

УДК 576.314.6.088.6 + 612.11.612.82.015

АГОНИСТЫ И АНТАГОНИСТЫ МУСКАРИНОВЫХ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ – МОДУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ α_1 -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ МЕМБРАН КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

© 2010 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 (499)135-80-12, электронная почта: manukhinb@mail.ru

Поступила в редакцию 20.04.2009 г.

На синапсомембранных мембранах головного мозга крыс исследовано влияние активации и блокады мускариновых холинорецепторов карбахолом и атропином на связывание специфического неселективного антагониста α_1 -адренорецепторов [^3H]празозина. Установлено, что лиганд-рецепторное взаимодействие α_1 -адренорецепторов соответствует модели: один пул рецепторов и присоединение двух молекул лиганда к одному рецептору. Параметры связывания [^3H]празозина – $K_d = 1.56 \pm 0.17$ нМ, $B_{\max} = 30.25 \pm 1.78$ фмоль/мг белка, $n = 2$. При блокаде мускариновых холинорецепторов атропином и активации карбахолом связывание радиоактивного лиганда с α_1 -адренорецепторами происходит по такой же модели, но при $n = 1$. На фоне атропина чувствительность α_1 -адренорецепторов к [^3H]празозину снижается более чем в 2 раза ($K_d = 3.52 \pm 0.36$ нМ), а концентрация активных адренорецепторов на 36% ($B_{\max} = 19.45 \pm 1.46$ фмоль/мг белка). Под влиянием карбахола сродство адренорецепторов к лиганду не уменьшается, а количество активных рецепторов снижается так же, как на фоне атропина. Предполагается, что α_1 -адренорецепторы в мембранах головного мозга крыс существуют в виде димеров. Выявлено модулирующее действие атропина и карбахола на связывание специфического антагониста α_1 -адренорецепторами, которое проявляется в изменении общего характера связывания (мономеризации α_1 -адренорецепторов) и ингибиторном эффекте на параметры связывания [^3H]празозина.

Ключевые слова: [^3H]празозин, мембраны коры головного мозга крыс, α_1 -адренорецепторы, димеры, мономеризация рецепторов.

В последние годы все больший интерес вызывает взаимодействие регуляторных систем. Так, на уровне мембран показан модуляторный эффект никотина на связывание лиганда М-холинорецепторами мембран коры головного мозга крыс [1]. Классический антагонист М-холинорецепторов атропин изменяет ионные эффекты, вызванные активацией никотиновых рецепторов [2]. АТР повышает чувствительность α_1 - и α_2 -адренорецепторов афферентных артериол почки к норадреналину. Эффект обусловлен активацией АТР-рецепторов P2 и изменением концентрации внутриклеточного кальция [3]. Через α_1 - и α_2 -адренорецепторы спинного мозга осуществляется анальгезирующий эффект электроакупунктуры у крыс [4]. В мембранах мозга цыплят серотонин изменяет параметры связывания антагониста [^3H]RX821002 с α_2 -адренорецепторами [5]. Показано, что агонист α -адренорецепторов норадреналин в мембранах коры головного мозга крыс, снижает общую концентрацию М-холинорецепторов, но повышает их концентрацию в высокоаффинном пуле. Агонист α_2 -адренорецепторов клонидин и антагонист α_2 -адренорецепторов иохимбин повышают концентрацию М-холинорецепторов [6]. Агонист β -адренорецепторов CGP–12177A является неселективным агонистом α_1 -адренорецепторов [7].

Приведенные данные свидетельствуют о взаимодействии нейротрансмиттерных систем, которое, в случае экспериментов с радиоактивными лигандами, более вероятно на уровне мембраны клетки. Можно предположить, что присоединение нейротрансмиттера к своему рецептору изменяет активность других рецепторов, модулируя специфические реакции клеток [8].

Задачей работы было изучение действия специфического агониста и антагониста мускариновых холинорецепторов карбахола и атропина на кинетику связывания специфического неселективного антагониста α_1 -адренорецепторов [^3H]празозина синапсомембранными мембранами коры головного мозга крыс.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Опыты проводили на синапсомембранах коры головного мозга крыс-самцов линии Вистар (210–250 г), которые выделяли согласно [9] с некоторыми модификациями [10]. Изолированные мембранные препараты хранили при -70°C в течение 3 недель. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [11], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (“Sigma”, США). Связывание радиоактивного лиганда проводили в инкубационной среде с последующим отмыванием мембран от несвязанного лиганда на стекловолокнистых

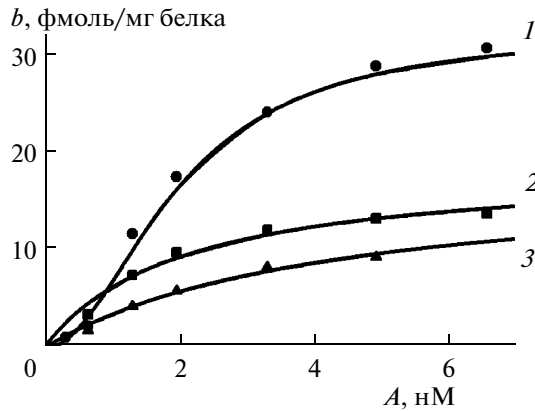


Рис. 1. Экспериментальные точки и теоретические кривые специфического связывания [^3H]празозина α_1 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс в контроле и при действии атропина и карбахола. По оси абсцисс – концентрация [^3H]празозина (нМ), по оси ординат – количество мест, связанных лигандом (b , фмоль/мг белка). 1 – Контроль, 2 – атропин, 3 – карбахол. Теоретические кривые, параметры связывания в контрольном опыте $K_d = 1.98 \pm 0.30$ нМ, $B_{\max} = 32.72 \pm 3.06$ фмоль/мг белка, $n = 2$; на фоне атропина – $K_d = 4.20 \pm 1.17$ нМ, $B_{\max} = 17.95 \pm 2.86$ фмоль/мг белка, $n = 1$; на фоне карбахола – $K_d = 2.02 \pm 0.42$ нМ, $B_{\max} = 8.81 \pm 1.50$ фмоль/мг белка, $n = 1$.

фильтрах GFB по общепринятому методу [12]. Объем инкубационной среды составлял 100 мкл – 50 мкл суспензии мембран, буфер трис-HCl 50 мМ, pH 7.4, “холодный” вытеснитель, агонист или антагонист мускариновых холинорецепторов и радиоактивный лиганд. Реакцию останавливали добавлением 1 мл холодного буфера (0°C). Для определения параметров связывания лиганда с α_1 -адренорецепторами использовали специфический неселективный антагонист α_1 -адренорецепторов [^3H]празозин (“Amersham”, Великобритания, 77 Ки/мМ) в концентрации 0.33–6.60 нМ. Специфическое связывание радиоактивного лиганда определяли по разнице между общим и неспецифическим, в присутствии нерадиоактивного лиганда – празозина в концентрации 10 мкМ. В качестве агониста и антагониста мускариновых холинорецепторов использовали карбахол и атропин (“Sigma”) в концентрациях 10 мкМ. Смесь инкубировали в течение 30 мин при 22°C. Вещества вводили в инкубационную среду за 20 мин перед добавлением [^3H]празозина.

Для определения закономерностей связывания антагонистов со специфическими рецепторами использовали математические и графические методы анализа лиганд-рецепторных взаимодействий. Ранее теоретически и экспериментально были обоснованы методы количественного определения основных параметров в реакциях с использованием радиоактивных лигандов [13, 14]. Показано, что взаимодействие специфических радиоактивных антагонистов адренорецепторов с изолированными мембранами коры мозга крыс можно описать уравнениями для одного или двух пулов рецепторов. Действие каждого из исследованных веществ анализировали с использова-

нием 9 математических моделей связывания лиганда рецептором [13]. Установлено, что взаимодействие лиганда с α_1 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс соответствует модели с одним пулом рецепторов и присоединением двух молекул лиганда к рецептору.

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

где b – количество связанного лиганда, B_{\max} – количество мест связывания лиганда с константой диссоциации K_d и коэффициентом Хилла n , $[A]$ – 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) [14]. На рис. 1 и 2 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 в трехкратной повторности. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента ($p < 0.05$). Все значения представлены как средние арифметические и стандартные ошибки средней ($M \pm SEM$). Экспериментальные данные анализировали методом минимизации среднеквадратичных отклонений между экспериментальными данными и моделью, характеристикой степени приближения которого является стандартная ошибка измерения (Standard Error of the Estimate) (таблица).

Для количественной оценки влияния исследованных веществ на основные параметры лиганд-рецепторного взаимодействия (K_d или B_{\max}) рассчитывали их константы ингибирования и активации по уравнениям [15]:

$$IC_{50} = (I K_{dc})/(K_{de} - K_{dc}), \quad (3)$$

$$IC_{50} = (I B_{\max e})/(B_{\max c} - B_{\max e}). \quad (4)$$

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

$$IC_{50} = I[(K_{dc}B_{\max e})/(K_{de}B_{\max c} - K_{dc}B_{\max e})], \quad (5)$$

где показатель IC_{50} для уравнений (3) и (4) соответствует концентрации вещества, снижающей активность (повышение K_d) или количество (B_{\max}) рецепторов в 2 раза. Величина IC_{50} в уравнении (5) показывает теоретическую концентрацию 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 экспе-

рименте, B_{\max} и B_{\max} – количество активных рецепторов в контроле и в эксперименте соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ

График специфического связывания [³H]празозина изолированными мембранами коры головного мозга крыс представляет собой типичную кривую насыщения (рис. 1). Математический анализ экспериментальных данных показал, что наименьшие ошибки параметров и стандартной ошибки вычисления (Standard Error of the Estimate) 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 (6), линеаризированной формы уравнения (1), в координатах ($b; b/A^2$) также показывает существование одного гомогенного пула α_1 -адренорецепторов, при $n = 2$ (рис. 2).

$$(b/A^2) = [(B_{\max})/(K_d^2)] - [b/(K_d^2)]. \quad (6)$$

Экспериментальные точки на графике расположены на прямой линии. Для подтверждения соответствия рассчитанных параметров полученным данным по уравнению (1) проведена теоретическая кривая, по уравнению (6) – линейная регрессия, с которыми хорошо совпадают экспериментальные точки (рис. 1, 1 и 2, 1).

Атропин, антагонист М-холинорецепторов, вызвал существенные изменения связывания специфического антагониста [³H]празозина. Он повлиял как на общий характер взаимодействия лиганда с α_1 -адренорецепторами, так и на параметры связывания. При блокаде мускариновых холинорецепторов связывание радиоактивного лиганда с α_1 -адренорецепторами происходит по модели: один пул рецепторов, присоединение одной молекулы лиганда к рецептору. Обнаружено, что величина K_d достоверно увеличилась (в два с лишним раза), и значительно (на 36%) снизилось

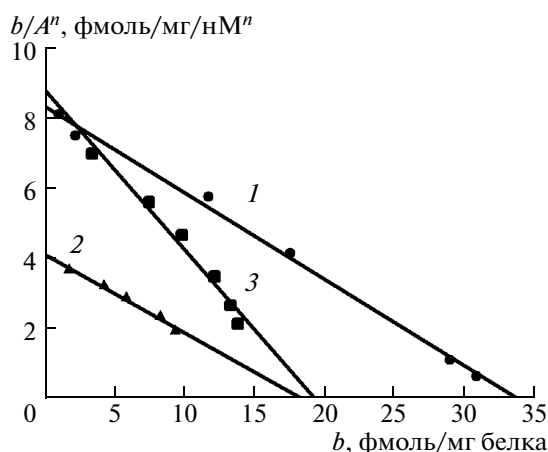


Рис. 2. Экспериментальные точки и теоретические кривые специфического связывания [³H]празозина α_1 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс в контроле (1), при действии атропина (2) и карбахола (3). По оси абсцисс – количество мест связанных лигандом (b , фмоль/мг белка), по оси ординат – отношение количества мест связанных лигандом к его концентрации (b/A^n , фмоль/мг/нМⁿ). Для контроля $n = 2$, для атропина и карбахола $n = 1$.

количество α_1 -адренорецепторов (B_{\max}). В результате, в 2 раза снизилась эффективность связывания (таблица) лиганда. Ингибиторный эффект атропина на связывание [³H]празозина обусловлен снижением как чувствительности, так и концентрации активных α_1 -адренорецепторов. Результаты графического анализа экспериментов хорошо совпадают с расчетными данными (таблица). На графике (рис. 1, 2) приведены экспериментальные точки и теоретические кривые, построенные по уравнению (1). Видно снижение количества мест связывания [³H]празозина при всех его концентрациях и совпадение экспериментальных точек с теоретическими кривыми. Действие атропина на связывание лиганда рецепторами представлено также на графике, построенном в координатах Скотчарда с помощью лине-

Влияние атропина и карбахола на связывание [³H]празозина α_1 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс

Параметры	Контроль	Атропин	Карбахол
K_d , нМ	1.56 ± 0.17 (9)	3.52 ± 0.36* (9)	2.02 ± 0.24 (9)
B_{\max} , фмоль / мг	30.25 ± 1.78	19.45 ± 1.46*	19.58 ± 2.39*
n	2	1	1
E , фмоль / мг / нМ	7.46 ± 1.32	3.25 ± 0.44*	6.53 ± 0.74
Стандартная ошибка измерения,** фмоль / мг	1.94 ± 0.41	0.77 ± 0.16	0.73 ± 0.08
IC_{50} , мкМ, (K_d)		7.96	33.91
IC_{50} , мкМ, (B_{\max})		18.01	18.35
IC_{50} , мкМ, (K_d, B_{\max})		3.99	9.99

Примечание. K_d – константы диссоциации; B_{\max} – концентрация адренорецепторов, E – эффективность, n – коэффициент Хилла. IC_{50} – характеристика ингибирования рецепторов. В скобках указано количество экспериментов.

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

** Standard Error of the Estimate.

аризированной формы уравнения (1), в координатах b , b/A , при $n = 1$ (рис. 2, 2),

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

Под влиянием атропина происходит увеличение угла наклона прямой, что указывает на повышение K_d , смещение ее по оси абсцисс влево отражает снижение концентрации мест связывания лиганда. Следовательно, результаты графического анализа совпадают с математическими расчетами параметров (таблица).

Карбахол, агонист М-холинорецепторов, также вызвал существенные изменения связывания специфического антагониста [^3H]празозина. Взаимодействие лиганда с α_1 -адренорецепторами можно описать моделью: один пул рецепторов и присоединение одной молекулы лиганда к рецептору. При этом недостоверно возросла величина K_d и достоверно снизилось количество адренорецепторов (B_{\max}). В результате на 13% снижается эффективность (E) связывания (таблица). Количественные изменения в связывании [^3H]празозина видны на графике (рис. 1, 3), на котором показано снижение количества мест связывания [^3H]празозина при всех его концентрациях и совпадение экспериментальных точек с теоретическими кривыми. График (рис. 2, 3), построенный по уравнению (7) в координатах b , b/A , отражает особенности влияния карбахола на связывание лиганда. Смещение прямой влево по оси абсцисс свидетельствует об уменьшении количества мест связывания лиганда. Наклон прямой меняется мало, что соответствует несущественному изменению величины K_d . Экспериментальные точки хорошо совпадают с теоретическими прямыми. Следовательно, графический анализ экспериментальных результатов подтверждает математический анализ (таблица).

Для количественной характеристики действия атропина и карбахола на величину основных параметров связывания [^3H]празозина α_1 -адренорецепторами (K_d и B_{\max}) были рассчитаны IC_{50} по уравнениям (3), (4). Общую количественную характеристику их действия на связывание лиганда α_1 -адренорецепторами дает величина IC_{50} , рассчитанная по уравнению (5), (таблица). При концентрации атропина 3.99, а карбахола — 9.99 мкМ, связывание [^3H]празозина α_1 -адренорецепторами снижается в 2 раза (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 максимальная концентрация комплекса лиганда с активными рецепторами. Экспериментальные данные в контроле лучше описываются уравнением (1) при величине $n = 2$, т.е. к рецептору присоединяются две молекулы ли-

ганда и α_1 -адренорецепторы представлены в виде гомогенного пула димеров (таблица).

На рис. 1 в картезианских координатах показано, что количество связанных рецепторов зависит от концентрации лиганда, и график представлен гиперболой. Величины основных параметров K_d и B_{\max} характеризуют аффинность рецепторов и их количество в эффекторной системе. Предполагается, что n (коэффициент кооперативности, коэффициент Хилла) характеризует кооперативность взаимодействия лиганда с ферментом или рецептором и показывает число молекул лиганда, присоединяющихся к ферменту (рецептору) [16, 17]. Хилл [18] 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 в зависимости от состава инкубационной среды. Молекула гемоглобина состоит из четырех субъединиц [19], что теоретически позволяет предположить возможность присоединения четырех молекул кислорода. Полученная нами величина $n = 2$ (таблица) в уравнении связывания лиганда с рецептором формально указывает на присоединение двух молекул лиганда к одному рецептору. Это возможно 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. Присоединение лиганда к одному из них недостаточно для активации рецептора [20]. В последние годы установлена способность различных семидоменных G-белок-связывающих рецепторов образовывать гомо- и гетеродимеры [21]. Показана гомодимеризация подтипов α_1 -адренорецепторов α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} [22], гомо- и гетеродимеризации α_{2A} и α_{2C} -адренорецепторов [23]. Гетеродимер α_{1B} и α_{1D} образует один рецептор с активностью большей, чем отдельные подтипы [24].

В литературе существует недостаточно данных о непосредственном присоединении двух молекул лиганда к одному рецептору. Показано присоединение двух молекул хинуклидинилбензилата к М-холинорецепторам мембран коры мозга [10] и [^3H]пропранолола к β -адренорецепторам эритроцитов крыс [12]. На такую возможность указывают также экспериментальные данные, в которых получены коэффициенты n больше единицы для мускариновых холинорецепторов мембран миокарда [25], мембран электрического органа ската *Torpedo californica* [26]. Описано кооперативное связывание [^3H]хинуклидинилбензилата и других лигандов с М-холинорецепторами [25–28], изопротеренола с β -адренорецепторами [29]. Теоретические и экспериментальные данные позволяют 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.

Существенные изменения характера связывания [³H]празозина с α_1 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс при активации и блокаде мускариновых холинорецепторов выявлены при помощи математического анализа. Под влиянием атропина достоверно снижается сродство α_1 -адренорецепторов к [³H]празозину (возрастает K_d). Карбахол достоверно не изменяет величину этого параметра. Под влиянием этих холинотропных веществ достоверно снижается количество активных рецепторов (B_{max}) и димерные α_1 -адренорецепторы переходят в мономерное состояние — величина n на фоне атропина и карбахола равна 1 (таблица). Эти изменения свойств адренорецепторов видны также на рис. 1 и 2. На рис. 1 в картезианских координатах показано, что на фоне холинотропных веществ уменьшается величина связывания лиганда рецепторами при всех его концентрациях. На рис. 2 точки пересечения прямых 2 и 3 с осью абсцисс сдвинуты влево, что соответствует примерно одинаковому снижению концентрации мест связывания лиганда в эксперименте. На фоне атропина угол наклона прямой возрастает (рис. 2, 2), что отражает достоверное снижение сродства α_1 -адренорецепторов к [³H]празозину. Карбахол существенно не влияет на сродство лиганда к рецептору (K_d) — угол наклона прямой не изменяется по сравнению с контролем (рис. 2, 3). Таким образом, установлен ингибиторный эффект атропина и карбахола на связывание α_1 -адренорецепторов [³H]празозином, который проявляется как в снижении их количества, так и аффинности (таблица).

Дополнительную информацию о модулирующем действии М-холинотропных веществ на связывание [³H]празозина α_1 -адренорецепторами дает расчет IC_{50} (таблица). Ингибиторное действие атропина на аффинность (K_d) в 4 раза сильнее, чем карбахола (таблица). Оба вещества снижают плотность активных рецепторов (B_{max}) в 2 раза при концентрации 18 мкМ. Количество мест связывания лиганда (b) при его концентрации, равной K_d , снижается в 2 раза на фоне 4 мкМ атропина и 10 мкМ карбахола.

В организме все регуляторные системы (нервная, эндокринная, иммунная) действуют одновременно и между ними существуют агонистические или антагонистические взаимодействия (cross-talk). Агонисты и антагонисты α -адренорецепторов изменяют связывание антагониста мускариновых рецепторов [³H]хинуклидинилбензилата с мускариновыми рецепторами коры головного мозга [6]. Представленные результаты показывают, что агонист и антагонист мускариновых рецепторов модулируют активность α_1 -адренорецепторов.

Рассмотрена также 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), 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. Используемый метод анализа лиганд-рецепторных взаимодействий применим для исследования любых биологических реакций, результаты которых могут быть представлены количественно.

Таким образом, выявлено модулирующее действие атропина и карбахола на связывание α_1 -адренорецепторами специфического антагониста. Это проявляется в переходе рецепторов из димерного в мономерное состояние и ингибиторном эффекте на параметры связывания α_1 -адренорецепторами [³H]празозина.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang H., Cui W.Y., Liu C.H. Modulation by nicotine on binding of cerebral muscarinic receptors with muscarinic agonist and antagonist // Acta Pharmacol. 1996. V. 17. № 6. P. 497–499.
2. Zwart R., Vijverberg H.P.M. Potentiation and inhibition of neuronal nicotinic receptors by atropine: competitive and noncompetitive effects // Mol. Pharmacol. 1997. V. 52. № 5. P. 886–895.
3. Hultström M., Lai E.Y., Ma Z., Källskog O., Patzak A., Persson A.E. Adenosine triphosphate increases the reactivity of the afferent arteriole to low concentrations of norepinephrine // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2007. V. 293. № 6. P. R2225–2231.
4. Koo S.T., Lim K.S., Chung K., Ju H., Chung J.M. Electroacupuncture-induced analgesia in a rat model of ankle sprain pain is mediated by spinal alpha-adrenoceptors // Pain. 2008. V. 135. № 1–2. P. 11–19.
5. Diez-Alarcia R., Pilar-Cue'llar F., Panigua M.A., Meana J.J., Ferná'ndes-Lo'pez A. Pharmacological characterization and autoradiographic distribution of alpha2-adrenoceptor antagonist [³H]RX821002 binding sites in the chicken brain // Neuroscience. 2006. V. 141. № 1. P. 357–369.
6. Нестерова Л.А., Смурова Е.А., Манухин Б.Н. Влияние адренотропных веществ на связывание [³H]хинуклидинилбензилата М-холинорецепторами коры головного мозга крыс // Биол. мембраны. 2001. Т. 18. № 1. С. 10–17.
7. Floreani M., Varani K., Quintieri L., Dorigo P. 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. 2008. V. 590. № 1–3. P. 303–309.
8. Манухин Б.Н., Нестерова Л.А., Смурова Е.А. Модуляция связывания [³H]дигидроалprenолола β -адренорецепторами нативных эритроцитов крыс агонистом α_1 -адренорецепторов метоксамином, блокатором М-холинорецепторов атропином и мембранотроп-

- ным агентом кокаином // Биол. мембраны. 2001. Т. 18. № 4. С. 277–282.
9. Henn S.W., Henn F.A. The identification of subcellular fractions of the central nervous system // Handbook of neurochemistry / Ed. Lajtha A. N.Y., London: Plenum Press. 1982. P. 147–161.
 10. Нестерова Л.А., Смурова Е.А., Манухин Б.Н. Характеристика связывания специфического блокатора [³H]хинуклидинилбензилата М-холинорецепторами мембран коры головного мозга крыс // ДАН. 1995. Т. 343. № 2. С. 268–271.
 11. 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.
 12. Манухин Б.Н., Нестерова Л.А., Смурова Е.А. Характеристика кинетики взаимодействия β-адренорецепторов эритроцитов крыс со специфическим блокатором пропранололом // Биол. мембраны. 1994. Т. 11. № 5. С. 489–485.
 13. Манухин Б.Н., Нестерова Л.А., Смурова Е.А., Кичиколова Т.П. Анализ взаимодействия радиоактивных лигандов со специфическими рецепторами // Биол. мембраны. 1999. Т. 16. № 3. С. 541–555.
 14. Manukhin B.N., Nesterova L.A., Smurova E.A., Kichikolova T.P. An approach to analysis of radiolabeled ligand interactions with specific receptors // Eur. J. Pharmacol. 1999. V. 386. № 2–3. P. 273–288.
 15. 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.
 16. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Пер. с англ. М.: Мир, 1982. Т. 3. 1117 с.
 17. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. Пер. с англ. М.: Мир, 1990. 348 с.
 18. Hill A.V. The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves // J. Physiol. 1910. V. 40. Proceedv. Physiol. Soc. P. iv–vii.
 19. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М.: Медицина, 2007. 704 с.
 20. Herrick-Davis K., Grinde E., Harrigan T.J., Mazurkiewicz J.E. Model of wild-type 5-HT_{2C} receptor inactivation following heterodimerization with S138R 5-HT_{2C} receptors // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 48. P. 40144–40151.
 21. Авдонин П.В. Структура и сигнальные свойства сопряженных с G-белками рецепторных комплексов // Биол. мембраны. 2005. Т. 22. № 1. С. 3–26.
 22. 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.
 23. Small K.M., Schwarb M.R., Glinka C., Theiss C.T., Brown K.M., Seman C.A., Liggett S.B. Alpha1A- and alpha2C-adrenergic receptors form homo- and heterodimers: the heterodimeric state impairs agonist-promoted GRK phosphorylation and beta-arrestin recruitment // Biochemistry. 2006. V. 18. № 45. P. 4760–4767.
 24. Hague C., Lee S.E., Chen Z., Prinster S.C., Hall R.A., Minneman K.P. Heterodimers of alpha1B- and alpha1D-adrenergic receptors form a single functional entity // Mol. Pharmacol. 2006. V. 69. № 1. P. 45–55.
 25. Wreggett K.A., Wells J.W. Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. № 38. P. 22488–22499.
 26. Dunn S.M., Raftery M.A. Agonist binding to the Torpedo acetylcholine receptor. 2. Complexities revealed by association kinetics // Biochemistry. 1997. V. 36. № 13. P. 3846–3853.
 27. Cidiac P., Green M.A., Pawagi A.B., Wells J.W. Cardiac muscarinic receptors. Cooperativity as the basis for multiple states of affinity // Biochemistry. 1997. V. 36. № 24. P. 7361–7379.
 28. Lazareno S., Birdsall N.J. 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. 1995. V. 48. № 2. P. 362–378.
 29. Fowler C.J., Vedin V., Sjoberg E. Evidence for cooperative binding of (–) Isoproterenol to rat brain beta1-adrenergic receptors // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. V. 257. № 2. P. 629–634.

Muscarinic Cholinoceptor Agonists and Antagonists Are the Modulators of the α₁-Adrenoceptors Activity in the Membranes of Rat Brain Cortex

L. A. Nesterova, B. N. Manukhin

*Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova, 26, Moscow, 119334 Russia; Fax: +7-(499)-135-80-12; e-mail: manukhinb@mail.ru*

The influence of activation and inhibition of muscarinic cholinoceptors by carbachol and atropine on binding of the specific nonselective α₁-antagonist [³H]prazosine in synaptosomal membranes from rat cerebral cortex was studied. It was shown that for α₁-adrenoceptors, the ligand–receptor interaction corresponded to the model suggesting the presence of one receptor pool and binding of two ligand molecules to the receptor. The parameters of [³H]prazosine binding to α₁-adrenoceptors were as follows: $K_d = 1.6 \pm 0.3$ nM, $B_{max} = 30 \pm 2$ fmol/mg protein, $n = 2$. Upon inhibition of muscarinic cholinoceptors by atropine or their activation by carbachol, the binding of the radiolabelled ligand with α₁-adrenoceptors occurred according to the same model but at $n = 1$. In the presence of atropine, the affinity of α₁-adrenoceptors to [³H]prazosine decreased more than twofold ($K_d = 3.5 \pm 0.4$ nM) and the concentration of the active receptors was 36% lower ($B_{max} = 19.5 \pm 1.5$ fmol/mg protein). Carbachol insignificantly decreased the affinity of adrenoceptors; the concentration of the active receptors decreased as in the case of the atropine action. The data suggest that α₁-adrenoceptors in rat cerebral cortex exist as dimers. The observed modulatory effects of atropine and carbachol on the specific binding of the antagonist to α₁-adrenoceptors are exhibited as changes in the binding character (monomerisation of α₁-adrenoceptors) and inhibition of the [³H]prazosine binding.