

УДК 576.314.6.088.6+612.11;612.82.015

## АЛЛОСТЕРИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ АТРОПИНА И КАРБАХОЛА НА АКТИВНОСТЬ $\alpha_2$ -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ МЕМБРАН КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

© 2011 г. Б. Н. Манухин, Л. А. Нестерова

Учреждение Российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334; факс 8 499 135 80 12; электронная почта: manukhinb@mail.ru

Поступила в редакцию 10.03.2011 г.

Показано аллостерическое влияние ингибирования и активации мускариновых рецепторов атропином и карбахолом на связывание специфического неселективного антагониста  $\alpha_2$ -адренорецепторов [ $^3\text{H}$ ]RX821002 мембранами коры головного мозга крыс. Установлено, что для  $\alpha_2$ -адренорецепторов лиганд-рецепторное взаимодействие соответствует модели – один гомогенный по аффинности пул рецепторов с двумя специфическими местами связывания лиганда. Параметры связывания [ $^3\text{H}$ ]RX821002 –  $K_d = 1.94 \pm 0.08$  нМ,  $B_{\max} = 13.4 \pm 1.8$  фмоль/мг белка,  $n = 2$ . Ингибирование мускариновых холинорецепторов атропином вызывает повышение аффинности  $\alpha_2$ -адренорецепторов ( $K_d = 1.36 \pm 0.12$  нМ) и снижение количества мест связывания ( $B_{\max} = 10.18 \pm 0.48$  фмоль/мг белка). Агонист мускариновых холинорецепторов карбахол повышает аффинность ( $K_d = 1.56 \pm 0.05$  нМ) и количество мест связывания ( $B_{\max} = 16.61 \pm 0.29$  фмоль/мг белка). В результате под влиянием атропина и карбахола увеличивается эффективность связывания лиганда ( $E = B_{\max}/2K_d$ ) с  $3.50 \pm 0.40$  до  $5.60 \pm 0.79$  и  $6.86 \pm 0.20$  фмоль/мг белка/нМ соответственно. Предполагается, что в мембранах коры головного мозга крыс  $\alpha_2$ -адренорецепторы существуют в виде гомодимеров.

**Ключевые слова:**  $\alpha_2$ -адренорецепторы, модуляция, связывание, [ $^3\text{H}$ ]RX821002, атропин, карбахол, димеры.

Взаимное влияние регуляторных систем организма (cross talk) может осуществляться на клеточном и субклеточном уровнях. На мембранах коры головного мозга крыс показано, что агонисты и антагонисты адренорецепторов аллостерически изменяют параметры кинетики связывания [ $^3\text{H}$ ]хинуклидинилбензилата мускариновыми рецепторами [1]. Подобные взаимодействия между рецепторами называют “внутримембранной рецептор-рецепторной взаимосвязью”, при которой стимуляция одного рецептора влияет на характеристики другого, что выражается в снижении или повышении аффинности к лиганду [2]. Так, активация  $\alpha_2$ -адренорецепторов модулирует мускариновый респираторный ритм новорожденных мышей [3]. Агонисты и антагонисты  $\alpha_2$ -адренорецепторов влияют на интраспинальное выделение ацетилхолина через никотиновые холинорецепторы [4]. Спинальные  $\alpha_2$ -адренорецепторы функционально связаны с холинергической активностью [5]. Взаимодействия нейротрансмиттерных систем в радиолигандных экспериментах более вероятно на рецепторном уровне. Можно предположить, что присоединение медиатора к своему рецептору изменяет характер связывания другого лиганда и, соответственно, реакцию клетки на этот медиатор [6].

Задача представленной работы состояла в изучении модулирующего действия антагониста и агониста мускариновых холинорецепторов атропина и карбахола на кинетику связывания специфического антагониста  $\alpha_2$ -адренорецепторов [ $^3\text{H}$ ]RX821002 мембранами коры головного мозга крыс.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

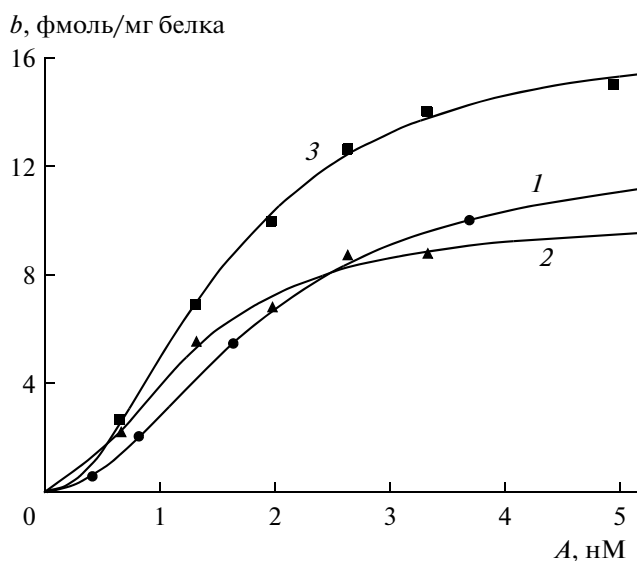
Опыты проводили на мембранах коры головного мозга крыс-самцов линии Вистар (210–250 г). Мембраны выделяли по методу [7]. Готовые мембранные препараты хранили при  $-70^\circ\text{C}$  в течение 3 недель. Концентрацию белка определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (Sigma) [8]. Связывание радиоактивного лиганда проводили в инкубационной среде с последующим отмыванием мембран от несвязанного лиганда на стекловолокнистых фильтрах GF/B. Объем инкубационной среды составлял 100 мкл – 50 мкл суспензии мембран, 50 мМ трис-НСl-буфер, рН 7.4, “холодный” вытеснитель, радиоактивный лиганд и агонист или антагонист мускариновых холинорецепторов. Смесь инкубировали в течение 30 мин при  $22^\circ\text{C}$ . Реакцию останавливали добавлением 1 мл холодного буфера ( $0^\circ\text{C}$ ). Для определения параметров связывания лиганда с  $\alpha_2$ -адреноре-

цепторами использовали специфический антагонист [ $^3\text{H}$ ]RX821002 (Amersham, Великобритания, 50 Ки/мМ) в концентрации 0.41–4.92 нМ. Специфическое связывание радиоактивного лиганда определяли по разнице между общим и неспецифическим в присутствии нерадиоактивного лиганда раувольфсина (100 мкМ). В качестве антагониста и агониста мускариновых холинорецепторов использовали атропин и карбахол (Sigma) в концентрации 10 мкМ. Вещества вводили в инкубационную среду за 20 мин перед добавлением [ $^3\text{H}$ ]RX821002.

Для определения закономерностей связывания радиоактивного лиганда со специфическими рецепторами использовали математические и графические методы анализа лиганд-рецепторных взаимодействий. Ранее теоретически и экспериментально были обоснованы методы количественного определения основных параметров в радиолигандных реакциях [9]. Взаимодействия специфических радиоактивных антагонистов адренорецепторов с изолированными мембранами коры мозга крыс описываются уравнениями для одного или двух пулов рецепторов. Действие каждого из веществ анализировали с использованием математических моделей связывания лиганда рецептором. Модели: I – один пул рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{\max}$ ,  $K_d$  и заданной величиной  $n = 1$ ; II – один пул рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{\max}$ ,  $K_d$  и заданной величиной  $n = 2$ ; III – один пул рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{\max}$ ,  $K_d$ ,  $n$ ; IV – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{m1}$ ,  $K_{d1}$ , и  $B_{m2}$ ,  $K_{d2}$  и заданной величиной  $n_1 = n_2 = 1$ ; V – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{m1}$ ,  $K_{d1}$ ,  $n_1$  и  $B_{m2}$ ,  $K_{d2}$ ,  $n_2$  ( $n_1 = n_2$ ); VI – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{m1}$ ,  $K_{d1}$ , и  $B_{m2}$ ,  $K_{d2}$  и заданной величиной  $n_1 = n_2 = 2$ ; VII – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{m1}$ ,  $K_{d1}$ ,  $n_1$  и  $B_{m2}$ ,  $K_{d2}$ ,  $n_2$  ( $n_1 \neq n_2$ ); VIII – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{m1}$ ,  $B_{m2}$ ,  $K_{d1} = K_{d2}$  и заданными величинами  $n_1 = 1$  и  $n_2 = 2$ ; IX – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{m1}$ ,  $B_{m2}$ ,  $K_{d1} = K_{d2}$ ,  $n_1 \neq n_2$ ; X – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{m1}$ ,  $B_{m2}$ ,  $K_{d1}$ ,  $K_{d2}$ ,  $n_1 = 1$ ,  $n_2 = 2$ . Теоретически возможны и другие, более сложные модели лиганд-рецепторного взаимодействия, но их применение пока не давало удовлетворительных результатов. Исходя из этого установлено, что связывание лиганда  $\alpha_2$ -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс в контроле происходит по модели, включающей один пул рецепторов и присоединение двух молекул лиганда к рецептору (модель III).

$$b = [(B_{\max}A^n)/(K_d^n + A^n)], \quad (1)$$

где  $b$  – количество связанного лиганда,  $B_{\max}$  – количество мест связывания лиганда с константой



**Рис. 1.** Экспериментальные точки и теоретические кривые специфического связывания [ $^3\text{H}$ ]RX821002  $\alpha_2$ -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс в контроле и при действии атропина и карбахола. По оси абсцисс – концентрация [ $^3\text{H}$ ]RX821002 (нМ). По оси ординат – количество мест, связанных лигандом ( $b$ , фмоль/мг белка). 1 – Контроль, 2 – атропин, 3 – карбахол. Параметры связывания в контрольном опыте –  $K_d = 1.88 \pm 0.29$  нМ,  $B_{\max} = 12.64 \pm 0.97$  фмоль/мг белка,  $n = 2$ . На фоне атропина –  $K_d = 1.26 \pm 0.12$  нМ,  $B_{\max} = 10.11 \pm 0.52$  фмоль/мг белка,  $n = 2$ . На фоне карбахола –  $K_d = 1.58 \pm 0.05$  нМ,  $B_{\max} = 16.86 \pm 0.31$  фмоль/мг белка,  $n = 2$ .

диссоциации  $K_d$  и коэффициентом Хилла  $n = 2$ ,  $A$  – концентрация лиганда в инкубационной среде. Расчет основных параметров лиганд-рецепторного взаимодействия –  $K_d$ ,  $B_{\max}$ ,  $n$  проводили с помощью компьютерной программы SigmaPlot. Эффективность связывания лигандов с рецепторами оценивали по уравнению:

$$E = B_{\max}/2K_d. \quad (2)$$

Эффективность  $E$  – интегральный показатель, количественно характеризующий величину связывания лиганда при его концентрации, равной  $K_d$  (фмоль/мг белка/нМ) [9]. На рисунках приведены данные конкретных опытов, а в таблице – средние результаты экспериментов. Теоретические кривые строили по уравнению (1) для одного пула рецепторов. На теоретические кривые нанесены экспериментальные точки. В опытах было по пять–семь точек, каждая с трехкратным повтором. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента ( $p < 0.05$ ). Все значения представлены как средние арифметические и стандартные ошибки средней ( $M \pm SEM$ ).

Для количественной оценки влияния исследованных веществ на основные параметры лиганд-рецепторного взаимодействия ( $K_d$  или  $B_m$ ) рас-

Аллостерическое влияние атропина и карбахола на связывание [<sup>3</sup>H]RX821002 α<sub>2</sub>-адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс

Параметр	Контроль	Атропин	Карбахол
$K_d$ , нМ	1.94 ± 0.08	1.36 ± 0.12*	1.56 ± 0.05*
$B_{max}$ , фмоль/мг	13.37 ± 1.75	10.18 ± 0.48	16.61 ± 0.29*
$n$	2	2	2
$E$ , фмоль/мг/нМ	3.50 ± 0.40	5.60 ± 0.79*	6.86 ± 0.20*
$AC_{50}$ ( $K_d$ ), мкМ		33.45	51.05
$AC_{50}$ ( $B_{max}$ ), мкМ			41.26
$IC_{50}$ ( $B_{max}$ ), мкМ		31.91	

*Примечание.*  $K_d$  – константа диссоциации,  $B_{max}$  – количество адренорецепторов,  $E$  – эффективность,  $n$  – коэффициент Хилла,  $IC_{50}$  – количественная характеристика ингибирования связывания,  $AC_{50}$  – количественная характеристика активации связывания. \*  $p < 0.05$ .

считывали их константы ингибирования и активации по уравнениям [10]:

$$IC_{50} = (I B_{maxe}) / (B_{maxc} - B_{maxe}), \quad (3)$$

$$AC_{50} = (A K_{dc}) / (K_{dc} - K_{de}), \quad (4)$$

$$AC_{50} = (A B_{maxc}) / (B_{maxe} - B_{maxc}), \quad (5)$$

где показатель  $IC_{50}$  в уравнении (3) соответствует концентрации вещества, снижающей количество рецепторов ( $B_{max}$ ) в 2 раза, а  $AC_{50}$  в уравнениях (4) и (5) соответствует концентрации вещества, повышающей аффинность (снижение  $K_d$ ) или количество мест связывания ( $B_{max}$ ) в 2 раза.  $A$  – концентрация активатора,  $K_{dc}$  – константа диссоциации в контроле,  $K_{de}$  – константа диссоциации в эксперименте,  $B_{maxc}$  и  $B_{maxe}$  – плотность рецепторов в контроле и эксперименте соответственно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Связывание [<sup>3</sup>H]RX821002 α<sub>2</sub>-адренорецепторами изолированных мембран коры головного мозга крыс описывается стандартной кривой насыщения (рис. 1, 1). Математический анализ экспериментальных данных показал, что наименьшие стандартные ошибки средней в контроле получены при их расчете по уравнению (1) и модели III связывания – присоединение двух молекул лиганда к рецептору и одного гомогенного по аффинности пула рецепторов (таблица). Графический анализ экспериментальных данных с помощью уравнения (6) – линеаризированной формы уравнения (1) – в координатах ( $b$ ;  $b/A^n$ ) также соответствует существованию одного гомогенного пула α<sub>2</sub>-адренорецепторов при  $n = 2$  (рис. 2, 1).

$$(b/A^n) = [(B_{max}) / (K_d^n)] - [b / (K_d^n)]. \quad (6)$$

Для демонстрации соответствия рассчитанных параметров экспериментальным результатам в конкретном опыте по уравнениям (1) и (6) построены теоретические кривые, с которыми хорошо совпадают экспериментальные точки (рис. 1, 1 и 2, 1).

Ингибирование мускариновых холинорецепторов атропином вызывает изменения связывания специфического антагониста [<sup>3</sup>H]RX821002. Общий характер взаимодействия лиганда с α<sub>2</sub>-адренорецепторами не меняется, но при этом на 30% повышается чувствительность (снижается  $K_d$ ) и отмечается некоторое уменьшение плотности α<sub>2</sub>-адренорецепторов ( $B_{max}$ ). В результате эффективность связывания ( $E$ ) достоверно повышается на 60% (таблица). Количественные изменения в связывании [<sup>3</sup>H]RX821002 представлены на рис. 1, 2), на котором видно хорошее совпадение экспериментальных точек и теоретических кривых. На графике (рис. 2, 2), построенном по уравнению (6), экспериментальные точки расположены на одной прямой. Смещение точки пересечения с осью ординат вверх указывает на повышение аффинности рецепторов, а сдвиг влево по оси абсцисс – уменьшение их плотности, что соответствует математическим расчетам (таблица).

Карбахол, агонист мускариновых холинорецепторов, также не повлиял на общий характер взаимодействия специфического антагониста [<sup>3</sup>H]RX821002 с α<sub>2</sub>-адренорецепторами, но вызвал изменения в параметрах его связывания. Чувствительность повысилась на 20%, количество мест связывания адренорецепторов увеличилось на 24%. В результате в 2 раза возросла эффективность связывания [<sup>3</sup>H]RX821002 α<sub>2</sub>-адренорецепторами (таблица, рис. 1, 3). На графике приведены экспериментальные точки и теоретические кривые, построенные по уравнению (1) в картезианских координатах. Видно увеличение количества мест связывания [<sup>3</sup>H]RX821002 при всех его концентрациях и совпадение экспериментальных точек с теоретическими кривыми. В координатах  $b$ ,  $b/A^2$  по уравнению (6) построены теоретические кривые в контроле и при действии карбахола, на которые нанесены экспериментальные точки (рис. 2, 3). Под влиянием карбахола происходит небольшое увеличение угла наклона прямой и ее смещение по оси абсцисс, что соответствует изменению параметров связывания лиганда (таблица).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Величина связывания лиганда зависит от его концентрации и насыщаема, т.е. при определенной, характерной для каждого типа рецепторов, концентрации лиганда в инкубационной среде достигается максимальное количество комплекса лиганда с активными рецепторами. Экспериментальные результаты лучше описываются уравнением (1) при величине  $n = 2$ , т.е. к рецептору присоединяются две молекулы лиганда, и  $\alpha_2$ -адренорецепторы существуют в виде гомогенного пула (таблица). На рис. 1 в картезианских координатах представлена зависимость величины реакции от концентрации лиганда. Величины основных параметров  $K_d$  и  $B_{max}$  характеризуют аффинность рецепторов и их плотность в эффекторной системе. Предполагается, что  $n$  (коэффициент Хилла) характеризует кооперативность взаимодействия лиганда с ферментом, показывает число молекул лиганда, присоединяющихся к ферменту [11, 12]. Хилл рассчитал кинетику связывания кислорода с гемоглобином в шести разных инкубационных средах и показал, что количество молекул кислорода, связывающихся с молекулой гемоглобина (величина  $n$ ), колеблется от 1.67 до 3.19 [13]. Для диализированного гемоглобина  $n = 1$ . Молекула гемоглобина состоит из четырех субъединиц [14], что позволяет предположить возможность присоединения к ней четырех молекул кислорода. Способность семидоменных G-белок-связывающих рецепторов образовывать гомо- и гетеродимеры установлена экспериментально [15]. Рецепторный гомодимер представляет собой макромолекулярный комплекс, состоящий, как минимум, из двух идентичных функциональных рецепторных единиц. В рецепторном гетеродимере биохимические свойства каждого из компонентов различаются [2]. Установлена гомо- и гетеродимеризация  $\alpha_{2A}$ - и  $\alpha_{2C}$ -адренорецепторов [16]. Гетеродимер  $\alpha_{1B}$  и  $\alpha_{1D}$  образует один рецептор с активностью большей, чем у отдельных подтипов [17].  $\alpha_{2B}$ -Адренорецепторы могут образовывать гомодимеры и гетеродимеры с мутантным  $\alpha_2$ -адренорецептором [18]. Полученная нами величина  $n = 2$  (таблица) в уравнении связывания лиганда с рецептором формально указывает на присоединение двух молекул лиганда к одному рецептору или существование рецепторов в виде гомодимеров. На основании теоретических и экспериментальных данных можно предполагать, что величина  $n$  показывает количество молекул лиганда, присоединяющихся к одному моно- или димерному рецептору. Эта величина, наряду с  $K_d$  и  $B_{max}$ , является объективным количественным показателем кинетики лиганд-рецепторного взаимодействия и функциональной характеристики специфических рецепторов.

Математический анализ выявил изменения в связывании [ $^3$ H]RX821002  $\alpha_2$ -адренорецепторами

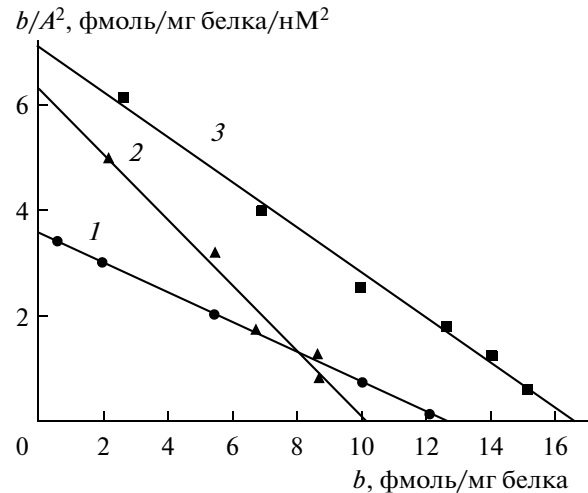


Рис. 2. Экспериментальные точки и теоретические кривые специфического связывания [ $^3$ H]RX821002  $\alpha_2$ -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс в контроле (1), при действии атропина (2) и карбахола (3). По оси абсцисс — количество мест, связанных лигандом ( $b$ , фоль/мг белка), по оси ординат — отношение количества мест, связанных лигандом, к квадрату его концентрации ( $b/A^2$ , фоль/мг/нМ<sup>2</sup>).

мембран коры головного мозга крыс при активации и ингибировании мускариновых холинорецепторов. Величина  $n$  в этих условиях не изменилась. Эффективность связывания лиганда возросла за счет повышения чувствительности рецепторов. Для количественной оценки действия атропина на параметры связывания  $\alpha_2$ -адренорецепторов были рассчитаны  $IC_{50}$  и  $AC_{50}$  по уравнениям (3) и (4) (таблица). Атропин достоверно повышает аффинность  $\alpha_2$ -адренорецепторов к [ $^3$ H]RX821002, но незначительно снижает их концентрацию. Для количественной характеристики действия карбахола на параметры связывания  $\alpha_2$ -адренорецепторов были рассчитаны  $AC_{50}$  по уравнениям (4), (5) (таблица). Активирующий эффект карбахола на связывание [ $^3$ H]RX821002 обусловлен увеличением как аффинности ( $K_d$ ), так и количества мест связывания ( $B_{max}$ ). Под влиянием карбахола эффективность связывания ( $E$ ) лиганда повысилась больше, чем при действии атропина, так как увеличились аффинность  $\alpha_2$ -адренорецепторов и количество мест связывания (таблица).

Рассмотрена система количественного анализа лиганд-рецепторных взаимодействий. Определяемые при этом основные параметры дают характеристику свойств исследуемой системы: количество пулов рецепторов, их аффинность к лиганду ( $K_d$ ), плотность рецепторов ( $B_{max}$ ), количество молекул лиганда, связывающихся с рецептором ( $n$ ). Производный параметр — эффективность  $E = B_{max}/2K_d$ , количественно характеризует общую активность эффекторной системы. На фоне антагониста и агониста мускариновых рецепторов атропина и карбахола возрастает связывание  $\alpha_2$ -адренорецепторами специфического антагониста [ $^3$ H]RX821002. При этом

эффект карбохола в 3.4 раза выше, чем атропина (таблица). Используемый метод анализа лиганд-рецепторных взаимодействий применим для изучения биологических реакций, результаты которых можно представить в количественном виде.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 09-04-00111а).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нестерова Л.А., Манухин Б.Н. 2010. Агонисты и антагонисты мускариновых холинорецепторов – модуляторы активности  $\alpha_1$ -адренорецепторов мембран коры головного мозга крыс. *Биол. мембраны*. **27** (2), 189–194.
2. Ferre A., Baler R., Bouvier M., Caron M.G., Devi L.A., Durroux T., Fuxe K., George S.R., Javitch J.A., Lohse M.J., Maskie K., Milligan G., Pflieger K.D.G., Pin J.-P., Volkow N.D., Waldhoer M., Franco R. 2009. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat. Chem. Biol.* **5** (3), 131–134.
3. Zanella S., Viemari J.C., Hilaire G. 2007. Muscarinic receptors and alpha2-adrenoceptors interact to modulate the respiratory rhythm in mouse neonates. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **157** (2–3), 215–225.
4. Abelson K.S., Höglund A.U. 2004. The effects of the alpha2-adrenergic receptor agonists clonidine and rilmenidine, and antagonists yohimbine and efaroxan, on the spinal cholinergic receptor system in the rat. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **94** (4), 153–160.
5. Yoon S.Y., Kim H.W., Roh D.H., Kwon Y.B., Han H.J., Beitz A.J., Lee J.H. 2006. Intrathecal clonidine suppresses zymosan-induced peripheral leukocyte migration in a mouse air pouch model via activation of spinal muscarinic type 2 receptors and sympathoadrenal medullary activity. *Neuropharmacology*. **51** (4), 829–837.
6. Манухин Б.Н., Нестерова Л.А., Смурова Е.А. 2001. Модуляция связывания [ $^3$ H]дигидроалprenолола  $\beta$ -адренорецепторами нативных эритроцитов крыс агонистом  $\alpha_1$ -адренорецепторов метоксамином, блокатором М-холинорецепторов атропином и мембранотропным агентом кокаином. *Биол. мембраны*. **18** (4), 277–282.
7. Henn S.W., Henn F.A. 1982. The identification of sub-cellular fractions of the central nervous system. In: *Handbook of Neurochemistry*. Ed. Lajtha A. New York, London: Plenum Press, p. 147–161.
8. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.I.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
9. Manukhin B.N., Nesterova L.A., Smurova E.A., Kichiculova T. P. 1999. An approach to analysis of radiolabeled ligand interactions with specific receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **386** (2–3), 273–288.
10. Манухин Б.Н., Нестерова Л.А. 2004. Влияние оксида азота на связывание [ $^3$ H]хинуклидинилбензилата мускариновыми холинорецепторами мембран коры головного мозга крыс. *Биол. мембраны*. **21** (1), 19–23.
11. Диксон М., Уэбб Э. 1982. *Ферменты*. Пер. с англ. М.: Мир, 1117 с.
12. Келети Т. 1990. *Основы ферментативной кинетики*. Пер. с англ. М.: Мир, 348 с.
13. Hill A.V. 1910. The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.* **40**. Proceed. Physiol. Soc. P. iv–vii.
14. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. 2007. *Биологическая химия*. М.: Медицина, 704 с.
15. Авдонин П.В. 2005. Структура и сигнальные свойства сопряженных с G-белками рецепторных комплексов. *Биол. мембраны*. **22** (1), 3–26.
16. Small K.M., Schwarb M.R., Glinka C., Theiss C.T., Brown K.M., Seman C.A., Liggett S.B. 2006. Alpha1A- and alpha2C-adrenergic receptors form homo- and heterodimers: the heterodimeric state impairs agonist-promoted GRK phosphorylation and beta-arrestin recruitment. *Biochemistry*. **45** (15), 4760–4767.
17. Hague C., Lee S.E., Chen Z., Prinster S.C., Hall R.A., Minneman K. P. 2006. Heterodimers of alpha1B- and alpha1D-adrenergic receptors form a single functional entity. *Mol. Pharmacol.* **69** (1), 45–55.
18. Zhou F., Filipeanu C.M., Duvernay M.T., Wu G. 2006. Cell-surface targeting of alpha2-adrenergic receptors – inhibition by a transport deficient mutant through dimerization. *Cell Signal*. **18** (3), 18–27.

## Allosteric Effects of Atropine and Carbachol on the Activity of $\alpha_2$ -Adrenoceptors in Rat Brain Cortex Membranes

B. N. Manukhin, L. A. Nesterova

*Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova, 26, Moscow, 119334 Russia; Fax: (095)8 499 135 80 12; e-mail: manukhin@mail.ru*

Activation and inhibition of the muscarinic cholinergic receptors by atropine and carbachol are shown to exert allosteric effects on the binding of specific nonselective  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist [ $^3$ H]RX821002 in rat cerebral cortex membranes. The ligand-receptor interaction for  $\alpha_2$ -adrenoceptors corresponded to the model suggesting the presence of one homogenous pool of receptors with two specific binding sites. The parameters of the [ $^3$ H]RX821002 binding were  $K_d = 1.94 \pm 0.08$  nM,  $B_{max} = 13.4 \pm 1.8$  fmol/mg protein,  $n = 2$ . The inhibition of muscarinic cholinergic receptors by atropine induced a decrease of dissociation constant ( $K_d = 1.36 \pm 0.12$  nM), an increase of the affinity and a decrease of the  $\alpha_2$ -adrenoceptor density ( $B_{max} = 10.18 \pm 0.48$  fmol/mg protein). The muscarinic cholinergic receptors agonist carbachol induced an increase of the affinity ( $K_d = 1.56 \pm 0.05$  nM) and the quantity of receptors ( $B_{max} = 16.61 \pm 0.29$  fmol/mg protein). As the result, under the influence the atropine and carbachol, the binding efficiency ( $E = B_{max}/2K_d$ ) increased from  $3.50 \pm 0.40$  to  $5.60 \pm 0.79$  and  $6.86 \pm 0.20$  fmol/mg protein/nM, respectively. The data suggest that  $\alpha_2$ -adrenoceptors exist as homodimers in rat cerebral cortex.