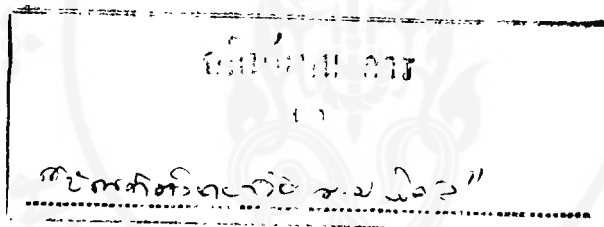




5 APR 1994

ADRENERGIC-CHOLINERGIC INTERACTION IN
RAT HEART: EVIDENCE FROM
RADIOLIGAND BINDING STUDIES

SURIN PLASEN



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(PHARMACOLOGY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1993

Copyright by Mahidol University

25767

สมรรถนะสูงและต่ำ การเติม isoproterenol และ Gpp(NH)p ลงไปพร้อมกันมีผลให้ความสามารถในการจับของตัวรับยาทั้งในบริเวณที่มีสมรรถนะสูงและต่ำลดลงไปได้อีก ผลการทดลองนี้เสนอแนะว่าตัวรับยาชนิดบีต้าและโคลิเนอร์จิกในหัวใจมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดและสามารถมีอิทธิพลต่อกันและกันได้

Concanavalin A (Con A) ถูกใช้เป็นสารที่ศึกษาอันตรกิริยาชนิดนี้ในระดับของเยื่อหุ้มเซลล์ การใส่ Con A ในขนาด 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ก่อนหน้าเป็นเวลา 30 นาที ไม่มีผลต่อการจับกับตัวรับยาของ [^3H](-) DHA และ [^3H] (-) QNB อาจสรุปได้ว่าผลของ Con A ในการกระตุ้นการสังเคราะห์ของสาร cAMP ไม่มีผลสืบเนื่องมาจากการจับตัวของสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นกับตัวรับยา

โปรตีนที่มีผลกระตุ้นเซลล์ตัวอ่อน (IAP) ถูกใช้เป็นสารเพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของอันตรกิริยานี้กับขบวนการเปลี่ยนแปลงของสาร cyclic nucleotide จากการศึกษาบทบาทของ pilocarpine ในขนาดความเข้มข้น 10^{-5} M ไม่สามารถหักล้างฤทธิ์ของ Gpp(NH)p ในขนาดความเข้มข้น 10^{-4} M ได้ แสดงให้เห็นว่าเมื่อมี IAP อยู่ด้วยพบว่า pilocarpine มีผลต่ออันตรกิริยาชนิดนี้ในระดับของการจับตัวของ GTP กับโปรตีน โดยการหักล้างฤทธิ์ของ pilocarpine ในการไปเปลี่ยนแปลงผลของ guanine nucleotide ต่อความสามารถในการจับตัวของ isoproterenol กับตัวรับยาชนิดบีต้า

ผลการวิจัยในวิทยานิพนธ์นี้อาจสรุปได้ว่าปรากฏการณ์การต้านฤทธิ์ของระบบประสาทอัตโนมัติอะดรีเนอร์จิกและโคลิเนอร์จิกที่หัวใจ สามารถอธิบายได้เป็นครั้งแรกว่าความสามารถในการจับกับตัวรับยาชนิดอะดรีเนอร์จิกถูกเปลี่ยนแปลงได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อตัวรับยาชนิดโคลิเนอร์จิกที่อยู่ใกล้เคียงถูกกระตุ้นพร้อมกันไปด้วย และผลนี้เกิดขึ้นโดยผ่านทาง GTP binding protein

THESIS TITLE Adrenergic-Cholinergic Interaction in Rat Heart:
Evidence from Radioligand Binding Studies.

NAME Surin Plasen.

DEGREE Doctor of Philosophy (Pharmacology).

THESIS SUPERVISORY COMMITTEE

Kampon Sriwatanakul, M.D., Ph.D.

Jutamaad Satayavivad, Ph.D.

Krongtong Yoovathaworn Ph.D.

Yupin Sanvarinta, Ph.D.

Supeenun Unchern Ph.D.

DATE OF GRADUATION 5 January, B.E. 2537 (1994).

ABSTRACT

Adrenergic-cholinergic interaction plays an important role in the control of cardiac functions in both normal and disease states. When both divisions of the autonomic nervous system are stimulated simultaneously, the cholinergic components predominate the adrenergic nervous system. This accentuated antagonism can be clearly demonstrated at the physiological level. In this thesis, the first attempt has been made to demonstrate this interaction at the receptor level by using radioligand binding studies and computer assisted weighted nonlinear least-square curve fitting analysis (LIGAND program).

By using [³H](-)DHA as a β-adrenergic radioligand, it was demonstrated that muscarinic cholinergic receptor agonist, pilocarpine (10⁻⁷-10⁻⁵ M) decreased the affinity of high affinity binding site for isoproterenol. There was no effect on antagonistic competition with propranolol. Gpp(NH)p (10⁻⁶-10⁻⁴ M) decreased the affinity of the β-adrenergic receptor for isoproterenol for both high and low affinity binding sites. The simultaneous incubation of pilocarpine and Gpp(NH)p resulted in a reversal in affinity for both high and low affinity binding sites similar to those obtained from the control curve. These results suggest that muscarinic cholinergic agonist can modulate β-adrenergic agonist affinity and that the Gpp(NH)p reduction of β-adrenergic agonist affinity may be reversed by muscarinic cholinergic occupancy. These data are the first study to support that modification of one type of receptor may influence the other one situated nearby.

By using [³H](-)QNB as a muscarinic cholinergic radioligand, isoproterenol (10⁻⁶-10⁻⁵ M) decreased the affinity of high affinity binding site for pilocarpine. Effect on antagonistic competition with atropine could not be demonstrated. Gpp(NH)p (10⁻⁶-10⁻⁴M) decreased the affinity of muscarinic receptor for pilocarpine for both high and low affinity binding sites. The

simultaneous incubation of isoproterenol and Gpp(NH)p resulted in a further decrease in affinity for both high and low affinity agonist sites. These results suggested that β -adrenergic and muscarinic cholinergic receptor in the heart have interdependent linkage and can modulate agonist binding affinity of each other.

Concanavalin A (Con A) was used as a probe to study this type of interaction at cell membrane level. Preincubation with Con A 0.5 μ g/ml for 30 min had no effect on [3 H](-)DHA and [3 H](-)QNB binding. It can be implied that amplification of agonist-stimulated cAMP generation by Con A is not due to an increase in agonist receptor coupling.

Islet-activating protein(IAP) was also used as a probe to explore whether this adrenergic-cholinergic interaction is related to cyclic nucleotide metabolism. In the presence of 10^{-4} M Gpp(NH)p, 10^{-5} M pilocarpine cannot reverse the effect of 10^{-4} M Gpp(NH)p. These results suggested that IAP exerts its effects on this interaction at GTP binding protein level by cancelling the effect of pilocarpine in reversing the guanine nucleotide induced decrease in affinity of β -adrenergic receptor for isoproterenol.

It can be concluded that the phenomenon of accentuated antagonism in the heart could be explained for the first time that binding affinity of adrenoceptor may be changed significantly when the cholinceptor situated nearby are simultaneously activated and this effect may be mediated via GTP binding protein.