



УДК 577.354.088.6

РАДИОРЕЦЕПТОРНЫЙ АНАЛИЗ: ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА

Зайцев С. В., Сергеева М. Г., Варфоломеев С. Д.

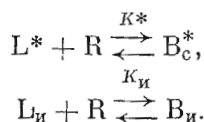
*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

В работе обоснованы общие принципы радиорецепторного метода анализа с использованием препаратов, содержащих мембранно-связанные рецепторы. Проанализировано влияние условий проведения анализа, средства лигандов к рецепторам, относительного вклада неспецифического связывания и концентраций лигандов на точность метода, его чувствительность, на максимальную определяемую из данной калибровочной кривой концентрацию и на диапазон достоверно определяемых концентраций исследуемого соединения. Показано, что характеристики анализа тем лучше, чем меньше концентрация меченого лиганда, больше его сродство к рецептору и меньше вклад неспецифического связывания.

В последние годы получили распространение конкурентные методы анализа, в которых в качестве центров связывания лигандов используются антитела, специфически связывающие белки и ферменты [1—5]. Достоинствами этих методов являются высокая специфичность и чувствительность, обусловленные высоким сродством антител к их лигандам. В настоящее время для количественного определения соединений нейрогормональной природы и лекарственных препаратов на их основе, а также для скрининга новых соединений и оценки их возможной физиологической активности широкое распространение получает радиорецепторный метод анализа [6—10]. В связи с этим возникает необходимость теоретического рассмотрения возможностей радиорецепторного метода, его достоинств и ограничений, что и явилось целью настоящей работы.

Радиорецепторный метод анализа основан на изучении конкурентного ингибирования исследуемыми соединениями связывания меченого лиганда со специфическими к нему рецепторами. Практически метод выглядит следующим образом: препараты, содержащие фиксированные количества мембран и меченого лиганда, инкубируют в присутствии различных количеств исследуемого соединения до достижения равновесия, затем с помощью фильтрования или центрифугирования мембраны отделяют от раствора и измеряют их радиоактивность. На основе полученных результатов строят калибровочную кривую, с помощью которой можно легко определить концентрацию исследуемого соединения в других образцах. Например, представленная на рис. 1 калибровочная кривая позволяет определить концентрацию гексапептида *Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg*.

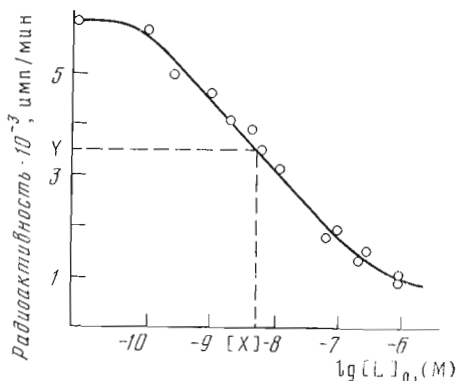
Рассмотрим простейший случай, когда меченый лиганд (L^*) и исследуемый лиганд (L_n) специфически связываются только с одним типом рецептора (R) с образованием комплексов B_c^* и B_n соответственно:



В этом случае концентрация связанного лиганда $[L^*]$ определяется уравнением (1) [11]:

$$[B^*] = [B_c^*] + [B_n] = \frac{[R]_0 [L^*]}{K^*(1 + [L_n]/K_n) + [L^*]} + K_{nc}^* [L^*], \quad (1)$$

Рис. 1. Калибровочная кривая для определения концентрации Туг-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg по вытеснению $[^3\text{H}]$ налоксона. Условия: 0,5 мл суспензии лиофилизированных мембран головного мозга крыс (1,5 мг белка/мл), содержащей 10 мМ N-(2-оксиэтилпиперазин)-N'-этансульфоновую кислоту (рН 7,4), инкубировали в присутствии 0,4 нМ $[^3\text{H}]$ налоксона (Amersham, Англия; 59 Ки/ммоль) и различных количества указанного пептида в течение 30 мин при 25° С. Для отделения мембран от раствора использовали фильтры GF/B (Whatman, Англия). Y — радиоактивность фильтра при концентрации [X] исследуемого пептида



где $[R]_0$ — общая концентрация рецептора; K^* и K_n — константы диссоциации комплексов B_c^* и B_n ; K_{nc}^* — константа, характеризующая неспецифическое связывание меченого лиганда (измеряется в присутствии избытка L_n); $[L^*]$ и $[L_n]$ — концентрации меченого лиганда и анализируемого соединения в растворе. В условиях проведения радиорецепторного анализа концентрации связанных лигандов, как правило, значительно меньше их концентраций в растворе, поэтому вместо $[L^*]$ и $[L_n]$ можно использовать значения исходных концентраций этих лигандов.

Основные характеристики любого метода анализа — это его чувствительность, точность, максимальная определяемая с помощью данной калибровочной кривой концентрация и диапазон достоверно определяемых концентраций соединения. Представляется целесообразным остановиться на рассмотрении этих характеристик более подробно.

Чувствительность радиорецепторного анализа можно определить как минимальную доступную измерению с помощью данной калибровочной кривой концентрацию лиганда, $[L_n]_{\text{мин}}$ (рис. 2). $[L_n]_{\text{мин}}$ — наименьшая концентрация лиганда, при которой разность концентраций связанного меченого лиганда в отсутствие и в присутствии исследуемого лиганда, т. е. разность $[B^*]_0 - [B^*]_1$, еще статистически значима. Статистическая значимость в данном случае означает, что если ошибки измерения величин $[B^*]_0$ и $[B^*]_1$ нормально распределены и оценки стандартных отклонений S_1 их средних значений $[\bar{B}^*]_0$ и $[\bar{B}^*]_1$ одинаковы, то эти значения различаются по критерию Стьюдента [12]:

$$t = \frac{[\bar{B}^*]_0 - [\bar{B}^*]_1}{S_1 \sqrt{\frac{1}{n_0} + \frac{1}{n_1}}} \geq t_\alpha, \quad (2)$$

где n_0 и n_1 — число измерений концентраций $[B^*]_0$ и $[B^*]_1$; t_α — граница одностороннего критерия Стьюдента с соответствующим уровнем значимости α и степенями свободы $n_0 + n_1 - 2$. Из соотношения (2) видно, что наименьшее отличие $[\bar{B}^*]_1$ от $[\bar{B}^*]_0$ будет наблюдаться при $t = t_\alpha$. В этом случае

$$\Delta[B^*]_0 = [\bar{B}^*]_0 - [\bar{B}^*]_1 = t_\alpha S_1 \sqrt{\frac{1}{n_0} + \frac{1}{n_1}} \quad (3)$$

и при фиксированных значениях t_α , n_0 и n_1 , величина $\Delta[B^*]_0$ пропорциональна S_1 . Во многих случаях, в частности, как установлено нами, при радиорецепторном анализе опиатов и опиоидных пептидов, относительная ошибка измерения $[B^*]$ постоянна и равна ε . Отсюда следует, что

$$S_1 = \varepsilon [\bar{B}^*]_0. \quad (4)$$

Таким образом:

$$\Delta[B^*]_0 = [\bar{B}^*]_0 t_\alpha \varepsilon \sqrt{\frac{1}{n_0} + \frac{1}{n_1}} = \gamma_1 [\bar{B}^*]_0, \quad (5)$$

где $[R_{nc}]_0$ — общая концентрация центров неспецифического связывания на мембранах; K_d^* — константа диссоциации комплексов меченого лиганда с этими центрами; $K_{ад}^*$ — константа, характеризующая адсорбцию меченого лиганда на фильтрах или на стенках центрифужных пробирок. Используя выражение (9), отношение $K_{nc}^* K^* / [R]_0$ можно записать следующим образом:

$$\frac{K_{nc}^* K^*}{[R]_0} = \frac{K^*}{[R]_0} \left(\frac{[R_{nc}]_0}{K_d^*} + K_{ад}^* \right). \quad (10)$$

Если неспецифическое связывание меченого лиганда обусловлено преимущественно мембранами, т. е. если $K_{ад}^* \ll [R_{nc}]_0 / K_d^*$ (это наблюдается, например, при связывании опиатов — морфина, налоксона и др.), то уравнение (10) приобретает вид

$$\frac{K_{nc}^* K^*}{[R]_0} = \frac{K^*}{[R]_0} \frac{[R_{nc}]_0}{K_d^*} \quad (11)$$

и величина $K_{nc}^* K^* / [R]_0$ определяется только относительным содержанием центров неспецифического и специфического связывания, которое постоянно для каждого конкретного препарата и не зависит от концентрации мембран. В этом случае для уменьшения неспецифического связывания можно использовать мембранные фракции, обогащенные рецепторами. Если же в неспецифическое связывание ощутимый вклад вносит адсорбция меченого лиганда на фильтрах или на стенках центрифужных пробирок (такие условия реализуются, например, при связывании опиоидных пептидов), то уравнение (10) можно записать так:

$$\frac{K_{nc}^* K^*}{[R]_0} = \frac{K^*}{[R]_0} \frac{[R_{nc}]_0}{K_d^*} + \frac{K^*}{[R]_0} K_{ад}^* = \text{const} + \frac{K^*}{[R]_0} K_{ад}^*. \quad (12)$$

Отсюда следует, что величину $K_{nc}^* K^* / [R]_0$ можно уменьшить (и, следовательно, повысить чувствительность анализа) путем увеличения концентрации мембран. Существуют и способы уменьшения $K_{ад}^*$: с этой целью фильтры предварительно силилируют или обрабатывают растворами веществ, способных блокировать центры неспецифического связывания исследуемых лигандов. Например, при изучении связывания β -эндорфина для блокирования этих центров используют бычий сывороточный альбумин или основной белок миелина [13].

Анализируя уравнение (8), надо отметить, что чувствительность анализа тем выше, чем меньше отношение $[L^*] / K^*$. Следовательно, анализ целесообразно проводить в условиях, когда $[L^*] \ll K^*$. В этом случае

$$[L_n]_{\text{мин}} = \gamma_1 \left[1 + \frac{K_{nc}^* K^*}{[R]_0} \right] K_n, \quad (13)$$

т. е. чувствительность анализа не зависит от концентрации меченого лиганда и определяется только его сродством к рецепторам. Если одновременно выполняются условия $[L^*] \ll K^*$ и $[L_n] \ll K_n$, то величина $K_{nc}^* K^* / [R]_0$ равна отношению концентраций неспецифически и специфически связанного меченого лиганда и выражение (13) приобретает вид

$$[L_n]_{\text{мин}} = \gamma_1 (1 + [\bar{B}_{nc}^*] / [\bar{B}_c^*]) K_n. \quad (14)$$

Согласно полученному уравнению, при $[\bar{B}_{nc}^*] / [\bar{B}_c^*] \ll 1$ чувствительность анализа зависит только от константы диссоциации комплекса исследуемого лиганда с рецептором.

На рис. 3 представлена кривая зависимости $[L_n]_{\text{мин}}$ от отношения $[L^*] / K^*$, построенная с помощью уравнения (8). Видно, что при заданных

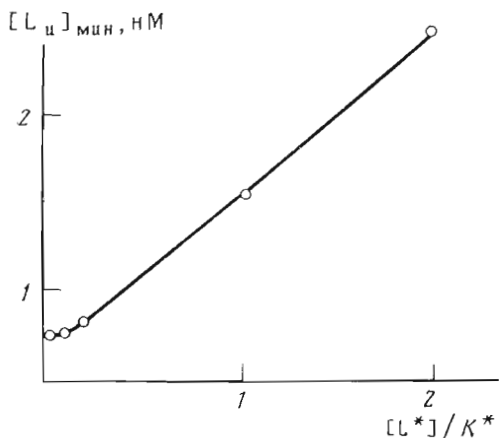


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость чувствительности анализа ($[L_u]_{\text{мин}}$) от концентрации меченого лиганда при $K_{II} = K^* = 5$ нМ, $[R]_0$ 0,2 нМ, $K_{HC}^* 0,005$

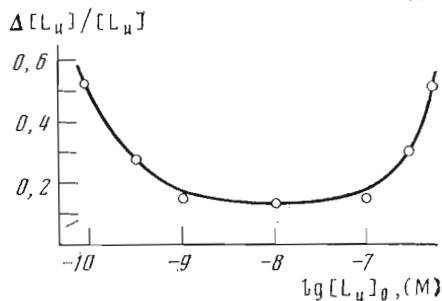


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость точности радиорецепторного метода анализа от измеряемой концентрации лиганда при $K_{H1} = K_1^* = 0,6$ нМ, $K_{H2} = K_2^* = 18$ нМ, $K_{HC}^* 0,006$, $[R_1]_0$ 0,11 нМ, $[R_2]_0$ 0,5 нМ

параметрах K^* , K_{HC}^* , $[R]_0$ и низких концентрациях L^* чувствительность слабо зависит от концентрации меченого лиганда. При работе с меченым лигандом минимальная определяемая концентрация зависит не только от свойств системы, но и от условий измерения радиоактивности. Для соблюдения условия постоянства относительной ошибки измерения необходимо учитывать зависимость времени просчета образца от его активности, а также от уровня фона сцинтиллятора. Методы определения времени счета образца и фона при заданной точности анализа приведены в работе [14].

Максимальная определяемая концентрация соединения. Важной характеристикой анализа является максимальная, точно определяемая из данной калибровочной кривой концентрация исследуемого соединения $[L_u]_{\text{макс}}$. Определим $[L_u]_{\text{макс}}$ как предельную концентрацию исследуемого лиганда, при которой еще наблюдается специфическое связывание меченого лиганда, т. е. разность концентраций $[B^*]_5$ и $[B_{HC}^*]$ достоверно больше нуля. Исходя из таких же предположений, которые использовались при выводе уравнения (3), получаем

$$\Delta [B^*]_5 = [\bar{B}^*]_5 - [\bar{B}_{HC}^*] = t_{\alpha} S_3 \sqrt{\frac{1}{n_{HC}} + \frac{1}{n_5}}, \quad (15)$$

или, поскольку $S_3 = \varepsilon [B_{HC}^*] = \varepsilon K_{HC}^* [L^*]$,

$$\Delta [B^*]_5 = K_{HC}^* [L^*] t_{\alpha} \varepsilon \sqrt{\frac{1}{n_{HC}} + \frac{1}{n_5}} = \gamma_2 K_{HC}^* [L^*], \quad (16)$$

где

$$\gamma_2 = t_{\alpha} \varepsilon \sqrt{\frac{1}{n_{HC}} + \frac{1}{n_5}},$$

n_{HC} и n_5 — число измерений концентраций $[B^*]_5$ и $[B_{HC}^*]$, а $[\bar{B}^*]_5$, $[\bar{B}_{HC}^*]$ — их средние значения. С другой стороны, согласно уравнению (1),

$$\Delta [B^*]_5 = \frac{[R]_0 [L^*]}{K^* \left(1 + \frac{[L_u]_{\text{макс}}}{K_{II}} \right) + [L^*]}. \quad (17)$$

Совместное решение уравнений (16) и (17) приводит к уравнению

$$[L_{II}]_{\max} = K_{II} \left[\frac{[R]_0}{K_{HC}^* K^* \gamma_2} - 1 - \frac{[L^*]}{K^*} \right]. \quad (18)$$

Полученное соотношение позволяет сделать следующие выводы: 1) максимальная, достоверно определяемая концентрация исследуемого соединения возрастает с уменьшением его сродства к рецептору, концентрации меченого лиганда и константы диссоциации комплекса этого лиганда с рецептором, а также с уменьшением ошибки определения $[B^*]_{HC}$, характеризуемой параметром γ_2 ; 2) $[L_{II}]_{\max}$ увеличивается с ростом отношения $[R]_0/K_{HC}^* K^*$. Как было показано выше, это отношение не зависит от концентрации рецепторов (а следовательно, и мембран), когда за неспецифическое связывание ответственны только мембраны и $[L^*] \ll K^*$. Если же неспецифическое связывание обусловлено не только мембранами, но и, например, фильтрами, то отношение $[R]_0/K_{HC}^* K^*$ возрастает с увеличением концентрации мембран. В обоих случаях при $[L^*] \ll K^*$ максимальная, достоверно определяемая концентрация соединения, как и $[L_{II}]_{\min}$, не зависит от концентрации меченого лиганда:

$$[L_{II}]_{\max} = K_{II} \left[\frac{[R]_0}{K_{HC}^* K^* \gamma_2} - 1 \right]. \quad (19)$$

Чувствительность радиорецепторного анализа и максимальная, достоверно определяемая концентрация соединения являются границами рабочего диапазона данной калибровочной кривой. В литературе при рассмотрении различных радиолигандных методов в качестве их основных характеристик приводят в первую очередь чувствительность и точность анализа [2, 3], не уделяя должного внимания максимальной, определяемой из данной калибровочной кривой концентрации соединения, а также ширине диапазона измерений его концентрации.

Рассмотрим факторы, определяющие ширину этого диапазона. Очевидно, этот диапазон тем шире, чем больше отношение $[L_{II}]_{\max}/[L_{II}]_{\min}$. Используя выражения (8) и (18), получаем

$$\frac{[L_{II}]_{\max}}{[L_{II}]_{\min}} = \frac{[R]_0/K_{HC}^* K^* \gamma_2 - 1 - [L^*]/K^*}{\gamma_1 \left[1 + \frac{K_{HC}^* K^*}{[R]_0} \left(1 + \frac{[L^*]}{K^*} \right) \right] \left(1 + \frac{[L^*]}{K^*} \right)}. \quad (20)$$

Из уравнения (20) видно, что отношение $[L_{II}]_{\max}/[L_{II}]_{\min}$ возрастает с уменьшением концентрации меченого лиганда. В случае же $[L^*] \ll K^*$ уравнение (20) приобретает вид

$$\frac{[L_{II}]_{\max}}{[L_{II}]_{\min}} = \frac{[R]_0/K_{HC}^* K^* \gamma_2 - 1}{\gamma_1 \left(1 + \frac{K_{HC}^* K^*}{[R]_0} \right)}. \quad (21)$$

Итак, диапазон достоверного определения концентрации исследуемого соединения тем шире, чем меньше ошибка измерения $[B^*]$ и константа диссоциации K^* и чем больше отношение $[R]_0/K_{HC}^* K^*$.

Точность радиорецепторного анализа. Важной характеристикой анализа является точность измерения концентрации исследуемого соединения, определяемая как относительная ошибка ее измерения (рис. 2):

$$\frac{\Delta [L_{II}]}{[L_{II}]} = \frac{S_2}{[L_{II}] |d[B^*]/d[L_{II}]|_2},$$

где $|d[\bar{B}^*]/d[L_n]|_2$ — абсолютное значение производной зависимости $[\bar{B}^*]$ от $[L_n]$ в точке $[L_n]$. С учетом уравнений (1) и (4) получаем

$$\frac{\Delta[L_n]}{[L_n]} = \varepsilon \left[1 + \frac{K_{nc}^* K^*}{[R]_0} \left(1 + \frac{[L_n]}{K_n} + \frac{[L^*]}{K^*} \right) \right] \cdot \left(1 + \frac{[L_n]}{K_n} + \frac{[L^*]}{K^*} \right) \frac{K_n}{[L_n]} \quad (22)$$

Из выражения (22) видно, что отношение $\Delta[L_n]/[L_n]$ уменьшается, т. е. точность анализа возрастает с уменьшением относительной ошибки определения $[\bar{B}^*]$, а также с уменьшением величины отношения $K_{nc}^* K^*/[R]_0$ и концентрации меченого лиганда. При условии $[L^*] \ll K^*$ выражение (22) упрощается:

$$\frac{\Delta[L_n]}{[L_n]} = \varepsilon K_n \left[\frac{1}{[L_n]} + \frac{1}{K_n} + \frac{K_{nc}^* K^*}{[R]_0} \left(\frac{1}{[L_n]} + \frac{2}{K_n} + \frac{[L_n]}{K_n^2} \right) \right] \quad (23)$$

В этом случае точность тем выше, чем меньше константа диссоциации комплекса меченого лиганда с рецептором.

Как видно из соотношений (22) и (23), $\Delta[L_n]/[L_n]$ зависит от измеряемой концентрации лиганда и имеет минимальное значение, т. е.

$$\left(\frac{\Delta[L_n]}{[L_n]} \right) / \partial [L_n] = 0, \quad \text{при}$$

$$[L_n] = K_n \sqrt{\left(1 + \frac{[L^*]}{K^*} \right) \left(\frac{[R]_0}{K_{nc}^* K^*} + 1 + \frac{[L^*]}{K^*} \right)},$$

равное

$$\begin{aligned} & \left(\frac{\Delta[L_n]}{[L_n]} \right)_{\text{мин}} = \\ & = \frac{\varepsilon \left[1 + \frac{K_{nc}^* K^*}{[R]_0} \left(1 + \frac{[L^*]}{K^*} + \sqrt{\left(1 + \frac{[L^*]}{K^*} \right) \left(\frac{[R]_0}{K_{nc}^* K^*} + 1 + \frac{[L^*]}{K^*} \right)} \right) \right]}{\sqrt{\left(1 + \frac{[L^*]}{K^*} \right) \left(\frac{[R]_0}{K_{nc}^* K^*} + 1 + \frac{[L^*]}{K^*} \right)}} \times \\ & \times \left[1 + \frac{[L^*]}{K^*} + \sqrt{\left(1 + \frac{[L^*]}{K^*} \right) \left(\frac{[R]_0}{K_{nc}^* K^*} + 1 + \frac{[L^*]}{K^*} \right)} \right]. \quad (24) \end{aligned}$$

Если $[L^*] \ll K^*$, то

$$\left(\frac{\Delta[L_n]}{[L_n]} \right)_{\text{мин}} = \frac{\varepsilon \left[1 + \frac{K_{nc}^* K^*}{[R]_0} \left(1 + \sqrt{\frac{[R]_0}{K_{nc}^* K^*} + 1} \right) \right] \left(1 + \sqrt{\frac{[R]_0}{K_{nc}^* K^*} + 1} \right)}{\sqrt{\frac{[R]_0}{K_{nc}^* K^*} + 1}} \quad (25)$$

Из соотношений (24) и (25) видно, что максимальная точность определения $[L_n]$ не зависит от сродства немеченого лиганда к рецепторам и целиком определяется свойствами меченого лиганда и препарата мембран. При $[L^*] \ll K^*$ и $[R]_0/K_{nc}^* K^* \ll 1$ максимальная точность достигается при концентрациях исследуемого соединения L_n , близких к константе диссоциации K_n .

Влияние гетерогенности рецепторов на радиорецепторный анализ. Мембранные препараты, получаемые, как правило, из грубого гомогената мозга, обычно содержат несколько типов рецепторов одного и того же класса, например μ -, δ - и κ -опиатные рецепторы. В этом случае лиганды, имеющие специфичность к одному типу рецепторов данного класса, могут связываться и с другими рецепторами этого же класса. Влияние гетеро-

тениости рецепторов на характеристики радиорецепторного метода анализа рассмотрим на примере простейшей схемы, содержащей только два типа специфических рецепторов, с которыми связываются лиганды L_{II} и L^* . Подобное ограничение вполне обосновано, поскольку из анализа изо-терм связывания лигандов следует, что экспериментально редко наблюдается связывание одного лиганда более чем с двумя типами рецепторов [11]. Если в процессе связывания лигандов участвует более двух рецеп-торов, основные выводы о влиянии гетерогенности сохраняются.

В основе радиорецепторного анализа с участием двух рецепторов ле-жит уравнение

$$[B^*] = \frac{[R_1]_0 [L^*]}{K_1^* \left(1 + \frac{[L_{II}]}{K_{II1}}\right) + [L^*]} + \frac{[R_2]_0 [L^*]}{K_2^* \left(1 + \frac{[L_{II}]}{K_{II2}}\right) + [L^*]} + K_{nc}^* [L^*],$$

где $[R_1]_0$, $[R_2]_0$ — концентрации рецепторов R_1 и R_2 ; K_1^* , K_2^* и K_{II1} , K_{II2} — константы диссоциации комплексов меченого и исследуемого лигандов с этими рецепторами. Аналогично схеме с одним рецептором получаем, что чувствительность радиорецепторного метода анализа в этом случае равна

$$[L_{II}]_{\min} = \frac{\gamma_1 \left[\frac{[R_1]_0}{K_1^* + [L^*]} + \frac{[R_2]_0}{K_2^* + [L^*]} + K_{nc}^* \right]}{\frac{[R_1]_0 (K_1^*/K_{II1})}{(K_1^* + [L^*])^2} + \frac{[R_2]_0 (K_2^*/K_{II2})}{(K_2^* + [L^*])^2}}. \quad (26)$$

Из уравнения (26) получаем, что чувствительность тем выше, чем мень-ше ошибка определения $[B^*]$, характеризуемая параметром γ_1 , константа неспецифического связывания K_{nc}^* и концентрация меченого лиганда $[L^*]$, т. е. условия повышения чувствительности такие же, что и для схе-мы с одним рецептором. Если $[L^*]$ значительно меньше K_1^* и K_2^* , то чувствительность радиорецепторного анализа не зависит от $[L^*]$ и опре-деляется выражением

$$[L_{II}]_{\min} = \frac{\gamma_1 \left[[R_1]_0/K_1^* + [R_2]_0/K_2^* + K_{nc}^* \right]}{[R_1]_0/K_1^* K_{II1} + [R_2]_0/K_2^* K_{II2}}. \quad (27)$$

В случае, когда лиганды L и L^* обладают одинаковой специфичностью, т. е., например, $K_{II2} > K_{II1}$, а $K_2^* > K_1^*$, и сродство лигандов к низкоаффи-нным рецепторам в несколько раз превышает их сродство к высокоаффи-ным, так что $K_2^* K_{II2} \gg K_1^* K_{II1}$, а концентрации этих рецепторов близки, то

$$\frac{[R_1]_0}{K_1^* K_{II1}} \gg \frac{[R_2]_0}{K_2^* K_{II2}}$$

и выражение (27) примет следующий вид:

$$[L_{II}]_{\min} = \gamma_1 K_{II1} \left[1 + \frac{[R_2]_0}{[R_1]_0} \left(\frac{K_1^*}{K_2^*} \right) + \frac{K_{nc}^* K_1^*}{[R_1]_0} \right]. \quad (28)$$

Сравнение уравнений (28) и (13) показывает, что они различаются толь-ко членом $([R_2]_0/[R_1]_0) (K_1^*/K_2^*)$. Таким образом, наличие наряду с высо-коаффиным низкоаффиного центра связывания приводит к уменьшению чувствительности радиорецепторного метода анализа, причем степень уменьшения зависит от вклада низкоаффиного центра в специфическое связывание. Следует, однако, отметить, что и в этом случае чувствитель-

ность радиорецепторного анализа определяется главным образом характеристиками связывания лигандов L_n и L^* с высокоаффинными рецепторами.

Гетерогенность рецепторов сказывается и на величине максимальной определяемой концентрации лиганда. Нетрудно показать, что в случае связывания лиганда с двумя типами рецепторов в условиях

$$[L^*] \ll K_1^* \text{ и } [L^*] \ll K_2^*$$

$$\begin{aligned}
 [L_n]_{\text{макс, гет}} = & \frac{1}{2} \left[\frac{[R_1]_0 K_{n1}}{\gamma_2 K_{nc}^* K_1^*} + \frac{[R_2]_0 K_{n2}}{\gamma_2 K_{nc}^* K_2^*} - K_{n1} - K_{n2} + \right. \\
 & + \sqrt{\left(\frac{[R_1]_0 K_{n1}}{\gamma_2 K_{nc}^* K_1^*} + \frac{[R_2]_0 K_{n2}}{\gamma_2 K_{nc}^* K_2^*} - K_{n1} - K_{n2} \right)^2 + \dots} \\
 & \left. + 4K_{n1}K_{n2} \left(\frac{[R_1]_0}{\gamma_2 K_{nc}^* K_1^*} + \frac{[R_2]_0}{\gamma_2 K_{nc}^* K_2^*} - 1 \right) \right]. \quad (29)
 \end{aligned}$$

Отношения $[R_1]_0/\gamma_2 K_{nc}^* K_1^*$ и $[R_2]_0/\gamma_2 K_{nc}^* K_2^*$ равны соответственно $[\bar{B}_{1c}]_0/\gamma_2 [\bar{B}_{nc}]_0$ и $[\bar{B}_{2c}]_0/\gamma_2 [\bar{B}_{nc}]_0$ и, как следует из уравнения (19), превышают 1 (в противном случае эти величины не могут быть измерены).

Как видно из соотношений (19) и (29),

$$\begin{aligned}
 [L_n]_{\text{макс, гет}} & > \left(\frac{[R_1]_0}{\gamma_2 K_{nc}^* K_1^*} - 1 \right) K_{n1} + \left(\frac{[R_2]_0}{\gamma_2 K_{nc}^* K_2^*} - 1 \right) K_{n2} = \\
 & = [L_n]_{\text{макс, гом}} + \left(\frac{[R_2]_0}{\gamma_2 K_{nc}^* K_2^*} - 1 \right) K_{n2},
 \end{aligned}$$

т. е. наличие других типов рецепторов данного класса в системе приводит к увеличению максимальной определяемой концентрации лиганда L_n . Используя выражения (27) и (29), можно определить ширину диапазона определения концентрации L_n .

В случае, когда $[L^*]$ значительно меньше K_1^* и K_2^* , точность анализа определяется выражением

$$\begin{aligned}
 \frac{\Delta [L_n]}{[L_n]} = & \varepsilon \left[[R_1]_0 K_1^* \left(1 + \frac{[L_n]}{K_{n1}} \right) (K_2^*)^2 \left(1 + \frac{[L_n]}{K_{n2}} \right)^2 + \right. \\
 & + [R_2]_0 K_2^* \left(1 + \frac{[L_n]}{K_{n2}} \right) (K_1^*)^2 \left(1 + \frac{[L_n]}{K_{n1}} \right)^2 + \\
 & + K_{nc}^* (K_1^*)^2 \left(1 + \frac{[L_n]}{K_{n1}} \right)^2 (K_2^*)^2 \left(1 + \frac{[L_n]}{K_{n2}} \right)^2 \left. \right] / \left\{ [L_n] \times \right. \\
 & \times \left[[R_1]_0 \left(\frac{K_1^*}{K_{n1}} \right) (K_2^*)^2 \left(1 + \frac{[L_n]}{K_{n2}} \right)^2 + [R_2]_0 \left(\frac{K_2^*}{K_{n2}} \right) (K_1^*)^2 \left(1 + \frac{[L_n]}{K_{n1}} \right)^2 \right] \right\}. \quad (30)
 \end{aligned}$$

На рис. 4 представлена зависимость точности радиорецепторного метода анализа от измеряемой концентрации лиганда, рассчитанная с использованием формулы (30).

Полученные зависимости характеристик радиорецепторного метода анализа от параметров системы показывают, что все эти характеристики тем лучше, чем меньше ошибки определения $[B^*]$, чем меньше концентрация меченого соединения, больше его сродство к рецепторам, меньше вклад в $[B^*]_0$ неспецифического связывания, т. е. чем меньше отношение

$[\bar{B}_{nc}]_0/[\bar{B}_c]_0$. Различно влияние сродства исследуемого лиганда к рецеп-

тору на характеристики анализа: увеличение сродства приводит к увеличению чувствительности (уравнения (8), (13), (26) и (27)) и уменьше-

нию максимальной, достоверно определяемой концентрации лиганда (соотношение (18)), однако не влияет на ширину диапазона определения концентраций (уравнения (20) и (21)) и сложным образом влияет на точность (уравнения (22) и (30)). Все это необходимо учитывать при проведении анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Yalow R. S., Berson S. A.* In: Radioisotopes in medicine. In vitro studies/Eds Hayes R. Z., Coswitz F. A., Marphy B. E. P. Oak Ridge: U. S. Atomic Energy Commission, 1968, p. 7-41.
2. *Ekins R. P.* In: Radiochemical methods in analysis/Ed. Coomber D. J. N. Y.: Plenum Press, 1975, p. 349-406.
3. Principles of competitive binding assays/Eds Odell W. D., Daughaday W. H. Philadelphia - Toronto: J. B. Lippincott Company, 1974.
4. *Berson S. A., Yalow R. S.* J. Clin. Invest., 1959, v. 38, № 5, p. 1996-2016.
5. *Ekins R. P., Newman G. B., O'Riordan J. L.* In: Radioisotopes in medicine. In vitro studies/Eds Hayes R. Z., Coswitz F. A., Marphy B. E. P. Oak Ridge: U. S. Atomic Energy Commission, 1968, p. 59-101.
6. *Simantov R., Kuhar M. J., Pasternak G. W., Snyder S. H.* Brain Res., 1976, v. 106, № 1, p. 189-197.
7. *Hammonds R. G., Nicolas P., Li C. H.* Int. J. Peptide and Protein Res., 1982, v. 19, № 3, p. 556-561.
8. *Зайцев С. В., Курочкин И. Н., Сергеева М. Г.* Тез. докл. на IV Всесоюз. симпозиуме «Инженерная энзимология». М., 1983, ч. 1, с. 100.
9. *Зайцев С. В., Курочкин И. Н., Сергеева М. Г., Варфоломеев С. Д.* Тез. докл. на VI Всесоюз. симпозиуме «Химия белков и пептидов». Рига, 1983, с. 289.
10. *Сергеева М. Г.* Тез. IX всесоюз. конф. по биохимии нервной системы. Ереван, 1983, с. 85.
11. *Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В.* Кинетические методы в биохимических исследованиях. М.: Изд-во МГУ, 1982.
12. *Rodbard D.* Anal. Biochem., 1978, v. 90, № 1, p. 1-12.
13. *Ferrara P., Houghten R., Li C. H.* Biochim. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 89, № 3, p. 786-792.
14. *Donald L. H.* Applications of liquid scintillation counting. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 306-331.

Поступила в редакцию
18.VI.1984
После доработки
21.IX.1984

RADIORECEPTOR ASSAY: THEORETICAL PRINCIPLES OF THE METHOD

ZAITSEV S. V., SERGEEVA M. G., VARFOLOMEEV S. D.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic
Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

General principles of radioreceptor assay pertinent to the membrane receptor preparations are discussed. The effects of the following factors are analyzed: concrete conditions of the assay, ligands affinity for receptors, the effects of relative contribution of nonspecific binding and ligands concentrations on the precision and sensitivity of the assay, as well as on the maximal measurable concentration found from a given standard curve and on the range of reliable concentrations for a compound under study. The performance of the assay is shown to be the better, the lower is the concentration of the labeled ligand, the higher its affinity for the receptor and the lower is the nonspecific binding contribution.