту в подпрограмме PARAB превышает 32.

Основная программа обращается к четырем подпрограммам, осуществляющим ввод исходных данных, вычисление частных производных функций, определение оптимальной длины шага в заданном направлении [9] и вычисление ошибки аппроксимации (а при $L = 2$ — обратное масштабирование и печать результатов). Кроме того, в ходе вычислений используются две стандартные подпрограммы математического обеспечения ЭВМ HP 2116C: решения системы линейных уравнений и обращения матрицы.

Примененный нами метод получения кинетического уравнения предложенной схемы процесса эффектор-рецепторного взаимодействия отличается от описанных [2, 8, 10]; его преимуществами являются простота и универсальность. Этот метод широко используется в энзимологии [11] и пригоден также для описания любых подобных схем кинетических моделей равновесного эффектор-рецепторного взаимодействия. Он допускает включение в модель любого числа дополнительных активных центров и дополнительных констант. Для демонстрации возможностей метода рассмотрим следующий пример. Пусть рецептор имеет два центра P и P' , которые образуют комплексы с агонистом — $[AP]$ — и с неконкурентным антагонистом — $[BP']$. Допустим, что один из постулатов «оккупационной» рецепторной теории — условие независимости констант диссоциации от состояния рецепторной системы — не выполняется. Это значит, что процесс образования комплекса $[APP'V]$ зависит от того, какой из эффекторов первым занял свой центр (рис. 3), т. е. $K_1 \neq K_3$. Другими словами, мы допускаем, что присоединение B к P' аллостерически изменяет структуру центра P таким образом, что изменяется константа диссоциации комплекса Z_1 . Это равноценно образованию нового комплекса — Z_4 . В первом случае, при независимых константах, мы имеем явление неконкурентного антагонизма, которое описывается уравнением (27).

Выведем уравнение для второго случая, «зависимой» константы, согласно схеме и матрице (рис. 3) процесса. Аналогично сделанному выше

выводу:

$$[Z_2] = \frac{[B]}{K_2} [Y] = \frac{K_1 [B]}{K_2 [A]} [Z_1],$$

$$[Z_3] = \frac{[B]}{K_2} [Z_1], \quad [Z_4] = \frac{[A]}{K_3} [Z_2] = \frac{K_1 [B]}{K_2 K_3} [Z_1]$$

и эффект

$$E = \frac{K_H}{1 + \frac{K_1}{[A]} + \frac{K_1 [B]}{K_2 [A]} + \frac{[B]}{K_2} + \frac{K_1 [B]}{K_2 K_3}}, \quad (39)$$

где K_H — «нормировочный» коэффициент.

Как видно, допущенное нами влияние комплекса $[P'V]$ на активный центр проявилось себя в виде дополнительного члена $K_1 [B]/K_2 K_3$ в знаменателе кинетического уравнения рассмотренной рецепторной системы. Отсюда легко вычислить, при каких значениях констант можно ожидать достоверной различимости между этими двумя процессами и какой должна быть максимальная погрешность экспериментальных данных для проверки сделанного предположения.

Применение метода аппроксимации при определении параметров эф­ фектор-рецепторного взаимодействия позволяет исключить неточности, вносимые графическим методом.

При аутоантагонизме экспериментально полученный максимальный эф­ фект не совпадает с теоретическим вследствие появления эффекта ауто- антагонизма уже на восходящей части кривой. Предусмотренный в нашей модели «нормировочный» коэффициент K_5 позволяет учитывать это влия- ние.

Константа диссоциации комплекса $[AP'']$, характеризующая аутоан- тагонизм, графически определяется как концентрация агониста, соответ- ствующая 50% эффекту на нисходящей ветви кривой концентрация — эффект, отрицательный логарифм которой по аналогии с pD_2 [10] можно обозначить как pA_1 . Но часто такое определение непосредственно прове- сти невозможно из-за того, что нисходящая ветвь не достигает 50% эффекта. Так же отрицательно влияет и несоответствие максимума кривой 100% и, следовательно, соответственное отклонение половинного эффекта. Кроме того, значительным преимуществом машинной обработки результатов является отсутствие необходимости прибегать к громоздким и трудоем- ким преобразованиям (по Лайнуверу — Берку, Диксону и т. п. [8,11]) для определения значений параметров (рис. 4).

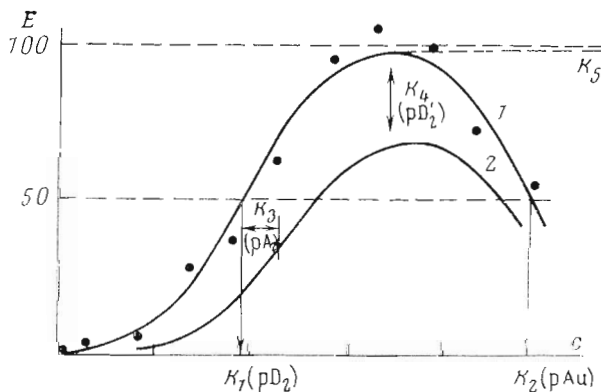


Рис. 4. Кумулятивные кривые «концентрация — эффект»: 1 — в отсутствие, 2 — в присутствии антагониста. Графическое представление параметров эф­ фектор-рецепторного взаимодей- ствия K_1 — K_4 и «нормировочного» коэффициента K_5 . Ось X — логарифм концентрации агониста, ось Y — биоэффект

Исследование антагонистических свойств аналогов и фрагментов ангиотензина в широком диапазоне концентраций по отношению как к самому гормону, так и к некоторым его аналогам показало, что наблюдаемые эффекты лишь в редких случаях соответствуют «чистым» явлениям конкурентного или неконкурентного антагонизма. Часто экспериментальные данные необходимо интерпретировать в соответствии с механизмом дуализма антагонизма (или смешанного антагонизма), когда антагонист взаимодействует как с активным центром рецепторной системы, так и с ее аллостерическим участком (см. схему эффектор-рецепторного взаимодействия). Преобладание того или иного механизма характеризуется соотношением значений констант диссоциаций соответствующих эффектор-рецепторных комплексов. Автоантагонизм ангиотензина еще более усложняет картину, особенно при наличии сильного конкурентного антагонизма. В таких случаях при значительном сдвиге вправо кривой стандарта в присутствии антагониста ее максимум находится в районе нисходящей ветви стандартной кривой и заведомо не достигает 100% эффекта. Все это затрудняет интерпретацию результатов и определение параметров взаимодействия графическим методом, в частности при попытках определения различия между конкурентным и неконкурентным механизмом антагонизма. Использование в этих целях описанного выше метода позволяет сделать более достоверные выводы.

Для иллюстрации применения предложенной схемы эффектор-рецепторного взаимодействия и методов ее расчета на ЭВМ рассмотрим результаты нескольких отдельных экспериментов. На рис. 5 приведены кумулятивные кривые концентрации — эффект (КККЭ) [10] на ободочной кишке (*colon ascendens*) крысы ангиотензина и некоторых его аналогов в отсутствие и в присутствии антагонистов — аналогов и фрагментов гормона. В таблице даны соответствующие значения параметров.

Конкурентный характер влияния $\text{Gly}^3\text{-AT}$, $(L\text{-Hty}^4)\text{AT}$ 3—6 и $(D\text{-Hty}^4)\text{AT}$ 3—6 на миотропное действие ангиотензина выражается в параллельном сдвиге КККЭ стандарта в присутствии антагониста в сторону высших концентраций, что характеризуется отсутствием $K_4(y(L\text{-Hty}^4)\text{AT}$ 3—6) или преобладанием K_3 над K_4 (т. е. $pA_2 - pD_2 = \Delta_{\text{ант}} > 1$; для $\text{Gly}^3\text{-AT}$ $\Delta_{\text{ант}} = 1,24$; для $(D\text{-Hty}^4)\text{AT}$ 3—6 $\Delta_{\text{ант}} = 1,80$).

Наоборот, для неконкурентного антагонизма характерно отсутствие константы K_3 ($y \text{Gly}^{1,2}\text{-AT}$) или преобладание K_4 над K_3 ($pA_2 - pD_2 = \Delta_{\text{ант}} < -1$), что проявляется в снижении максимума КККЭ без ее перемещения. Дуализм же антагонизма (сдвиг КККЭ вправо со снижением максимума) характеризуется близкими значениями K_3 и K_4 : $-1 < \Delta_{\text{ант}} < 1$ (для $(D\text{-Hty}^4)\text{AT}$ 3—6 относительно ангиотензина $\Delta_{\text{ант}} = 0,38$, для АТА относительно $(D\text{-Hty}^4)\text{AT}$ $\Delta_{\text{ант}} = 0,77$ и для АТА относительно $(L\text{-Hty}^4)\text{AT}$ $\Delta_{\text{ант}} = 0,84$). Последний из этих примеров показывает, что в данном случае графически дуализм антагонизма проявился только при концентрации антагониста в 10^{-8} М, но не в 10^{-9} М.

Таким образом, приведенные примеры показывают, что использование предложенной схемы эффектор-рецепторного взаимодействия и описанной программы, несмотря на их недостаточное совершенство, позволяет нам более объективно оценивать результаты исследований биологических свойств синтезируемых пептидов и, возможно, окажется полезным при интерпретации других подобных экспериментов.

Как уже было сказано, из предложенной модели действия эффекторов на рецептор можно вывести ряд частных моделей. Следует отметить, что выбор модели, наиболее адекватной реальному процессу, является далеко не простой задачей. Две (и более) различные гипотезы могут оказаться формально равноценными с точки зрения их соответствия экспериментальным данным. Поэтому лучше всего располагать прямыми биологическими доказательствами того или иного механизма действия изучаемого соединения. В этом случае параметры, характеризующие модель, могут служить

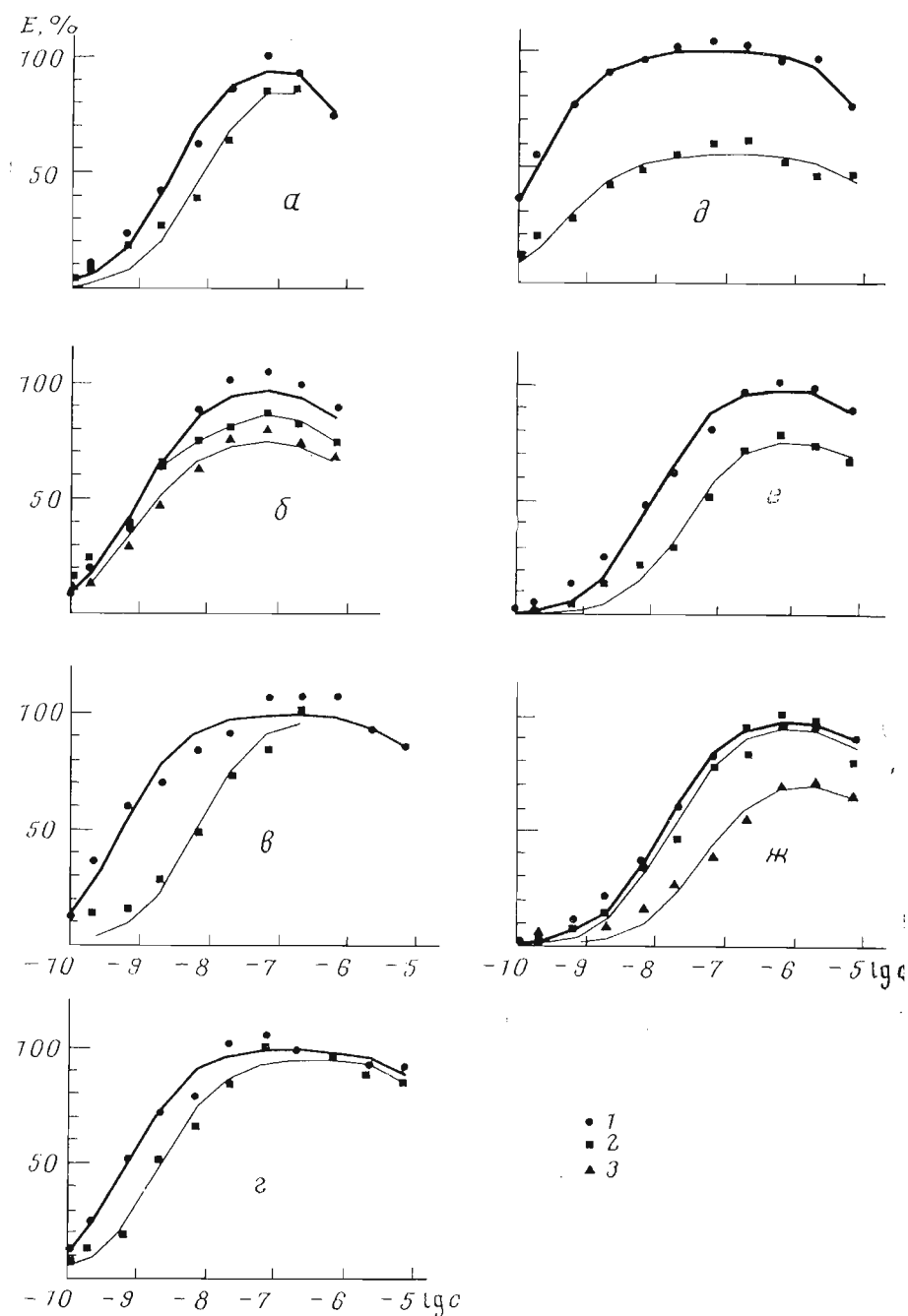


Рис. 5. Примеры приложения предложенной схемы эффектор-рецепторного взаимодействия. Кумулятивные кривые «концентрация — эффект» на изолированном *colop ascendens* крысы ангиотензина и некоторых его аналогов в отсутствие (1) и в присутствии (2, 3) антагонистов. Точки — экспериментальные данные, кривые рассчитаны на ЭВМ. *a* — агонист — АТ, антагонист — $\text{Gly}^3\text{-AT}$ (10^{-9} М); *б* — агонист — АТ, антагонист — $\text{Gly}^{3,2}\text{-AT}$ (2 — 10^{-10} М; 3 — 10^{-9} М); *в* — агонист — АТ, антагонист — $(L\text{-Hty}^4)$ АТ 3—6 (10^{-9} М); *г* — агонист — АТ, антагонист — $(D\text{-Hty}^4)$ АТ 3—6 (10^{-9} М); *д* — агонист — АТ, антагонист — $(D\text{-Tyr}^4)$ АТ 3—6 (10^{-9} М); *е* — агонист — $(D\text{-Hty}^4)$ АТ, антагонист — АТА (10^{-8} М); *ж* — агонист — $(L\text{-Hty}^4)$ АТ, антагонист — АТА (2 — 10^{-9} М, 3 — 10^{-8} М). Ось X — концентрация агониста (М), ось Y — сокращение *colop ascendens* крысы в % от максимального. Расшифровка условных обозначений и значения параметров эффектор-рецепторных взаимодействий приведены в таблице

Параметры эффектор-рецепторного взаимодействия

№	Агонист	Антагонист	K_{11}, M	K_{21}, M	K_{31}, M	K_{41}, M	K_{51}, M	σ
1	АТ	Gly ³ -АТ	$3,17 \cdot 10^{-9}$	$2,17 \cdot 10^{-6}$	$7,33 \cdot 10^{-10}$	$4,92 \cdot 10^{-8}$	6,5	
2	АТ	Gly ^{1,2} -АТ	$9,91 \cdot 10^{-10}$	$4,00 \cdot 10^{-6}$	—	$3,31 \cdot 10^{-9}$	6,6	
3	АТ	(L-Нту ⁴)АТ 3-6	$5,26 \cdot 10^{-10}$	$4,23 \cdot 10^{-5}$	$8,79 \cdot 10^{-11}$	—	8,3	
4	АТ	(D-Нту ⁴)АТ 3-6	$6,87 \cdot 10^{-10}$	$5,60 \cdot 10^{-5}$	$4,72 \cdot 10^{-10}$	$3,04 \cdot 10^{-8}$	5,3	
5	АТ	(D-Тур ⁴)АТ 3-6	$4,85 \cdot 10^{-10}$	$2,21 \cdot 10^{-5}$	$5,42 \cdot 10^{-10}$	$1,24 \cdot 10^{-9}$	3,6	
6	(L-Нту ⁴)АТ	АТА	$1,24 \cdot 10^{-8}$	$5,43 \cdot 10^{-5}$	$3,90 \cdot 10^{-9}$	$2,68 \cdot 10^{-8}$	4,5	
7	(D-Нту ⁴)АТ	АТА	$1,03 \cdot 10^{-8}$	$4,71 \cdot 10^{-5}$	$6,22 \cdot 10^{-9}$	$3,63 \cdot 10^{-8}$	5,4	

Примечания: K_1-K_5 — константы диссоциации эффектор-рецепторных комплексов; среднеквадратичная ошибка аппроксимации $\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x}_i)^2}{n-1}}$, где x_i — фактическое значение эффекта, а \bar{x}_i — рассчитанное значение эффекта при i -й концентрации; n — число точек на графике. АТ — [4-аспарагин, 5-валин]-ангиотензин II; Gly³-АТ — [4-аспарагин, 3-глицин, 5-валин]-ангиотензин II; Gly^{1,2}-АТ — [1-глицин, 2-глицин, 5-валин]-ангиотензин II; АТА — [1-аспарагин, 5-валин, 8-аланин]-ангиотензин II, (L-Нту⁴)АТ — [1-аспарагин, 4-аза- α -гомо-L-тирозин, 5-валин]-ангиотензин II, (D-Нту⁴)АТ — [1-аспарагин, 4-аза- α -гомо-D-тирозин, 5-валин]-ангиотензин II; (L-Нту⁴)АТ 3-6 — H-Val-аза- α -гомо-L-Тур-Val-His-ОН; (D-Нту⁴)АТ 3-6 — H-Val-аза- α -гомо-D-Тур-Val-His-ОН; (D-Тур⁴)АТ 3-6 — H-Val-D-Тур-Val-His-ОН. Все соединения синтезированы в лаборатории пептидов ИОС АН ЛатвССР [42--45].

для количественной оценки действия эффектора (сравнение соединений, оценка индивидуальной вариабельности и т. д.). В случае же, если такие прямые доказательства отсутствуют, дискриминация гипотез о механизме (модели) действия может быть сделана и на основании статистических критериев. Однако этот вопрос требует специального рассмотрения и будет освещен в одной из последующих статей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Clark A. J. (1937) *General Pharmacology. Handbuch der Experimentellen Pharmacologie* (Heffter A., ed.), p. 63, Verlag von Julius Springer, Berlin, 2nd Reprint 1973.
2. Ariens E. J., Simonis A. M., van Rossum J. M. (1964) *Molecular Pharmacology* (Ariens E. J., ed.), pp. 136—393, Acad. Press, N. Y.— London.
3. Индулен Ю. И., Силис Я. Я. (1976) в сб. Синтез и исследование биологически активных соединений. Материалы V конференции молодых ученых ИОС АН ЛатвССР, с. 76, «Зинатне», Рига.
4. Ellis D. E., Reit E. (1969) *Brit. J. Pharm.*, 35, 132—140.
5. Regoli D., Park W. K., Rioux F. (1974) *Pharmac. Rev.*, 26, 69—123.
6. Индулен Ю. И., Розенблит А. Б., Силис Я. Я., Клуша В. Е. (1976) в сб. Кинины и кининовые системы крови (Пасхина Т. С., Меньшиков В. В., ред.), с. 52—54, М.
7. Chipens G. I. (1976) USSR — FRG Symposium on chemistry of peptides and proteins. Abstracts, pp. 42—44, Dushanbe — Moscow.
8. Комиссаров И. В. (1969) Элементы теории рецепторов в молекулярной фармакологии, с. 28—92, «Медицина», М.
9. Голендер В. Е., Силис Я. Я., Розенблит А. Б. (1972) в сб. Автоматизация научных исследований. Материалы III Всесоюзной школы (Редько В. А., ред.), с. 272—286, «Зинатне», Рига.
10. Van Rossum J. M. (1963) *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 143, 299—330.
11. Уэбб Л. (1966) Ингибиторы ферментов и метаболизма, с. 157, 160, «Мир», М.
12. Павар А. П., Чипенс Г. И. (1971) *Ж. общ. химии*, 41, 467—476.
13. Романовская И. К., Индулен Ю. И., Павар А. П., Клуша В. Е., Аува З. П., Чипенс Г. И. (1974) III Всес. симп. по химии пептидов и белков. Тез. докл., с. 128, Киев.
14. Анцан Ю. Е., Афанасьева Г. А., Индулен Ю. И., Клуша В. Е., Чипенс Г. И. (1974) III Всес. симп. по химии пептидов и белков. Тез. докл. с. 10, Киев.
15. Анцан Ю. Е., Чипенс Г. И. (1975) *Биоорган. химия*, 1, 1410—1417.

Поступила в редакцию
28.II.1977

После доработки
5.V.1977

EFFECTOR-RECEPTOR INTERACTION. FUNCTIONAL MODEL OF RECEPTOR WITH THREE ACTIVE CENTRES AND SOME ITS APPLICATIONS

ROSENBLIT A. B., INDULEN Yu. I., SILIS Ya. Ya.,
MAKAROVA N. A., CHIPENS G. I.

Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latv. SSR, Riga

A scheme of the receptor bearing three active centres is suggested, which rationalizes the agonism, autoantagonism, competitive antagonism and non-competitive antagonism phenomena, as well as their various combinations. The kinetics of interaction of such a receptor with agonist (with autoantagonism) in the presence of antagonist with dual (competitive and non-competitive) character of antagonism is described basing of the postulates of «occupational» receptor theory. The FORTRAN program for approximation of experimental data to the theoretical process of effector-receptor interaction is expounded. The examples are given on the application of this model to the interaction of angiotensin II and its analogs or fragments with rat isolated colon ascendens.