

УДК 576.314.6.088.6+612.11.612.82.015

## АГОНИСТЫ И АНТАГОНИСТЫ СЕРТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ – МОДУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ $\alpha_1$ -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ МЕМБРАН КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

© 2012 г. Л. А. Нестерова, Б. Н. Манухин\*

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 20.09.2011 г.

Исследовано влияние активации и ингибирования серотониновых рецепторов серотином (5-НТ) и миансерином на связывание  $\alpha_1$ -адренорецепторами специфического неселективного антагониста [ $^3\text{H}$ ]празозина в субклеточных фракциях мембран коры головного мозга крыс. Установлено, что лиганд-рецепторное взаимодействие  $\alpha_1$ -адренорецепторов соответствует модели: один пул рецепторов и присоединение двух молекул лиганда к одному рецептору. Параметры связывания [ $^3\text{H}$ ]празозина –  $K_d = 1.85 \pm 0.16$  нМ,  $B_{\max} = 31.1 \pm 0.3$  фмоль/мг белка,  $n = 2$ . При активации 5-НТ-рецепторов серотином изменяется характер связывания лиганда – определяются два пула рецепторов с параметрами:  $K_{d1} = 0.61 \pm 0.04$ ,  $K_{d2} = 3.82 \pm 0.15$  нМ,  $B_{m1} = 6.6 \pm 0.7$ ,  $B_{m2} = 25.6 \pm 0.4$  фмоль/мг белка,  $n = 2$ . Чувствительность высокоаффинного пула рецепторов возрастает в 3 раза, низкоаффинного – снижается в 2 раза по сравнению с контролем. Величина максимальной реакции ( $B_{\max}$ ) не изменяется. При ингибировании 5-НТ-рецепторов миансерином связывание радиоактивного лиганда с  $\alpha_1$ -адренорецепторами происходит по той же модели, что и в контроле. Чувствительность к [ $^3\text{H}$ ]празозину  $\alpha_1$ -адренорецепторов снижается в 2 раза ( $K_d = 3.97 \pm 0.12$  нМ), а их концентрация возрастает ( $B_{\max} = 40.0 \pm 0.5$  фмоль/мг белка). Предполагается, что  $\alpha_1$ -адренорецепторы в субклеточных фракциях мембран головного мозга крыс существуют в виде димеров. Выявлено модулирующее действие серотонина и миансерина на связывание [ $^3\text{H}$ ]празозина специфического антагониста  $\alpha_1$ -адренорецепторами, которое проявляется в изменении параметров и общего характера лиганд-рецепторного взаимодействия.

**Ключевые слова:** мембраны коры головного мозга крыс, связывание,  $\alpha_1$ -адренорецепторы, [ $^3\text{H}$ ]празозин, серотонин, миансерин, димеры.

Адренергическая и серотонинергическая системы реципрокно взаимодействуют на уровне нервных клеток и специфических рецепторов. Так, повышение активности адренергических нейронов через  $\alpha_1$ -постсинаптические адренорецепторы влияет на серотонинергические нейроны [1]. Ингибиторы нейронального захвата серотонина снижают также включение норадреналина в адренергические нейроны [2]. Неселективный антагонист  $\beta$ -адренорецепторов басиндолол активирует серотониновые рецепторы сердечно-сосудистой системы и ингибирует  $\alpha_1$ -адренорецепторы [3]. Антагонист серотониновых рецепторов миансерин увеличивает диастолическое давление, которое регулируется через адренорецепторы [4]. Лиганды 1-3 диоксолановой структуры могут связываться с  $\alpha_1$ -адрено- и 5-НТ(1A)-рецепторами [5].

Приведенные данные свидетельствуют о существовании взаимодействия адренергической и серотонинергической 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.

Задачей работы было изучение действия агониста и антагониста серотониновых рецепторов – серотонина и миансерина, на кинетику связывания специфического неселективного антагониста  $\alpha_1$ -адренорецепторов [ $^3\text{H}$ ]празозина в субклеточных фракциях мембран коры головного мозга крыс.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на субклеточных фракциях синаптосомальных мембран коры головного мозга крыс-самцов линии Вистар (210–250 г), которые выделяли по методу Henn, Henn, 1982 [6] с некоторыми модификациями. Готовые мембранные препараты хранили при  $-70^\circ\text{C}$  в течение

3 нед. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [7], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (Sigma). Связывание радиоактивного лиганда проводили в инкубационной среде с последующим отмыванием мембран от несвязанного лиганда на стекловолокнистых фильтрах GF/B (Whatman). Объем инкубационной среды составлял 100 мкл – 50 мкл суспензии мембран, буфер трис-НСI 50 мМ, рН 7.4, немеченый вытеснитель празозин, антагонист серотониновых рецепторов и радиоактивный лиганд [<sup>3</sup>H]празозин. Реакцию останавливали добавлением 1 мл холодного буфера (0°C). Параметры связывания лиганда с  $\alpha_1$ -адренорецепторами определяли с использованием специфического неселективного антагониста [<sup>3</sup>H]празозина (77 Ки/мМ Amersham, Великобритания) в концентрации 0.33–14.85 нМ. Специфическое связывание радиоактивного лиганда оценивали по разнице между общим и неспецифическим связыванием в присутствии нерадиоактивного лиганда – празозина в концентрации 10 мкМ. В качестве агониста и антагониста 5-HT-рецепторов использовали серотонин и миансерин (Sigma) в концентрации 10 мкМ. Смесь инкубировали в течение 30 мин при 22°C. Вещества вводили в инкубационную среду за 20 мин до добавления [<sup>3</sup>H]празозина.

Закономерности связывания антагониста со специфическими рецепторами определяли с использованием математических и графических методов анализа лиганд-рецепторных реакций [8]. Взаимодействие адренорецепторов изолированных мембран коры головного мозга крыс со специфическим радиоактивным антагонистом описывается уравнениями для одного или двух пулов рецепторов. Действие веществ анализировали с использованием 10 математических моделей связывания лиганда рецептором [9]. Модели: I – один пул рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{\max}$ ,  $K_d$  и заданной величиной  $n = 1$ ; II – один пул рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{\max}$ ,  $K_d$  и заданной величиной  $n = 2$ ; III – один пул рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{\max}$ ,  $K_d$ ,  $n$ ; IV – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{m1}$ ,  $K_{d1}$ ,  $B_{m2}$ ,  $K_{d2}$  и заданной величиной  $n_1 = n_2 = 1$ ; V – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{m1}$ ,  $K_{d1}$ ,  $n_1$  и  $B_{m2}$ ,  $K_{d2}$ ,  $n_2$  ( $n_1 = n_2$ ); VI – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{m1}$ ,  $K_{d1}$ ,  $B_{m2}$ ,  $K_{d2}$  и заданной величиной  $n_1 = n_2 = 2$ ; VII – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{m1}$ ,  $B_{m2}$ ,  $K_{d1}$ ,  $K_{d2}$  и заданными величинами  $n_1 = 1$ ,  $n_2 = 2$ ; VIII – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{m1}$ ,  $K_{d1}$ ,  $n_1$  и  $B_{m2}$ ,  $K_{d2}$ ,  $n_2$  ( $n_1 \neq n_2$ ); IX – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{m1}$ ,  $B_{m2}$ ,  $K_{d1} = K_{d2}$ , и заданными величинами  $n_1 = 1$  и  $n_2 = 2$ ; X – два пула рецепторов с рассчитанными параметрами  $B_{m1}$ ,  $B_{m2}$ ,  $K_{d1} = K_{d2}$  и  $n_1 \neq n_2$ . Теоретически возможны и другие более сложные

модели лиганд-рецепторного взаимодействия, но их применение пока не давало удовлетворительных результатов.

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 “SigmaPlot” по уравнениям (1) и (2).

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

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

где  $b$  – количество связанного лиганда,  $B_{\max}$  – количество мест связывания лиганда с константой диссоциации  $K_d$ ;  $B_{m1}$  и  $B_{m2}$  – количество мест связывания лиганда 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 коэффициентом Хилла  $n_1$ ,  $n_2$ ;  $[A]$  – концентрация лиганда в среде.

Эффективность связывания лиганда с рецепторами определяли по уравнению:

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

Эффективность ( $E$ ) – интегральный показатель, количественно характеризующий величину связывания лиганда при его концентрации, равной  $K_d$  (фоль/мг белка/нМ). На рис. 1, 2 и 3 приведены данные конкретных опытов, а в табл. 1 – средние результаты экспериментов. Теоретические кривые строили по уравнениям (1) и (2). На теоретические кривые нанесены экспериментальные точки. 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 ( $M \pm SEM$ ).

Для количественной оценки влияния веществ на основные параметры лиганд-рецепторного взаимодействия ( $K_d$  или  $B_{\max}$ ) рассчитывали их концентрации активации и ингибирования по уравнениям [10]:

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

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

$$IC_{50} = (IK_{dc})/(K_{de} - K_{dc}), \quad (6)$$

$$IC_{50} = (IB_{maxc})/(B_{maxc} - B_{maxe}), \quad (7)$$

где показатели  $AC_{50}$  и  $IC_{50}$  для уравнений (4), (6) соответствуют концентрации вещества, повышающего или снижающего активность рецепторов (снижение и повышение  $K_d$  в 2 раза), соответственно, а  $AC_{50}$  и  $IC_{50}$  для уравнений (5), (7) соответствуют концентрации вещества, повышающего и снижающего количество ( $B_{\max}$ ) рецепторов в 2 раза. Общий эффект веществ на связывание

[<sup>3</sup>H]празозина определяли по уравнениям, включающим оба основных параметра ( $K_d$  и  $B_{max}$ ):

$$AC_{50} = A[(K_{dc}B_{max}) / (K_{dc}B_{max} - K_{de}B_{max})], \quad (8)$$

$$IC_{50} = I[(K_{dc}B_{max}) / (K_{de}B_{max} - K_{dc}B_{max})]. \quad (9)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что взаимодействие лиганда с  $\alpha_1$ -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс в контроле соответствует модели (II) с одним, а в эксперименте – с одним или двумя пулами рецепторов (II, VI) и присоединением двух молекул лиганда к рецептору ( $n = 2$ ) (уравнения (1), (2)).

График специфического связывания [<sup>3</sup>H]празозина  $\alpha_1$ -адренорецепторами изолированных 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 (II) лиганд-рецепторного взаимодействия, предполагающей присоединение двух молекул лиганда к одному рецептору и включающей один пул рецепторов (табл. 1). Графический анализ экспериментальных данных в контроле с помощью уравнения (10),

$$(b/A^2) = [(B_{max}) / (K_d^2)] - [b / (K_d^2)] \quad (10)$$

линеаризированной формы уравнения (1), в координатах ( $b$ ;  $b/A^2$ ) также показывает существование одного гомогенного пула  $\alpha_1$ -адренорецепторов (рис. 3, 1). Экспериментальные точки на графике расположены на прямой линии (линейной регрессии). Для подтверждения соответствия полученным данным параметров, рассчитанных по уравнениям (1) и (10), проведены теоретические кривые, с которыми хорошо совпадают экспериментальные точки (рис. 1, 1 и 3, 1).

Серотонин, агонист 5-НТ-рецепторов, вызвал изменения параметров связывания [<sup>3</sup>H]празозина и повлиял на общий характер взаимодействия лиганда с  $\alpha_1$ -адренорецепторами. Присоединение лиганда к адренорецепторам происходит по модели: два пула рецепторов, связывание двух молекул лиганда рецептором. В высокоаффинном пуле величина  $K_d$  на 66% меньше, чем в контрольных опытах, в низкоаффинном – в 2 раза больше, чем в контроле. Количество мест связывания в высокоаффинном пуле составляет 18%, в низкоаффинном – 82%. В итоге величина  $B_{max}$  и общая эффективность связывания лиганда ( $E$ ) не изменились (табл. 1). Результаты графического анализа экспериментов хорошо совпадают с расчетными данными. На графике (рис. 1, 2) приведены экспериментальные точки и теоретические кривые, построенные по уравнению (1). Видно

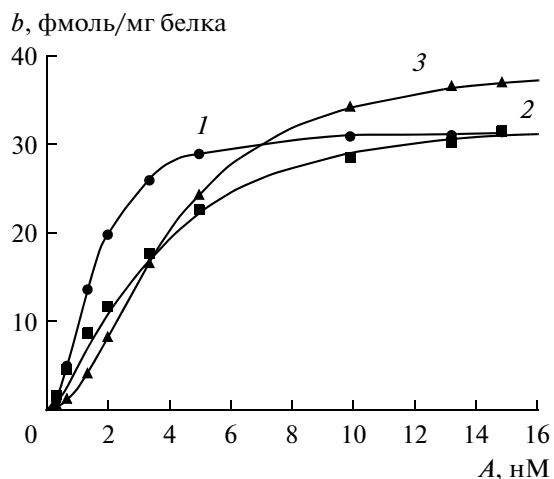


Рис. 1. Экспериментальные точки и теоретические кривые специфического связывания [<sup>3</sup>H]празозина  $\alpha_1$ -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс в контроле и при действии серотонина и миансерина. Ось абсцисс – концентрация [<sup>3</sup>H]празозина (нМ), ось ординат – количество мест, связанных лигандом ( $b$ , фмоль/мг белка). 1 – Контроль, 2 – серотонин, 3 – миансерин. Теоретические кривые, параметры связывания в контрольном опыте  $K_d = 1.53 \pm 0.01$  нМ,  $B_{max} = 31.6 \pm 0.1$  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,  $B_{max} = 35.5 \pm 0.1$  фмоль/мг белка,  $n = 2$ .

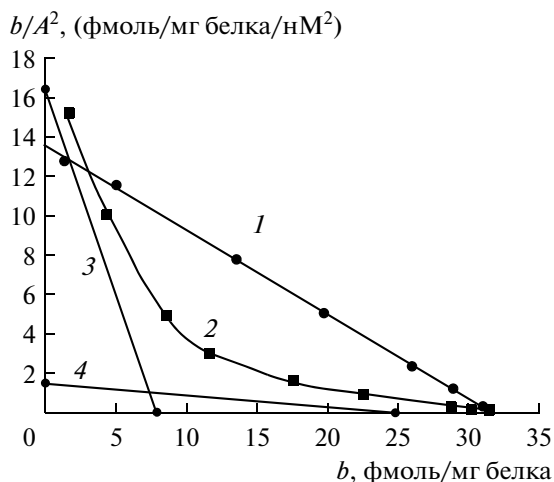
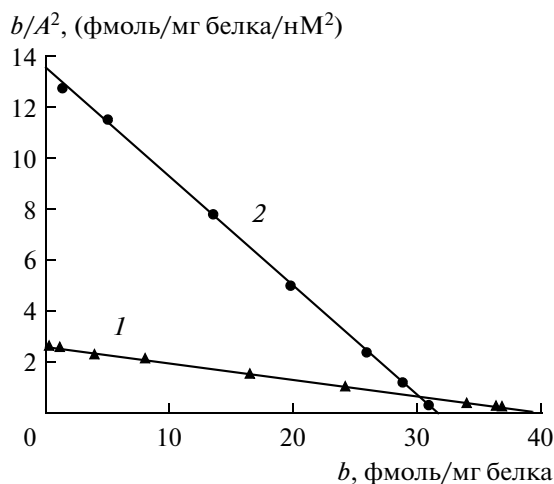


Рис. 2. Экспериментальные точки и теоретические кривые специфического связывания [<sup>3</sup>H]празозина  $\alpha_1$ -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс в контроле (1) и при действии серотонина (2). 3, 4 – Асимптоты высоко- и низкоаффинного пулов. Ось абсцисс – количество мест, связанных лигандом ( $b$ , фмоль/мг белка), ось ординат – отношение количества мест, связанных лигандом, к его концентрации ( $b/A^2$ , фмоль/мг белка/нМ<sup>2</sup>).

хорошее совпадение экспериментальных точек с теоретическими кривыми. Количество мест связывания [<sup>3</sup>H]празозина ( $b$ ) снижено, и только при



**Рис. 3.** Экспериментальные точки и теоретические кривые специфического связывания  $[^3\text{H}]$ празозина  $\alpha_1$ -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс в контроле (1) и при действии миансерина (2). Ось абсцисс — количество мест, связанных лигандом ( $b$ , фмоль/мг белка), ось ординат — отношение количества мест, связанных лигандом, к его концентрации ( $b/A^2$ , фмоль/мг белка/нМ<sup>2</sup>).

последних высоких концентрациях лиганда достигает контрольного уровня. Особенности влияния серотонина на связывание лиганда рецепторами представлено также на графике, построенном с помощью уравнения (11), в координатах  $b$ ,  $b/A^2$ , (рис. 2, 2).

$$(b/A^2) = [(B_{m1} + B_{m2}) / (K_{d1}^2 + K_{d2}^2)] - [b / (K_{d1}^2 + K_{d2}^2)]. \quad (11)$$

**Таблица 1.** Влияние активации и ингибирования серотониновых рецепторов на параметры связывания  $[^3\text{H}]$ празозина  $\alpha_1$ -адренорецепторами субклеточных фракций мембран коры головного мозга крыс

Параметр	Контроль	Серотонин	Серотонин	Миансерин
$K_d$ , нМ	$1.85 \pm 0.16$		$2.64 \pm 0.01^*$	$3.97 \pm 0.12^*$
$K_{d1}$ , нМ		$0.61 \pm 0.04^*$		
$K_{d2}$ , нМ		$3.82 \pm 0.15^*$		
$B_{\max}$ , фмоль/мг	$31.1 \pm 0.3$		$30.8 \pm 0.1$	$40.0 \pm 0.5^*$
$B_{m1}$ , фмоль/мг		$6.6 \pm 0.7^*$		
$B_{m2}$ , фмоль/мг		$25.6 \pm 0.4^*$		
$n$	2		2	2
$n_1$		2		
$n_2$		2		
$E$ , фмоль/мг/нМ	$8.7 \pm 0.8$		$5.8 \pm 0.04^*$	$5.04 \pm 0.04^*$
$E_1$ , фмоль/мг/нМ		$5.4 \pm 0.8^*$		
$E_2$ , фмоль/мг/нМ		$3.4 \pm 0.2^*$		
Модель	II	VI	II	II

*Примечание.*  $K_d, K_{d1}, K_{d2}$  — константы диссоциации;  $B_{m1}, B_{m2}$  — концентрация адренорецепторов (высоко- и низкоаффинного пулов);  $B_{\max} = B_{m1} + B_{m2}$ ;  $E$  — эффективность;  $n$  — коэффициент Хилла.

\* Различие с контролем достоверно.

Выявляется два пула рецепторов, каждый из которых представлен на графике в виде асимптот (рис. 2, 3, 4). Поскольку под влиянием серотонина образуются высоко- и низкоаффинный пулы  $\alpha_1$ -адренорецепторов, количество мест связывания лиганда ( $b$ ) определяется его концентрацией, активностью и количеством рецепторов отдельно в каждом пуле ( $K_{d1}, K_{d2}, B_{m1}, B_{m2}$ ). Для сравнительной оценки действия серотонина в опыте и в контроле необходимо учитывать количество лиганда, одновременно связывающегося с обоими пулами рецепторов. С этой целью были рассчитаны параметры связывания лиганда под влиянием серотонина по модели II (табл. 1) и концентрация серотонина ( $IC_{50}, K_d, B_{\max}$ ), вызывающая ингибирование связывания  $[^3\text{H}]$ празозина в 2 раза (табл. 2). Смещение точек пересечения асимптот с осями абсцисс и ординат по сравнению с контролем (рис. 2, 3, 4) показывает изменение чувствительности и количества мест связывания в каждом пуле. Так, точки пересечения асимптот высоко- и низкоаффинного пулов с осью абсцисс значительно сдвинуты влево по сравнению с контрольной прямой, что свидетельствует о меньшем, чем в контроле, количестве мест связывания в каждом пуле рецепторов (рис. 2, 3, 4). Однако общее количество мест связывания лиганда не изменяется (табл. 1). Асимптота высокоаффинного пула пересекает ось ординат выше контрольной кривой, что указывает на повышение активности рецепторов. Чувствительность рецепторов низкоаффинного пула значительно меньше, чем в контроле, что видно по точке пересечения с осью ординат.

Совпадение экспериментальных точек с теоретической кривой свидетельствует о соответствии математического и графического методов анализов экспериментальных результатов (табл. 1).

Миансерин, антагонист 5-HT-рецепторов, также вызвал существенные изменения параметров связывания [<sup>3</sup>H]празозина, но не характера связывания лиганда (рис. 1, 3). Взаимодействие лиганда с  $\alpha_1$ -адренорецепторами описывается моделью: один пул рецепторов и присоединение двух молекул лиганда к рецептору (табл. 1). В 2 раза снизилась чувствительность рецепторов (возросла величина  $K_d$ ), количество мест связывания увеличилось на 28%. Достоверно возрастает количество связанных рецепторов ( $B_{max}$ ). Эти изменения свойств  $\alpha_1$ -адренорецепторов видны также на рис. 1 и 3. В результате эффективность ( $E$ ) связывания  $\alpha_1$ -рецепторов снизилась на 42% (табл. 1). Поскольку миансерин снижает активность адренорецепторов и увеличивает их количество, связывание лиганда в концентрации от 0.33 до 7.25 нМ меньше, чем в контроле, а в диапазоне концентраций от 7.25 до 14.85 нМ — превышает контрольное (рис. 1). График, построенный по уравнению (10) в координатах  $b$ ,  $b/A^2$ , отражает влияние миансерина на связывание лиганда (рис. 3, 2). Экспериментальные точки хорошо ложатся на прямую (линейную регрессию). Следовательно, результаты графического анализа экспериментальных данных также совпадают с результатами математического анализа (табл. 1).

Для количественной характеристики действия серотонина и миансерина на величину основных параметров связывания [<sup>3</sup>H]празозина  $\alpha_1$ -адренорецепторами ( $K_d$  и  $B_{max}$ ) были рассчитаны  $AC_{50}$  и  $IC_{50}$  по уравнениям (4) — (7). Из табл. 2 видно, что серотонин в 2 раза по сравнению с контролем снижает активность рецепторов низкоаффинного пула при теоретической концентрации 9.39 мкМ и в концентрации 14.92 мкМ в 2 раза повышает активность рецепторов высокоаффинного пула (снижает  $K_d$ ). При теоретической концентрации серотонина, равной 12.68 мкМ, появляется высокоаффинный пул ( $B_{m1}$ ), а при 56.51 мкМ — низкоаффинный ( $B_{m2}$ ).

Миансерин в концентрации 8.73 мкМ в 2 раза снижает аффинность адренорецепторов по сравнению с контролем, а в концентрации 30.03 мкМ — количество активных рецепторов (табл. 2).

Таким образом, под влиянием серотонина у 20%  $\alpha_1$ -адренорецепторов сродство к [<sup>3</sup>H]празозину возрастает в 3 раза: с 1.85 до 0.61 нМ. У 80% рецепторов оно снижается в 2 раза:  $K_d$  возрастает с 1.85 до 3.82 нМ. При этом количество мест связывания изменяется мало. На фоне миансерина сродство рецепторов к лиганду снижается в 2.2 раза, и на 28% увеличивается количество мест связывания (табл. 1). Рассчитаны концентрации

**Таблица 2.** Расчетные концентрации серотонина и миансерина, вызывающие двукратное изменение величин основных параметров связывания [<sup>3</sup>H]празозина  $\alpha_1$ -адренорецепторами субклеточных фракций мембран коры головного мозга крыс

Параметры, мкМ	Серотонин	Серотонин	Миансерин
$IC_{50}(K_d)$		23.4	8.7
$AC_{50}(K_{d1})$	14.9		
$IC_{50}(K_{d2})$	9.4		
$AC_{50}(B_m)$		0	30.0
$IC_{50}(B_{m1})$	12.7		
$IC_{50}(B_{m2})$	56.5		
$IC_{50}(K_d B_m)$		22.7	14.9
Модель	VI	II	II

*Примечание.*  $AC_{50}$ ,  $IC_{50}$  (мкМ) — концентрации серотонинотропных веществ, вызывающие активацию ( $AC_{50}$ ) или ингибирование ( $IC_{50}$ ) параметров связывания [<sup>3</sup>H]празозина рецепторами ( $K_d$  или  $B_m$ ) в 2 раза.  $IC_{50}(K_d B_m)$  (мкМ) — концентрация серотонинотропных веществ, снижающая количество мест связывания лиганда ( $b$ ) в 2 раза при  $K_d B_m$  (табл. 1).

миансерина, вызывающие снижение аффинности рецепторов к лиганду в 2 раза ( $IC_{50}$ ), повышение количества связанных рецепторов ( $AC_{50}$ ), и общее ингибирование связывания ( $IC_{50} K_d B_m$ ) (табл. 2). Величины  $K_d$  на фоне миансерина и серотонина в низкоаффинном пуле совпадают.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Величина связывания лиганда зависит от его концентрации. При определенной концентрации лиганда в инкубационной среде достигается максимальная величина комплекса лиганда с активными рецепторами. Экспериментальные данные в контроле лучше описываются уравнением (1) при величине  $n = 2$ , т.е. к рецептору присоединяются две молекулы [<sup>3</sup>H]празозина, и  $\alpha_1$ -адренорецепторы представлены в виде гомогенного пула димеров (табл. 1). Величина  $n$  (коэффициент кооперативности, коэффициент Хилла) характеризует взаимодействие лиганда с рецептором, показывает число молекул лиганда, присоединяющихся к рецептору [11, 12]. Исторически под аллостерией понимают регуляцию белков посредством изменений в их четвертичной структуре. Классический пример кооперативных белков — гемоглобин [13]. Полученная нами величина  $n = 2$  в уравнении связывания лиганда с рецептором указывает на присоединение двух молекул лиганда к димерному рецептору (табл. 1). Это предположе-

ние подтверждается опубликованными данными. Возможность различных G-белок-связывающих рецепторов (GPCRs) формировать гомо- и гетеродимеры хорошо известна [14] – гомодимеризация подтипов  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$   $\alpha_1$ -адренорецепторов [15], гомо- и гетеродимеризации  $\alpha_{2A}$  и  $\alpha_{2C}$ -адренорецепторов [16, 17]. Гетеродимер  $\alpha_{1B}$  и  $\alpha_{1D}$  образует один рецептор с активностью большей, чем у отдельных подтипов [18]. Показано, что G-белок-связывающий димер серотониновых рецепторов присоединяет две молекулы лиганда и активирует один G-белок. Образование димеров не зависит от активного или неактивного конформационного состояния и не регулируется воздействиями веществ [19, 20]. Прямых данных о присоединении двух молекул лиганда к одному рецептору мало. Показано присоединение двух молекул хинуклидинилбензилата к M-холинорецепторам мембран коры головного мозга [21] и [ $^3\text{H}$ ]пропранолола к  $\beta$ -адренорецепторам эритроцитов крыс [22]. На такую возможность указывают и эксперименты на мембранах миокарда, для мускариновых холинорецепторов которых получены коэффициенты  $n$  больше единицы [23]. Гетеромеры G-белок-связывающих рецепторов участвуют в узнавании агониста в том числе и через аллостерические механизмы, включающие кооперативность [24–26].

Показано кооперативное связывание [ $^3\text{H}$ ]хинуклидинилбензилата и других лигандов с M-холинорецепторами [27, 28], изопротеренола с  $\beta$ -адренорецепторами [29]. Теоретические и экспериментальные данные позволяют предполагать, что величина  $n$  показывает количество молекул лиганда, присоединяющихся к одному моноили димерному рецептору. Эта величина, наряду с  $K_d$  и  $B_{\max}$ , является объективным количественным показателем кинетики лиганд-рецепторного взаимодействия и функциональной характеристики специфических рецепторов.

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 экспериментальное воздействие. Серотонин снижает эффективность ( $E$ ) связывания лиганда в каждом отдельном пуле при однонаправленных изменениях количества  $\alpha_1$ -адренорецепторов. Миансерин также снижает эффективность связывания лиганда  $\alpha_1$ -адренорецепторами (табл. 1).

Дополнительную информацию о модулирующем действии серотонинергических веществ на связывание [ $^3\text{H}$ ]празозина  $\alpha_1$ -адренорецепторами дает расчет величин активации ( $AC_{50}$ ) и ингибирования ( $IC_{50}$ ), которые показывают теоретические концентрации веществ, вызывающих увеличение или снижение основных параметров ( $K_d$ ,

$B_{\max}$ ) в 2 раза. Величина  $IC_{50}$  ( $K_d$ ,  $B_m$ ) (мкМ) показывает расчетные концентрации серотонина и миансерина, уменьшающие количество мест связывания [ $^3\text{H}$ ]празозина в 2 раза (табл. 2).

Аллостерический эффект использованных веществ зависит от их концентрации и проявляется, в конечном итоге, в дозозависимом снижении количества активных специфических  $\alpha_1$ -адренорецепторов. Предполагается, что аллостерическое влияние серотонина и миансерина на  $\alpha_1$ -адренорецепторы опосредовано активацией или ингибированием специфических серотониновых рецепторов. Показано, что антагонисты серотониновых рецепторов влияют на дофаминергические и адренергические пути передачи [30]. Рассмотрена система количественного анализа лиганд-рецепторных взаимодействий. Определяемые при этом основные параметры дают характеристику свойств исследуемой системы: число пулов рецепторов, их аффинность к лиганду ( $K_d$ ), концентрацию 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 изучения любых биологических реакций, результаты которых могут быть представлены количественно.

Выявлено модулирующее действие серотонина и миансерина на связывание специфического антагониста  $\alpha_1$ -адренорецепторами, которое проявляется в ингибиторном эффекте на параметры связывания [ $^3\text{H}$ ]празозина и в изменении общего характера связывания. Предполагается, что  $\alpha_1$ -адренорецепторы в мембранах головного мозга крыс существуют в виде димеров.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Manta S., Dong J., Debonnel G., Blier P. 2009. Enhancement of the function of rat serotonin and norepinephrine neurons by sustained vagus nerve stimulation. *J. Psychiatry Neurosci.* **34** (4), 272–280.
2. Blier P., Szabo S.T. 2005. Potential mechanisms of action of atypical antipsychotic medications in treatment-resistant depression and anxiety. *J. Clin. Psychiatry.* **66**, Suppl 8, 30–40.
3. 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.
4. Kalkman H.O., van Gelderen E.M., Timmermans P.B., van Zwieten P.A. 1983. К effects of (+) and (–) miансерин on alpha adrenoceptors and tyramine induced tachycardia in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **90** (2–3), 221–226.

5. Sorbi C., Franchini S., Tait A., Prandi A., Gallesi R., Angeli P., Marucci G., Pirona L., Poggesi E., Brasili L. 2009. 1,3-Dioxolane-based ligands as rigid analogues of naftopidil: structure-affinity/activity relationships at alpha1 and 5-HT1A receptors *Chem. Med. Chem.* **4** (3), 393–399.
6. Henn S.W., Henn F.A. 1982. *The identification of sub-cellular fractions of the central nervous system. Handbook of neurochemistry.* Ed. Lajtha A. New York, London: Plenum Press, 147–161.
7. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.I.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
8. 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.
9. Манухин Б.Н., Нестерова Л.А. 2009. Аллостерическая модуляция связывания [<sup>3</sup>H]хинуклидинилбензилата мускариновыми холинорецепторами мембран коры головного мозга крыс адрентропными веществами. *Биол. мембраны.* **26** (2), 104–110.
10. Манухин Б.Н., Нестерова Л.А. 2006. Модуляция связывания [<sup>3</sup>H]хинуклидинилбензилата мускариновыми холинорецепторами мембран коры мозга крыс при активации и ингибировании серотониновых рецепторов. *Биол. мембраны.* **23** (1), 21–25.
11. Диксон М., Уэбб Э. 1982. *Ферменты.* Пер. с англ. М.: Мир, 1117 с.
12. Hill A.V. 1910. The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.* **40**. Proc. Physiol. Soc. P. iv–vii.
13. Scarff C.A., Patel V.J., Thalassinos K., Scrivens J.H. 2009. Probing hemoglobin structure by means of traveling-wave ion mobility mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **20** (4), 625–631.
14. Rondard P., Goudet C., Kniazeff J., Pin J.P., Prézeau L. 2011. The complexity of their activation mechanism opens new possibilities for the modulation of mGlu and GABAB class C G protein-coupled receptors. *Neuropharmacology.* **60** (1), 82–92.
15. 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.
16. Small K.M., Schwarb M.R., Glinka C., Theiss C.T., Brown K.M., Seman C.A., Liggett S.B. 2006. Alpha1A- and alpha2C-adrenergic receptors form homo- and heterodimers: the heterodimeric state impairs agonist-promoted GRK phosphorylation and beta-arrestin recruitment. *Biochemistry.* **45** (15), 4760–4767.
17. 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.
18. 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.
19. Herrick-Davis K., Grinde E., Harrigan T.J., Mazurkiewicz J.E. 2005. Inhibition of Serotonin 5-Hydroxytryptamine2C Receptor Function through Heterodimerization. Receptor dimers bind two molecules of ligand and one G-protein. *Biol. Chem.* **280** (48), 40144–40151.
20. Herrick-Davis K., Grinde E., Weaver V.A. 2007. Serotonin 5-HT(2C) receptor homodimerization is not regulated by agonist inverse agonist treatment. *Eur. J. Pharmacol.* **568** (1–3), 45–53.
21. Нестерова Л.А., Смурова Е.А., Манухин Б.Н. 1995. Характеристика связывания специфического блокатора [<sup>3</sup>H]хинуклидинилбензилата М-холинорецепторами мембран коры головного мозга крыс. *ДАН.* **343** (2), 268–271.
22. Манухин Б.Н., Нестерова Л.А., Смурова Е.А. 1994. Характеристика кинетики взаимодействия β-адренорецепторов эритроцитов крыс со специфическим блокатором пропранололом. *Биол. мембраны.* **11** (5), 489–485.
23. 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.
24. Fuxe K., Marcellino D., Guidolin D., Woods A.S., Agnati L.F. 2008. Heterodimers and receptor mosaics of different types of G-protein-coupled receptors. *Physiology* (Bethesda). **23**, 322–332.
25. Kornau H.C. 2006. GABA(B) receptors and synaptic modulation. *Cell Tissue Res.* **326** (2), 517–533.
26. Fuxe K., Marcellino D., Borroto-Escuela D.O., Frankowska M., Ferraro L., Guidolin D., Ciruela F., Agnati L.F. 2010. The changing world of G protein-coupled receptors: from monomers to dimers and receptor mosaics with allosteric receptor-receptor interactions. *J. Recept Signal Transduct. Res.* **30** (5), 272–283.
27. 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.
28. 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.
29. Fowler C.J., Vedin V., Sjöberg E. 1999. Evidence for cooperative binding of (–) Isoproterenol to rat brain beta1-adrenergic receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257** (2), 629–634.
30. Millan M.J. 2005. Serotonin 5-HT2C receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: focus on novel therapeutic strategies. *Therapie.* **60** (5), 441–460.

## Serotonergic Agonists and Antagonists Are the Modulators of the $\alpha_1$ -Adrenoceptor Activity in Rat Cortex Brain Membranes

L. A. Nesterova, B. N. Manukhin

*Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova, 26, Moscow, 119334 Russia;  
e-mail: manukhinb@mail.ru*

The effects of activation and inhibition of serotonin receptors by serotonin (5-HT) and mianserin on the specific nonselective  $\alpha_1$ -antagonist [ $^3$ H]prazosine binding in rat cerebral cortex membranes was studied. It was shown that the ligand–receptor interaction for  $\alpha_1$ -adrenoceptors corresponded to the model suggesting the presence of one pool of receptors and binding of two ligand molecules to the receptor. The parameters of [ $^3$ H]prazosine binding to  $\alpha_1$ -adrenoceptors were:  $K_d = 1.85 \pm 0.16$  nM,  $B_{max} = 31.1 \pm 0.3$  fmol/mg protein,  $n = 2$ . In the case of activation of 5HT-receptors by serotonin, the character of ligand binding was different: two pools of receptors were detected with the parameters  $K_{d1} = 0.61 \pm 0.04$ ,  $K_{d2} = 3.82 \pm 0.15$  nM,  $B_{m1} = 6.6 \pm 0.7$ ,  $B_{m2} = 25.6 \pm 0.4$  fmol/mg protein,  $n = 2$ . The affinity of high-affinity pool increased threefold and the affinity of low-affinity pool decreased twofold as compared with control. The value of maximal reaction ( $B_{max}$ ) did not change. In the case of inhibition of 5HT-receptors by mianserin the binding of radioactive ligand to  $\alpha_1$ -adrenoceptors occurs according to the same model as in control conditions. The affinity of  $\alpha_1$ -adrenoceptors to [ $^3$ H]prazosine decreases twofold and the concentration increases ( $K_d = 3.97 \pm 0.12$  nM,  $B_{max} = 40.0 \pm 0.5$  fmol/mg protein). The data suggest that  $\alpha_1$ -adrenoceptors in rat cerebral cortex exist as dimers. Modulatory effects of serotonin and mianserin on the specific binding of [ $^3$ H]prazosine to  $\alpha_1$ -adrenoceptors was detected that was displayed in changes of binding parameters and general character of ligand–receptor interactions.