

ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ
И ЧЕЛОВЕКА

УДК 576.314.6.088.6+612.11,612.82.015

АЛЛОСТЕРИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ СЕРТОНИНА И МИАНСЕРИНА
НА КИНЕТИКУ СВЯЗЫВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ [³H]-ЛИГАНДОВ
АДРЕНЕРГИЧЕСКИМИ И МУСКАРИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ
В МЕМБРАНАХ КЛЕТОК КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

© 2015 г. Б. Н. Манухин, Л. А. Нестерова

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,

119443 Москва, ул. Вавилова, 26

E-mail: nesterovala@idbras.ru

Поступила в редакцию 16.07.2014 г.

Изучено влияние активации (серотонином) и ингибирования (миансерином) серотониновых рецепторов на свойства α_1 -, α_2 -адренорецепторов и мускариновых холинорецепторов субклеточных фракций мембран из клеток коры головного мозга крыс. Экспериментальные данные кинетики связывания специфических антагонистов адренергическими и мускариновыми рецепторами, проанализированные с помощью графических и математических методов, свидетельствуют о наличии аллостерического (cross-talk) взаимодействия. В контроле α_1 - и α_2 -адренорецепторы представлены одним, а мускариновые — двумя пулами. На фоне серотонина выявлены два пула адренорецепторов с различной аффинностью. Установлено, что миансерин вызывает образование двух пулов только α_2 -рецепторов, а мускариновые рецепторы в контроле и опыте представлены двумя пулами, различающимися по значениям основных параметров — константы диссоциации и концентрации адренорецепторов. Показано, что аллостерическое влияние серотонина и миансерина проявляется в ингибировании мускариновых рецепторов. Предполагается существование адрено- и холинорецепторов в виде димеров. Взаимодействие между адренергической, холинергической и серотонинергической системами, вероятно, реализуется на уровне клеточной мембраны.

DOI: 10.7868/S0002332915020058

В регуляторных системах организма одновременно действуют нейротрансмиттеры, гормоны и другие биологически активные вещества. Эти регуляторы не только влияют на специфические рецепторы, но и могут аллостерически модулировать (cross-talk) активность других эффекторных систем. В частности, показана функциональная взаимосвязь между серотонинергической, холинергической и адренергической системами. Серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-НТ) — один из основных нейромедиаторов, участвующих во многих процессах в центральной нервной системе, включая поведение, агрессию, восприятие боли и тревоги. На периферии 5-НТ регулирует активность вегетативной нервной системы, сердечно-сосудистую деятельность, агрегацию тромбоцитов, рост гладких мышц, работу желудочно-кишечного тракта и т.д. (Ramage, Villalón, 2008). 5-НТ, активируя пресинаптические 5-НТ₃- и 5-НТ₄-рецепторы в дыхательных путях человека, модулирует сократительную холинергическую реакцию (Dupont *et al.*, 1999). Обезболивающий эффект 5-НТ₂-агонистов обусловлен выделением ацетилхолина в спинальных нейронах (Obata *et al.*, 2003). Антагонист 5-НТ миансерин проявляет антимиускаринную активность по отношению к преси-

наптическим (Kwok, Mitchelson, 1982) и увеличивает аффинность постсинаптических мускариновых рецепторов (M-XP) (Carlson *et al.*, 2003). На срезах гиппокампа 5-НТ конкурентно снижает вызванную карбахолом ритмическую активность (Matsumoto *et al.*, 2001). 5-НТ модулирует когнитивные (Rashid *et al.*, 2003) и связанные с памятью процессы, в которых участвует холинергическая нервная система (Birtheimer *et al.*, 2003). Антагонисты 5-НТ-рецепторов ингибируют связывание L-хинуклидинил-[фенил-4-³H]бензилат ([³H]-QNB) мембранами миокарда крысы. При этом по активности некоторые из них сопоставимы со специфическими антагонистами мускариновых рецепторов (Matsumoto *et al.*, 2001).

Адренергическая и серотониновая системы реципрокно взаимодействуют на уровне клеток. Так, ингибиторы обратного захвата 5-НТ снижают транспорт норадреналина в нейроны (Blier, Szabo, 2005). Неселективный блокатор β -адренорецепторов басиндолол активирует 5-НТ-рецепторы сердечно-сосудистой системы и ингибирует α_1 -адренорецепторы (AP) (Watts *et al.*, 2000). Антагонист 5-НТ-рецепторов миансерин увеличивает диастолическое давление, которое регулируется α -адренорецепторами (Kalkman *et al.*, 1983).

Лиганды 1,3-диоксолановой структуры могут связываться с α_1 -АР и 5-НТ(1А)-рецепторами (Sorbi *et al.*, 2009). 5-НТ изменяет параметры связывания [3 H]-RX821002 с α_2 -АР в мембранах коры головного мозга цыплят (Diez-Alarcia *et al.*, 2006). [3 H]-8-ОН-DPAT – лиганд 5-НТ(1А/7)-рецепторов – также связывается с α_2 -АР мозга мышей (Bonaventure *et al.*, 2004).

Приведенные данные свидетельствуют о существовании взаимодействия серотонинергической, холинергической и адренергической нейротрансмиттерных систем. Для радиолигандных экспериментов оно более вероятно на уровне мембраны клетки. Можно предположить, что присоединение нейротрансмиттера к своему рецептору аллостерически изменяет активность других рецепторов, модулируя физиологические и биохимические реакции клеток.

Цель работы – изучение действия 5-НТ и антагониста серотониновых рецепторов миансерина на кинетику связывания специфических антагонистов [3 H]-празозина, [3 H]-RX821002 α_1 -, α_2 -адренорецепторами и [3 H]-QNB мускариновыми холинорецепторами в мембранах клеток коры головного мозга крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на клеточных мембранах коры головного мозга крыс-самцов линии Вистар (210–250 г, 65 крыс), которые выделяли методом Хенн С.В. и Хенн Ф.А. (Henn, Henn, 1982). Готовые мембранные препараты хранили при -70°C в течение трех недель. Концентрацию белка определяли методом Лоури (Lowry *et al.*, 1951); в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (Sigma, США). Несвязанный лиганд отмывали с мембран на стекловолокнистых фильтрах GF/B (Whatman, Великобритания). Объем инкубационной среды составлял 100 мкл: 50 мкл суспензии мембран, в опыте вносили агонист или антагонист серотониновых рецепторов (серотонин или миансерин, Sigma) в концентрации 10 мкМ (10 мкл) и радиоактивный лиганд, а в контроле – нерадиоактивный вытеснитель лиганда. Буфером Tris-HCl 50 мМ, pH 7.4, инкубационную среду доводили до стандартного объема. Реакцию останавливали добавлением 1 мл холодного буфера (0°C). Параметры связывания лигандов определяли с использованием специфических неселективных антагонистов: α_1 -АР – [3 H]-празозина (77 Ки/мМ) в концентрациях 0.33–14.85 нМ, α_2 -АР – [3 H]-RX821002 (77 Ки/мМ) в концентрациях 0.33–6.6 нМ и М-ХР – L-хинуклидинил-[фенил-4- 3 H]бензилат (41.5 Ки/мМ) в концентрациях 0.3–4.95 нМ. Специфическое связывание радиоактивного лиганда оценивали

по разнице между общим и неспецифическим связыванием в присутствии нерадиоактивных антагонистов – празозина, раувольфсцина и атропина (Sigma) в концентрациях 10 мкМ. Вещества вводили в инкубационную среду за 20 мин до добавления радиоактивного лиганда. Реакцию связывания лиганда с рецепторами проводили в течение 30 мин при 22°C . Общее время инкубации составило 50 мин.

Взаимодействие α_1 -, α_2 -АР и М-ХР изолированных мембран коры головного мозга крыс со специфическим радиоактивным антагонистом описывается уравнениями для одного или двух пулов рецепторов (Manukhin *et al.*, 1999). Основные параметры лиганд-рецепторного взаимодействия (K_d , B_{\max} , K_{d1} , K_{d2} , B_{m1} , B_{m2} , и n_1 , n_2) рассчитывали с помощью компьютерной программы:

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

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

где b – количество связанного лиганда; B_{\max} – количество рецепторов в 1 мг белка с константой диссоциации K_d ; B_{m1} и B_{m2} – количества рецепторов в 1 мг белка в высоко- и низкоаффинном пулах рецепторов в одной эффекторной системе ($B_{\max} = B_{m1} + B_{m2}$) с константами диссоциации K_{d1} и K_{d2} и коэффициентами кооперативности (Хилла) n_1 и n_2 соответственно; $[A]$ – концентрация лиганда в среде. Характер ингибиторного действия серотонина и миансерина на связывание лигандов α_1 -, α_2 -АР и М-ХР оценивали по изменению количества и аффинности активных рецепторов (B_{\max} и K_d) (Диксон, Уэбб, 1982).

Эффективность связывания (E) лиганда с рецепторами определяли по уравнению

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

где E – интегральный показатель, количественно характеризующий связывание лиганда при его концентрации, равной K_d ((фмоль/мг белка)/нМ).

В опытах было по 7–9 точек, каждая с трехкратным повтором. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента ($p < 0.05$). Все значения представлены как средние арифметические и стандартные ошибки средней ($M \pm SEM$). Дополнительно наглядную информацию о закономерностях лиганд-рецепторного взаимодействия дает графический анализ экспериментальных данных с помощью линеаризированных по Скотчгарду уравнений (1) и (2):

$$(b/A^n) = [(B_{\max})/(K_d^n)] - [b/(K_d^n)], \quad (4)$$

$$(b/A^n) = [(B_{m1} + B_{m2})/(K_{d1}^{n1} + K_{d2}^{n2})] - [b/(K_{d1}^{n1} + K_{d2}^{n2})]. \quad (5)$$

Действие веществ анализировали с использованием 10 математических моделей связывания лиганда рецептором (Manukhin *et al.*, 1999; Ману-

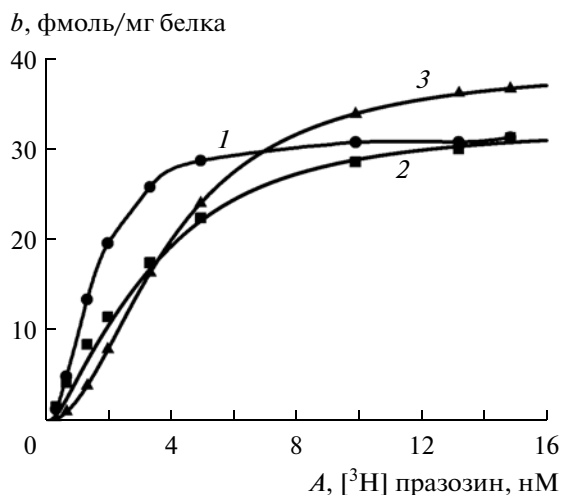


Рис. 1. Влияние серотонина и миансерина на связывание $[^3\text{H}]$ -празозина α_1 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс. A – концентрация лиганда, b – количество рецепторов в 1 мг белка. 1 – контроль, 2 – серотонин, 3 – миансерин; для рис. 1–7. Параметры связывания $[^3\text{H}]$ -празозина α_1 -адренорецепторами: в контрольном опыте $K_d = 1.53 \pm 0.01$ нМ, $B_{\text{max}} = 31.6 \pm 0.1$ фмоль/мг белка, $n = 2$; на фоне серотонина $K_{d1} = 0.69 \pm 0.09$ нМ, $K_{d2} = 4.1 \pm 0.2$, нМ, $B_{m1} = 7.9 \pm 0.9$ фмоль/мг белка, $B_{m2} = 24.9 \pm 0.8$ фмоль/мг белка $n = 2$; на фоне миансерина $K_{d1} = 3.94 \pm 0.01$ нМ, $B_{\text{max}} = 35.5 \pm 0.1$ фмоль/мг белка, $n = 2$.

хин, Нестерова, 2009). На графиках представлены результаты одного опыта. Экспериментальные точки нанесены на теоретические кривые. Их совпадение демонстрирует адекватность математических расчетов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Серотонин и миансерин – модуляторы активности α_1 -адренорецепторов мембран клеток коры головного мозга крыс. На рис. 1–3 приведены экспериментальные точки и теоретические кривые, рассчитанные по конкретным результатам одного из экспериментов. В контрольных опытах графики специфического связывания $[^3\text{H}]$ -празозина с α_1 -АР изолированных мембран клеток коры головного мозга крыс представляют собой типичную кривую насыщения (рис. 1, 1). Математический анализ показал существование пула рецепторов с одинаковой аффинностью и присоединение двух молекул лиганда к одному месту связывания (табл. 1). Графический анализ результатов с помощью уравнения (4) подтверждает существование в контроле одного гомогенного по аффинности пула α_1 -АР (рис. 2, 1; рис. 3, 1).

5-НТ вызывает изменения как параметров связывания $[^3\text{H}]$ -празозина, так и общего характера взаимодействия лиганда с α_1 -АР. Выявлены высоко- и низкоаффинный пулы рецепторов и

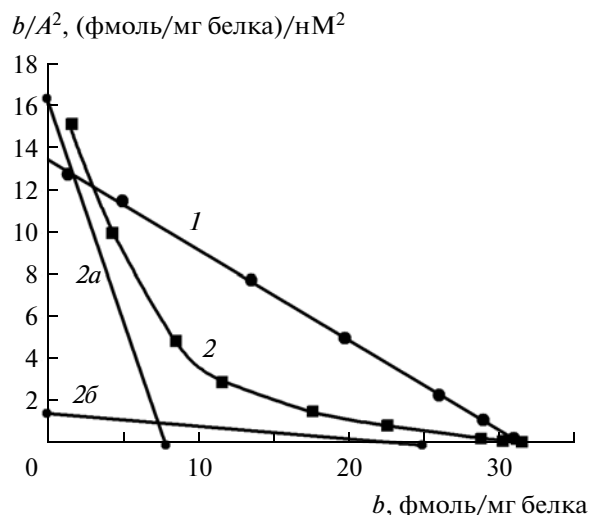


Рис. 2. Влияние серотонина на связывание $[^3\text{H}]$ -празозина α_1 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс. 2а, 2б – асимптоты высоко- и низкоаффинного пулов; для рис. 2, 5, 6.

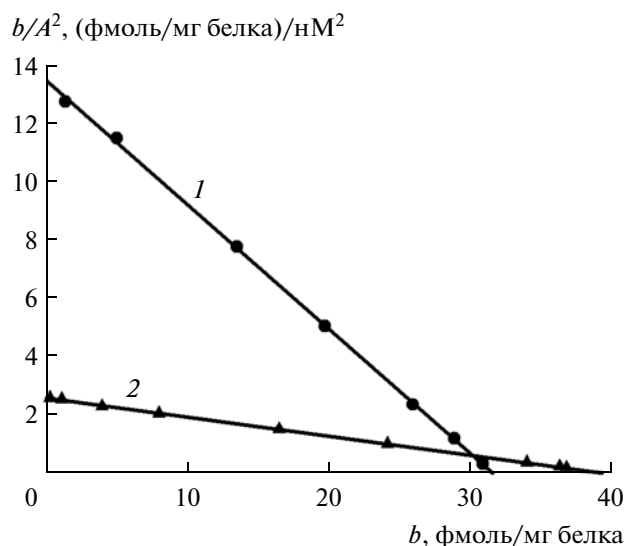


Рис. 3. Влияние миансерина на связывание $[^3\text{H}]$ -празозина α_1 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс.

связывание двух молекул лиганда рецептором. При этом общее значение B_{max} ($B_{\text{max}} = B_{m1} + B_{m2}$) не изменилось (табл. 1). Результаты графического анализа экспериментов по уравнению (1) совпадают с расчетными данными (рис. 1). Влияние 5-НТ на связывание лиганда рецепторами представлено также на графике (рис. 2), построенном с помощью уравнения (5). Кривая 2 (рис. 2) отражает связывание лиганда двумя пулами рецепторов, каждый из которых представлен в виде асимптот (рис. 2, 2а, 2б). Смещение точек пересечения асимптот с осями абсцисс и ординат по сравне-

Таблица 1. Влияние активации и ингибирования серотониновых рецепторов на параметры связывания [³H]-празозина с α_1 -АР субклеточных фракций мембран коры головного мозга крыс

Параметр	Контроль	Серотонин	Миансерин
K_d , нМ	1.85 ± 0.16	—	3.97 ± 0.12*
K_{d1} , нМ	—	0.61 ± 0.04*	—
K_{d2} , нМ	—	3.82 ± 0.15*	—
B_{max} , фмоль/мг	31.12 ± 0.33	—	40.04 ± 0.53*
B_{m1} , фмоль/мг	—	6.6 ± 0.7*	—
B_{m2} , фмоль/мг	—	25.6 ± 0.4*	—
n	2	—	2
n_1	—	2	—
n_2	—	2	—
E , (фмоль/мг)/нМ	8.36 ± 0.05	—	5.04 ± 0.04*
E_1 , (моль/мг)/нМ	—	5.4 ± 0.7*	—
E_2 , (фмоль/мг)/нМ	—	3.4 ± 0.45*	—
Модель	II	VI	II

Примечание. K_d , K_{d1} , K_{d2} – константы диссоциации; B_{max} , B_{m1} , B_{m2} – концентрация адренорецепторов; E – эффективность; n – коэффициент кооперативности; II, VI – модели лиганд-рецепторного взаимодействия (Manukhin *et al.*, 1999, Манухин, Нестерова, 2009); “—” – отсутствие измерения; для табл. 1–4.

* Различие с контролем достоверно ($p < 0.05$); для табл. 1–4.

нию с контролем (рис. 2, 1, 2а, 2б) демонстрирует изменение чувствительности рецепторов и значения B_{max} [³H]-празозина в каждом пуле. Так, точки пересечения асимптот высоко- и низкоаффинного пулов с осью абсцисс сдвинуты влево по сравнению с контрольной прямой, что свидетельствует о меньшем значении B_{max} в каждом пуле рецепторов. Однако общее число мест связывания лиганда не изменяется (табл. 1). Пересечение асимптотой высокоаффинного пула оси ординат выше контрольной кривой указывает на повышенные активности этого пула рецепторов. Чувствительность рецепторов низкоаффинного пула значительно ниже, чем в контроле, – точка пересечения с осью ординат ниже контрольной.

Миансерин также вызывал существенные изменения параметров связывания [³H]празозина. Под влиянием миансерина в 2 раза снижается чувствительность рецепторов, достоверно увеличивается значение B_{max} (табл. 1). В результате связывание лиганда при концентрациях 0.33–7.25 нМ меньше, чем в контроле, а при концентрациях 7.25–14.85 нМ превышает контрольное (рис. 1, 3). График, построенный по уравнению (4), отражает влияние миансерина на связывание лиганда (рис. 3, 2). Экспериментальные точки ложатся на прямую линию, что свидетельствует о существовании одного пула рецепторов. Снижение аффинности рецепторов под влиянием 5-НТ и миансерина приводит к уменьшению эффективности связывания лиганда (табл. 1).

Под влиянием 5-НТ выявляются два различных по аффинности пула рецепторов – высоко- и низкоаффинный. При этом значение B_{max} достоверно не изменяется. Миансерин сохраняет один пул рецепторов, но достоверно снижает аффинность и увеличивает количество активных α_1 -АР (табл. 1, 2).

Агонисты и антагонисты серотониновых рецепторов – модуляторы активности α_2 -адренорецепторов мембран клеток коры головного мозга крыс. График специфического связывания [³H]-RX821002 с α_2 -АР изолированных мембран клеток коры головного мозга крыс представляет собой кривую насыщения (рис. 4, 1). Наименьшие стандартные ошибки средней параметров получены при расчете по уравнению (1) (табл. 2). Графический анализ экспериментальных данных с помощью уравнения (4) также свидетельствует о существовании одного гомогенного по аффинности пула α_2 -АР – экспериментальные точки расположены на прямой линии (рис. 5, 1). 5-НТ вызывает изменения параметров связывания специфического антагониста [³H]-RX821002 и общего характера взаимодействия лиганда с α_2 -АР. Присоединение лиганда к адренорецепторам происходит по модели, предполагающей существование высоко- и низкоаффинного пулов рецепторов.

При активации 5-НТ-рецепторов достоверно снижается значение K_{d1} высокоаффинного пула и возрастает значение K_{d2} низкоаффинного пула, уменьшается количество активных α_2 -АР (B_{m1} ,

Таблица 2. Влияние активации и ингибирования серотониновых рецепторов на связывание [³H]-RX821002 с α₂-адренорецепторами субклеточных фракций мембран коры головного мозга крыс

Параметр	Контроль	Серотонин	Миансерин
K_d , нМ	1.57 ± 0.07	—	—
K_{d1} , нМ	—	0.83 ± 0.05*	0.48 ± 0.09*
K_{d2} , нМ	—	2.65 ± 0.22*	3.79 ± 0.72*
B_{max} , фмоль/мг	5.67 ± 0.02	—	—
B_{m1} , фмоль/мг	—	1.65 ± 0.23*	0.63 ± 0.17*
B_{m2} , фмоль/мг	—	4.20 ± 0.11*	4.75 ± 0.21*
n	2	—	—
n_1	—	2	2
n_2	—	2	2
E , (фмоль/мг)/нМ	1.81 ± 0.01	—	—
E_1 , (фмоль/мг)/нМ	—	0.88 ± 0.12*	0.45 ± 0.03*
E_2 , (фмоль/мг)/нМ	—	0.81 ± 0.10*	0.85 ± 0.07*
Модель	II	VI	VI

B_{m2}) в высоко- и низкоаффинных пулах. Общее количество рецепторов (B_{max}) уменьшается на 20%. В итоге значительно снижается эффективность связывания лиганда (E_1 и E_2) в обоих пулах рецепторов (табл. 2, рис. 4, 2). Действие 5-НТ на связывание лиганда рецепторами представлено

также на графике (рис. 5, 2), построенном по уравнению (5). Вогнутая кривая на рис. 5 свидетельствует о присутствии двух пулов рецепторов, различающихся по аффинности (табл. 2). Каждый пул рецепторов представлен на графике в виде асимптоты (рис. 5, 2а, 2б).

Миансерин вызвал существенные изменения параметров и характера связывания рецепторами специфического антагониста [³H]-RX821002. Взаимодействие лиганда с α₂-АР описывается моделью с двумя пулами рецепторов (высоко- и низкоаффинный) и присоединением двух молекул лиганда к рецептору (табл. 2). Чувствительность

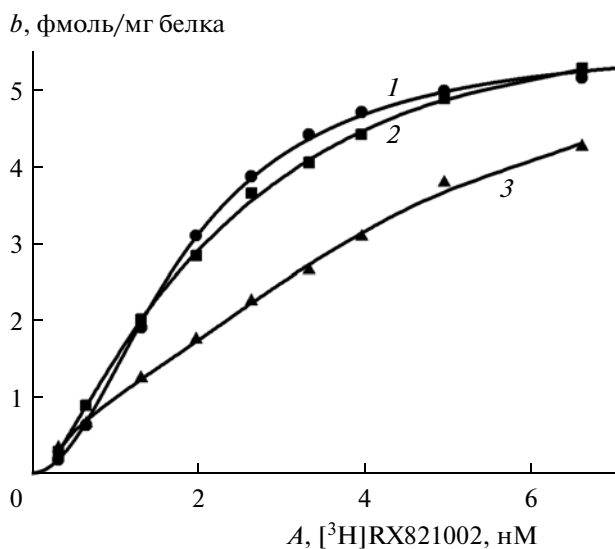


Рис. 4. Влияние серотонина и миансерина на связывание [³H]-RX821002 α₁-адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс. Параметры связывания: в контрольном опыте $K_d = 1.80 \pm 0.03$ нМ, $B_{max} = 5.64 \pm 0.05$ фмоль/мг белка, $n = 2$; на фоне серотонина $K_{d1} = 0.89 \pm 0.17$ нМ, $K_{d2} = 2.89 \pm 0.36$ нМ, $B_{m1} = 1.90 \pm 0.57$ фмоль/мг белка, $B_{m2} = 4.06 \pm 0.49$ фмоль/мг белка $n = 2$; на фоне миансерина $K_{d1} = 0.53 \pm 0.13$ нМ, $K_{d2} = 4.28 \pm 0.41$ нМ, $B_{m1} = 0.94 \pm 0.19$ фмоль/мг белка, $B_{m2} = 4.79 \pm 0.21$ фмоль/мг белка $n = 2$.

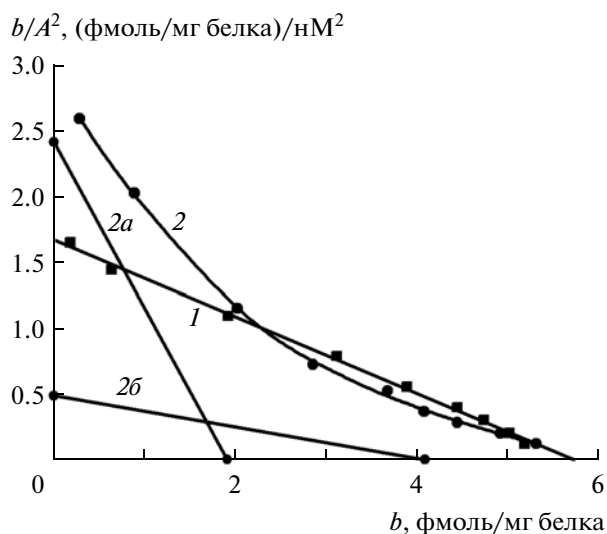


Рис. 5. Влияние серотонина на связывание [³H]-RX821002 α₂-адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс.

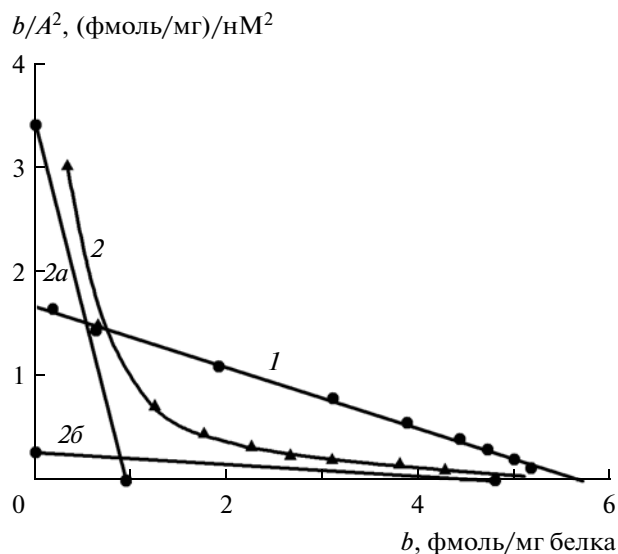


Рис. 6. Влияние миансерина на связывание $[^3\text{H}]$ -RX821002 α_2 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс.

к лиганду высокоаффинного пула возрастает по сравнению с контролем (снижается значение K_{d1}), а низкоаффинного – снижается (увеличивается значение K_{d2}). Достоверно не меняется значение B_{max} $[^3\text{H}]$ -RX821002. В результате эффективность связывания лиганда снижается (табл. 2). График (рис. 6, 2), построенный с помощью уравнения (5), отражает особенности влияния миансерина на связывание лиганда. Высоко- и низкоаффинный пулы на графике представлены в виде асимптот (рис. 6, 2а, 2б).

Особенность действия 5-НТ и миансерина – появление высоко- и низкоаффинного пулов α_2 -АР. Общее действие 5-НТ и миансерина на связывание $[^3\text{H}]$ -RX821002 ингибиторное. По всем параметрам (табл. 2) миансерин как ингибитор более активен, чем 5-НТ.

Модуляция связывания $[^3\text{H}]$ -QNB мускариновыми рецепторами клеточных мембран коры мозга крыс при активации и ингибировании серотониновых рецепторов. В контроле наименьшие стандартные ошибки средней параметров получены при расчете по уравнению (2) – два пула рецепторов с параметрами B_{m1} , K_{d1} , B_{m2} , K_{d2} и $n_1 = n_2 = 2$. М-ХР связывают $[^3\text{H}]$ -QNB с параметрами $K_{d1} = 0.4 \pm 0.1$, $K_{d2} = 2.9 \pm 0.55$ нМ, $B_{m1} = 160 \pm 19$, $B_{m2} = 615 \pm 97$ фмоль/мг белка, $n = 2$, $E_1 = 200$, $E_2 = 106$ (фмоль/мг белка)/нМ (табл. 3).

5-НТ не влияет на общий характер взаимодействия лиганда с рецепторами, сохраняются два пула. Значения K_d достоверно не меняются, но значительно снижаются значения B_{max} активных М-ХР за счет уменьшения концентрации рецепторов в высоко- и низкоаффинном пулах (на 60 и 40% соответственно). В результате почти в 2 раза снизилась эффективность связывания лиганда в обоих пулах (табл. 3). Ингибиторное влияние 5-НТ на связывание $[^3\text{H}]$ -QNB в основном обусловлено снижением концентраций активных рецепторов (B_{m1} и B_{m2}). Следовательно, 5-НТ действует преимущественно как неконкурентный ингибитор М-ХР.

Миансерин не изменил общего характера связывания $[^3\text{H}]$ -QNB мускариновыми рецепторами – в картезианских координатах (рис. 7, 3) связывание лиганда описывается стандартной гиперболой. Как и при действии 5-НТ, происходит снижение количества активных рецепторов в обоих пулах (табл. 3). Миансерин снизил сродство М-ХР высокоаффинного пула в 2.3, а низкоаффинного – в 1.4 раза. Количество активных рецепторов достоверно не изменилось. За счет этого на 60% уменьшилась эффективность высокоаффинного пула и на 39% – низкоаффинного. В реакции связывания $[^3\text{H}]$ -QNB миансерин действует как конкурентный ингибитор обоих пулов М-ХР (табл. 3).

Количественные изменения связывания $[^3\text{H}]$ -QNB показаны на графике (рис. 7). На нем в

Таблица 3. Влияние серотонина и миансерина на параметры связывания $[^3\text{H}]$ -QNB с М-ХР субклеточных фракций мембран коры головного мозга крыс

Параметр	Контроль	Серотонин	Миансерин
K_{d1} , нМ	0.40 ± 0.10	0.29 ± 0.04	$0.93 \pm 0.14^*$
K_{d2} , нМ	2.90 ± 0.55	3.61 ± 1.23	$4.10 \pm 0.16^*$
n_1	2	2	2
n_2	2	2	2
B_{m1} , фмоль/мг белка	160 ± 19	$59 \pm 28^*$	149 ± 11
B_{m2} , фмоль/мг белка	615 ± 97	$392 \pm 26^*$	535 ± 22
$E_1 = B_{m1}/2K_{d1}$, фмоль/мг белка/нМ	200 ± 19	$102 \pm 14^*$	$80 \pm 5^*$
$E_2 = B_{m2}/2K_{d2}$, (фмоль/мг белка)/нМ	106 ± 48	$54 \pm 13^*$	$65 \pm 11^*$
Модель	VI	VI	VI

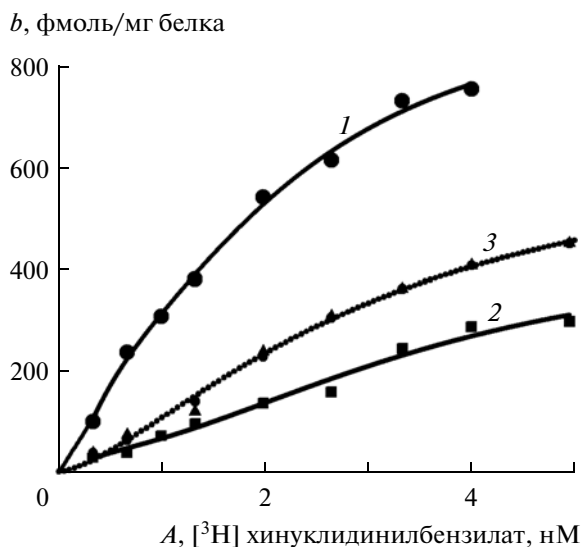


Рис. 7. Влияние серотонина и миансерина на связывание $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ мускариновыми рецепторами мембран коры головного мозга крыс. Параметры связывания: 1 (контроль) – K_{d1} – 0.42 нМ, K_{d2} – 2.30 нМ, B_{m1} = 236 фмоль/мг белка, B_{m2} = 701 фмоль/мг белка; 2 (серотонин) – K_{d1} = 0.29 нМ, K_{d2} = 3.59 нМ, B_{m1} = 39.07 фмоль/мг белка, B_{m2} = 409.9 фмоль/мг белка; 3 (миансерин) – K_{d1} = 0.6 нМ, K_{d2} = 2.37 нМ, B_{m1} = 141 фмоль/мг белка, B_{m2} = 548 фмоль/мг белка.

картезианских координатах представлены экспериментальные точки и теоретические кривые связывания $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ в контроле (1), на фоне 5-НТ (2) и миансерина (3). Для дальнейшего ана-

лиза экспериментальных результатов с помощью уравнения (5) построены теоретические кривые для контрольных опытов и при действии 5-НТ, на которые нанесены экспериментальные точки (рис. 8, 1 и 2). Под влиянием 5-НТ происходит смещение кривой по осям ординат при сохранении двух пулов рецепторов. На рис. 8 (1, 3) приведены также аналогичные графики действия миансерина на связывание $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ с М-ХР. Активация 5-НТ-рецепторов достоверно не изменяет аффинность М-ХР высоко- и низкоаффинного пулов, но снижает их количество в обоих пулах. Миансерин снижает аффинность обоих пулов М-ХР, при этом число активных рецепторов достоверно не изменяется. Следовательно, 5-НТ действует на М-ХР преимущественно как неконкурентный ингибитор, а миансерин – как конкурентный.

По величине аффинности исследованные α_1 -, α_2 -адренорецепторы и мускариновые холинорецепторы находятся в узком интервале концентраций (0.54 ± 0.05 – 0.79 ± 0.07 1/нМ) (табл. 4). Рецепторы нейротрансмиттеров ассоциированы с G-белками. Вероятно, небольшие, на грани достоверности ($p = 2.86$), различия в их значениях K_a могут быть обусловлены только специфическими структурами, обеспечивающими ортостерическое связывание лиганда со специфическими рецепторами. Установлены значительные различия в концентрациях исследованных рецепторов в коре го-

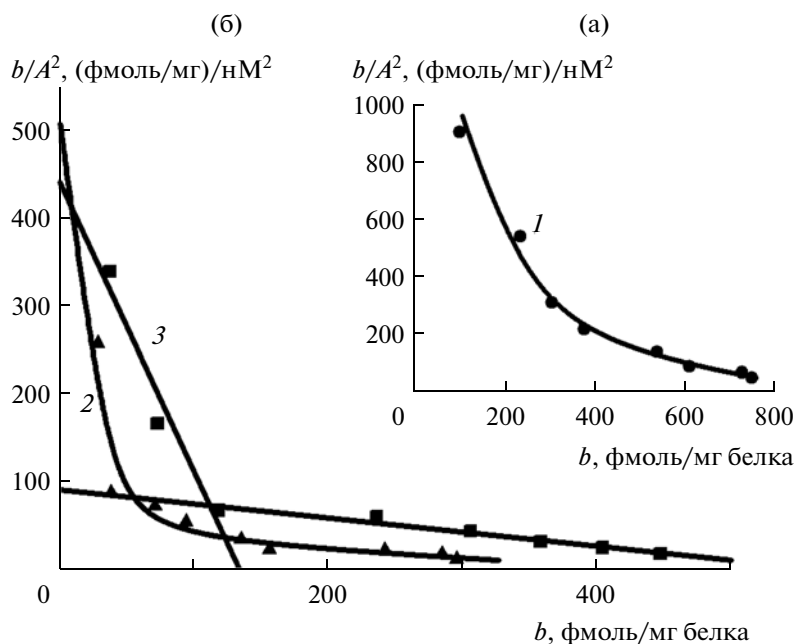


Рис. 8. Влияние серотонина и миансерина на связывание $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ мускариновыми рецепторами мембран коры головного мозга крыс в контроле (а, 1), после действия серотонина (б, 2) и миансерина (б, 3).

Таблица 4. Сравнительная характеристика влияния серотонина и миансерина на активность α_1 -, α_2 -адрено- и мускариновых рецепторов субклеточных фракций мембран коры головного мозга крыс

Параметр	Контроль	Серотонин	Миансерин
[³ H]-празозин			
K_a , 1/нМ	0.54 ± 0.05	0.39 ± 0.03*	0.25 ± 0.01*
B_{max} , фмоль/мг белка	31.12 ± 0.33	32.20 ± 0.80	40.04 ± 0.53*
n	2	2	2
$E = B_{max} K_a/2$, (фмоль/мг белка) нМ	8.36 ± 0.05	5.92 ± 0.24*	5.04 ± 0.06*
[³ H]-RX821002			
K_a , 1/нМ	0.64 ± 0.01	0.54 ± 0.02*	0.37 ± 0.05*
B_{max} , фмоль/мг белка	5.67 ± 0.02	5.51 ± 0.15	4.77 ± 0.17*
n	2	2	2
$E = B_{max} K_a/2$, (фмоль/мг белка) нМ	1.81 ± 0.01	1.49 ± 0.02 *	1.00 ± 0.06*
[³ H]-QNB			
K_a , 1/нМ	0.79 ± 0.07	0.38 ± 0.05*	0.44 ± 0.08
B_{max} , фмоль/мг белка	798.42 ± 41.65	377.45 ± 38.23*	536.15 ± 28.82*
n	2	2	2
$E = B_{max} K_a/2$, (фмоль/мг белка) нМ	314.34 ± 5.00	73.43 ± 12.92 *	117.58 ± 5.19 *
Модель	II	II	II

Примечание. K_a – константа ассоциации.

лового мозга крыс. По отношению к М-ХР α_1 -АР составляют 4, а α_2 -АР – 0.7%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для определения девяти параметров (K_d , K_{d1} , K_{d2} , B_{max} , B_{m1} , B_{m2} , n , n_1 , n_2) закономерности связывания радиоактивного лиганда со специфическими рецепторами использованы базовые уравнения (1) и (2). С их помощью оценено количество связанного лиганда – как результат аллостерического взаимодействия рецепторов с различной специфичностью и активностью.

Кинетика связывания специфических радиоактивных лигандов [³H]-празозина и [³H]-RX821002 с α_1 -, α_2 -АР мембран коры головного мозга крыс в контроле описана уравнением (1), а [³H]-QNB с М-ХР – уравнением (2). Адренорецепторы α_1 и α_2 представлены одним пулом, мускариновые – двумя пулами рецепторов.

АР на фоне 5-НТ представлены двумя пулами с различной аффинностью. Миансерин вызывает появление двух пулов только α_2 -рецепторов (табл. 1, 2). М-ХР в контроле и опыте определяются как два пула рецепторов с различающимися значениями основных параметров (K_d и B_{max}) (табл. 3).

Использование уравнения (2) для анализа экспериментальных результатов позволяет получить подробную характеристику свойств рецепторов определенной эффекторной системы: их концентрацию, число пулов с разной аффинностью, плотность моно- и димерных рецепторов. Значительное число характеристик рецепторов иногда затрудняет сравнение физиологических свойств различных нейротрансмиттерных систем. Поэтому для получения общих количественных характеристик изменения активности рецепторов в контроле и экспериментах, дополнительно проведен расчет их параметров по уравнению (1) и вместо K_d представлена K_a – константа ассоциации (аффинности) ($K_a = (1/K_d)$) (табл. 4).

5-НТ снижает аффинность (K_a) рецепторов для [³H]-празозина в 1.4, для [³H]-RX821002 в 1.2, для [³H]-QNB в 2 раза. Миансерин K_a для [³H]-празозина снижает в 2, для [³H]-RX821002 – в 1.7, для [³H]-QNB – 1.8 раза. Количество АР на фоне 5-НТ достоверно не изменяется, мускариновых – снижается в 2 раза. Под влиянием миансерина количество α_1 -АР возрастает, α_2 -АР и мускариновых снижается. Эффективность связывания под влиянием 5-НТ и миансерина во всех вариантах опытов снижена.

5-НТ действует на α_1 - и α_2 -АР по типу конкурентного ингибитора – их аффинность снижает-

ся, а число достоверно не изменяется. Миансерин также снижает аффинность АР как конкурентный ингибитор и влияет на нее как неконкурентный активатор количества α_1 -АР и ингибитор α_2 -АР. На активность М-ХР 5-НТ и миансерин действуют как ингибиторы смешанного типа: уменьшают их аффинность и количество.

Имеются данные об аллостерическом влиянии на активность рецепторов агонистов и антагонистов других нейротрансмиттерных систем. Показано, что агонист дофаминовых рецепторов 3-(3,4dimethylphenyl)-1-(2-piperidin-1-yl)ethyl piperidine модулирует аффинность аденозиновых гомо- и гетеродимерных рецепторов (Trincavelly *et al.*, 2012). Обратное взаимодействие (negative cross-talk) между α_1 - и β -АР отмечено при глюконогенезе в гепатоцитах (Diaz-Stus *et al.*, 2011). На фоне атропина и карбахола аффинность α_1 -АР к [³H]-празозину снижается, а димерные в контроле рецепторы становятся мономерными (Нестерова, Манухин, 2010). В коре мозга крыс норадреналин снижает связывание [³H]-RX821002 с α_2 -АР с аффинностью, которая в 10 раз больше таковой у дофамина (Cornil, Ball, 2008). Под влиянием атропина и карбахола повышаются аффинность и значение B_{\max} антагониста α_2 -АР [³H]-RX821002 (Манухин, Нестерова, 2011).

Ингибитор синтеза оксида азота L-NNA снижает аффинность М-ХР и увеличивает их количество в мембранах коры головного мозга крыс. Доноры оксида азота нитропруссид натрия и L-аргинин повышают аффинность М-ХР и не изменяют их количество (Манухин, Нестерова, 2004). Асенапин — антагонист серотониновых, адренергических и дофаминергических рецепторов — вызывает выделение моноаминов в префронтальной коре мозга. Агонисты и антагонисты 5-НТ-рецепторов и α_2 -АР ослабляют или усиливают этот эффект (Fränberg *et al.*, 2012).

Считается, что в эмбриональной и дефинитивной нервной системе состав синтезируемых клетками нервной системы нейротрансмиттеров может изменяться и регулироваться как внутренними, так и внешними сигналами (Vogodinsky *et al.*, 2014). Мы предполагаем, что один из механизмов, обеспечивающих транзиторные изменения активности нейротрансмиттерных систем — аллостерические адаптации количества и аффинности рецепторов одной нейротрансмиттерной системы под влиянием агонистов другой.

Использованный метод позволяет проводить количественную оценку лиганд-рецепторных взаимодействий на различных уровнях — от клеточной мембраны до организма (Манухин, 2000). Связывание лиганда с рецептором описывается уравнениями (1) и (2). Входящие в уравнения три или шесть основных параметров дают количе-

ственную характеристику свойств специфических рецепторов. Константа диссоциации характеризует аффинность рецепторов ($K_a = 1/K_d$), B_{\max} — их количество, а n — моно- или димерность. Этот аналитический подход позволяет получить сравнительную количественную характеристику действия определенного биологически активного вещества на рецепторы и физиологические реакции различных нейротрансмиттерных систем. Так, на фоне кокаина возрастает α -адренергическая реакция на норадреналин изолированных семяносающего протока крысы, амниона куриного эмбриона, количество α -АР в мембранах коры головного мозга крыс и снижается активность М-ХР в этих эффекторных системах (Манухин и др., 2011).

Экспериментально было установлено, что в одной эффекторной системе могут быть один (K_a) или два различающихся по аффинности пула рецепторов (K_{a1} , K_{a2}). Рецепторы в гомогенном по аффинности пуле (B_{\max}) и при двух пулах (B_{m1} , B_{m2}) в одной эффекторной системе могут быть гомо-, ди- или гетеромерными (Uberti *et al.*, 2003; Small *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006). Возможно также существование гомо- и димерных рецепторов в одном по аффинности пуле (Манухин, Нестерова, 2009).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные результаты и анализ данных научной литературы указывают на способность серотонина и миансерина количественно и качественно действовать на активность α_1 -, α_2 -адренергических и мускариновых рецепторов мембран коры головного мозга крыс. При этом агонисты и антагонисты 5-НТ-рецепторов по-разному аллостерически изменяют основные характеристики α_1 -, α_2 -АР и М-ХР по девяти параметрам — числу пулов рецепторов, их аффинности, концентрации активных моно- и димерных рецепторов. Следовательно, присутствие в межклеточной среде различных нейротрансмиттеров и других активных веществ обеспечивает в организме их аллостерическое регуляторное взаимодействие на уровне специфических рецепторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-0400845).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Пер. с англ. М.: Мир, 1982. Т. 3. 1117 с.
- Манухин Б.Н. Анализ лиганд-рецепторных взаимодействий на уровнях от молекулярного до организменного // Рос. физиол. журн. 2000. Т. 86. № 10. С. 1220–232.

- Манухин Б.Н., Нестерова Л.А. Влияние оксида азота на связывание [³H] хинуклидинилбензилата мускариновыми холинорецепторами мембран коры головного мозга крыс // Биол. мембраны. 2004. Т. 21. № 1. С. 19–23.
- Манухин Б.Н., Нестерова Л.А. Аллостерическая модуляция связывания [³H]хинуклидинилбензилата мускариновыми рецепторами мембран коры головного мозга крыс адренотропными веществами // Биол. мембраны. 2009. Т. 26. № 2. С. 104–110.
- Манухин Б.Н., Нестерова Л.А. Аллостерическое влияние атропина и карбахола на активность альфа₂-адренорецепторов мембран коры головного мозга крыс // Биол. мембраны. 2011. Т. 28. № 5. С. 382–386.
- Манухин Б.Н., Бердышева Л.В., Бойко О.В., Нестерова Л.А. Общность и различие в действии кокаина на α-адренергические и мускариновые реакции // Изв. РАН. Сер. биол. 2011. № 3. С. 322–333.
- Нестерова Л.А., Манухин Б.Н. Агонисты и антагонисты мускариновых холинорецепторов – модуляторы активности α₁-адренорецепторов мембран коры головного мозга крыс // Биол. мембраны. 2010. Т. 276. № 2. С. 189–194.
- Birtheimer A., Stemmelin J., Jackisch R., Cassel J.C. Presynaptic modulation of acetylcholine, noradrenaline, and serotonin release in the hippocampus of aged rats with various levels of memory impairments // Brain Res. Bull. 2003. V. 15. № 60(3). P. 283–296.
- Blier P., Szabo S.T. Potential mechanisms of action of atypical antipsychotic medications in treatment-resistant depression and anxiety // J. Clin. Psychiatry. 2005. V. 66. № 8. P. 30–40.
- Bonaventure P., Nepomuceno D., Hein L. et al. Radioligand binding analysis of knockout mice reveals 5-hydroxytryptamine (7) receptor distribution and uncovers 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin interaction with alpha(2) adrenergic receptors // Neuroscience. 2004. V. 124. № 4. P. 901–911.
- Borodinsky L.N., Belgasem Y.H., Swapna I., Sequerra E.B. Dynamic regulation of neurotransmitter specification: Relevanse to nervous system homeostasis // Neuropharmacology. 2014. V. 78. P. 75–80.
- Carlson B.B., Wisniewski A., Salamone J.D. Local injections of the 5-hydroxytryptamine antagonist mianserin into substantia nigra pars reticulata block tremulous jaw movements in rats: studies with a putative model of Parkinsonian tremor // Psychopharmacology. 2003. V. 165. № 3. P. 229–237.
- Cornil C.A., Ball G.F. Interplay among catecholamine systems: dopamine binds to alpha2-adrenergic receptors in birds and mammals // J. Comp. Neurol. 2008. V. 511. № 5. P. 610–627.
- Diaz-Crus A., Vilchis-Landeros M.M., Guinsberg R. et al. NOX2 activated by α₁-adrenoceptors modulates hepatic metabolic routes stimulated by β-adrenoceptors // Free Radic. Res. 2011. V. 45. № 11–12. P. 1366–1378.
- Diez-Alarcia R., Pilar-Cuellar F., Panigua M.A. et al. Pharmacological characterization and autoradiographic distribution of alpha2-adrenoceptor antagonist [³H]RX 821002 binding sites in the chicken brain // Neuroscience. 2006. V. 141. № 1. P. 357–369.
- Dupont L.J., Pype J.I., Demedts M.G. et al. The effects of 5-HT on cholinergic contraction in human airways *in vitro* // Eur. Resp. J. 1999. V. 14. № 3. P. 642.
- Frånberg O., Marcus M.M., Svensson T.H. Involvement of 5-HT_{2A} receptor and α₂-adrenoceptor blockade in the asenapine-induced elevation of prefrontal cortical monoamine outflow // Synapse. 2012. V. 66. № 7. P. 650–660.
- 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, 1982. P. 147–161.
- Kalkman H.O., van Gelderen E.M., Timmermans P.B., van Zwieten P.A. К effects of (+) and (–) mianserin on alpha adrenoceptors and tyramine induced tachycardia in rats // Eur. J. Pharmacol. 1983. V. 90. № 2–3. P. 221–226.
- Kwok Y.H., Mitchelson F. The effect of some antidepressants on prejunctional muscarinic receptors on the sympathetic nerves of the isolated rabbit ear artery // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 1982. V. 320. № 1. P. 14–19.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.I.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
- Manukhin B.N., Nesterova L.A., Smurova E.A., Kichiculova T.P. An approach to analysis of radiolabeled ligand interactions with specific receptors // Eur. J. Pharmacol. 1999. V. 386. № 2–3. P. 273–288.
- Matsumoto M., Togashi H., Mori K. et al. Evidence for involvement of central 5-HT(4) receptors in cholinergic function associated with cognitive processes: behavioral, electrophysiological, and neurochemical studies // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001. V. 296 (3). P. 676–682.
- Obata H., Saito S., Sasaki M., Goto F. Interactions of 5-HT₂ receptor agonists with acetylcholine in spinal analgesic mechanisms in rats with neuropathic pain // Brain Res. 2003. V. 965. № 1–2. P. 114–120.
- Ramage A.G., Villalón C.M. 5-hydroxytryptamine and cardiovascular regulation // Trends Pharmacol. Sci. 2008. V. 29. № 9. P. 472–481.
- Rashid M., Muntasir H.A., Watanabe M. et al. Assessment of affinities and dissociation potencies of several 5-HT (2) antagonists to and from M(2) muskarinic receptor in rat heart membranes // Biol. Pharm. Bull. 2003. V. 28. № 8. P. 1184–1187.
- Small K.M., Schwarb M.R., Glinka C. et al. Alpha1A- and alpha2C-adrenergic receptors form homo- and heterodimers: the heterodimeric state impairs agonist-promoted GRK phosphorylation and beta-arrestin recruitment // Biochemistry. 2006. V. 45. № 15. P. 4760–4767.
- Sorbi C., Franchini S., Tait A. et al. 1,3-Dioxolane-based ligands as rigid analogues of naftopidil: structure-affinity/activity relationships at alpha1 and 5-HT_{1A} receptors // Chem. Med. Chem. 2009. V. 4. № 3. P. 393–399.
- Trincavelly M.L., Daniele S., Orlandini E. et al. A new dopamine receptor agonist allosterically modulates

A(2A) adenosine receptor signaling by interacting with the A(2A) D-receptor heteromer // *Cell Signal*. 2012. V. 24. № 4. P. 951–960.

Uberti M.A., Hall R.A., Minneman K.P. Subtype-specific dimerization of alpha1-adrenoceptors: effects on receptor expression and pharmacological properties // *Mol. Pharmacol*. 2003. V. 64. № 6. P. 1379–1390.

Watts S.W., Fink G.D., Silver P.J., Cusshing D.J. Interaction of the beta adrenergic receptor antagonist bucindolol with serotonergic receptors // *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 2000. V. 35. P. 29–36.

Zhou F., Filipeanu C.M., Duvernay M.T., Wu G. Cell-surface targeting of alpha2-adrenergic receptors – inhibition by transport deficient mutant through dimerization // *Cell Signal*. 2006. V. 18. № 3. P. 318–327.

Allosteric Effect of Serotonin and Mianserin on the Kinetics of Specific [³H]-Ligand Binding to Adrenergic and Muscarinic Receptors in the Rat Cerebral Cortex Membranes

B. N. Manukhin and L. A. Nesterova

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia
e-mail: nesterovala@idbras.ru*

The effects of serotonin receptor activation (by serotonin) and inhibition (by mianserin) on the properties of the α_1 -, α_2 -adrenoreceptors, and muscarinic cholinergic receptors in subcellular membrane fractions from the rat cerebral cortex were studied. Experimental data on the kinetics of specific antagonists binding to adrenergic and muscarinic receptors were analyzed by graphical and mathematical methods. The results suggest the presence of allosteric (cross-talk) interaction. In the control, α_1 - and α_2 -adrenoreceptors were represented by a single pool, and muscarinic receptors, by two pools. Two pools of adrenoreceptors with different affinity were detected against the background of serotonin. It was found that mianserin induces the formation of two pools of only α_2 -receptors and muscarinic receptors are represented by two pools differing in the main parameters, such as dissociation constants and adrenoreceptor concentrations, in the control and experimental groups. It was shown that the allosteric effect of serotonin and mianserin is manifested in the inhibition of muscarinic receptors. It was assumed that the adrenergic and cholinergic receptors exist as dimers. The interaction between the adrenergic, cholinergic, and serotonergic systems is likely to be implemented at the cell membrane level.