

## Выявление наиболее общих свойств агонистов и антагонистов внешнеклеточных рецепторов на модели транскрипции *in vitro*

В. В. Прокопенко, В. В. Холодович, А. И. Луйк

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины  
Ул. Мурманская, 1, Киев, 252660, Украина

*Для поиска наиболее общих свойств агонистов и антагонистов внешнеклеточных рецепторов проведено сравнительное изучение их влияния на транскрипцию *in vitro*, осуществляемую РНК-полимеразой фага Т7. Были исследованы обзидан (антагонист  $\beta$ -адренорецепторов), празозин (антагонист  $\alpha_1$ -адренорецепторов), иохимбин (антагонист  $\alpha_2$ -адренорецепторов), атропин (антагонист *m*-холинорецепторов), изадрин (агонист  $\beta$ -адренорецепторов), мезатон (агонист  $\alpha_1$ -адренорецепторов), клонидин (агонист  $\alpha_2$ -адренорецепторов), карбахол (агонист *m*-холинорецепторов) и синтетический трипептид fMLP (агонист рецепторов хемотаксиса полиморфноядерных лейкоцитов). Установлено, что агонисты в концентрациях  $10^{-5}$ – $10^{-4}$  М либо не влияют на транскрипцию, либо активируют ее на 8–21 %. Антагонисты в тех же концентрациях ингибируют полимеразную реакцию на 15–45 %. Обсуждаются качественные различия строения агонистов и антагонистов.*

**Введение.** В последние годы нами разрабатывается иерархическая классификация физиологически активных веществ (ФАВ). Она строится на основе последовательных переходов от наиболее общих фармакологических и химических признаков ФАВ к частным. Так, на первой ступени данной классификации все вещества разделены на два исходных класса в соответствии с их влиянием на основные клеточные сигнальные системы [1–3]. В частности, ФАВ первого класса активируют аденилатциклазную и подавляют Са-мобилизующую полифосфоинозитидную систему. ФАВ второго класса присуща обратная направленность действия: они ингибируют аденилатциклазную систему и активируют Са-мобилизующую полифосфоинозитидную. Показано, что весьма разнородные ФАВ, объединенные в пределах каждого из указанных исходных классов, вызывают сходные физиологические эффекты на модельных клеточных биообъектах и обладают некоторыми наиболее общими принципами химического строения [3–6].

В соответствии с концепцией биорегуляторной

стереотипии [3, 7, 8], предполагается, что на следующей ступени иерархической классификации ФАВ в каждом из указанных классов можно будет выделить вещества, действующие посредством активации и блокады рецепторов сигнальных систем, и установить наличие элементов общности в каждой из этих групп. Гипотезы о возможности наличия некоторых общих черт строения и механизмов действия лекарственных веществ, действующих за счет блокады различных биосубстратов, высказывались ранее и некоторыми другими авторами [9, 10]. Однако эти идеи не получили дальнейшего развития. Экспериментальной проверке данных предположений и посвящена настоящая работа.

Выявить наиболее общие фармакологические свойства веществ можно, исследуя их действие на неспецифические для них модели [6, 7]. В данной работе исследовали эффекты ФАВ, активирующих либо ингибирующих определенные внешние рецепторы клеточных сигнальных каскадов, на модели, заведомо не имеющей данных рецепторов. В частности, оценивали их влияние на процесс транскрипции, т. е. ДНК-зависимый синтез РНК. Наиболее удобной представлялась система транскрип-

ции *in vitro*, основанная на применении ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага Т7. Фермент относится к так называемым «минимальным полимеразам», обладающим достаточно простым строением и способным осуществлять полный транскрипционный цикл.

**Материалы и методы.** В работе использовали: БСА, РНКзин, Т7 РНК-полимеразу, NTPs («Pharmacia Biotech», Австрия), рестрикционную эндонуклеазу *NdeI*, плазмиду *pGEM-3Zf(+)* («Promega», США), [ $U-^{14}C$ ]GTP («UVVVR», Чехия), трис («Fluka», ФРГ). Остальные реактивы отечественного производства квалификации «хч» и «осч».

Эксперименты проводили по известным методам [11, 12] с некоторыми модификациями. В качестве ДНК-матрицы использовали плазмиду *pGEM-3Zf(+)*, содержащую промотор Т7. ДНК плазмиды расщепляли рестрикционной эндонуклеазой *NdeI*, экстрагировали смесью фенол — хлороформ, осаждали этанолом и ресуспендировали в 10 мМ трис-НСI (рН 7,8), содержащем 1 мМ ЭДТА до конечной концентрации 1 мг/мл. Инкубационная смесь для транскрипции (10 мкл) содержала 40 мМ трис-НСI (рН 7,9), 10 мМ  $MgCl_2$ , 10 мМ NaCl, 50 мкг/мл БСА, по 0,5 мМ каждого NTP, [ $U-^{14}C$ ]GTP (радиоактивность  $5 \cdot 10^4$  имп/мин), 10 мМ DTT, 1 ед/мкл РНКзина, 0,2 мг/мл линейаризованной ДНКматрицы, исследуемое ФАВ. Реакцию инициировали добавлением Т7 РНК-полимеразы до конечной концентрации 0,4 ед/мкл. Смесь инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. После инкубации отбирали 8 мкл, наносили на фильтр Вагман 3 ММ. Фильтр последовательно промывали 10 %-м и 5 %-м раствором трихлоруксусной кислоты, затем этанолом и сушили на воздухе. Радиоактивность кислотонерастворимого материала определяли в толуольном сцинтилляторе ЖС-1 на сцинтилляционном счетчике «1219 РАСКВЕТА» («Л.КВ», Швеция).

**Результаты и обсуждение.** Проведено сравнительное изучение двух групп ФАВ. Из числа блокаторов были исследованы обзидан (антагонист  $\beta$ -адренорецепторов), празозин (антагонист  $\alpha_1$ -адренорецепторов), иохимбин (антагонист  $\alpha_2$ -адренорецепторов) и атропин (антагонист m-холинорецепторов). В качестве препаратов группы активаторов исследовали изадрин (агонист  $\beta$ -адренорецепторов), мезатон (агонист  $\alpha_1$ -адренорецепторов), клонидин (агонист  $\alpha_2$ -адренорецепторов), карбахол (агонист m-холинорецепторов) и синтетический трипептид fMLP (агонист специфических рецепторов Са-мобилизующей полифосфоинозитидной системы, инициирующей хемотаксис полиморфноядерных лейкоцитов).

Полученные результаты приведены в таблице. Вещества первой группы, проявляющие блокирующее действие на рецепторы клеточных сигнальных каскадов, в концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  М существенно подавляют полимеразную реакцию. В ряду активностей блокаторы расположились следующим образом. Обзидан ингибирует транскрипцию на 30 %, атропин — на 36, празозин на — 38 и иохимбин на — 45. В концентрации  $1 \cdot 10^{-5}$  М достоверно угнетает транскрипцию только празозин (на 19 %) и иохимбин (на 15 %).

В группе активаторов ни одно ФАВ не ингиби-

Влияние ФАВ на транскрипцию *in vitro*, осуществляемую РНК-полимеразой фага Т7

Препарат	Концентрация, моль/л	Активность фермента, % к контролю	p
Обзидан	$1 \cdot 10^{-6}$	98 ± 6	>0,05
	$1 \cdot 10^{-5}$	92 ± 4	>0,1
	$1 \cdot 10^{-4}$	70 ± 7	<0,001
Празозин	$1 \cdot 10^{-6}$	93 ± 4	> 0,1
	$1 \cdot 10^{-5}$	81 ± 4	< 0,001
	$1 \cdot 10^{-4}$	62 ± 4	< 0,001
Иохимбин	$1 \cdot 10^{-6}$	97 ± 5	> 0,05
	$1 \cdot 10^{-5}$	85 ± 7	< 0,05
	$1 \cdot 10^{-4}$	55 ± 7	< 0,001
Атропин	$1 \cdot 10^{-6}$	96 ± 8	> 0,05
	$1 \cdot 10^{-5}$	97 ± 4	> 0,05
	$1 \cdot 10^{-4}$	64 ± 6	< 0,001
Изадрин	$1 \cdot 10^{-6}$	102 ± 5	> 0,05
	$1 \cdot 10^{-5}$	98 ± 5	> 0,05
	$1 \cdot 10^{-4}$	98 ± 6	> 0,05
Мезатон	$1 \cdot 10^{-6}$	103 ± 4	> 0,05
	$1 \cdot 10^{-5}$	102 ± 5	> 0,05
	$1 \cdot 10^{-4}$	108 ± 4	< 0,05
Клонидин	$1 \cdot 10^{-6}$	99 ± 6	> 0,05
	$1 \cdot 10^{-5}$	107 ± 6	> 0,05
	$1 \cdot 10^{-4}$	120 ± 5	< 0,001
Карбахол	$1 \cdot 10^{-6}$	99 ± 7	> 0,05
	$1 \cdot 10^{-5}$	103 ± 5	> 0,05
	$1 \cdot 10^{-4}$	118 ± 6	< 0,01
fMLP	$1 \cdot 10^{-6}$	105 ± 7	> 0,05
	$1 \cdot 10^{-5}$	115 ± 4	< 0,05
	$1 \cdot 10^{-4}$	121 ± 7	< 0,001



ровало транскрипции. Напротив, в концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  М мезатон, карбахол, клонидин и fMLP достоверно активируют полимеразную реакцию на 8, 18, 20 и 21 % соответственно. Активирующее влияние fMLP (на 15 %) проявляется и при концентрации  $1 \cdot 10^{-5}$  М. Влияние активаторов по своей выраженности уступает эффектам блокаторов.

Однако сам факт достоверной активации процесса транскрипции веществами, являющимися высокоселективными агонистами внешнемембранных рецепторов клетки, на наш взгляд, вызывает особый интерес, поскольку прямых ксеногенных активаторов каких-либо ферментативных процессов *in vitro* известно крайне мало.

Установленное сходство биологических эффектов антагонистов и агонистов рецепторов подтверждает наличие и некоторых общих черт химического строения ФАВ в пределах каждой из данных двух групп. На схеме структурные формулы исследуемых антагонистов (слева) и агонистов (справа), расположенные (сверху вниз) в порядке возрастания их действия на процесс транскрипции.

Как видно, исследуемые ФАВ существенно различаются по химическому строению. Причем значительные различия существуют как между представителями двух оцениваемых групп, так и в пределах каждой группы. При таком разнообразии структур выделить какие-либо фармакофорные признаки агонистов и антагонистов обычными методами невозможно. В подобных случаях необходимо привлечение методов электронно-топологического анализа, искусственного интеллекта и распознавания образов, которыми мы успешно пользовались на первом этапе построения рациональной классификации ФАВ [5, 13, 14]. Это требует дополнительных специальных исследований. В рамках же настоящей работы можно сделать только ряд следующих первичных заключений.

Молекулы агонистов рецепторов имеют относительно простое строение и значительно более конформационно лабильны по сравнению с более сложными пространственно затрудненными структурами антагонистов. Достаточно близким химическим строением среди исследованных ФАВ обладают только три соединения: антагонист обзидан и агонисты изадрин и мезатон. Заметим, что эти вещества в своих группах наименее активны по своему влиянию на процесс транскрипции. По-видимому, в силу близости химического строения фармакофорные признаки агонистов и антагонистов у них менее выражены, чем у прочих представителей данных двух групп. Вместе с тем обзидан все же существенно ингибирует транскрипцию, в то время как изадрин на нее не влияет, а мезатон

оказывает слабое активирующее действие. На этом основании можно предположить, что качественные различия строения антагонистов и агонистов определяются достаточно тонкими особенностями их химической структуры.

Таким образом, результаты настоящей работы подтверждают предположение о наличии некоторых наиболее общих биологических свойств в группах ФАВ, активирующих и блокирующих рецепторы внешней клеточной мембраны. Эти свойства проявляются в различном характере действия представителей данных двух групп веществ даже на такую высокоспецифичную и автономную модельную систему, как процесс транскрипции *in vitro*, не имеющий никакой прямой связи с внешнемембранными рецепторными структурами. Проведенные эксперименты согласуются с упоминавшейся выше концепцией биорегуляторной стереотипии и вытекающим из нее подходом к построению иерархической классификации ФАВ [3, 5]. Дальнейшие исследования в данном направлении следует сосредоточить на выявлении общих черт химического строения блокаторов и активаторов клеточных рецепторов современными методами квантовой химии, искусственного интеллекта и теории распознавания образов.

В. В. Прокопенко, В. В. Холодович, О. І. Луйк

Пошук найзагальніших властивостей агоністів та антагоністів зовнішньоклітинних рецепторів на моделі транскрипції *in vitro*

#### Резюме

Для пошуку найзагальніших властивостей агоністів та антагоністів зовнішньоклітинних рецепторів здійснено порівняльне вивчення їхнього впливу на транскрипцію *in vitro*, спричинену РНК-полімеразою фага Т7. Було досліджено обзидан (антагоніст  $\beta$ -адренорецепторів), празозин (антагоніст  $\alpha_1$ -адренорецепторів), йохімбін (антагоніст  $\alpha_2$ -адренорецепторів), анролін (антагоніст т-холінорецепторів), изадрин (агоніст  $\beta$ -адренорецепторів), мезатон (агоніст  $\alpha_1$ -адренорецепторів), клонідин (агоніст  $\alpha_2$ -адренорецепторів), карбахол (агоніст т-холінорецепторів) і синтетичний трипептид fMLP (агоніст рецепторів хемотаксису поліморфоядерних лейкоцитів). Виявлено, що агоністи в концентраціях  $10^{-5}$ — $10^{-4}$  або не впливають на транскрипцію, або активують її на 8—21 %. Антагоністи в тих же концентраціях пригнічують полімеразну реакцію на 15—45 %. Обговорюються якісні відмінності будови агоністів та антагоністів.

V. V. Prokopenko, V. V. Kholodovych, A. I. Luyk

Search for the most common properties of extracellular receptors agonists and antagonists in the *in vitro* transcription as the model

#### Summary

To search the most common properties of extracellular receptors agonists and antagonists the study of their action on the bacteriophage T7 RNA-polymerase *in vitro* transcription was undertaken. Propranolol ( $\beta$ -adrenoceptors antagonist), prazosin ( $\alpha_1$

*adrenoceptors antagonist*), yohimbine, ( $\alpha_2$ -adrenoceptors antagonist), atropine (muscarinic antagonist), isoproterenol ( $\beta$ -adrenoceptors agonist), phenylephrine ( $\alpha_1$ -adrenoceptors agonist), clonidine ( $\alpha_2$ -adrenoceptors agonist), carbachol (muscarinic agonist) and synthetical tripeptide fMLP (polymorphonuclear leucocytes chemotaxis receptors agonist) were studied. It was shown that agonists at the concentration of  $10^{-5}$ — $10^{-4}$  M either do not affect transcription or elevate its activity as much as 8—21 %. Antagonists at the same concentrations inhibit the polymerase reaction making it 15—45 % less active. The structural differences of the agonists and antagonists are discussed.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Луйк А. И., Кухарь В. П., Савранский Л. И., Скрыма Р. Н., Мухин В. В., Шептун В. Л. Универсальные системы восприятия, проведения и реализации внешних сигналов клеткой как основа для систематизации лекарственных средств и анализа соотношений «структура—активность» // Докл. АН СССР.—1988.—301, N 3.—С. 765—768.
2. Луйк А. И., Могилевич С. Е. Некоторые принципы классификации лекарств // Эксперим. и клин. фармакология.—1992.—55, № 1.—С. 64—67.
3. Химия биорегуляторных процессов / Под ред. В. П. Кухаря, А. И. Луйка.—Киев: Наук. думка, 1992.—368 с.
4. Луйк А. И. Иерархическая классификация физиологически активных веществ // Теор. и эксперим. химия.—1998.—34, № 4.—С. 199—212.
5. Пода Г. И., Димоголо А. С., Танчук В. Ю., Тетко И. В., Кошель М. И., Луйк А. И. Исследование «структура—активность» физиологически активных веществ, объединенных по общей направленности влияния на клеточную сигнализацию // Хим.-фарм. журн.—1996.—30, № 6.—С. 29—35.
6. Prokopenko R. A., Mogilevich S. E., Luik A. I. et al. Effects of haloperidol and chlorpromazine on smooth muscle contractility, platelet aggregation and neuronal calcium current // Gen. Physiol. Biophys.—1995.—14.—P. 349—357.
7. Luik A. I., Naboka Yu. N., Mogilevich S. E. et al. The influence of pH alteration and pharmacological modulators of adenylate cyclase system on human serum albumin conformation // J. Biomol. Struct. and Dyn.—1998.—16, № 1.—P. 21—26.
8. Луйк А. И., Кухарь В. П., Радченко И. В., Найденова И. Ю. Стереотипный компонент механизма действия ксенобиотиков // Докл. АН УССР. Сер. Б.—1990—№ 8.—С. 67—71.
9. Green J. Polypharmac antagonists — a class of their own // TIPS.—1987.—8, N 10.—P. 377—379.
10. LaBella F. Molecular basis for binding promiscuity of antagonist drugs // Biochem. Pharmacol.—1991.—42, Suppl.—P. 1—8.
11. Davanloo P., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Studier F. W. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—N 81.—P. 2035—2043.
12. Krieg P. A., Melton D. A. In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase // Meth. Enzymol.—1987.—N 155.—P. 397—415.
13. Tetko I. V., Tanchuk V., Yu. Luik A. I. Application of an evolutionary algorithm to the structure-activity relationship // Proc. of 3rd Ann. Conf. on Evol. Program / Eds A. Sebald, L. Fogel.—New York: World Sci., 1994.—P. 109—119.
14. Tetko I. V., Livingstone D., Luik A. I. Neural network studies. 1. Comparison of overfitting and overtraining // J. Chem. Inf. Comput. Sci.—1995.—35, N 5.—P. 826—833.

УДК 577.21:615.5

Поступила в редакцию 14.07.98