

УДК 576.314.6.088.6+612.11,612.82.015

## АГОНИСТЫ И АНТАГОНИСТЫ $\beta$ -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ – МОДУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ $\alpha_2$ -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ МЕМБРАН КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

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

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

Поступила в редакцию 16.03.2010 г.

На субклеточных фракциях мембран коры головного мозга крыс изучено влияние активации и блокады  $\beta$ -адренорецепторов изопропилнорадреналином и пропранололом на связывание специфического неселективного антагониста  $\alpha_2$ -адренорецепторов [ $^3\text{H}$ ]RX821002. Установлено, что лиганд-рецепторное взаимодействие  $\alpha_2$ -адренорецепторов соответствует модели: один по аффинности пул рецепторов и присоединение двух молекул лиганда к одному димерному рецептору. Параметры связывания [ $^3\text{H}$ ]RX821002 –  $K_d = 1.57 \pm 0.27$  нМ,  $B_{\max} = 7.24 \pm 1.63$  фмоль/мг белка,  $n = 2$ . При активации  $\beta$ -адренорецепторов изопропилнорадреналином связывание радиоактивного лиганда с  $\alpha_2$ -адренорецепторами происходит по такой же модели. Чувствительность  $\alpha_2$ -адренорецепторов к [ $^3\text{H}$ ]RX821002 снижается на 56% ( $K_d = 3.55 \pm 0.02$  нМ), а количество активных адренорецепторов увеличивается на 69% ( $B_{\max} = 12.24 \pm 0.06$  фмоль/мг белка). Под влиянием пропранолола изменяется характер связывания лиганда – определяются два пула рецепторов с параметрами  $K_{d1} = 0.61 \pm 0.02$  нМ,  $K_{d2} = 3.41 \pm 0.13$  нМ,  $B_{m1} = 1.88 \pm 0.03$  фмоль/мг белка,  $B_{m2} = 9.27 \pm 0.08$  фмоль/мг белка,  $n = 2$ . Количество активных рецепторов ( $B_{\max}$ ) возрастает на 54%. Предполагается, что в субклеточных фракциях мембран головного мозга крыс  $\alpha_2$ -адренорецепторы существуют в виде димеров. Выявлено модулирующее действие изопропилнорадреналина и пропранолола на связывание специфического антагониста  $\alpha_2$ -адренорецепторами, которое проявляется в ингибировании и изменении общего характера связывания [ $^3\text{H}$ ]RX821002.

**Ключевые слова:** субклеточные фракции мембран головного мозга крыс, связывание, антагонист  $\alpha_2$ -адренорецепторов [ $^3\text{H}$ ]RX821002, изопропилнорадреналин, пропранолол, димеры рецепторов.

Реакция организма, органа или клетки на изменение внешней или внутренней среды является результатом взаимодействия нескольких регуляторных систем. Взаимодействия (cross-talks) могут быть как антагонистическими, так и односторонними и осуществляются на уровнях от организменного до клеточного. Межклеточное взаимодействие в нервных системах происходит с участием специфических рецепторов. Так, агонист  $\alpha_1$ -адренорецепторов метоксамин, антагонист М-холинорецепторов атропин и мембранотропный агент кокаин модулируют связывание [ $^3\text{H}$ ]дигидроалprenолола  $\beta$ -адренорецепторами нативных эритроцитов крыс [1]. В мембранах мозга цыпят серотонин изменяет параметры связывания специфического антагониста [ $^3\text{H}$ ]RX821002 с  $\alpha_2$ -адренорецепторами [2]. Ацетилхолин модулирует активность дыхательного ритма через никотиновые и мускариновые холинорецепторы, взаимодействуя с  $\alpha_2$ -адренорецепторами [3]. Обнаружен модуляторный эффект рецепторов аденозина А1 на  $\alpha_2$ -адренорецепторы в культуре нейронов нормо- и гипертензивных

крыс [4]. Агонисты и антагонисты  $\alpha_2$ -адренорецепторов влияют на спинальную холинергическую систему крыс [5]. Клонидин регулирует микроциркуляцию у спонтанно гипертензивных крыс [6].  $\alpha_2$ - и  $\beta$ -адренорецепторы в нейронах мезэнцефального красного ядра модулируют ответы GABA<sub>A</sub> и GABA<sub>B</sub> [7]. Неселективный блокатор  $\alpha_1$ -рецепторов доксазосин ингибирует сократительную реакцию мочевого пузыря кролика на серотонин и связывание [ $^3\text{H}$ ]5-гидрокситриптамина со специфическими рецепторами [8].  $\alpha_2$ -Адренорецепторная система принимает участие в модуляции супраспинальной опиоидной анальгезии [9]. Опиоидный агонист меперидин взаимодействует с  $\alpha_2$ -адренорецепторами [10]. Агонист  $\beta$ -адренорецепторов CGP-12177A является неселективным агонистом  $\alpha_1$ -адренорецепторов [11].

Приведенные данные свидетельствуют о взаимодействиях нейротрансмиттерных систем. В радиолигандных экспериментах оно более вероятно на уровне мембраны клетки. Можно предположить, что присоединение нейротрансмиттера к своему рецептору изменяет активность других ре-

цепторов, модулируя специфические реакции клеток.

Задачей работы было изучение действия специфических агониста и антагониста  $\beta$ -адренорецепторов — изопропилнорадреналина и пропранолола — на кинетику связывания специфического неселективного антагониста  $\alpha_2$ -адренорецепторов [ $^3\text{H}$ ]RX821002 субклеточными фракциями мембран коры головного мозга крыс.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на субклеточных фракциях мембран коры головного мозга крыс-самцов линии Вистар (210–250 г), которые выделяли по методу Henn S.W. и Henn F.A. [12]. Готовые мембранные препараты хранили при  $-70^\circ\text{C}$  в течение 3 нед. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [13], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (Sigma). Связывание радиоактивного лиганда проводили в инкубационной среде с последующим отмыванием мембран от несвязанного лиганда на стекловолоконных фильтрах GFB [14]. Объем инкубационной среды составлял 100 мкл — 50 мкл суспензии мембран, трис-НСI-буфер 50 мМ, pH 7.4, “холодный” вытеснитель, агонист или антагонист  $\beta$ -адренорецепторов и радиоактивный лиганд. Реакцию останавливали 1 мл холодного буфера ( $0^\circ\text{C}$ ). Для определения параметров связывания лиганда с  $\alpha_2$ -адренорецепторами использовали специфический неселективный антагонист  $\alpha_2$ -адренорецепторов [ $^3\text{H}$ ]RX821002 (Amersham, Великобритания, 77 Ки/мМ) в концентрации 0.33–6.60 нМ. Специфическое связывание радиоактивного лиганда определяли по разнице между общим и неспецифическим связыванием в присутствии нерadioактивного лиганда — раувольфсина в концентрации 10 мкМ. В качестве агониста и антагониста  $\beta$ -адренорецепторов использовали изопропилнорадреналин и пропранолол (Sigma) в концентрации 10 мкМ. Смесь инкубировали в течение 30 мин при  $22^\circ\text{C}$ . Вещества вводили в инкубационную среду за 20 мин до добавления [ $^3\text{H}$ ]RX821002.

Для определения закономерностей связывания антагонистов со специфическими рецепторами использовали математические и графические методы анализа лиганд-рецепторных взаимодействий [15]. Ранее теоретически и экспериментально было показано, что взаимодействие специфических радиоактивных антагонистов адренорецепторов с субклеточными фракциями мембран коры головного мозга крыс описывается уравнениями для одного или двух пулов рецепторов. Действие каждого из исследованных веществ анализировали с использованием 9 математических моделей связывания лиганда рецептором [16]. Установлено, что взаимодействие лиганда с

$\alpha_2$ -адренорецепторами субклеточных фракций мембран коры головного мозга крыс в контроле соответствует модели с одним, а в эксперименте с одним или двумя пулами рецепторов и присоединением двух молекул лиганда к рецептору.

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

$$b = [(B_{m1}A^{n1})/(K_{d1}^{n1} + A^{n1})] + [(B_{m2}A^{n2})/(K_{d2}^{n2} + A^{n2})], \quad (2)$$

где  $b$  — количество связанного лиганда,  $B_{\max}$  (фмоль/мг белка) — количество мест связывания лиганда с константой диссоциации  $K_d$  (нМ),  $B_{m1}$  и  $B_{m2}$  — количество мест связывания лиганда в высоко- и низкоаффинном пулах рецепторов в одной эффекторной системе с константами диссоциации  $K_{d1}$  и  $K_{d2}$  и коэффициентами Хилла  $n_1$  и  $n_2$ ,  $[A]$  — концентрация лиганда в среде. Расчет основных параметров лиганд-рецепторного взаимодействия —  $K_d$ ,  $B_{\max}$ ,  $K_{d1}$ ,  $K_{d2}$ ,  $B_{m1}$ ,  $B_{m2}$  и  $n_1$ ,  $n_2$  — проводили с помощью компьютерной программы “SigmaPlot”. Эффективность связывания лигандов с рецепторами оценивали по уравнению:

$$E = B_{\max}/2K_d. \quad (3)$$

Эффективность ( $E$ , фмоль/мг белка/нМ) — интегральный показатель, количественно характеризующий величину связывания лиганда при его концентрации, равной  $K_d$  [15]. На рис. 1 и 2 приведены данные конкретных опытов, а в таблице — средние результаты экспериментов. Теоретические кривые строили по уравнениям (1) и (2). На теоретические кривые нанесены экспериментальные точки. В опытах было по 7–9 концентраций лиганда, каждая с трехкратным повтором. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента ( $p < 0.05$ ). Все значения представлены как средние арифметические и стандартные ошибки средней ( $M \pm \text{SEM}$ ) (таблица).

Для количественной оценки влияния исследованных веществ на основные параметры лиганд-рецепторного взаимодействия ( $K_d$  или  $B_{\max}$ ) рассчитывали их концентрации активации и ингибирования по уравнениям (4)–(6):

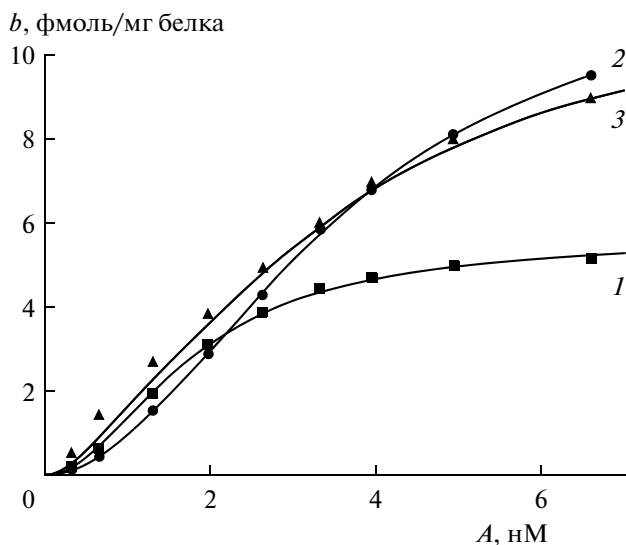
$$IC_{50} = (IK_{dc})/(K_{de} - K_{dc}), \quad (4)$$

$$AC_{50} = (IB_{\max})/(B_{\max e} - B_{\max}). \quad (5)$$

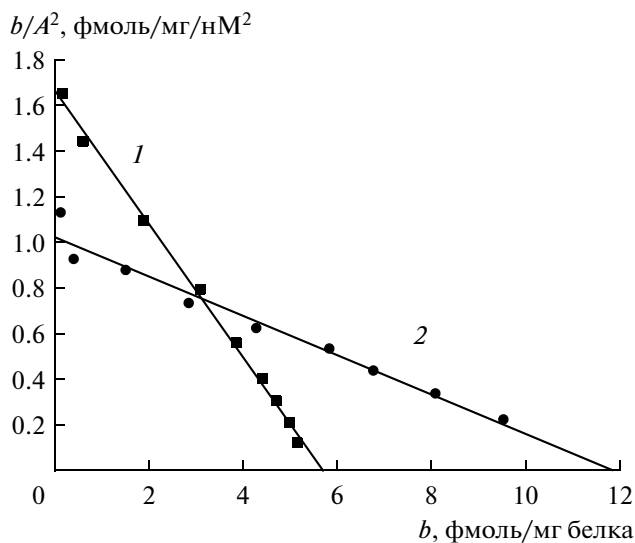
Общий эффект веществ на связывание [ $^3\text{H}$ ]RX821002 определяли по уравнениям, включающим оба основных параметра ( $K_d$  и  $B_{\max}$ ):

$$IC_{50} = I[(K_{dc}B_{\max e})/(K_{de}B_{\max e} - K_{dc}B_{\max e})], \quad (6)$$

где показатель  $IC_{50}$  (нМ) для уравнения (4) соответствует концентрации вещества, снижающей активность рецепторов (повышение  $K_d$ ) в 2 раза, а  $AC_{50}$  (нМ) для уравнения (5) соответствует концентрации вещества, повышающей количество рецепторов ( $B_m$ ) в 2 раза. Величина  $IC_{50}$  в уравнении (6) показывает теоретическую концентрацию



**Рис. 1.** Экспериментальные точки и теоретические кривые специфического связывания  $[^3\text{H}]\text{RX821002}$   $\alpha_2$ -адренорецепторами субклеточных фракций мембран коры головного мозга крыс в контроле (1) и при действии изопрропилнорадреналина (2) и пропранолола (3). По оси абсцисс — концентрация  $[^3\text{H}]\text{RX821002}$  (нМ), по оси ординат — количество мест, связанных лигандом ( $b$ , фмоль/мг белка). Параметры связывания в контрольном опыте  $K_d = 1.80 \pm 0.03$  нМ,  $B_{\text{max}} = 5.64 \pm 0.04$  фмоль/мг белка,  $n = 2$ ; на фоне изопрропилнорадреналина —  $K_d = 3.57 \pm 0.04$  нМ,  $B_{\text{max}} = 12.32 \pm 0.11$  фмоль/мг белка,  $n = 2$ ; на фоне пропранолола —  $K_{d1} = 0.58 \pm 0.85$  нМ,  $K_{d2} = 3.66 \pm 0.18$  нМ,  $B_{m1} = 1.83 \pm 0.25$  фмоль/мг белка,  $B_{m2} = 9.38 \pm 0.19$  фмоль/мг белка,  $n = 2$ .



**Рис. 2.** Экспериментальные точки и теоретические кривые специфического связывания  $[^3\text{H}]\text{RX821002}$   $\alpha_2$ -адренорецепторами субклеточных фракций мембран коры головного мозга крыс в контроле (1) и при действии изопрропилнорадреналина (2). По оси абсцисс — количество мест, связанных лигандом ( $b$ , фмоль/мг белка), по оси ординат — отношение количества мест, связанных лигандом, к его концентрации ( $b/A^2$ , фмоль/мг/нМ<sup>2</sup>). Параметры связывания см. в подписи к рис. 1.

ингибитора, снижающую связывание лиганда в 2 раза при его концентрации равной  $K_d$ .  $I$  — концентрация ингибитора,  $K_{dc}$  — константа диссоциации в контроле,  $K_{de}$  — константа диссоциации в эксперименте,  $B_{\text{maxc}}$  и  $B_{\text{maxe}}$  — количество активных рецепторов в контроле и в эксперименте соответственно [16].

### РЕЗУЛЬТАТЫ

График специфического связывания  $[^3\text{H}]\text{RX821002}$   $\alpha_2$ -адренорецепторами субклеточных фракций мембран коры головного мозга крыс представляет собой типичную кривую насыщения (рис. 1, 1). Математический анализ экспериментальных данных показал, что наименьшие ошибки параметров получены при расчете по уравнению (1) модели лиганд-рецепторного взаимодействия, предполагающей присоединение двух молекул лиганда к одному рецептору и включающей один пул рецепторов (таблица). Графический анализ экспериментальных данных с помощью уравнения (7), линеаризированной формы уравнения (1), в координатах ( $b$ ;  $b/A^2$ ) также пока-

зывает существование одного гомогенного пула  $\alpha_2$ -адренорецепторов (рис. 2, 1):

$$(b/A^2) = [(B_{\text{max}})/(K_d^2)] - [b/(K_d^2)]. \quad (7)$$

Экспериментальные точки на графике расположены на прямой линии. Для подтверждения соответствия полученным данным параметров, рассчитанных по уравнениям (1) и (7), проведены теоретические кривые, с которыми хорошо совпадают экспериментальные точки (рис. 1, 1 и рис. 2, 1).

Изопрропилнорадреналин, агонист  $\beta$ -адренорецепторов, вызвал изменения параметров связывания специфического антагониста  $[^3\text{H}]\text{RX821002}$ , но не повлиял на общий характер взаимодействия лиганда с  $\alpha_2$ -адренорецепторами. Присоединение лиганда к адренорецепторам происходит по той же модели: один пул рецепторов, присоединение двух молекул лиганда к рецептору. При активации  $\beta$ -адренорецепторов достоверно в 2 раза возросла величина  $K_d$  (снизилось сродство рецепторов к лиганду), на 70% увеличилось количество активных  $\alpha_2$ -адренорецепторов ( $B_{\text{max}}$ ). В итоге эффективность связывания лиганда снизилась всего на 40% (таблица). Результаты графического анализа экспериментов хорошо совпадают с расчетными данными. На графике (рис. 1, 2) приведены экспериментальные точки и теоретические кривые, построенные

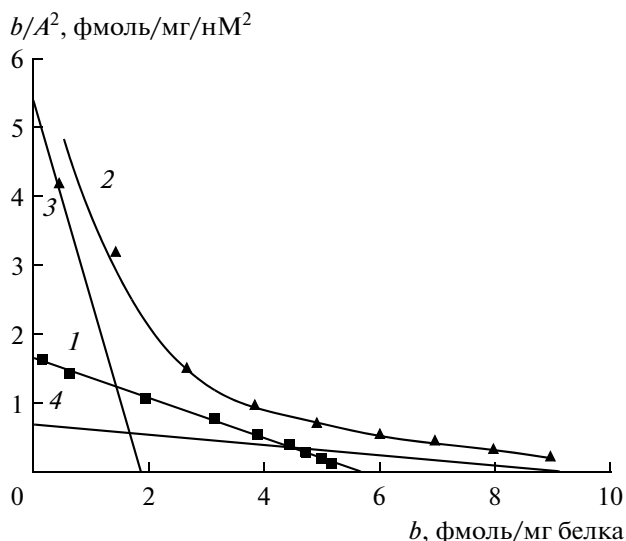
Влияние изопропилнорадреналина и пропранолола на связывание [<sup>3</sup>H]RX821002 α<sub>2</sub>-адренорецепторами субклеточных фракций мембран коры головного мозга крыс

Параметры	Контроль	Изопропил-норадреналин	Пропранолол
$K_{d1}$ , нМ	1.57 ± 0.27	3.55 ± 0.02*	0.61 ± 0.02
$K_{d2}$ , нМ	—	—	3.41 ± 0.13
$B_{m1}$ , фмоль/мг белка	—	—	1.88 ± 0.03
$B_{m2}$ , фмоль/мг белка	—	—	9.27 ± 0.08
$B_{max}$ , фмоль/мг белка	7.24 ± 1.63	12.24 ± 0.06*	11.15 ± 0.08*
$n_1$	2	2	2
$n_2$	—	—	2
$E_1$ , фмоль/мг белка/нМ	4.01 ± 1.16	1.72 ± 0.01*	1.50 ± 0.12
$E_2$ , фмоль/мг белка/нМ	—	—	1.36 ± 0.04
$IC_{50}(K_d)$ , нМ	—	7.90	18.39
$AC_{50}(B_{max})$ , нМ	—	14.05	26.01
$IC_{50}(K_d, B_{max})$ , нМ	—	29.34	86.87

\*  $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

Примечание.  $K_d$  — константы диссоциации;  $B_m$  — концентрация адренорецепторов (высоко- и низкоаффинного пулов);  $B_{max}$  — общее количество мест связывания лиганда;  $E$  — эффективность;  $n$  — коэффициент Хилла;  $AC_{50}$ ,  $IC_{50}$  — характеристика активации и ингибирования рецепторов.

по уравнению (1). Видно увеличение количества мест связывания [<sup>3</sup>H]RX821002 при всех его концентрациях и совпадение экспериментальных точек с теоретическими кривыми. Действие изо-



**Рис. 3.** Экспериментальные точки и теоретические кривые специфического связывания [<sup>3</sup>H]RX821002 α<sub>2</sub>-адренорецепторами субклеточных фракций мембран коры головного мозга крыс в контроле (1) и при действии пропранолола (2). 3 и 4 — Асимптоты высоко- и низкоаффинного пулов. По оси абсцисс — количество мест, связанных лигандом ( $b$ , фмоль/мг белка), по оси ординат — отношение количества мест, связанных лигандом, к его концентрации ( $b/A^2$ , фмоль/мг/нМ<sup>2</sup>). Параметры связывания см. в подписи к рис. 1.

пропилнорадреналина на связывание лиганда рецепторами представлено также на графике, построенном с помощью уравнения (6) в координатах  $b$ ,  $b/A^2$ , (рис. 2, 2). Под влиянием изопропилнорадреналина происходит уменьшение угла наклона прямой, что указывает на увеличение  $K_d$ , смещение ее вправо по оси абсцисс отражает увеличение количества мест связывания лиганда. Следовательно, результаты графического анализа совпадают с математически рассчитанными параметрами (таблица).

Пропранолол, антагонист β-адренорецепторов, также существенно изменяет связывание специфического антагониста [<sup>3</sup>H]RX821002. Взаимодействие лиганда с α<sub>2</sub>-адренорецепторами описывается моделью: два пула рецепторов и присоединение двух молекул лиганда к рецептору (таблица). Возрастает величина  $K_d$ , и увеличивается общее количество мест связывания лиганда ( $B_{max}$ ). В результате на 60% снижается эффективность ( $E$ ) связывания обоих пулов рецепторов (таблица). Количественные изменения в связывании [<sup>3</sup>H]RX821002 видны на графике (рис. 1, 3), на котором показано увеличение количества связанного лиганда при всех его концентрациях и совпадение экспериментальных точек с теоретическими кривыми. График (рис. 3, 2), построенный по уравнению (8) в координатах  $b$ ,  $b/A^2$ , отражает особенности влияния пропранолола на связывание лиганда:

$$(b/A^2) = [(B_{m1} + B_{m2}) / (K_{d1}^2 + K_{d2}^2)] - [b / (K_{d1}^2 + K_{d2}^2)]. \quad (8)$$

Выявляются два пула рецепторов, каждый из которых представлен на графике в виде асимптоты (рис. 3, 3, 4). Экспериментальные точки хорошо совпадают с теоретической кривой. Следовательно, графический анализ экспериментальных результатов подтвержден математически (таблица).

Для количественной характеристики действия изопрропилнорадреналина на величину основных параметров связывания [ $^3\text{H}$ ]RX821002  $\alpha_2$ -адренорецепторами ( $K_d$  и  $B_{\max}$ ) по уравнениям (4), (5) рассчитаны  $IC_{50}$  и  $AC_{50}$ . Из таблицы видно, что изопрропилнорадреналин снижает аффинность рецепторов ( $K_d$ ), увеличивает их количество ( $B_{\max}$ ). Общее действие — ингибиторное. Количественную характеристику связывания лиганда  $\alpha_2$ -адренорецепторами дает величина  $IC_{50}$ , рассчитанная по уравнению (6) (таблица). Пропранолол, как и изопрропилнорадреналин, увеличивает количество активных  $\alpha_2$ -адренорецепторов, но снижает их сродство к лиганду. В результате способность связывать лиганд снижается. При расчетных концентрациях изопрропилнорадреналина 29.34 мкМ и пропранолола 86.87 мкМ связывание лиганда снижается в 2 раза (таблица).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Величина связывания лиганда зависит от его концентрации. При определенной, характерной для каждого типа рецепторов концентрации лиганда в инкубационной среде достигается максимальное связывание лиганда с активными рецепторами. Связывание лиганда с рецепторами в контрольных экспериментах описываются уравнением (1) при  $n = 2$ , т.е. к рецептору присоединяются две молекулы лиганда, и  $\alpha_2$ -адренорецепторы представлены гомогенным пулом димеров (таблица).

На рис. 1 в картезианских координатах видно, что количество связанных рецепторов зависит от концентрации лиганда и график этой зависимости представлен гиперболой. Величины основных параметров  $K_d$  и  $B_{\max}$  характеризуют аффинность рецепторов и их количество в эффекторной системе. Величина  $n$  (коэффициент кооперативности, коэффициент Хилла) характеризует кооперативность взаимодействия лиганда с ферментом или рецептором, показывает число молекул лиганда, присоединяющихся к рецептору [17, 18]. Полученная нами величина  $n = 2$  (таблица) в уравнении связывания лиганда с рецептором формально указывает на присоединение двух молекул лиганда к одному рецептору. Это возможно только при наличии двух специфических мест связывания лиганда на одной молекуле рецептора или существовании рецепторов в виде димеров. По-видимому, кооперативный эффект может развиваться только при активации обоих активных центров связывания димерных рецепторов.

Присоединения лиганда к одному из них недостаточно для активации рецептора [19].

Это предположение подтверждается опубликованными данными. В последние годы установлена возможность различных семидоменных G-белок-связывающих рецепторов образовывать гомо- и гетеродимеры [20]. Показана гомодимеризация подтипов  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$   $\alpha_1$ -адренорецепторов [21], гомо- и гетеродимеризации  $\alpha_{2A}$ - и  $\alpha_{2C}$ -адренорецепторов [22, 23]. Гетеродимер  $\alpha_{1B}$  и  $\alpha_{1D}$  образует один рецептор с активностью большей, чем отдельные подтипы [24].

Прямых данных о присоединении двух молекул лиганда к одному рецептору мало. Показано присоединение двух молекул хинуклидинилбензилата к М-холинорецепторам мембран коры мозга [25] и [ $^3\text{H}$ ]пропранолола к  $\beta$ -адренорецепторам эритроцитов крыс [14]. На такую возможность указывают также экспериментальные данные, в которых получены коэффициенты  $n$  больше единицы для мускариновых холинорецепторов мембран миокарда [26], мембран электрического органа ската *Torpedo californica* [27]. Есть данные о кооперативном связывании [ $^3\text{H}$ ]хинуклидинилбензилата и других лигандов с М-холинорецепторами [28, 29], изопротеренола с  $\beta$ -адренорецепторами [30]. Теоретические и экспериментальные данные позволяют предположить, что величина  $n$  показывает количество молекул лиганда, присоединяющихся к одному рецептору. К рецептору может присоединиться только одна молекула лиганда ( $n = 1$ ), к димерному рецептору — две молекулы ( $n = 2$ ). Величина  $n$ , наряду с  $K_d$  и  $B_{\max}$ , является объективным количественным показателем кинетики лиганд-рецепторного взаимодействия и функциональной характеристики специфических рецепторов.

Математический анализ выявил существенные изменения характера связывания [ $^3\text{H}$ ]RX821002 с  $\alpha_2$ -адренорецепторами субклеточных фракций мембран коры головного мозга крыс при активации и блокаде  $\beta$ -адренорецепторов. Под влиянием изопрропилнорадреналина достоверно снижается сродство  $\alpha_2$ -адренорецепторов к [ $^3\text{H}$ ]RX821002 (возрастает  $K_d$ ). Пропранолол изменяет не только величину этого параметра, но и характер связывания лиганда — выявляются высоко- и низкоаффинный пулы рецепторов. Чувствительность высокоаффинного пула в 2 раза выше, чем при контрольном связывании, тогда как низкоаффинного — в 2 раза ниже. Под влиянием этих адренотропных веществ достоверно увеличивается количество активных рецепторов ( $B_{\max}$ ) (таблица). Эти изменения свойств  $\alpha_2$ -адренорецепторов видны также на рис. 1–3. На рис. 1 в картезианских координатах на фоне  $\beta$ -адренотропных веществ увеличивается связывание лиганда рецепторами при всех его концентрациях. На рис. 2 точка пересечения прямой (2) с осью абсцисс сдвинута вправо относительно контроля, что указывает на увеличение концентрации

мест связывания лиганда. На фоне изопропилнорадреналина угол наклона прямой снижается, что отражает снижение сродства  $\alpha_2$ -адренорецепторов к [ $^3\text{H}$ ]RX821002. Пропранолол существенно изменяет характер связывания лиганда — график имеет форму гиперболы (рис. 3, 2). На него нанесены асимптоты, соответствующие связыванию лиганда высоко- и низкоаффинным пулами рецепторов (рис. 3, 3, 4). Точка пересечения асимптоты высокоаффинного пула (рис. 3, 3) с осью абсцисс сдвинута влево по сравнению с точкой пересечения контрольной кривой, что соответствует снижению количества мест связывания, а точка пересечения с осью ординат — вверх, что отражает увеличение сродства рецепторов, по сравнению с контролем. Асимптота, отражающая связывание низкоаффинного пула (рис. 3, 4) пересекается с осью абсцисс правее (незначительное увеличение количества мест связывания), а с осью ординат ниже (снижение сродства) по сравнению с контролем. Таким образом, изопропилнорадреналин снижает, а пропранолол повышает концентрацию  $\alpha_2$ -адренорецепторов (таблица).

Величина интегрального показателя  $E$  дает количественную оценку изменения эффекторной системы при экспериментальных воздействиях, которая позволяет учитывать вклад каждого из параметров  $K_d$  и  $B_m$  в реакцию на это воздействие. Изопропилнорадреналин и пропранолол снижают эффективность ( $E$ ) связывания лиганда при разнонаправленном изменении количества  $\alpha_2$ -адренорецепторов.

Дополнительную информацию о модулирующем действии  $\beta$ -адренотропных веществ на связывание [ $^3\text{H}$ ]RX821002  $\alpha_2$ -адренорецепторами дает расчет величин  $AC_{50}$  и  $IC_{50}$ , соответствующих концентрациям вещества, вызывающим изменение основных параметров ( $K_d$ ,  $B_{max}$ ) или количества связанного лиганда в 2 раза. Оба вещества увеличивают плотность активных рецепторов ( $B_{max}$ ) в 2 раза при расчетной концентрации 14 и 26 мкМ и снижают аффинность к лиганду. Изопропилнорадреналин и пропранолол оказывают общее ингибиторное действие на связывание лиганда при их теоретической концентрации 29.34 и 86.87 мкМ (таблица).

В организме все регуляторные системы (нервная, эндокринная, иммунная) действуют одновременно, и между ними существуют агонистические или антагонистические взаимодействия (cross-talk). Агонисты и антагонисты  $\alpha$ -адренорецепторов изменяют связывание антагониста мускариновых рецепторов [ $^3\text{H}$ ]хинуклидинилбензилата с мускариновыми рецепторами коры головного мозга [31]. Воздействие на  $\alpha_1$ -адрено- и М-холинорецепторы вызывает изменение характера связывания [ $^3\text{H}$ ]дигидроалprenолола  $\beta$ -адренорецепторами эритроцитов крыс [1].

Рассмотрена система количественного анализа лиганд-рецепторных взаимодействий. Опреде-

ляемые при этом основные параметры дают характеристику свойств исследуемой системы: число пулов рецепторов, их аффинность к лиганду ( $K_d$ ), количество активных рецепторов ( $B_{max}$ ), количество молекул лиганда, связывающихся с рецептором ( $n$ ). Производный параметр — эффективность  $E = B_{max}/2K_d$  — количественно характеризует общую активность эффекторной системы. Исползованный метод анализа лиганд-рецепторных взаимодействий применим для исследования любых биологических реакций, результаты которых могут быть представлены количественно.

Таким образом, выявлено модулирующее действие изопропилнорадреналина и пропранолола на связывание специфического антагониста  $\alpha_2$ -адренорецепторами. Это действие проявляется в ингибировании и изменении общего характера связывания [ $^3\text{H}$ ]RX821002. Предполагается, что в мембранах головного мозга крыс  $\alpha_2$ -адренорецепторы существуют в виде димеров.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 09-04-00111а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Манухин Б.Н., Нестерова Л.А., Смурова Е.А. 2001. Модуляция связывания [ $^3\text{H}$ ]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.
2. Diez-Alarcia R., Pilar-Cuellar F., Panigua M.A., Meana J.J., Fernandes-Lopez A. 2006. Pharmacological characterization and autoradiographic distribution of alpha2-adrenoceptor antagonist [(3)H]RX821002 binding sites in the chicken brain. *Neuroscience*. **141** (1), 357–369.
3. Zanella S., Viemari J.C., Hilaire G. 2007. Muscarinic receptors and alpha2-adrenoceptors interact to modulate respiratory rhythm in mouse neonates. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **1** (157), 215–225.
4. Carretiero D.C., Almeida R.S., Fior-Cardi D.R. 2008. Adenosine modulates alpha2-adrenergic receptors within specific subnuclei of nucleus tractus solitarius in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Res.* **31** (12), 2177–2186.
5. Abelson K.S., Hoglund 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. *Clin. Pharmacol. Toxicol.* **94** (4), 153–160.
6. Estado V., Araujo C.V., Bousquet P., Tibirica E. 2004. Effects of centrally acting antihypertensive drugs on the

- microcirculation of spontaneously hypertensive rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **37** (10), 1541–1549.
7. Ciranna L., Licata F., Li V.G., Santangelo F. 2004. Alpha2- and beta-adrenoceptors differentially modulate GABAA- and GABAB-mediated inhibition of red nucleus neuronal firing. *Exp. Neurol.* **185** (2), 297–304.
  8. Watts S.W., Fink G.D., Silver P.J., Cusshing D.J. 2000. Interaction of the beta adrenergic receptor antagonist bucindolol with serotonergic receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **35**, 29–36.
  9. Ware T.D., Paul D. 2000. Cross-tolerance between analgesia produced by xylazine and selective opioid receptor subtype treatments. *Eur. J. Pharmacol.* **389**, 181–185.
  10. Takada K., Clarc D.J., Davies M.F., Tonner P.H., Krause T.K., Dtrtaccini E., Maze M. 2002. Meperidine exerts agonist activity at the alpha(2B)-adrenoceptor subtype. *Anesthesiology.* **96** (6), 1420–1426.
  11. Floreani M., Varani K., Quintieri L., Dorigo P. 2008. Comparison of the binding activity of CGP-12177A at recombinant rat alpha(1D)-adrenoceptors expressed in BHK-21 cell membranes and alpha(1)-adrenoceptors present in rat cerebral cortex membranes. *Eur. J. Pharmacol.* **590** (1–3), 303–309.
  12. Henn S.W., Henn F.A. 1982. The identification of subcellular fractions of the central nervous system. *Handbook of Neurochemistry.* Ed. Lajtha A. New York, London: Plenum Press. 147–161.
  13. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
  14. Манухин Б.Н., Нестерова Л.А., Смурова Е.А. 1994. Характеристика кинетики взаимодействия  $\beta$ -адренорецепторов эритроцитов крыс со специфическим блокатором пропранололом. *Биол. мембраны.* **11** (5), 489–495.
  15. 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.
  16. 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.
  17. Диксон М., Уэбб Э. 1982. *Ферменты.* Пер. с англ. М.: Мир, 3.
  18. Келети Т. 1990. *Основы ферментативной кинетики.* Пер. с англ. М.: Мир.
  19. Herrick-Davis K., Grinde E., Harrigan T.J., Mazurkiewicz J.E. 2005. Model of wild-type 5-HT<sub>2C</sub> receptor inactivation following heterodimerization with S138R 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *J. Biol. Chem.* **280** (48), 40144–40151.
  20. Авдонин П.В. 2005. Структура и сигнальные свойства сопряженных с G-белками рецепторных комплексов. *Биол. мембраны.* **22** (1), 3–26.
  21. Uberti M.A., Hall R.A., Minneman K. P. 2003. Subtype-specific dimerization of alpha1-adrenoceptors: Effects on receptor expression and pharmacological properties. *Mol. Pharmacol.* **64** (6), 1379–1390.
  22. 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.* **18** (45), 4760–4767.
  23. Zhou F., Filipeanu C.M., Duvernay M.T., Wu G. 2006. Cell-surface targeting of alpha2-adrenergic receptors – inhibition by transport deficient mutant through dimerization. *Cell Signal.* **18** (3), 318–327.
  24. 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.
  25. Нестерова Л.А., Смурова Е.А., Манухин Б.Н. 1995. Характеристика связывания специфического блокатора [ $^3$ H]хинуклидинилбензилата М-холинорецепторами мембран коры головного мозга крыс. *ДАН СССР.* **343** (2), 268–271.
  26. Wreggett K.A., Wells J.W. 1995. Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors. *J. Biol. Chem.* **270** (38), 22488–22499.
  27. Dunn S.M., Raftery M.A. 1997. Agonist binding to the *Torpedo* acetylcholine receptor. 2. Complexities revealed by association kinetics. *Biochemistry.* **36** (13), 3846–3853.
  28. Cidiac P., Green M.A., Pawagi A.B., Wells J.W. 1997. Cardiac muscarinic receptors. Cooperativity as the basis for multiple states of affinity. *Biochemistry.* **36** (24), 7361–7379.
  29. Lazareno S., Birdsall N.J. 1995. Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors: Interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* **48** (2), 362–378.
  30. Fowler C.J., Vedin V., Sjoberg E. 1999. Evidence for cooperative binding of (-) Isoproterenol to rat brain beta1-adrenergic receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257** (2), 629–634.
  31. Нестерова Л.А., Смурова Е.А., Манухин Б.Н. 2001. Влияние адренотропных веществ на связывание [ $^3$ H]хинуклидинилбензилата М-холинорецепторами коры головного мозга крыс. *Биол. мембраны.* **18** (1), 10–17.

## **$\beta$ -Adrenoceptor Agonists and Antagonists Are the Modulators of the $\alpha_2$ -Adrenoceptor Activity in Rat Cortex Brain Membranes**

**L. A. Nesterova, B. N. Manukhin**

*Institute of Developmental Biology RAS, ul. Vavilova, 26, Moscow, 119334 Russia; Fax: (499) 135 80 12;  
e-mail : manukhinb@mail.ru*

The influence of activation and inhibition of  $\beta$ -adrenoceptors by isoprenaline and propranolol on the specific nonselective  $\alpha_2$ -antagonist [ $^3\text{H}$ ]RX821002 binding was studied on rat cerebral cortex subcellular membrane fractions. It was shown that the ligand-receptor interaction for  $\alpha_2$ -adrenoceptors corresponded to the model suggesting the presence of one pool of receptors and binding of two ligand molecules to the dimer receptor. The parameters of [ $^3\text{H}$ ]RX821002 binding to  $\alpha_2$ -adrenoceptors were:  $K_d = 1.57 \pm 0.27$  nM,  $B_{\text{max}} = 7.24 \pm 1.63$  fmol/mg protein,  $n = 2$ . In activation of  $\beta$ -adrenoceptors by isoprenaline, the binding of the radiolabelled ligand with  $\alpha_2$ -adrenoceptors occurs according to the same model. The affinity of  $\alpha_2$ -adrenoceptors to [ $^3\text{H}$ ]RX821002 decreased more than twofold ( $K_d = 3.55 \pm 0.02$  nM), and the quantity of active receptors increased by 69% ( $B_{\text{max}} = 12.24 \pm 0.06$  fmol/mg prot.). Under the influence of propranolol the character of ligand binding changed: two pools of receptors were detected with the parameters  $K_{d1} = 0.61 \pm 0.02$  nM,  $K_{d2} = 3.41 \pm 0.13$  nM,  $B_{m1} = 1.88 \pm 0.028$  fmol/mg protein,  $B_{m2} = 9.27 \pm 0.08$  fmol/mg prot.,  $n = 2$ . The data suggest that  $\alpha_2$ -adrenoceptors in rat cerebral cortex subcellular membrane fractions exist as dimers. Modulatory effects of isoprenaline and propranolol on the specific binding to  $\alpha_2$ -adrenoceptors were detected, which were manifested as an inhibitory effect on the [ $^3\text{H}$ ]RX821002 binding parameters and changing of the binding character.