



УДК 612.018.023

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНКУРЕНТНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ  
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНСТАНТ АССОЦИИ

Черняев Г. А.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Предложены три формулы расчета констант ассоциации конкурентов с рецептором. На примере ингибирования связывания [<sup>3</sup>H]эстрадиола с цитозолом матки кролика показано, что результаты, полученные при использовании трех формул, совпадают между собой. Обсуждается использование угля для определения связывания меченого лиганда.

Применение меченых лигандов позволяет изучать их связывание со специфическими макромолекулами — рецепторами. Средство немеченых лигандов и их аналогов можно изучать по способности этих соединений ингибировать связывание меченого лиганда. Этот способ нашел широкое применение при исследовании рецепции стероидных гормонов, и в частности женских половых гормонов — эстрогенов. Однако средство ингибитора к рецептору обычно выражается относительной величиной, т. е. ингибирующее действие немеченого аналога сравнивается со способностью немеченого лиганда ингибировать связывание меченого лиганда. В этой статье представлены формулы для расчета констант ассоциации конкурентов, а также проводится сравнение различных способов расчета на примере ингибирования связывания меченого эстрадиола с цитозольным рецептором матки кролика.

Рецепторная система характеризуется двумя параметрами: равновесной константой ассоциации  $K$  (или константой диссоциации) и концентрацией связывающих мест  $N$ . Для состояния равновесия  $P+L \rightleftharpoons PL$ , где  $P$  — рецептор,  $L$  — лиганд,  $PL$  — комплекс, константа ассоциации определяется как

$$K = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad \text{или} \quad K = \frac{B}{(N-B)U}$$

(где  $B$  — концентрация связанного меченого лиганда,  $U$  — концентрация свободного меченого лиганда). Преобразование этого выражения приводит к уравнению, связывающему величины  $B$  и  $U$ :

$$B = \frac{KU}{1+KU} N. \quad (1)$$

График этого уравнения имеет вид ветви гиперболы (рис. 1а). Обычно уравнение (1) представляют в виде, приводящем к линейности графика и позволяющем определять параметры связывающей системы. Это урав-

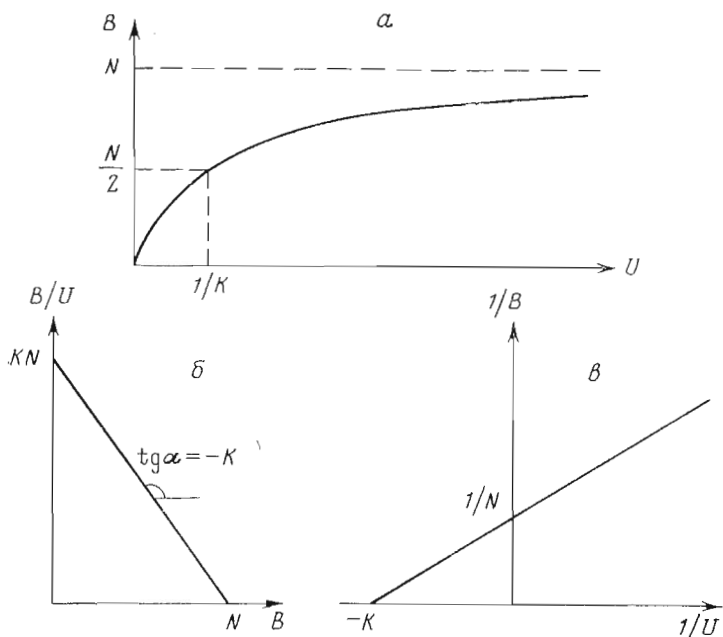


Рис. 1. Графическое выражение уравнения  $B = \frac{KU}{1+KU} \cdot N$  (а) и представление той же зависимости в координатах Скэтчарда (б) и Лайнуивера - Берка (в)

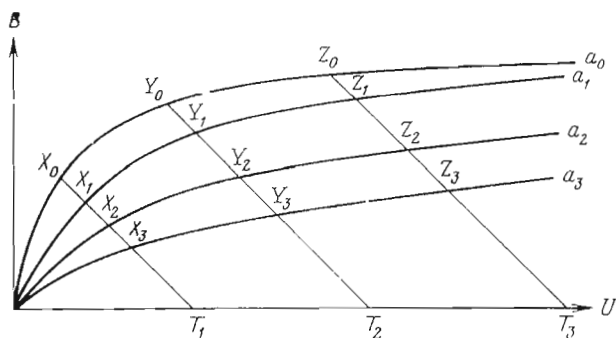


Рис. 2. График связывания меченого лиганда в отсутствие ингибитора ( $I=0$ ) ( $a_0$ ) и в присутствии возрастающих концентраций ингибитора ( $I_1 < I_2 < I_3$ ) (соответственно кривые  $a_1, a_2, a_3$ ). Значения  $X, Y, Z, T$  - см. пояснения в тексте

нения (2) и (3) и соответственно графики в координатах Скэтчарда [1] и Лайнуивера-Берка [2], показанные на рис. 1б, в:

$$\frac{B}{U} = KN - KB, \quad (2)$$

$$\frac{1}{B} = \frac{1}{N} + \frac{1}{KN} \cdot \frac{1}{U}. \quad (3)$$

Присутствие ингибиторов приводит к изменению упомянутых графиков (рис. 2). Если связывание меченого лиганда без ингибитора определялось точкой  $X_0$ , то в зависимости от концентраций ингибитора ( $I_1 < I_2 < I_3$ ) эта точка сместится соответственно в точки  $X_1, X_2, X_3$ . Смещение произойдет и с другими точками ( $Y_0, Z_0$ ), причем смещение будет про-

исходить по прямым, пересекающим координатные оси в точках, соответствующих общим концентрациям меченого лиганда  $T_1, T_2, T_3$ . Кривая связывания  $a_0$  примет соответственно вид  $a_1, a_2, a_3$ .

При конкурентном ингибировании, когда ингибитор и лиганд связываются с одним и тем же связывающим участком молекулы рецептора, данная концентрация ингибитора не будет влиять на связывание при достаточно большой концентрации меченого лиганда. Поэтому при больших значениях  $U$  графики  $a_1, a_2, a_3$  сольются с кривой связывания меченого лиганда  $a_0$  и присутствие конкурентного ингибитора не скажется на определении концентрации связывающих мест. Таким образом, графики в обратных координатах для различных концентраций конкурентного ингибитора пересекут ось ординат в одной точке, и эти графики можно использовать для выяснения характера ингибирования. Константа ассоциации меченого лиганда,  $K_H$ , и константа ассоциации конкурента,  $K_I$ , будут выражаться следующими уравнениями:

$$K_H = \frac{B}{(N-B-Z)U}, \quad (4)$$

$$K_I = \frac{Z}{(N-B-Z)(I-Z)}, \quad (5)$$

где  $K_I$  — константа ассоциации ингибитора;  $I$  — полная концентрация ингибитора;  $Z$  — концентрация связанного ингибитора.

Из этой системы двух уравнений, в которой неизвестными являются  $K_I$  и  $Z$ , можно определить константу ассоциации ингибитора. Формула для вычисления этой константы имеет следующий вид:

$$\frac{K_H}{K_I} = \frac{I}{U \left( \frac{N}{B} - 1 \right) - \frac{1}{K_H}} - \frac{B}{U}. \quad (6)$$

Это уравнение позволяет рассчитать константу ассоциации ингибитора для любых концентраций меченого лиганда и немеченого конкурента.

В работе Бест-Бельпомма и Дессена [3] была составлена иная система уравнений для конкурентного ингибирования, преобразуя которую авторы получили уравнение (в цитируемой работе под номером 5)

$$\frac{(PX)}{(P_T)} = \left[ 1 + \frac{1}{K(X)} + \frac{K_I(I_T)}{K(X) + K_I(PX)} \right]^{-1},$$

где  $K$  и  $K_I$  — константы ассоциации меченого лиганда и немеченого конкурента;  $(PX)$  — концентрация меченого комплекса;  $(X)$  — концентрация свободного меченого лиганда;  $(I_T)$  — полная концентрация немеченого конкурента;  $(P_T)$  — полная концентрация рецептора (обозначения авторов).

В уравнении Бест-Бельпомма и Дессена, как видно, неизвестна только величина  $K_I$ , которую можно рассчитать непосредственно из этого уравнения. Его преобразование приводит к уравнению (6).

Чэнг с сотр. [4] расширили систему уравнений, описывающих конкурентное ингибирование:

$$K_D = \frac{([R_L] - [RH])[H_f]}{[RH]},$$

$$K_D = \frac{([R_L] - [RH] - [RI])[H_f']}{[RH]},$$

$$K_I = \frac{([R_L] - [RH] - [RI])[I_f]}{[RI]}$$

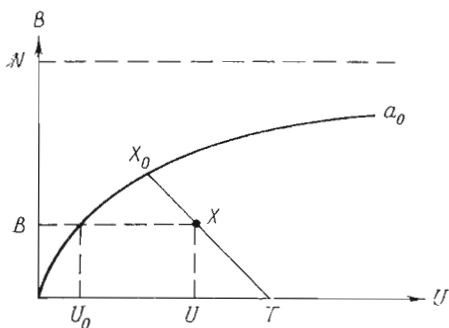


Рис. 3

Рис. 3. Определение величины  $U_0$  для расчета  $K_I$  по формуле (7). Обозначения — как для рис. 2

Рис. 4. Ингибирование связывания [ $^3\text{H}$ ]эстрадиола с цитозолом матки кролика немечеными стероидами: эстрадиолом (1), 8 $\alpha$ -эстрадиолом (2), эстроном (3), 17-дезоксистероидом (4)

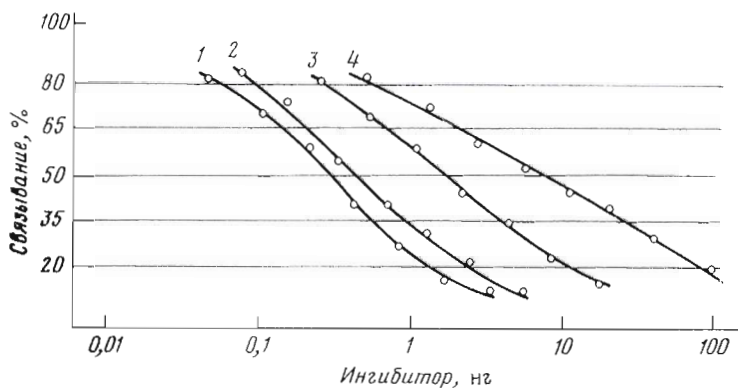


Рис. 4

где  $K_D$  и  $K_I$  — константы диссоциации меченого лиганда и немеченого конкурента;  $[\text{RH}]$  и  $[\text{RI}]$  — концентрации комплексов меченого лиганда и конкурента;  $[\text{H}_f]$  и  $[\text{H}_f']$  — концентрации свободного меченого лиганда без конкурента и в его присутствии;  $[\text{I}_f]$  — концентрация свободного конкурента (обозначения авторов).

С помощью этой системы было получено выражение для расчета константы ассоциации ингибитора, преобразование которого приводит к следующему уравнению (обозначения — как для системы уравнений 4 и 5):

$$\frac{1}{K_I} = \frac{IU_0}{U - U_0} - (N - B) \frac{U_0}{U}, \quad (7)$$

где  $U_0$  — концентрация свободного меченого лиганда, определяемая из графика связывания меченого лиганда в отсутствие ингибитора (рис. 3).

Часто связывающая способность ингибитора выражается величиной относительного средства, определяемой по способу, предложенному Коренманом [5]. При этом изучают ингибирование связывания с рецептором меченого лиганда при добавлении различных количеств конкурентов, в том числе немеченого лиганда, и сравнивают дозы конкурентов, вызывающие снижение связывания меченого лиганда на 50%. Относительное средство (A) выражают отношением указанной дозы немеченого лиганда к дозе немеченого аналога.

Коренман [6] и Скюдмор и др. [7] предложили несколько отличающиеся уравнения для расчета отношения констант ассоциации по величине относительного средства.

Преобразование этих уравнений приводит к общей формуле

$$\frac{K_i}{K} = \frac{U}{\frac{T}{A} - B}, \quad (8)$$

где  $B$  и  $U$  — концентрации связанного и свободного меченого лиганда при концентрации конкурентов, вызывающих одинаковое снижение связывания меченого лиганда.

Следует отметить, что относительное сродство можно определять не только для двукратного снижения связывания меченого лиганда, но и для любого снижения связывания, вызываемого присутствием конкурента.

Из формулы (8) вытекает, что относительное сродство не является постоянной величиной для данного конкурента, а зависит от условий ее определения. Можно показать, что величина относительного сродства больше величины отношения констант ассоциации и приближается к отношению констант при увеличении  $U$  и уменьшении  $B$ :

$$A \rightarrow \frac{K_i}{K} \text{ при } U \rightarrow T \text{ и } B \rightarrow 0.$$

Это происходит тогда, когда либо увеличивается полная концентрация меченого лиганда  $T$  (соответственно увеличиваются и концентрации конкурентов, которые необходимы, чтобы вызвать ту же степень ингибирования), либо для данного  $T$  величина  $A$  определяется при большей степени ингибирования.

Таким образом, изучая связывание меченого лиганда в присутствии немеченого конкурента, можно рассчитать  $K_i$  (по формулам 6 и 7) или отношение константы аналога к константе немеченого лиганда  $K_i/K$  (по формуле 8). Как следует из этих формул, нужно знать величины свободного меченого лиганда  $U$  и меченого комплекса  $B$ , которые определяют после разделения свободной и связанной форм меченого гормона.

Для разделения применяют различные способы: равновесный диализ [8, 9]; ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы или глицерина [10, 11]; фильтрацию на колонке (сефадекс G-25 [12], биогель П-10 [13], оксапатит [14]), адсорбцию свободного лиганда декстраном, покрытым углем [5], ультрафильтрацию [8] и фильтрацию через DEAE-целлюлозные фильтры [15], разделение инкубационной среды на фазы [16], осаждение комплексов протаминсульфатом [17] или  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  [18].

Первые два метода наиболее точны, но из-за высокой трудоемкости и длительности эксперимента они неудобны для применения в широком масштабе. Чаще применяется адсорбция углем, преимуществами которой являются быстрота, возможность одновременной обработки большого числа проб и хорошая воспроизводимость результатов [19]. Этот метод и был использован в нашей работе (см. «Экспериментальную часть»), однако при его применении приходится учитывать два обстоятельства.

Во-первых, уголь адсорбирует свободный лиганд неполностью, и поэтому кажущаяся концентрация комплексов, определенная по радиоактивности ( $B_c$ ), оказывается больше истинной концентрации комплексов, существовавшей в среде перед удалением угля ( $B_i$ ). Но зная полноту адсорбции углем свободного лиганда ( $x$ ), можно рассчитать концентрацию комплексов  $B_i$ , используя известную величину полной концентрации меченого лиганда ( $T$ ) и величину, определяемую по радиоактивности образца ( $B_c$ ):

$$\begin{aligned} U_c &= xU_i; \\ B_i &= T - U_i = T - \frac{U_c}{x}, \\ B_i &= T - \frac{T - B_c}{x}. \end{aligned} \quad (9)$$

Константы ассоциации немеченых стероидов,  
рассчитанные по формулам (6) и (7)

Стероид	Концентрация, нМ	$K_f, 10^9 \text{ M}^{-1}$			
		по формуле (6)	среднее	по формуле (7)	среднее
Эстрадиол	0,52	4,1	3,1±0,3	4,7	3,3±0,5
	1,05	3,3		4,2	
	2,1	3,4		3,8	
	4,2	3,1		3,1	
	8,4	2,9		2,6	
	16,8	1,9		1,6	
8α-Эстрадиол	0,8	2,1	2,0±0,2	2,7	2,2±0,3
	1,6	2,7		3,3	
	3,2	2,4		2,6	
	6,3	1,7		1,8	
	12,6	2,0		1,8	
	25,2	1,2		1,2	
Эстрон	2,6	0,78	0,53±0,07	0,84	0,59±0,08
	5,3	0,68		0,76	
	10,6	0,52		0,65	
	21	0,46		0,51	
	42	0,39		0,45	
	84	0,33		0,33	
17-Дезоксиэстрадиол	14	0,19	0,12±0,03	0,22	0,13±0,03
	28	0,16		0,17	
	56	0,12		0,14	
	112	0,10		0,12	
	220	0,08		0,09	
	440	0,07		0,06	

Нетрудно видеть, что неполнота адсорбции будет заметно сказываться при увеличении полной концентрации меченого лиганда, когда насыщается рецептор и увеличивается концентрация свободного лиганда.

Второе обстоятельство, которое приходится учитывать, применяя уголь, — это нарушение равновесия, вызываемое добавлением угля. Адсорбция свободных лигандов приводит к диссоциации комплексов.

Учесть частичную диссоциацию комплексов можно, изучив зависимость концентрации меченых комплексов от времени адсорбции и введя в уравнение (9) дополнительный коэффициент  $y = B_0/B_T$ , где  $B_0$  — равновесная концентрация комплексов. Формула для определения равновесной концентрации меченого комплекса примет вид

$$B_0 = \left[ T - \frac{T - B_e}{x} \right] y$$

или

$$B_0 = \frac{B_e - (1-x)T}{x} y. \quad (10)$$

Полноту адсорбции меченого лиганда — [ $^3\text{H}$ ] эстрадиола определяли, добавляя к меченому гормону: а) буфер, затем суспензию угля; б) цитозол, предварительно прогретый до  $70^\circ$ , и сразу после этого суспензию угля; в) суспензию угля и затем свежий цитозол.

Результаты, полученные различными способами, совпадали: полнота адсорбции стероидов углем была равна 0,98–0,99 независимо от концентрации стероида и от времени адсорбции (если время превышало 10 мин). Комплексы, образуемые [ $^3\text{H}$ ]эстрадиолом с рецептором цитозола матки в присутствии 0,4 М КСl, диссоциировали медленно [20], и коэффициент  $y$  для уравнения (10) был равен 1,10 для 30-минутной адсорбции. Константа ассоциации  $K_H$  меченого эстрадиола, определенная из графика Скэтчарда, была равна  $1,8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ .

**Специфичность эстрадиольного рецептора,  
определенная различными методами**

Немеченные лиганды	$K_I/K$ по формуле		
	(6)	(7)	(8)
Эстрадиол	1,00	1,00	1,0
8 $\alpha$ -Эстрадиол	0,64	0,66	0,63
Эстрон	0,17	0,18	0,17
17-Дезоксиэстрадиол	0,039	0,039	0,046

Для ингибирования связывания [ $^3\text{H}$ ]эстрадиола использовали немеченый эстрадиол и его аналоги: стереоизомер 8 $\alpha$ -эстрадиол и структурные производные эстрон и 17-дезоксистероид. Эти аналоги были оптически активными, и все конкурентно ингибировали связывание [ $^3\text{H}$ ]эстрадиола [20]. Для различных концентраций ингибитора по формулам (6) и (7) были рассчитаны константы ассоциации ингибиторов, представленные в табл. 1. Как видно, результаты, полученные с помощью различных формул, близки между собой, но наблюдается уменьшение  $K_I$  при увеличении концентрации ингибитора. Для небольших концентраций ингибитора (когда связывание [ $^3\text{H}$ ]эстрадиола снижается меньше чем на 50%) рассчитанные величины  $K_I$  для немеченого эстрадиола превосходят величину  $K_H$ , полученную для меченого эстрадиола. При больших концентрациях немеченого эстрадиола, когда связывание [ $^3\text{H}$ ]эстрадиола составляет 30–10% от исходного (т. е. наблюдаемого в отсутствие немеченого эстрадиола),  $K_I$  очень близка к  $K_H$ .

Вероятно, указанное изменение отражает отклонение свойств изучаемой связывающей системы от свойств идеальной системы, для которой были выведены все уравнения. Однако при использовании высоких концентраций меченого лиганда и немеченого конкурента связывающая система, возможно, приближается к идеальной, так как  $K_I$ , рассчитанная для немеченого эстрадиола, близка к  $K_H$ , полученной из графика Скэтчарда. На теоретическом графике (рис. 2) этой ситуации соответствует точка  $Z_3$ . Изменение связывания [ $^3\text{H}$ ]эстрадиола в зависимости от концентрации ингибитора показано на рис. 4, где за 100% принято исходное связывание. Хорошо видны непараллельность графиков в точке 50% и уменьшение наклона при уменьшении сродства соответствующего ингибитора к рецептору, как и следует из анализа формулы (8). Величины относительного сродства  $A$  определялись для различных уровней снижения связывания [ $^3\text{H}$ ]эстрадиола: до 80, 65, 50, 35 и 20% исходного связывания. На основании этих величин по формуле (8) рассчитывались отношения констант ассоциации  $K_I$  аналогов эстрадиола к константе ассоциации  $K$  немеченого эстрадиола ( $K_I/K$ ) и средние значения  $K_I/K$  представлены в табл. 2. Из средних значений констант ассоциации немеченых стероидов, рассчитанных по формулам (6) и (7) (табл. 1), были также вычислены отношения констант ассоциации аналогов эстрадиола к константе ассоциации немеченого эстрадиола (табл. 2). Следует отметить, что отношения  $K_I/K$ , рассчитанные по формулам (6) и (7) для наибольших концентраций ингибиторов (табл. 1), т. е. когда  $K$  для немеченого эстрадиола практически совпадала с  $K_H$  для меченого эстрадиола, очень близки к данным табл. 2. Из табл. 2 ясно следует, что все три способа анализа специфичности рецептора дают одинаковые результаты.

### Экспериментальная часть

В работе применялись [6, 7- $^3\text{H}_2$ ]эстрадиол (45 Ки/ммоль, Amersham, Англия) и немеченые стероиды: эстрадиол, 8 $\alpha$ -эстрадиол, эстрон и 17-дезоксистероид (получены как описано в работе [20]). Стероиды раство-

ряли в этаноле и разводили до нужной концентрации буфером (конечная концентрация этанола 1%; буфер — 0,02 М трис-HCl, 1,5 мМ EDTA, pH 7,5 (TE)). В опытах использовали самок кроликов шиншилла весом не более 2,5 кг. Животных декапитировали, и матки после освобождения от жировой ткани гомогенизировали в 10 объемах TE (гомогенизатор P-302, 3000 об/мин). Для получения цитозола гомогенат центрифугировали 1,5 ч при 40 000 об/мин (ротор Ti 42, центрифуга Beckman L5-50). К цитозолу добавляли раствор KCl в TE до конечной концентрации 0,4 М (цитозол-KCl). Концентрация белка, определенная по методу Лоури [21], была равна 0,6 мг/мл. 200 мкл раствора стероидов, содержащих 0,4 нг [<sup>3</sup>H]эстрадиола (конечная концентрация 2,1 нМ) или смесь с [<sup>3</sup>H]эстрадиола с различными дозами немеченых стероидов, смешивали с 500 мкл цитозола-KCl и смесь инкубировали 20 ч. Для адсорбции свободных стероидов в пробу добавляли 30 мкл суспензии 6% угля Norit и 0,6% декстрана (M 80 000) в TE. Пробы встряхивали в течение 30 мин, после чего уголь удаляли центрифугированием. Все операции проводили при 0–4°. Супернатант (500 мкл) смешивали с 8 мл диоксанового сцинтиллятора Bray; по радиоактивности определяли величину связывания меченого гормона (B<sub>e</sub>). Измерение радиоактивности проводили на счетчике Mark II (эффективность для трития 20%).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Scatchard G. (1949) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660–672.
2. Lineweaver H., Burk D. (1934) *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658–666.
3. Best-Belpomme M., Dessen P. (1973) *Biochimie*, **55**, 11–16.
4. Chang K.-J., Jacobs S., Cuatrecasas P. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **406**, 294–303.
5. Korenman S. G. (1969) *Steroids*, **13**, 163–177.
6. Korenman S. G. (1970) *Endocrinology*, **87**, 1119–1123.
7. Skidmore J., Walpole A. L., Woodburn J. (1972) *J. Endocr.*, **52**, 289–298.
8. Westphal U. (1971) *Steroid-Protein Interactions*. Springer-Verlag, Berlin.
9. King R. J. B., Gordon J., Cowan D. M., Inman D. R. (1966) *J. Endocr.*, **36**, 139–150.
10. Toft D., Shyamala G., Gorski J. (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **57**, 1740–1743.
11. Michel G., Jung I., Baulieu E. E., Aussel C., Uricel L. (1974) *Steroids*, **24**, 437–449.
12. Talwar G. P., Sopori M. L., Biswas D. K., Segal S. J. (1968) *Biochem. J.*, **107**, 765–774.
13. Vanderhaar B. K., Kim U. H., Mueller G. C. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **208**, 517–527.
14. Erdos T., Best-Belpomme M., Bessada R. (1970) *Anal. Biochem.*, **37**, 244–252.
15. Santì D. V., Sibley C. H., Perriard E. R., Tomkins G. M., Baxter J. D. (1973) *Biochemistry*, **12**, 2412–2416.
16. Shanbhag V. P., Söderård R., Carstensen H., Albertsson P. A. (1973) *J. Steroid Biochem.*, **4**, 537–550.
17. Steggle A. W., King R. J. B. (1970) *Biochem. J.*, **118**, 695–701.
18. O'Connor S., Baker H. W. G., Dulmanis A., Hudson B. (1973) *J. Steroid Biochem.*, **4**, 331–339.
19. Janne O., Kontula K., Luukkainen T., Vihko R. (1975) *J. Steroid Biochem.*, **6**, 501–509.
20. Черняев Г. А., Баркова Т. И., Лнанченко С. Н., Сорокина И. Б., Матарадзе Г. Д., Розен В. Б. (1979) *Вюорган. химия*, **5**, 869–878.
21. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A., Randall R. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.

Поступила в редакцию  
29.IX.1978

После доработки  
24.XI.1978

#### COMPETITIVE INHIBITION APPLICATION FOR DETERMINING THE ASSOCIATION CONSTANTS

CHERNYAEV G. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Three formulae have been proposed for calculating the association constants of the compounds which inhibit competitively the ligand-receptor binding. As exemplified with the inhibition of [<sup>3</sup>H]estradiol binding to the cytosol receptor from rabbit uterus, the calculations by all three formulae give the same result.