



УДК 577.175.8'16:615.21.07

© 1990 г.

*И. И. Изумрудова, С. В. Зайцев, А. А. Кошкин,
Н. В. Породенко*, С. Д. Варфоломеев*

КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦЕНТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ НЕЙРОЛЕПТИКОВ НА ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;
* Институт прикладной молекулярной биологии МЗ СССР, Москва*

Анализ характеристик центров связывания низкомолекулярных нейромедиаторов и нейромоделюляторов на клетках крови — новый шаг в исследовании высокоспецифичных мембранных рецепторов в организме человека. Как и методы томографии, этот анализ позволяет прижизненно оценивать состояние рецепторных систем в норме и при различных патологиях. Центры связывания нейролептиков, обнаруженные на лимфоцитах [1], представляют особый интерес в связи с широким применением этих препаратов в клинической практике. Ряд исследователей для изучения соответствующих рецепторов на лимфоцитах [2—4] использует спироперидол. Настоящая работа посвящена изучению с помощью этого препарата спорного до сего времени вопроса о количестве типов центров связывания на лимфоцитах человека и определению их кинетических характеристик.

Работу проводили на лимфоцитах, выделенных из свежей крови здоровых доноров по стандартной методике [5]. Чистоту и жизнеспособность клеток контролировали на микроскопе «OPTON» с использованием красителя трипанового синего [6]. Связывание меченого тритием спироперидола (77 Ки/ммоль; Amersham, Англия) с лимфоцитами изучали в равновесных условиях по модифицированной методике [7] при 37°С, ресуспендируя клетки (20—25 млн./мл) в среде инкубации (2,7 мМ КСl, 135 мМ NaCl, 1,5 мМ КН₂РO₄, 8 мМ NaН₂РO₄, 10 мкМ паргалин, 0,1% аскорбиновая кислота), рН 7,4; время инкубации 10 мин. Клетки отделяли от реакционной среды на фильтрах Whatman GF/B (Англия). Количество связавшегося лиганда определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Mark 3 (США). Неспецифическое связывание оценивали при добавлении спироперидола до концентрации 10 мкМ.

После предварительной проверки обратимости процесса связывания [³Н]спироперидола нами была изучена изотерма специфического связывания лиганда с рецепторами лимфоцитов. Ее преобразование в координатах Скэтчарда приводит к кривой гиперболического вида (рис. 1). Такой характер зависимости может иметь место при отрицательной кооперативности в системе или при наличии как минимум двух независимых типов центров связывания [8]. Кинетическое исследование системы позволяет провести дискриминацию моделей и определить значения кинетических констант по методу, описанному в работе [8]. Для этого была получена серия кинетических кривых связывания в диапазоне концентраций [³Н]спироперидола 0,9—9,5 пМ. Показано, что кинетические кривые ассоциации удовлетворительно описываются суммой двух экспоненциальных членов в соответствии с выражением (1):

$$B = C_1^{h_1 t} e^{-k_1 t} + C_2^{h_2 t} e^{-k_2 t}, \quad (1)$$

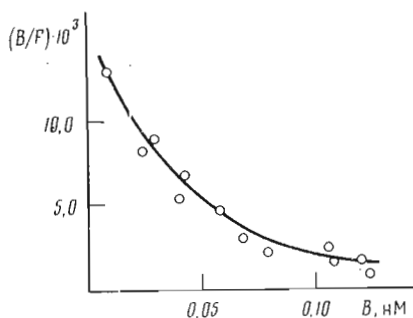


Рис. 1

Рис. 1. Изотерма специфического связывания спироперидола с центрами связывания лимфоцитов в координатах Скэтчарда

Рис. 2. Зависимости параметров λ и C (уравнения 1 и 2) от концентрации спироперидола $[L]$: а - для λ_1 (1) и λ_2 (2); б - для C_1 (1) и C_2 (2)

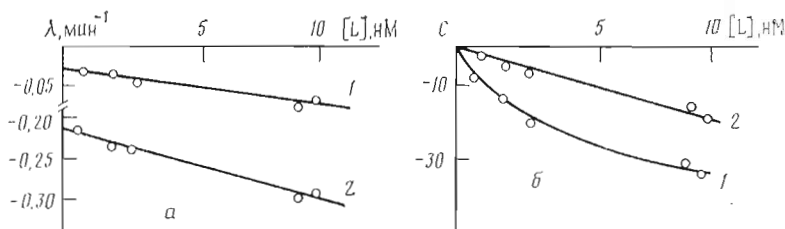


Рис. 2

где B — концентрация связанного $[^3H]$ спироперидола, C_1, C_2 — предэкспоненциальные множители,

$$\lambda_1 = -(k_1 [L] + k_{-1}); \quad \lambda_2 = -(k_2 [L] + k_{-2}). \quad (2)$$

На рис. 2 представлены зависимости параметров выражения (1) от концентрации спироперидола. Отрицательные значения множителей и линейный характер зависимостей показателей экспонент от концентрации лиганда позволяют сделать вывод об отсутствии в системе отрицательной кооперативности. Таким образом, гиперболический вид кривой на рис. 1 обусловлен наличием на лимфоцитах человека двух независимых типов центров связывания.

Для определения значений физико-химических параметров функционирования независимых типов центров связывания нами была применена компьютерная программа «Дельта» [9]. Равновесные значения констант диссоциации комплексов $[^3H]$ спироперидола с «высокоаффинными» и «низкоаффинными» центрами связывания $K_{д1}$ и $K_{д2}$ равны 3,5 и 19 нМ соответственно. При этом максимальные концентрации центров связывания равны 15 и 150 фмоль на 1 мг белка. Значения кинетических констант ассоциации (k_1 и k_2) комплексов спироперидола с центрами связывания на лимфоцитах определяли из прямых, представленных на рис. 2а с учетом выражений (2) [8]:

$$k_1 = 0,026 \text{ нМ}^{-1} \text{ мин}^{-1}, \quad k_2 = 0,008 \text{ нМ}^{-1} \text{ мин}^{-1}, \\ k_{-1} = 0,054 \text{ мин}^{-1}; \quad k_{-2} = 0,021 \text{ мин}^{-1},$$

откуда следует:

$$K_{д1} = \frac{k_{-1}}{k_1} = 2,1 \text{ нМ}, \quad K_{д2} = \frac{k_{-2}}{k_2} = 24 \text{ нМ}.$$

Хорошее соответствие значений констант, полученных двумя различными методами ($K_{д1}$ 2,1 и 3,5 нМ, $K_{д2}$ 19 и 26 нМ), говорит о справедливости сделанного ранее предположения о наличии в системе двух независимых типов центров связывания.

«Высокоаффинные» центры по значениям кинетических характеристик близки к центрам связывания спироперидола на препаратах головного мозга [10], в то время как описание «низкоаффинных» центров было проведено в данной работе впервые.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Leysen I. E.* // J. Physiol. 1981. V. 77. № 1. P. 351–362.
2. *Leysen I. E., Gommeren W., De Cleerck S.* // Eur. J. Pharmacol. 1983. V. 88. № 2. P. 125–130.
3. *Demon F.* // Life Sci. 1980. V. 27. № 19. P. 1587–1591.
4. *Coppen A., Wood K.* // Adv. Biochem. and Pharmacol. 1981. V. 34. P. 249–258.
5. *Хейфец Л. Б., Абалкин В. А.* // Лабор. дело. 1983. Т. 10. № 3. С. 579–581.
6. *Adams R. L. P.* Cell Culture for biochemists. Amsterdam/ North-Holland Biochemical Press, 1980. P. 254.
7. *Lowry O. U., Rosenbaush N. I., Farr U., Randell R. I.* // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
8. *Зайцев С. В., Курочкин П. Н., Варфоломеев С. Д., Березин П. В.* // Докл. АН СССР. 1985. Т. 281. № 3. С. 727–731.
9. *Зайцев С. В., Курочкин П. Н., Варфоломеев С. Д.* // Современные проблемы биоклетчатки. М.: МГУ, 1987. С. 198–225.
10. *Leysen I. E., Van Compel P., Verwimp M., Niemegeers C. I. E.* // CNS Receptors: From Pharmacology To Behaviour/Ed. Mandel P. N. Y.: Biochemical Press, 1983. P. 267.

Поступило в редакцию
6.VII.1989

I. I. IZUMRUDOVA, S. V. ZAITSEV, A. A. KOSHKIN,
N. V. PORODENCO*, S. D. VARFOLOMEEV

THE KINETIC CHARACTERISTICS OF THE NEUROLEPTIC BINDING SITES ON HUMAN LYMPHOCYTES

*M. V. Lomonosov Moscow State University; *Institute of Applied
Molecular Biology, Ministry of Health of the USSR, Moscow*

The kinetics and equilibrium of the interaction of [³H]spiperone with binding sites on human lymphocytes have been studied using radioligand analyses. The process of [³H]spiperone binding to these sites can be explained by the model of ligand interaction with two independent binding sites (high-affinity site, $K_{D_1}=3$ nM, and low-affinity site, $K_{D_2}=20$ nM), thus confirming the heterogeneity of the sites on human lymphocytes.