

УДК 576.314.6.088.6+612.11.612.82.015

АГОНИСТЫ И АНТАГОНИСТЫ СЕРТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ – МОДУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ α_2 -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ МЕМБРАН КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

© 2013 г. Л. А. Нестерова, Б. Н. Манухин

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26;
электронная почта: manukhinb@mail.ru, nesterova54@gmail.com

Поступила в редакцию 19.03.2013

Изучено влияние активации и ингибирования серотониновых рецепторов серотином (5НТ) и миансерином на связывание специфического неселективного антагониста α_2 -адренорецепторов [3 H]RX821002 в мембранах коры головного мозга крыс. Установлено, что лиганд-рецепторное взаимодействие α_2 -адренорецепторов соответствует модели один пул рецепторов и присоединение двух молекул лиганда к одному рецептору. Параметры связывания [3 H]RX821002 – $K_d = 1.57 \pm 0.27$ нМ, $B_{\max} = 7.24 \pm 1.63$ фмоль/мг белка, $n = 2$. При активации 5НТ-рецепторов серотином изменяется характер связывания лиганда – определяются два пула рецепторов с параметрами: $K_{d1} = 0.82 \pm 0.06$, $K_{d2} = 2.65 \pm 0.22$ нМ, $B_{m1} = 1.65 \pm 0.23$, $B_{m2} = 4.20 \pm 0.11$ фмоль/мг белка, $n = 2$. Чувствительность высокоаффинного пула возрастает по сравнению с контролем, низкоаффинного – снижается. Общее количество рецепторов – величина максимальной реакции (B_{\max}) – снижается на 20%. При ингибировании 5НТ-рецепторов миансерином изменяется также характер связывания радиоактивного лиганда с α_2 -адренорецепторами – определяются два пула рецепторов с параметрами: $K_{d1} = 0.48 \pm 0.09$, $K_{d2} = 3.79 \pm 0.71$ нМ, $B_1 = 0.63 \pm 0.17$, $B_2 = 4.75 \pm 0.21$ фмоль/мг белка. Чувствительность рецепторов высокоаффинного пула повышается по отношению к контрольному значению, низкоаффинного – снижается. Общее количество рецепторов (B_{\max}) снижается на 26%. Предполагается, что α_2 -адренорецепторы в мембранах головного мозга крыс существуют в виде димеров. Выявлено модулирующее действие серотонина и миансерина, которое проявляется изменением общего характера и параметров связывания специфического антагониста α_2 -адренорецепторами [3 H]RX821002.

Ключевые слова: мембраны коры головного мозга крыс, связывание, антагонист α_2 -адренорецепторов [3 H]RX821002, серотонин, миансерин, димеры.

DOI: 10.7868/S0233475513040063

В регуляторной системе организма одновременно действуют различные биологически активные соединения – нейротрансмиттеры, гормоны и другие, которые связываются не только со своими специфическими рецепторами, но могут аллостерически модулировать активность других эффекторных систем. Взаимодействие различных регуляторных систем (cross-talk) привлекает все большее внимание. Показана функциональная взаимосвязь между серотонинергической и адренергической системами. Один из основных нейромедиаторов центральной нервной системы – серотонин (5-гидрокситриптамин; 5-НТ) – регулирует поведение, агрессию, настроение, восприятие боли и тревожность [1]. 5-НТ участвует в работе вегетативной нервной системы и сердечно-сосудистой системы, в агрегации тромбоцитов, росте гладких мышц матки, сосудов и функционировании желудочно-кишечного тракта [2–4]. Катехоламинергические системы головного моз-

га модулируют соматические и висцеральные рефлексy, участвуют в регуляции циклов сна–бодрствования, в контроле температуры тела, трофических влияний. Через α -адренорецепторы осуществляется регуляция адренергических процессов в центральной и периферической нервной системах. Модулирующие эффекты при активации и ингибировании α -адренорецепторов обусловлены их взаимодействием (cross-talk) с другими регуляторными системами. Серотониновые и адренергические рецепторы реципрокно взаимодействуют на уровне клеток и клеточных терминалей. Так, ингибиторы обратного захвата серотонина снижают транспорт норадреналина в нейроны [5]. Неселективный блокатор β -адренорецепторов бисиндолол активировывает серотониновые рецепторы сердечно-сосудистой системы и ингибирует α_1 -адренорецепторы [6]. Антагонист серотониновых рецепторов миансерин повышает диастолическое давление, которое регулируется через α -адрено-

рецепторы [7]. Новый класс лигандов 1–3 диоксолановой структуры могут связываться с α_1 -адрено- и 5-НТ(1A)-рецепторами [8]. Серотонин изменяет параметры связывания [^3H]RX821002 с α_2 -адренорецепторами в мембранах коры головного мозга цыплят [9]. [^3H]8-ОН-ДРАТ, агонист рецепторов 5-НТ(1A/7), также связывается с α_{2A} -адренорецепторами мозга мышей [10]. Этот лиганд увеличивает венозный тонус крыс через активацию α_2 -адренорецепторов [11].

Приведенные данные свидетельствуют о взаимодействии серотонинергических и адренергических нейротрансмиттерных систем. Можно предположить, что присоединение нейротрансмиттера к своему рецептору аллостерически изменяет активность других рецепторов, модулируя физиологические и биохимические реакции клеток.

Задачей нашей работы было изучение модулирующего действия серотонина и трициклического антидепрессанта миансерина – антагониста серотониновых рецепторов, на кинетику связывания специфического антагониста [^3H]RX821002 α_2 -адренорецепторами в мембранах клеток коры головного мозга крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на мембранах коры головного мозга крыс-самцов линии Вистар (210–250 г), которые выделяли по методу Henn S.W. и Henn F.A. с некоторыми модификациями [12, 13]. Готовые мембранные препараты хранили при -70°C в течение 3 нед. Концентрацию белка определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (Sigma) [14]. Связывание радиоактивного лиганда [^3H]RX821002 проводили в инкубационной среде с последующим отмыванием мембран от несвязавшегося лиганда на стекловолокнистых фильтрах GFB [15]. Объем инкубационной среды составлял 50–100 мкл суспензии мембран, 50 мМ трис-НСI-буфер, рН 7.4, “холодный” вытеснитель, агонист или антагонист серотониновых рецепторов и радиоактивный лиганд. Реакцию останавливали добавлением 1 мл холодного буфера (0°C). Параметры связывания лиганда с α_2 -адренорецепторами определяли с использованием специфического неселективного антагониста [^3H]RX821002 (Amersham, Великобритания, 77 Ки/мМ) в концентрации 0.33–6.60 нМ. Специфическое связывание определяли по разнице между общим и неспецифическим связыванием в присутствии нерадиоактивного лиганда – раувольфсцина в концентрации 10 мкМ. В качестве агониста и антагониста 5НТ-рецепторов использовали серотонин и миансерин (Sigma) в концентрации 10 мкМ. Вещества вводили в инкубационную среду за 20 мин перед добавлением [^3H]RX821002. Реакцию связывания лиганда с ре-

цепторами проводили в течение 30 мин при 22°C . Общее время инкубации составило 50 мин.

Для определения закономерностей связывания антагонистов со специфическими рецепторами использовали математические и графические методы анализа лиганд-рецепторных взаимодействий [16]. Ранее теоретически и экспериментально было показано, что взаимодействие специфических радиоактивных антагонистов адренорецепторов с изолированными мембранами коры мозга крыс описывается уравнениями для одного или двух пулов рецепторов. Действие каждого из исследованных веществ анализировали с использованием 10 математических моделей связывания лиганда рецептором [17]. Установлено, что взаимодействие лиганда с α_2 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс в контроле соответствует модели с одним, а в эксперименте с двумя пулами рецепторов и присоединением двух молекул лиганда к рецептору:

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

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

где b – количество связанного лиганда; B_{\max} – 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 с константами диссоциации K_{d1} и K_{d2} и коэффициентом Хилла n_1 и n_2 ; $[A]$ – концентрация лиганда в среде. 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. Эффективность связывания лигандов с рецепторами оценивали по уравнению:

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

где эффективность (E) (фмоль/мг белка/нМ) [14] – интегральный показатель, количественно характеризующий величину связывания лиганда при его концентрации, равной K_d . На рис. 1, 2 и 3 приведены данные конкретных опытов, а в таблице – средние результаты. Теоретические кривые строили по уравнениям (1) и (2). На теоретические кривые нанесены экспериментальные точки. В опытах использовали по 7–9 точек, каждая в трехкратной повторности. Статистическую значимость различий оценивали с использованием критерия Стьюдента ($p < 0.05$). Все значения представлены как средние арифметические и стандартные ошибки средней ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

График специфического связывания [^3H]RX821002 α_2 -адренорецепторами изолиро-

ванных мембран коры головного мозга крыс представляет собой типичную кривую насыщения (рис. 1, кривая 1). Математический анализ экспериментальных данных показал, что наименьшие ошибки параметров получены при расчете по уравнению (1), модели лиганд-рецепторного взаимодействия, предполагающей присоединение двух молекул лиганда к одному рецептору и включающей один пул рецепторов (таблица). Графический анализ экспериментальных данных с помощью уравнения (4), линеаризованной формы уравнения (1), в координатах (b ; b/A^2) также показывает существование одного гомогенного пула α_2 -адренорецепторов (рис. 2, кривая 1):

$$(b/A^2) = [(B_{\max})/(K_d^2)] - [b/(K_d^2)]. \quad (4)$$

Экспериментальные точки на графике расположены на прямой линии. Для подтверждения соответствия полученным данным параметров, рассчитанных по уравнениям (1) и (4), проведены теоретические кривые, с которыми хорошо совпадают экспериментальные точки (рис. 1, кривая 1 и рис. 2, кривая 1).

Серотонин, агонист 5НТ-рецепторов, вызывает изменения параметров связывания специфического антагониста [3 H]RX821002 и общего характера взаимодействия лиганда с α_2 -адренорецепторами (таблица). Связывание лиганда с адренорецептором происходит согласно модели: два пула рецепторов, присоединение двух молекул лиганда к рецептору. При активации 5НТ-рецепторов, в высокоаффинном пуле статистически значимо, на 48% по сравнению с контрольными опытами, снизилась величина K_{d1} , на 69% увеличилась величина K_{d2} низкоаффинного пула, на 42% снизилось количество активных α_2 -адренорецепторов (B_{m1}) в высокоаффинном пуле и на 19% – в низкоаффинном пуле. В итоге эффективность связывания лиганда в высокоаффинном пуле снизилась на 78%, а в низкоаффинном – на 80%.

Миансерин, антагонист 5НТ-рецепторов, также вызвал существенные изменения параметров и характера связывания лиганда по сравнению с контролем. Взаимодействие лиганда с α_2 -адренорецепторами описывается моделью: два пула рецепторов и присоединение двух молекул лиганда к рецептору (таблица). Чувствительность рецепторов высокоаффинного пула снизилась на 69% (возросла величина K_d), низкоаффинного – в 1.41 раза, количество мест связывания лиганда – на 91 и 34% соответственно. В результате эффективность (E) связывания α_2 -рецепторов снизилась на 89 и 79% соответственно (таблица).

Результаты графического анализа хорошо совпадают с расчетными данными. На графике (рис. 1, кривая 2) приведены экспериментальные точки и

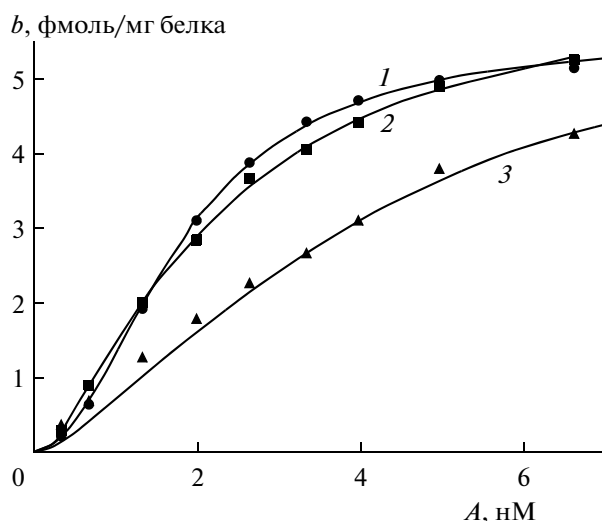


Рис. 1. Экспериментальные точки и теоретические кривые специфического связывания [3 H]RX821002 α_2 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс в контроле и при действии серотонина и миансерина. По оси абсцисс – концентрация [3 H]RX821002 (нМ), по оси ординат – количество мест, связанных лигандом (b , фмоль/мг белка). 1 – Контроль, 2 – серотонин, 3 – миансерин. Теоретические кривые, параметры связывания в контрольном опыте – $K_d = 1.80 \pm 0.03$ нМ, $B_{\max} = 5.63 \pm 0.04$ фмоль/мг белка, $n = 2$; на фоне серотонина – $K_{d1} = 0.89 \pm 0.17$ нМ, $K_{d2} = 2.89 \pm 0.36$ нМ, $B_1 = 1.90 \pm 0.58$ фмоль/мг белка, $B_2 = 4.06 \pm 0.49$ фмоль/мг белка, $n = 2$; на фоне миансерина – $K_{d1} = 0.52 \pm 0.13$ нМ, $K_{d2} = 4.28 \pm 0.41$ нМ, $B_1 = 0.94 \pm 0.18$ фмоль/мг белка, $B_2 = 4.79 \pm 0.21$ фмоль/мг белка, $n = 2$.

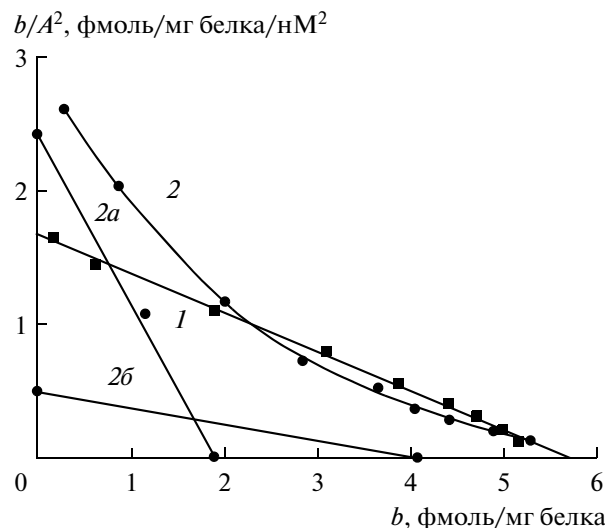


Рис. 2. Экспериментальные точки и теоретические кривые специфического связывания [3 H]RX821002 α_2 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс в контроле (1) и при действии серотонина (2). 2а, 2б – Асимптоты высоко- и низкоаффинного пулов. По оси абсцисс – количество мест, связанных лигандом (b , фмоль/мг белка); по оси ординат – отношение количества мест, связанных лигандом, к его концентрации (b/A_2 , фмоль/мг белка/нМ 2).

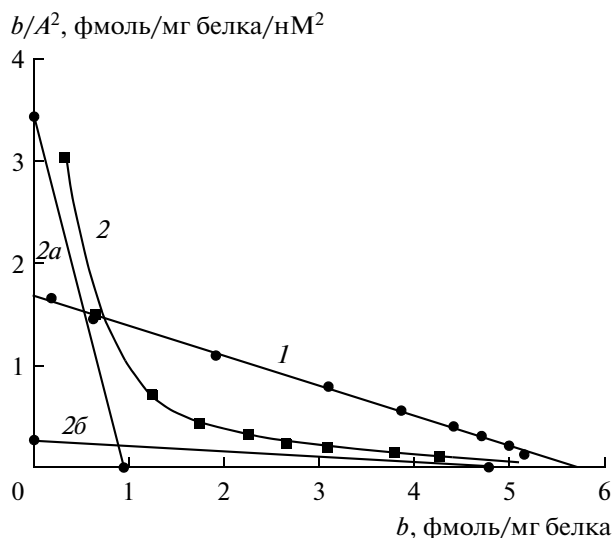


Рис. 3. Экспериментальные точки и теоретические кривые специфического связывания [^3H]RX821002 α_2 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс в контроле (1) и при действии миансерина (2). 2а, 2б – Асимптоты высоко- и низкоаффинного пулов. По оси абсцисс – количество мест, связанных лигандом (b , фмоль/мг белка); по оси ординат – отношение количества мест, связанных лигандом, к его концентрации (b/A^2 , фмоль/мг белка/ nM^2).

теоретические кривые, построенные по уравнению (1). Видно совпадение экспериментальных точек с теоретическими кривыми. Особенности действия серотонина на связывание лиганда рецепторами представлено также на графике, построенном с помощью уравнения (5), в координатах b , b/A^2 , (рис. 2, кривая 2):

$$(b/A^2) = [(B_{m1} + B_{m2})/(K_{d1}^2 + K_{d2}^2)] - [b/(K_{d1}^2 + K_{d2}^2)]. \quad (5)$$

График связывания представлен гиперболой, что свидетельствует об образовании двух пулов рецепторов, каждый из которых представлен в виде асимптот (рис. 2, кривые 2, 2а, 2б). Совпадение экспериментальных точек с теоретической кривой свидетельствует о соответствии математического и графического анализов экспериментальным результатам (таблица). Влияние миансерина также видно на графике (рис. 3, кривая 2), построенном по уравнению (5). Экспериментальные точки хорошо совпадают с теоретической кривой. Каждый пул представлен асимптотами (рис. 3, кривые 2, 2а, 2б). Следовательно, графический анализ экспериментальных результатов также подтверждает данные математического анализа (таблица).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Величина связывания лиганда зависит от его концентрации. При определенной, характерной

для каждого типа рецепторов, концентрации лиганда в инкубационной среде достигается максимальная величина комплекса лиганд-рецептор. Экспериментальные данные в контроле лучше описываются уравнением (1) при величине $n = 2$, т.е. к рецептору присоединяются две молекулы лиганда, и α_2 -адренорецепторы представлены гомогенным пулом димеров (таблица). Количество связанных рецепторов зависит от концентрации лиганда, и график представлен гиперболой (рис. 1). Величины основных параметров K_d и B_{max} отражают аффинность рецепторов и их количество в эффекторной системе. Величина n (коэффициент кооперативности, коэффициент Хилла) характеризует кооперативность взаимодействия лиганда с рецептором, показывает число молекул лиганда, присоединяющихся к рецептору [18, 19]. Полученная величина $n = 2$ (таблица) в уравнении связывания лиганда с рецептором указывает на присоединение двух молекул лиганда к одному рецептору. Это возможно при наличии двух специфических мест связывания лиганда на одной молекуле рецептора, представляющего собой димер. При этом при действии серотонина и миансерина оба пула рецепторов остаются димерными (таблица). Это подтверждается опубликованными данными. Известно, что различные семидоменные G-белок-связывающие рецепторы могут образовывать гомо- и гетеродимеры [20]. Показана гомодимеризация подтипов α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} α_1 -адренорецепторов [21], гомо- и гетеродимеризации α_{2A} - и α_{2C} -адренорецепторов [22, 23]. Гетеродимер α_{1B} и α_{1D} образует один рецептор с активностью большей, чем у отдельных подтипов [24]. Установлено, что один димер серотонинового рецептора связывает две молекулы лиганда, но активирует один G-белок. [25]. Получены данные о присоединении двух молекул [^3H]хинуклидинилбензилата к M-холинорецепторам мембран коры головного мозга [26] и [^3H]пропранолола к β -адренорецепторам эритроцитов крыс [27]. 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]RX821002 с α_2 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс при активации и ингибировании серотониновых рецепторов выявлены в результате математического анализа. Определены высоко- и низкоаффинный пулы рецепторов. Статистически значимо, по сравнению с контролем, увеличивается активность высокоаффинного пула α_2 -адренорецепторов и снижа-

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

Параметры	Контрольное связывание	Серотонин	Миансерин
K_d , нМ	1.57 ± 0.03		
K_{d1} , нМ		0.82 ± 0.06*	0.48 ± 0.09*
K_{d2} , нМ		2.65 ± 0.22*	3.79 ± 0.71*
B_{m1} , фмоль/мг		1.65 ± 0.23*	0.63 ± 0.17*
B_{m2} , фмоль/мг		4.20 ± 0.11*	4.75 ± 0.21*
B_{max} , фмоль/мг	5.67 ± 0.02	5.85 ± 0.11	5.39 ± 0.29
n_1	2	2	2
n_2		2	2
E , фмоль/мг/нМ	4.01 ± 1.16		
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*

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Примечание. K_d – константы диссоциации; B_m – концентрация адренорецепторов (высоко- и низкоаффинного пулов); B_{max} – общее количество мест связывания лиганда; E – эффективность; n – коэффициент Хилла.

ется – низкоаффинного. На рис. 2 видно смещение точек пересечения кривых с осями координат по сравнению с контрольным связыванием лиганда, что отражает изменение чувствительности и количества рецепторов в каждом пуле. Так, точки пересечения асимптот высоко- и низкоаффинного пулов с осью абсцисс значительно сдвинуты влево по сравнению с контрольной прямой, что указывает на снижение количества мест связывания лиганда в обоих пулах рецепторов. Асимптота высокоаффинного пула пересекает ось ординат выше контрольной, что свидетельствует о повышении чувствительности рецепторов. Активность рецепторов низкоаффинного пула значительно ниже, чем в контрольном связывании – это видно по точке пересечения асимптоты с осью ординат.

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 в количестве α₂-адренорецепторов. Эффективности связывания (E) низкоаффинного пула α₂-адренорецепторов при действии серотонина и миансерина совпадают (таблица).

Нами использован метод количественного анализа лиганд-рецепторных взаимодействий. Определяемые при этом основные параметры

позволяют охарактеризовать свойства 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. Под влиянием серотонина и миансерина связывание лиганда рецепторами изменяется однонаправлено, причем на фоне миансерина значимо больше, чем серотонина. Используемый метод анализа лиганд-рецепторных взаимодействий применим для изучения любых биологических реакций, результаты которых могут быть представлены количественно.

Показано, что *in vitro* α₂-адренорецепторы в мембранах головного мозга крыс существуют в виде димеров. Модулирующее действие серотонина и миансерина на присоединение специфического антагониста к α₂-адренорецепторам проявляется в образовании двух различных по аффинности пулов мест связывания лиганда [³H]RX821002.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bradley P.B., Engel G., Feniuk W., Fozard J.R., Humphrey P.P., Middlemiss D.N., Mylecharane E.J., Richardson B.P., Saxena P.R. 1986. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology*. **25** (6), 563–576.

2. Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R., Hartig P.R., Martin G.R., Mylecharane E.J., Saxena P.R., Humphrey P.P. 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.* **46** (2), 157–203.
3. Ramage A.G. 2006. The role of central 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) receptors in the control of micturition. *Br. J. Pharmacol.* **147** (2), 120–131.
4. Ramage A.G., Villalón C.M. 2008. 5-hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. *Trends Pharmacol. Sci.* **29** (9), 472–481.
5. Blier P., Szabo S.T. 2005. Potential mechanisms of action of atypical antipsychotic medications in treatment-resistant depression and anxiety. *J. Clin. Psychiatry.* **66** (8), 30–40.
6. 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.
7. Kalkman H.O., van Gelderen E.M., Timmermans P.B., van Zwieten P.A. 1983. К effects of (+) and (–) mianserin on alpha adrenoceptors and tyramine induced tachycardia in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **90** (2–3), 221–226.
8. 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.
9. Diez-Alarcia R., Pilar-Cuellar F., Panigua M.A., Meana J.J., Fernandez-Lopez A. 2006. Pharmacological characterization and autoradiographic distribution of alpha2-adrenoceptor antagonist [(3)H]RX 821002 binding sites in the chicken brain. *Neuroscience.* **141** (1), 357–369.
10. Bonaventure P., Nepomuceno D., Hein L., Sutcliffe J.G., Lovenberg T., Hedlund P.B. 2004. 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.* **124** (4), 901–911.
11. Tiniakov R., Scrogin K.E. 2006. The serotonin 5-hydroxytryptophan receptor agonist, (+)8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)-tetralin, stimulates sympathetic-dependent increases in venous tone during hypovolemic shock. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**, 776–782.
12. Henn S.W., Henn F.A. 1982. The identification of subcellular fractions of the central nervous system. In *Handbook of neurochemistry*. Ed. Lajtha A. New York, London: Plenum Press. p. 147–161.
13. Нестерова Л.А., Смурова Е.А., Манухин Б.Н. 1995. Характеристика связывания специфического блокатора [³H]хинуклидинилбензилата М-холинорецепторами мембран коры головного мозга крыс. *ДАН.* **343** (2), 268–271.
14. 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.
15. Манухин Б.Н., Нестерова Л.А., Смурова Е.А. 1994. Характеристика кинетики взаимодействия α-адренорецепторов эритроцитов крыс со специфическим блокатором пропранололом. *Биол. мембраны.* **11** (5), 489–485.
16. 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.
17. Манухин Б.Н., Нестерова Л.А. 2011. Аллостерическое влияние атропина и карбахола на активность альфа₂-адренорецепторов мембран коры головного мозга крыс. *Биол. мембраны.* **28**, (5), 382–386.
18. Диксон М., Уэбб Э. 1982. *Ферменты*. Пер. с англ. М.: Мир, 1117 с.
19. Келети Т. 1990. *Основы ферментативной кинетики*. Пер. с англ. М.: Мир, 348 с.
20. Авдонин П.В. 2005. Структура и сигнальные свойства сопряженных с G-белками рецепторных комплексов. *Биол. мембраны.* **22** (1), 3–26.
21. Uberti M.A., Hall R.A., Minneman K.P. 2003. Subtype-specific dimerization of alpha1-adrenoceptors: effects on receptor expression and pharmacological properties. *Mol. Pharmacol.* **64** (6), 1379–1390.
22. Small K.M., Schwarb M.R., Glinka C., Theiss C.T., Brown K.M., Seman C.A., Liggett S.B. 2006. Alpha1A- and alpha2C-adrenergic receptors form homo- and heterodimers: the heterodimeric state impairs agonist-promoted GRK phosphorylation and beta-arrestin recruitment. *Biochemistry.* **45** (15), 4760–4767.
23. Zhou F., Filipeanu C.M., Duvernay M.T., Wu G. 2006. Cell-surface targeting of alpha2-adrenergic receptors – inhibition by transport deficient mutant through dimerization. *Cell Signal.* **18** (3), 318–327.
24. Hague C., Lee S.E., Chen Z., Prinster S.C., Hall R.A., Minneman K.P. 2006. Heterodimers of alpha1B- and alpha1D-adrenergic receptors form a single functional entity. *Mol. Pharmacol.* **69** (1), 45–55.
25. Herrick-Davis K., Grinde E., Harrigan T.J., Mazurkiewicz J.E. 2005. Inhibition of serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor function through heterodimerization. Receptor dimers bind two molecules of ligand and one G-protein. *Biol. Chem.* **280** (48), 40144–40151.
26. Нестерова Л.А., Смурова Е.А., Манухин Б.Н. 1995. Характеристика связывания специфического блокатора [³H]хинуклидинилбензилата М-холинорецепторами мембран коры головного мозга крыс. *ДАН.* **343** (2), 268–271.
27. Манухин Б.Н., Нестерова Л.А., Смурова Е.А. 1994. Характеристика кинетики взаимодействия α-адренорецепторов эритроцитов крыс со специфическим блокатором пропранололом. *Биол. мембраны.* **11** (5), 489–485.

Serotonergic Agonists and Antagonists Modulating the Activity of Alpha₂-Adrenoceptors 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, nesterova54@gmail.com*

Activation and inhibition of serotonin receptors by serotonin and miancerine effect on specific binding of nonselective α_2 -antagonist [³H]RX821002 in rat cerebral cortex membranes was studied. It was shown that the ligand–receptor interaction for α_2 -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 the [³H]RX821002 binding to α_2 -adrenoceptors were as follows: $K_d = 1.57 \pm 0.27$ nM, $B_{\max} = 7.24 \pm 1.63$ 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 $K_{d1} = 0.82 \pm 0.06$; $K_{d2} = 2.65 \pm 0.22$ nM; $B_{m1} = 1.65 \pm 0.23$; $B_{m2} = 4.20 \pm 0.11$ fmol/mg protein; $n = 2$. The affinity of high-affinity receptors increased twofold and the affinity of low-affinity receptors decreased by 69% as compared to control values. The concentration of high-affinity receptors decreased 4.4-fold, and of low-affinity, 1.7-fold. The value of maximal reaction (B_{\max}) decreased by 20%. In the case of miancerine-induced inhibition of 5HT-receptors the character of ligand binding also changed; two pools of receptors were detected with the following parameters: $K_{d1} = 0.48 \pm 0.09$; $K_{d2} = 3.79 \pm 0.71$ nM; $B_1 = 0.63 \pm 0.17$; $B_2 = 4.75 \pm 0.21$ fmol/mg protein; $n = 2$. The affinity of high-affinity receptors increased by 70% and of low-affinity receptors decreased by 76% as compared to control values. The concentration of active high-affinity and low-affinity α_2 -adrenoceptors decreased by 70% and 141%, respectively. The total amount of the receptors (B_{\max}) decreased by 26%. The data suggest that α_2 -adrenoceptors in rat cerebral cortex exist as dimers. Modulatory effects of serotonin and miancerine on specific antagonist binding to α_2 -adrenoceptors may be accomplished by altering the character and binding parameters of the nonselective α_2 -antagonist [³H]RX821002.